

SERUM NEOPTERİN VE CRP DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

GÖRKEM UMUT

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Temmuz 2006

# SERUM NEOPTERİN VE CRP DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

GÖRKEM UMUT

Dumlupınar Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca  
Biyoloji Anabilim Dalında  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Mustafa YÖNTEM

Temmuz – 2006

**KABUL ve ONAY SAYFASI**

Görkem UMUT'un YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "SERUM NEOPTERİN VE CRP DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Üye	:	Prof. Dr. Ahmet ÖZATA
Üye	:	Yrd.Doç.Dr. Mustafa YÖNTEM
Üye	:	Yrd.Doç.Dr. Hülya ÖLÇER

Fen Bilimleri Enstitüsün Yönetim Kurulu'nun ...../...../..... gün ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. M. Sabri ÖZYURT  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## SERUM NEOPTERİN VE CRP DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

GÖRKEM UMUT

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 2006

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Mustafa YÖNTEM

### ÖZET

Neopterin (NP) düşük molekül ağırlıklı (253) 2-amino-4-hidroksi-(1',2',3'-trihidroksi propil) pterindir. NP INF- $\gamma$  ve az derecede diğer sitokinler, endotoksinler ve INF-  $\alpha$  tarafından GTP siklohidroksilaz-1 aracılığıyla monosit/makrofajlarda üretilir. Bu hücreler NP üretiminin en güçlü indükleyicileridir. NP konsantrasyonları vücut sıvılarında INF- $\gamma$  varlığını belirtir. Neredeyse tüm insan hücrelerinde GTP' den tetrahidrobiopterin (BH<sub>4</sub>) üretilir tek istisna, monosit ve makrofajlarda 6-pirovoil tetrahidropterin sentetazın eksikliğinde 7,8 dihidroneopterin trifosfatın hidroliz ve oksidasyonun bir sonucu olarak NP oluşur. Bu çalışmanın amacı hücrel imünite göstergesi olan neopterin düzeylerinin akut faz reaktanı olan C-Reaktif Protein (CRP) düzeyleri ile herhangi bir korelasyonunun olup olmadığını araştırmaktır.

Bu amaçla Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Biyokimya laboratuvarına gelen örneklerden seçilen 150 serum örneğinde neopterin ve CRP düzeylerine bakılmıştır. Neopterin düzeyleri HPLC cihazında floresans detektör kullanılarak, CRP düzeyleri ise immünoturbidometrik yöntem ile çalışılmıştır. Değişik CRP düzeyleri dikkate alınarak örnekler gruplanarak (0-5, 5-9, 10-29, 30-59, 60 ve üzeri mg/l) analiz edildi. Tüm örnek sonuçları değerlendirildiğinde, CRP düzeyleri ile neopterin düzeyi arasında anlamlı pozitif korelasyon ( $p<0.012$ ) tespit edildi. Bu korelasyonun değişik düzey CRP gruplarında farklı olduğu ve en yüksek neopterin düzeylerinin olduğu CRP grubunun 30-59 mg/l olan grup olduğu gözlemlendi.

Çalışma sonuçları ışığında, neopterin düzeylerinin genelde CRP düzeyleri ile korele olduğu ama bu korelasyonun CRP değer gruplarına göre farklı olduğu ve her gruba uygulanamayacağı gözlemlendi.

**Anahtar Kelimeler:** CRP, Neopterin.

## THE RESEARCH ON SERUM NEOPTERIN AND CRP LEVELS

Görkem UMUT

Department of Biology, M.S. Thesis, 2006

Thesis Supervisor: Yrd. Doç. Dr. Mustafa YÖNTEM

### SUMMARY

Neopterin (NP) is pterin that has low weighted molecule (253) 2-amino-4-hydroxy (1',2',3'-trihidroksi propil). NP is produced by INF- $\gamma$  and slight amount of other sythocins, endotoxin and INF- $\alpha$  by means of GTP syklohidrolase in monocyte/macrophage. These cells are the most influential stimulants of NP production. NP concentration indicates the presence of INF- $\gamma$  in the body fluids. In almost all of the human cells tetrahidrobioplerin (BH<sub>4</sub>) is produced from GTP. But the only exception is the occurrence of NP as a result of 7,8 dihidroneopterin trifosfat hidroxilase and oxidation in the monocyte and macrophage and in cessation, of deficiency in 6-pirovoil tetrahidropterin sentetase. The objective of this study is to investigate whether there is any correction with the C-Reactive Protein (CRP) levels which has acute phase reactor of the NP levels having the presence of cell immunity.

With the aim of this, NP and CRP levels are examined in the 150 serum species which were attained from Selcuk University Meram Clinical Medicine Faculty Biochemistry labratory and chosen. NP levels are examined by using fluorescent detector in the High Pressure Liquit Cromatography (HPLC) device and the CRP levels is examined with the method of immünoturbidometric. By considering various CRP levels, samples (0–5, 5–9, 10–29, 30–59, 60 and up mg/l) were analysed by grouping. When all of the results of the samples are evaluated, meaningful positive correlations has been detected between the NP and CRP levels. A distinct level of this correlation has been observed to be different in CRP groups and the highest point of NP level has been the 30–59 mg/l group in CRP.

In the light of the results of this study, it has been observed that the levels of NP is generading in correlation with CRP levels but this correlation has been different then other CRP groups and it can't be applied to all groups.

**Key Words:** CRP, Neopterin.

## TEŐEKKÜR

Bu tez alıőmasını yapmama vesile olan ve alıőmamın her basamağında yardımını ve bilgisini esirgemeyen danışman hocam Yrd. Do. Dr. Mustafa YÖNTEM'e, alıőmalar boyunca her konuda yol gösteren Seluk Üniversitesi Meram Tıp Fakóltesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. İdris MEHMETOđLU, Do. Dr. Ali ÜNLÜ, Dr. Recep GÖKE ile doktora öğrencisi Sedat ABUŐOđLU'na ve diğer tüm personele ayrıca her zaman bana destek olan aileme teőekkürü bir bor bilirim.

Görkem UMUT

## İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa</u></b>
KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
ÖZET.....	iv
SUMMARY .....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
TABLolar DİZİNİ .....	x
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ .....	1
2.GENEL BİLGİLER .....	2
2.1 İmmün Sistem .....	2
2.1.1. İmmün Sistemde Görevli Hücreler .....	2
2.1.1.1. Lenfositler .....	3
2.1.1.2. Monosit ve Makrofajlar .....	4
2.1.1.3. Antijen Sunucu Hücreler (APC) .....	5
2.1.2. Akut Faz Proteinleri .....	5
2.1.3. İnterferonlar .....	8
2.2. Pteridinler.....	9
2.2.1. Pteridinlerin Yapısı .....	9
2.2.1.1. Konjuge Pteridinler .....	10
2.2.1.2. Konjuge Olmayan Pteridinler .....	10
2.3. Neopterin.....	11
2.3.1. Neopterin Oluşumu .....	13
2.3.2. Tetrahidrobiopterin (BH <sub>4</sub> ) .....	15
2.3.3. Neopterin Vücuttaki Biyokimyasal ve Fizyolojik Rolü.....	15
2.3.4. Neopterin İmmünolojik Rolü .....	15
2.3.5. Vücut Sıvılarında Neopterin .....	16
2.3.5.1. Serumda Neopterin.....	16
2.3.5.2. İdrarda Neopterin .....	17
2.3.5.3. Beyin Omurilik Sıvısında (BOS) Neopterin .....	17

## İÇİNDEKİLER (devam)

	<b><u>Sayfa</u></b>
2.3.5.4. Diğer Biyolojik Sıvılarda Neopterin .....	18
2.3.6. NP ve SERBEST RADİKALLER .....	18
2.3.7. NP Ve Hematopoezis .....	18
2.3.8. NP ve Üveit .....	19
2.3.9. NP ve Multiple Skleroz (MS) .....	19
2.3.10. NP ve Malignant Hastalıklar .....	20
2.3.11. NP ve Otoimmün Hastalıklar .....	20
2.3.12. NP ve Renal Hastalıklar .....	20
2.3.13. NP ve Kardiyoloji .....	20
2.4. C-Reaktif Protein .....	21
2.4.1 CRP'nin Görevi.....	22
2.4.2.CRP'nin Klinik Önemi .....	22
3. MATERYAL VE METOD .....	23
3.1. Materyal .....	23
3.1.1. Kullanılan Cihaz Ve Kimyasal Maddeler .....	23
3.2. Metod .....	24
3.2.1. HPLC Sistemi ve Gerekli Donanımlar.....	24
3.2.2. Kullanılan Çözeltiler .....	26
3.2.3. Kromatografi .....	26
3.2.3.1 HPLC .....	27
3.3. Deneyin Yapılışı .....	30
4. SONUÇLAR .....	33
5. TARTIŞMA .....	36
KAYNAKLAR .....	39



**ŞEKİLLER DİZİNİ**

<b><u>Sekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
2.1. Pteridin ve Pterinlerin yapısı.....	9
2.2. Neopterinin kimyasal yapısı .....	12
2.3. İnsanda neopterin sentez basamakları .....	14
3.1. HPLC sistem şeması .....	25
3.2. HPLC .....	25
3.3. Neopterin standart grafiği .....	30
3.4. Randomik Kan Seçimi .....	31
3.5. Kanlara TCA katılması .....	31
3.6. Kanların santifrüjlenip süpernatant elde edilmesi .....	32
4.1. NP ile CRP grupları değerlerini gösteren şema .....	34
4.2. NP ve CRP arasında yaptığımız korelasyon değerlerimiz .....	35

**TABLULAR DİZİNİ**

<b><u>Tablo</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
2.1. İnsan dokularında ve vücut sıvılarında belirlenen pterinler .....	11
4.1. NP ve CRP düzeylerinin istatistiki sonuçları .....	33
4.2. CRP değerlerine göre oluşturduğumuz gruplarımızda NP düzeyleri .....	33
4.3. NP ve CRP düzeyleri arasındaki korelasyon.....	34

## KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltma</u>	<u>Anlamı</u>
APC	Antijen Sunucu Hücreler
BH <sub>4</sub>	Tetrahidrobiopterin
CRP	C-Reaktif Protein
ESR	Sedimantasyon Rate
GTP	Guanozintrifosfat
HOCl	Hipokloröz asit
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojenperoksit
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Ortofosforik asit
IFN	İnterferon
IL	İnterlökin
Ig	İmmunglobülin
K Hücreleri	Öldürücü Hücreler
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Potasyum dihidrojen fosfat
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dipotasyum hidrojen fosfat
MPO	Miyeloperoksidaz
NH <sub>2</sub> TP	Dihidroneopterintrifosfat
NP	Neopterin
PMNL	Polimorfonükleerasit
RES	Retiküloendotelyal Sistem
SAA	Serum amyloid A
sIL-R	Soluble İnterlökin Reseptörü
SP-MS	Sekonder Progressif Multiple Sikleroz

**KISALTMALAR DİZİNİ (devam)**

<b><u>Kısaltma</u></b>	<b><u>Anlamı</u></b>
sTNF-R	Soluble Tümör Nekroz Faktör Reseptörü
T-c Lenfosit	T Sitotoksik Lenfosit
TCGF	Tümör Hücresi Gelişme Faktörü
TD	T-Delayet Hypersensitivity
T-h Lenfosit	T Yardımcı Lenfosit
T-i Lenfosit	T Aktivatör Lenfosit
T-s Lenfosit	T Baskılayıcı Lenfosit

## 1. GİRİŞ

Neopterin, insan monosit ve makrofajlarından interferon-gamma aracılığıyla salınan, biyolojik fonksiyonu tam olarak anlaşılamamış, kendisine özgü bir reseptörü olmayan, pteridin türevi bir maddedir. Vücut sıvılarındaki neopterin (NP) düzeyi çeşitli enfeksiyonlar, sepsis, otoimmün hastalıklar, maliniteler, allograft rejeksiyon, sarkoidoz, tüberküloz, multiple sklerozun aktivasyonu, koroner arter hastalığı, miyokard enfarktüsü (MI), viral enfeksiyon, HIV enfeksiyonu, kanser, hepatit C, tüberküloz, çocukların merkezi sinir sistemi hastalıkları, böbrek, karaciğer, kalp, pankreas ve kemik iliği transplantlarının rejeksiyon derecesi gibi durumlarda artmaktadır.

C-Reaktif Protein  $\beta$ -globulin grubuna ait bir protein olup pentaksinler veya pretraksinler diye adlandırılan proteinlerin bir üst ailesi olarak sınıflandırılır. Globuler yapısına bakıldığında, birbirine nonkovalent olarak bağlı beş tane subunitten meydana gelmiş, elektron mikroskopunda disk şeklinde görülen, siklik, nonglikolize bir yapıdan oluşmuştur. CRP klasik bir akut faz reaktanı olup birçok patofizyolojik olayda artmaktadır.

CRP düzeyi bakteriyel ve viral enfeksiyonların ayırımında ve tedavinin takibinde kullanılan önemli bir analizdir. Ancak spesifikliğinin düşük olması nedeniyle gereksiz antibiyotik kullanımına neden olmaktadır. CRP analiziyle birlikte neopterin düzeylerinin de tayin edilmesiyle hastalığın viral ya da bakteriyel kaynaklı olup olmadığı kesinleştirilebilir. Bu sayede gereksiz antibiyotik kullanımının önüne geçilebileceği gibi hastalığın teşhis, tedavi ve tedavinin takibi daha uyumlu hale getirilebilir.

Bu çalışmamızda hücrel immünitinin de göstergesi olan NP düzeylerinin akut faz reaktanı CRP düzeyleri ile herhangi bir korelasyonunun olup olmadığı araştırılması amaçlanmıştır.

## **2.GENEL BİLGİLER**

### **2.1. İmmün Sistem**

Lenfoid organlar ve immün cevapta görevli olan hücrelerin tümüne immün sistem denir. Kemik iliği, dalak, karaciğer, kapsüllü ve kapsülsüz lenf düğümleri ile bu organlarda bulunan lenfositler, tek çekirdekli veya polimorf fagositer hücreler, bağ dokusu histiositleri, seröz sıvı ve alveol makrofajları, sinir sistemi mikrogliaları, langerhans ve kupffer hücrelerinden oluşan sisteme retiküloendotelial sistem (RES) ya da mononükleer fagositik sistem adı verilir [1, 2, 3, 4 ve 5].

İnsan organizmasında sürdürülen immün reaksiyonların amacı; yabancı organizmalardan (bakteri, virüs, mantar, parazit), organizmada mutasyonlar sonucu ortaya çıkan istenmeyen hücrelerden (kanser hücresi) ve mikroorganizmaların toksik etkilerinden korunmak şeklinde özetlenebilir. İmmün sistemin organları primer (timüs ve bursa fabrisius) ve sekonder (lenf nodülleri, dalak, bademcikler ve bağırsaklarla ilgili lenf dokuları) olmak üzere ikiye ayrılır [6].

#### **2.1.1. İmmün Sistemde Görevli Hücreler**

Omurgalıların immün sisteminde, kan ve dokularda bulunan üç ayrı hücre grubu görev yapmaktadır. Bunlar; lenfositler, monositler ve polimorfo nükleer granüositlerdir. Bu hücrelerin bir kısmı konağa giren antijen özelliğindeki molekülleri fagosite eder. Diğer bir kısmı ise antijenin uyarımıyla farklılaşarak onlara karşı immün cevap ürünleri çıkarmakta ve antijenleri yok etmektedir [3].

Kemik iliğinde yapılan hücrelerin lenfoid serisinden lenfositler, miyeloid serisinden ise fagositer hücreler gelişmektedir. Yerleşim bölgeleri ve fonksiyonlarına göre lenfositler üç büyük grupta toplanmaktadır. Bunlar; yüzeylerinde antijen tanıyan reseptörleri bulunan ve immün cevap ürünlerinin yapımından sorumlu olan T ve B lenfositler ile diğer matür hücrelerdir. T lenfositler timus kontrolünde olgunlaşırken B lenfositler ise fabrisius keseye eşdeğer organların kontrolünde olgunlaşmaktadır. B tipi lenfositlerin farklılaşmasıyla plazmositler gelişmektedir. T ve B lenfositlerin dışında bir üçüncü grup olan matür lenfositler, ne T ne de B veya null hücreleri olarak adlandırılan killer hücreleri (K), ile natural killer (NK) hücreleridir [2].

### 2.1.1.1. Lenfositler

Az miktarda sitoplazma ile çevrilmiş, içinde yuvarlak bir nükleus içeren ve aktif motilite gösteren hücreler olup fagositoz yaparlar. Membranda taşıdıkları reseptörler aracılığıyla genellikle antijenleri tanırlar. Lenfositler, primer veya merkez lenfoid organlarda oluştuktan sonra, bazıları kan sirkülasyonu yoluyla dalak, lenf düğümleri, tonsiller ve mukoza altı lenfoid dokular gibi sekonder lenfoid dokulara göç ederler. Uyarılan lenfositler blast şekline dönüşürler. Blast şekilleri 15–30 µm çapında, sitoplazması daha geniş, ribozom ve golgi cihazı gibi organelleri olan hücrelerdir. Lenfositler T lenfosit, B lenfosit, T-h lenfosit (T yardımcı) ve T-c (T sitotoksik) lenfositler olmak üzere dörde ayrılır. Lenfosit topluluğunda küçük, orta ve büyük lenfositler bulunur. Kemik iliği lenfoblastları, timus kontrolünde timusun korteks ve medullasında farklılaşarak T lenfositler şeklinde, fabrisius keseye eşdeğer organların kontrolünde farklılaşarak B lenfositler şeklinde olgunlaşmaktadır. Aktif T lenfositler ile plazmositler efektör hücrelerdir. Timüs bezi retiküler yapıya sahiptir. Timüs bezi yokluğunda T lenfositleri oluşmaz ve ağır immün yetmezlik belirtileri ortaya çıkar. Bursa fabrisius insanlarda yoktur ve bu organın insanlardaki karşılığı olarak fetüste karaciğer, erişkinlerde ise kemik iliğidir [6].

T lenfositleri; plazmositlerden immünglobülin salgılanmasını düzenlemek, gecikmiş tipteki aşırı duyarlılık reaksiyonlarına aracılık etmek, virüslerle infekte olmuş hücreleri yok etmek, yabancı dokuları ortadan kaldırmak gibi önemli reaksiyonlardan sorumludurlar. T lenfositleri  $\gamma$  interferon ( $\gamma$  IFN) salınarak aktifleşirler. İmmün sistemde yaptıkları görevler bakımından T lenfositleri düzenleyici T lenfositler ve eylemci T lenfositleri olmak üzere ikiye ayrılır [4, 6 ve 7].

Düzenleyici T lenfositlerinden bir kısmı aktivatör, diğer bir kısmı ise baskılayıcı etki göstererek immün cevabı kontrol ederler. Yardımcı T lenfositler (T helper, T-h) ile indükleyici T lenfositleri (T inducer, T-i) aktivatör, baskılayıcı T lenfositler (T supressor, Ts) ise Th ve B lenfositlerin fonksiyonlarını frenleyen lenfositlerdir [4]. Düzenleyici T lenfositlerinin kendileri antikor oluşturmazlar. T-h lenfositlerin görevi timüse bağımlı antijenlerin uyarımı karşısında B lenfositlerine yardım ederek onların plazma hücrelerine dönüşmesine ve antikor oluşturmalarına yardımcı olmak, T-c ve T-s lenfositler üzerinde uyarıcı etki yapmaktır. T-i lenfositleri ise bütün T lenfosit çeşitlerinin olgunlaşmalarında etkili rol oynamaktadır. T-s lenfositleri immün cevap

sırasında hem B hem de T lenfositlerinin üzerine baskılayıcı etki yaparak immün cevap mekanizmasını düzenlerler [3 ve 5].

Eylemci lenfositler hücrel bağışık cevapta doğrudan kendilerinin yer almaları ya da salgıladıkları lenfokin adı verilen maddelerin aracılığı ile etkili olan lenfositlerdir. Bunlardan T-c lenfositleri vücut savunmasında doğrudan yer alan tek lenfosit çeşididir. Etkileri sonucunda içlerinde mikroorganizma taşıyan hücreler, yabancı canlı hücreler ve tümör hücreleri öldürülür. Eylemci T lenfositleri içinde geç tip aşırı duyarlılıkta rol oynayan ve TD (T- Delayet Hypersnsivity) diye simgelenen bir diğer eylemci T lenfosit çeşidi daha vardır [4, 5 ve 6].

B lenfositleri ise kemik iliğindeki kök hücrelerden kaynaklanan bir kısım hücrelerin timüse uğramadan gelişimlerini tamamlayıp oluşurlar. En önemli özellikleri üzerlerinde çok sayıda immünglobülin (özellikle IgM) molekülleri taşımalarıdır. Bundan dolayı yüzeyleri T lenfositlerinin tersine düzgün değil pürüzlüdür. Ayrıca insan ve fare lenfoid hücreleri arasında yabancı hücrelere karşı sitotoksik etkinlik göstererek onları eritip öldüren ve özellikleri T-c lenfositlerinden farklı olarak K hücreleri ile NK hücreleri vardır [3, 4, 5 ve 6].

#### **2.1.1.2. Monosit ve Makrofajlar**

Monositler, kemik iliğinde yapıлып dolaşımında 1-3 gün kaldıktan sonra dokulara göç ederek burada doku makrofajı haline dönüşürler. Çapları 80  $\mu$ 'a kadar ulaşır. Monositler periferik kanda; makrofajlar ise bağ dokusu, karaciğer, akciğer, sinir sistemi, seröz boşluklar, lenfoid organlar, kemik ve eklemlerde bulunmaktadır. İmmün cevapta, monosit ve makrofajların önemli görevleri vardır. Bunlar 0,1 $\mu$ 'dan büyük molekülleri fagositoz yoluyla hücre içine alarak sindirme özelliklerine sahiptirler [5]. Makrofajlar yerleştikleri dokulara göre örneğin akciğerlerde dendritik makrofajlar, deri altı bağ dokusunda histiyositler, beyin, kupffer hücreleri, dalakta osteoklastlar, eklemlerde A ve M hücreleri gibi isimler alırlar. Makrofajlar ayrıca 50'ye yakın madde (monokinler, sitotoksik faktörler, sindirim enzimleri, prostaglandinler...) salgırlar [4, 5, 6 ve 7].

#### **2.1.1.3. Antijen Sunucu Hücreler (APC)**

Antijen sunucu hücreler (Antigen Presenting Cell/s, APC); langerhans hücreleri, B lenfositler, monositler ve makrofajlar ile retiküler dentritik hücrelerinden oluşan immüno-stimülâtör kapasiteli heterojen bir gruptur. Kemik iliğinde yapılan bu hücreler deri, lenf düğümleri, dalak ve timusta bulunmaktadır. Bazıları yardımcı T lenfositlere antijeni sunarken, bazıları diğer lökositlerle ilişki kurarlar [3].



### 2.1.2. Akut Faz Proteinleri

Plazma proteinlerinden bazılarının akut faz reaktanı olarak tanımlandığı bilinmektedir. Kushner tarafından akut faz cevabı, stres ya da bir travmanın olumsuz etkilerine karşı organizmayı hazırlıklı hale getirmek amacıyla oluşan bir dizi reaksiyonlar olarak tanımlanmıştır [8 ve 9]. Bu reaksiyonlar ateş, lökositoz, karaciğer tarafından çinko, bakır, demir gibi bazı metal ve aminoasitlerin artmış alınımı (tutulumu), steroid ve hormonları ile bazı plazma proteinlerinin sentez ve katabolizmasındaki artma ya da azalmalar, vazoaktif aminler ve araşidonik asit yolunun uyarılmasıyla damar geçirgenliğinde artma, lipid metabolizmasındaki oynamalar, negatif azot dengesi gibi değişiklikleri kapsar. Buradan da anlaşıldığı gibi birkaç akut faz proteininin plazma konsantrasyonundaki değişiklik, akut faz cevabı boyunca meydana gelen kompleks fizyolojik reaksiyonların sadece bir kısmıdır [8, 9 ve 10].

Akut faz cevabı ile beraber görülen diğer değişiklikler, immün cevabın ve RES fonksiyonlarının baskılanmasına bağlıdır. Glikoprotein yapısında olan akut faz proteinleri akut enflamasyon sonrasında serumun heksoz içeriğinin artışı ile tanınmışlardır. Doku hasarının bulunduğu bölgeden salınan medyatorlere cevap olarak sentezlendikleri düşünülen bu proteinlerin serumdaki dönüşümleri hızlıdır. Bu proteinlerin düzeylerinin yükselmesinden önceki döneme lag fazı adı verilmektedir. Doku hasarına verilen cevabın şiddeti ve zaman içinde gösterdiği değişiklikler açısından birbirlerinden farklı olan akut faz proteinleri, çeşitli durumlara göre değişen bir lag fazı ile yükselmektedir. Lag fazı esnasında alınan serumun hayvanlarda veya organ kültürlerinde akut faz proteinlerini uyarma yeteneğini aktarabildiği gösterilmiştir. Bu ise, uyarıcı faktörlerin bulunduğu bir kanıttır. Bu faktörlerde ilerde hakkında bilgi verilecek olan bazı sitokinlerdir. Kronik iltihap durumları dışında geçici olan akut faz cevabının duraklamasına yol açan faktörler ile ilgili anlaşılır şekilde fazla bilgi mevcut değildir [8 ve 11].

Organizma tarafından verilen bu akut faz cevabı romatoid artrit gibi konnektif doku hastalıkları, mikrobik enfeksiyonlar, miyokard iskemisi ve malignansiye de içeren geniş bir hastalık grubunda gözlenir [8 ve 12]. Bu proteinlerin esas sentez yeri olan karaciğerden başka (ekstrahepatik) sentez yerlerinin de olduğu ve bunun da doku travması veya enflamasyona karşı cevapta önemli bir faktör olduğu unutulmamalıdır. Son zamanlarda akut faz proteinlerinin sentez ve katabolizmasının düzenlenmesinde rol alan bazı polipeptitler örneğin interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6), interlökin-11 (IL-11), Tümör Nekroz Faktör (TNF), lökemia inhibitör faktör, oncostatin M gibi bulunmuş ve tarif edilmişlerdir. IL-6 daha çok hepatik akut faz cevabında etkili olurken, IL-1 ve TNF ekstrahepatik bulgularda daha etkindir [8, 13 ve 14].

IL-1, aktive edilmiş monosit ve makrofajlarca üretilir. IL-1'in akut faz proteinleriyle ilgili birçok gene etkili olduğu gösterilmiştir. Daha önce murin hepatosit kültürlerinde faktör B ve serum amyloid A (SAA)'nın sentezini artırırken, aynı zamanda albumin sentezini azalttığı ortaya konmuştur. Bu cevapların özgüllüğü, IL-1'in spesifik antikorlarla muamele edilerek inhibe edilmesiyle ortaya çıkarılmıştır. IL-1'in IL-1  $\alpha$  ve IL-1  $\beta$  olarak adlandırılan iki tane farklı formu vardır. Her ikisi de, molekül ağırlığı 31.000 olan prekürsör moleküllerden oluşan ve 15.000-17.000 arası moleküler ağırlığa sahip polipeptitlerdir. Son çalışmalar IL-1 için sekreteruar yolun, makrofajlarda lizozomal veziküller olduğunu desteklemektedir. Çalışmalar, IL-1'in hedef seçme mekanizmasıyla ilgili elde edilen bilgilerin daha çok subsellüler organeller olduğu yönündedir [8].

Membrana bağlı IL-1'in, konak oluşmasında, lokal doku homeostatik mekanizmalarının değiştirilmesinde önemli olduğu görüşü hakimdir. Makrofajlar yalnızca intertisiyel aralığa özellikle de dolaşıma IL-1'i yalnızca salgılamakla kalmaz, hücre yüzeyinde IL-1 aktivitesinin ortaya konulmasında da etkilidir. Membrana bağlı IL-1'in enflamasyona sekonder olarak ekstrahepatik dokularda önemli fonksiyonu olabilir. Çünkü birçok akut faz proteininin sentezi önceden bilindiği gibi karaciğer dışı dokularda da olmaktadır [15]. Ratlarda karşılaştırmalı yapılan bir çalışmada, IL-1'in subkutanöz olarak verilmesi, periferik ya da intraserebroventriküler verilmesine oranla daha fazla lenfosit üretimi, akut faz reaktanlarında yükselmeye birlikte serum demiri ve albuminde düşmeye sebep olduğu belirtilmiştir [16].

IL-2, aktif T lenfositleri ve timositler, özellikle Th-1 lenfositler tarafından salınan IL-2, T ve B lenfositlerini uyarmaktadır. T Lenfosit çoğalmasını indüklemesi nedeniyle T hücresi gelişme faktörü (T Cell Growth Factor, TCGF) de denilmektedir. Bu moleküller T ve B lenfositler ile monositlerin reseptörleriyle birleşmektedir. Monositler ile NK hücrelerin aktivasyonunu, T ve B lenfositlerin bölünmelerinin hızlanmalarını ve lenfositlerden INF salınımını sağlamaktadır [4].

TNF, protein metabolizması üzerine olan etkisinden dolayı kaşeksin diye adlandırılmasının yanı sıra akut faz reaksiyonu sinyallerinin iletilmesini de içeren bir düzenleyicidir. Molekül ağırlığı 17.500 olup, lipopolisakkaritlerce stimule edilen makrofajlardan salınan bir polipeptittir. TNF, IL-1 ile yapı olarak farklı iki düzenleyici olmasına rağmen, fonksiyonel olarak birkaç ortak noktaları vardır. Her iki düzenleyici de ateşe sebep olabilir, prostoglandin sentezini stimule eder, kollajenaz sentezini artırır ve her biri farklı bir hücre yüzey reseptörüyle etkileşmesine rağmen tümör hücresi bölünme hızını yavaşlatır. TNF'nin, romatoid artritli sinovyal membranda lokal olarak da üretildiği gösterilmiştir. Diğer

yandan IFN  $\gamma$ 'nın akut faz proteinleri üretimindeki direkt etkileri yanında, bu protein IL-1 ve TNF gibi makrofaj ürünlerini düzenleyen sitokinler aracılığıyla da yine akut faz cevabında etkili olurlar [15].

Enflamatuvar cevapta yer alan bir diğer önemli bileşik sınıfı ise araşidonik asit oksidasyonu ile oluşan kimyasal türler ki prostaglandinler ve lökotrienlerdir. Prostaglandinlerin seruloplazmin ve haptoglobinin üzerine olan etkisi, bir prostaglandin inhibitörü olan indometazinin plazma protein konsantrasyonlarındaki değişiklikleri inhibe etmesiyle gösterilmiştir. Akut faz reaktanları enflamasyonlu veya enfeksiyonlu dokunun tamiri boyunca çeşitli fonksiyonel roller üstlenirler [15]. Akut faz cevabının bir göstergesi olarak sedimantasyon rate (ESR) sık kullanılmasına rağmen (klinik uygulamada basit, maliyeti ucuz ve komplike cihaz gerektirmeyişine), akut faz proteinlerine nazaran daha az güvenilirdir. Çünkü ESR hastalıklar dışında pek çok faktörden etkilenmektedir [14].

Doku hasarıyla birlikte, karaciğerde bazı proteinlerin üretimi artarken (pozitif akut faz reaktanı), diğer bazı proteinlerin ise (normalde sağlıklı durumda düzeyine göre) üretimi baskılanır (negatif akut faz reaktanı). Negatif akut faz reaktanları arasında prealbumin, albumin, transferin,  $\alpha_2$  glikoprotein girerken diğerleri pozitif akut faz reaktanları olarak kabul edilir [17, 18 ve 19].

Bir enflamatuvar stimulus karşısında artan serum proteinleri düzeyleri;

- Normal düzeyinin 1–1,5 katı kadar artanlar, seruloplazmin (geç akut faz reaktanı),  $C_3$ ,  $C_4$  gibi.
- Normal düzeyinin 2–4 katı kadar artanlar,  $\alpha_1$ -asitglikoprotein,  $\alpha_1$ -antitripsin,  $\alpha_1$ -antikimotripsin, haptoglobin ve fibrinojen gibi.
- Normal düzeyinin 100–1000 katı kadar artanlar, CRP ve serum amiloid A proteini gibi [20].

Enflamasyonun akut dönemlerinde artış gösteren bu proteinlerin konsantrasyonlarındaki artış oranları ve zamanları birbirinden farklıdır. Böyle bir durumda sırası ile ilk önce CRP ve  $\alpha_1$ -antikimotripsin, haptoglobin,  $C_4$ , fibrinojen en sonra da  $C_3$  ve seruloplazminin serum seviyeleri yükselir [17].

### 2.1.3. İnterferonlar

İnterferonlar ilk kez 1957 yılında yapılan antiviral deneylerde keşfedilmiştir. İzole edildikleri yerden dolayı interferon adı verilmiştir. İnterferonlar buldukları organ ve hücrelere

göre; lökosit INF, fibroblast INF ve immün INF olmak üzere üçe ayrılır. İnterferonlar doğal proteinler, glikoproteinler ve peptitlerden sentezlenirler. Ayrıca hücre içinden makrofajlar, monositler, T lenfositler, glia ve nöronlardan üretilir [21].

İnterferonlar, bir virus yapım önleyicisi olan ve antikorlarla nötralize edilmeyen proteinlerdir. İnterferon yapımı, hücrenin yabancı nükleik asit alış verişine karşı silahlanma olayıdır. Üç tip interferon tanımlanmıştır. Lökositler tarafından salınan 18–20 kD molekül ağırlığında interferon alfa (INF- $\alpha$ ), fibroblastlar tarafından salgılanan 23 kD molekül ağırlığında interferon beta ya da interferon tip 1, T lenfositleri tarafından yapılan 20–25 kD molekül ağırlığında olan interferon gamma (INF- $\gamma$ ) veya tip II interferondur. Tip II yani IFN- $\gamma$  interferonlar, immün interferon olup makrofajları, NK hücreleri, Tc ve B lenfositleri aktive eden immünomodülatörlerdir [5].

İnterferon- $\alpha$ , protein bağışıklık modülü antiproliferatif ve antiviral özelliktedir. İnterferon- $\alpha$  bağışıklık sistemini dengelemede naturel killer hücreler ile birlikte önemli rol oynar. Silli lökim hücreleri, AIDS kaposisi, sarkoma, genital siğiller, kronik hepatit B ve C tedavisinde kullanılır. İnterferon- $\beta$ , düzenli bir bağışıklık sitokinidir. Önemli bir antiviral stokin olup natural killer hücrelerinden stimüle edilen bir üründür. İnterferon- $\gamma$  ise supernatant insan lenfositleri ile mitojen stimüle olup antiviral bir aktivite de INF- $\alpha$  dan birkaç yıl sonra bulunmuştur. Moleküler yapısı bulunan ilk yapı INF- $\gamma$  dir [1, 2, 3, 4, 5 ve 6].

## 2.2. Pteridinler

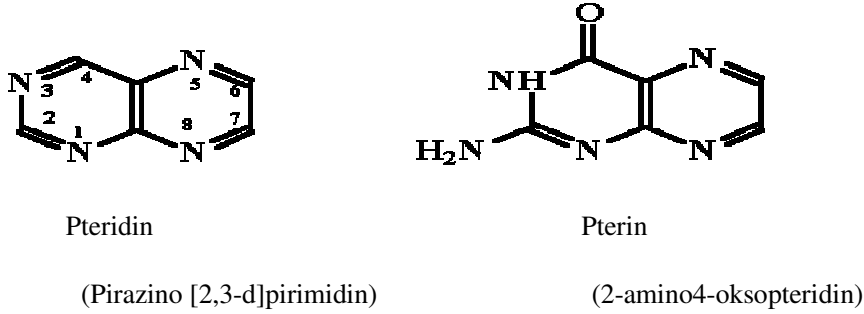
1889' da ilk kez biyolojik bir materyalden izole edilmiştir. Önce böcek ve aşağı omurgalıların pigmenti olarak tanımlanmıştır [22]. Pteridinlere karşı ilgi aşağıdaki üç önemli bulguyla artmıştır;

1. Tetrahidrobiopterin (BH<sub>4</sub>), aromatik hidroksilazların kofaktörü olduğunun anlaşılması,
2. BH<sub>4</sub> metabolizmadaki konjental bozuklukların hiperfenilalaninemiye yol açabileceğinin saptanması,
3. Malignensili ve enfeksiyonal hastalığı olan bireylerde, idrar pteridinlerdeki (özellikle neopterin) değişikliğinin bulunması [23].

### 2.2.1. Pteridinlerin Yapısı

Pterinler, pteridin olarak bilinen bileşiklerin bir grubudur. Pteridinler, pirazino [2,3,d] primidin yapısındadırlar. Pteridin halkasının ikincil konumunda amino dördüncü konumunda

okso grubu bulunduğu yapı pterin adını almaktadır [24]. Pterin ve pteridinlerin kimyasal yapıları Şekil 2.1 de görülmektedir.



**Şekil 2.1.** Pteridin ve Pterinlerin yapısı

Pteridinler, altıncı karbon atomundaki yan zincir ve oksidasyon durumuna göre;

- Tetrahidro formu
- Dihidro formu
- Okside formu olarak üç gruba ayrılmaktadır [24].

Ayrıca; konjuge pteridinler ve konjuge olmayan pteridinler olmak üzere de iki gruba ayrılırlar.

#### **2.2.1.1. Konjuge Pteridinler**

Bunlar p-amino benzoil glutamatlara bağlanmış folatlar olarak bilinir. Bunlar tiyamin sentezi, aminoasit metabolizması, pürin ve pirimidin sentezinde tek karbon atomu transferi reaksiyonlarında kofaktör olarak önemli rol oynamaktadırlar [24].

#### **2.2.1.2. Konjuge Olmayan Pteridinler**

Pteridin molekülünün altıncı konumundaki karbon, basit bir hidroksil alkil grubu içermektedir. İnsan doku ve vücut sıvılarındaki pterinler tablo 2.1. de görülmektedir [23].

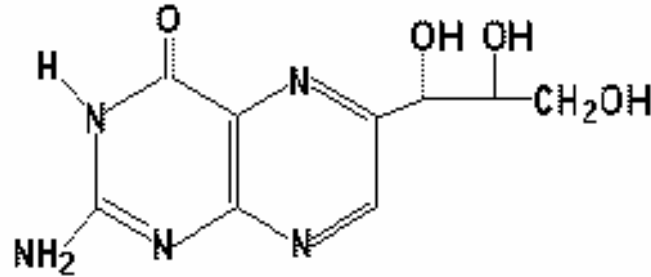
**Tablo 2.1.** İnsan dokularında ve vücut sıvılarında belirlenen pterinler

<b>Bileşik</b>	<b>Yan zincir</b>
Biopterin	C-6-CHOH-CHOH-CH <sub>3</sub>
7,8-Dihidrobiopterin	C-6-CHOH-CHOH-CH <sub>3</sub>
Tetrahidrobiopterin (BH <sub>4</sub> )	C-6-CHOH-CHOH-CH <sub>3</sub>
Neopterin	C-6-CHOH-CHOH-CH <sub>2</sub> OH
7,8-Dihidroneopterin	C-6-CHOH-CHOH-CH <sub>2</sub> OH
Sepiapterin	C-6-CHOH-CHOH-CH <sub>3</sub>
İzosepiapterin	C-7-CHOH-CHOH-CH <sub>3</sub>
Ksantopterin	C-6-OH
İzoksantopterin	C-7-OH
6-Karboksipterin	C-6-COOH

### 2.3. Neopterin (NP)

Neopterin (NP) ilk olarak 1963 yılında, arıların larvalarında bulunmuştur. İnsanlarda ise idrarda NP varlığı 1967 yılında gösterilmiştir [23 ve 27].

Yapılan bazı çalışmalar sonucunda gama interferonun (INF- $\gamma$ ) insan makrofajlarında in vitro olarak büyük miktarda NP üretimine ve salınımına yol açtığı bildirilirken diğer interferonların daha az ve diğer sitokinli stimülasyonların in vitro olarak NP salınımına neden olmadıkları gözlenmiştir [7 ve 25]. Şekil 2.2.de NP'nin kimyasal yapısı görülmektedir.



Şekil 2.2. Neopterinin kimyasal yapısı [Fuchs]

$\alpha$  Tümör Nekroz Faktörünün ( $\alpha$  -TNF), INF- $\gamma$  gibi etkiye sahip olmadığı, ama INF- $\gamma$  tarafından salınan NP oluşumuna sinerjik amplifiye ettiği bildirilmiştir. Daha sonraları çok sayıda klinik ve deneysel çalışmalar, klinik tıpta NP'nin potansiyel değerini araştırmaya rehberlik etmiştir. Günümüze kadar NP biyosentezinin, hücrel immün sistem aktivasyonu ile yakından ilişkili olduğunu gösteren destekleyici in vitro ve in vivo olarak çeşitli araştırmalar yapılmıştır. İnsanda temel NP kaynağı monosit/makrofajlardır. Ayrıca mikroglia hücreleri ve santral sinir sisteminden de NP salgılanır [26, 27 ve 28].

Neopterin, insan monosit ve makrofajlarından interferon-gamma aracılığıyla salınan, biyolojik fonksiyonu tam olarak anlayamamış, kendisine özgü bir reseptörü olmayan, pteridin türevi bir maddedir [7, 28, 29 ve 35]. Vücut sıvılarındaki NP düzeyi çeşitli enfeksiyonlar, sepsis, otoimmün hastalıklar, maliniteler, allograft reddi, sarkoidoz, tüberküloz, multipl sklerozun aktivasyonu, koroner arter hastalığı, miyokard enfarktüsü, viral enfeksiyon, HIV enfeksiyonu, prostat kanseri, hepatosellüler kanser, gastrointestinal kanser, akciğer kanseri, SARS, hepatit C, tüberküloz, çocukların merkezi sinir sistemi hastalıkları, böbrek, karaciğer, kalp, pankreas ve kemik iliği transplantlarının rejeksiyon derecesi gibi durumlarda artmaktadır. NP, günümüzde hücrel bağışıklık sisteminin aktivasyonunun biyokimyasal bir göstergesi olarak kabul edilmektedir [7, 22, 26, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 ve 50].

Aktif durumdaki yardımcı-T lenfosit hücrelerinden salınan interferon- $\gamma$ , makrofajların NP üretip, vücut sıvılarına bırakmalarına yol açmaktadır. NP konsantrasyonu ile bu hücrelerin hidrojen peroksit üretimi arasında da yakın ilişki bulunmaktadır [7]. Böylece NP seviyesi ile bağışıklık sisteminin aktivasyonu sonucu oluşan oksidatif stres değerlendirilebilmektedir. NP seviyesinin T-hücre proliferasyonundan 3 gün, antikor üretiminden de 1 hafta önce yükseldiği bilinmektedir. NP bu özellikleri nedeniyle, hem hücrel bağışıklık yanıtının

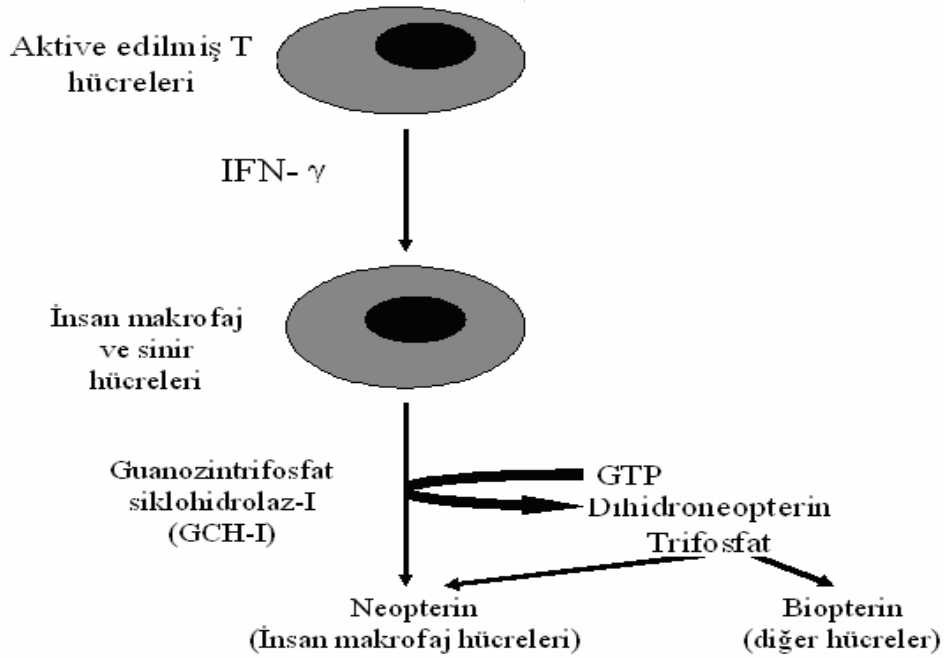
değerlendirilmesine yardımcı olmakta, hem de bağışıklık sistemi ile ilişkili olan hastalıkların tanı ve takibinde kullanılabilir [35]. Günümüzde NP ölçümü için çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Bunlar, ELISA, RIA ve HPLC olarak söylenebilir [7, 30, 32, 35, 38, 41, 43, 44, 46, 47 ve 48]. Pratik ve duyarlı olması nedeniyle NP ölçülmesinin flöresan dedektörlü, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi tercih edilmektedir [25, 31, 35, 45, 48 ve 49].

NP vücutta serum, beyin omurilik sıvısı, sinoviyal sıvı, idrar, pankreatik sıvı, semen ve tükürükte tespit edilmiştir [29, 35, 50 ve 51]. Bunlarla birlikte rat ve insan gözünde iris, lens, silier cisim ve retinada da salgılandığı gösterilmiştir [51]. Damar dışına çıkmadığından ve böbreklerden değişime uğramadan atıldığından dolayı, idrar NP seviyesi ile dolaylı olarak İnterferon- $\gamma$  seviyesi değerlendirilebilmektedir [22, 35 ve 52]. NP düzeyleri gebelik süresi ile artar ve son üçüncü üç aylık dönemde pik yapar [22 ve 53]. Yeni doğanlarda NP konsantrasyonları, maternal düzeylerden üç kat daha yüksektir. Çünkü gebelik boyunca monosit/makrofaj aktivasyonunda bir artış belirir.

### 2.3.1. Neopterin Oluşumu

NP sentezinde görev yapan siklohidrolaz-1 enziminin aktivitesi büyük oranda IFN- $\gamma$  az derecede diğer sitokinler, endotoksinler ve IFN- $\alpha$  tarafından düzenlenir. Sentez sırasında ara ürün olarak da dihidroneopterin trifosfat (NH<sub>2</sub>TP) ortaya çıkar [29]. NP prizino-primidin bileşiği olup düşük molekül ağırlıklı 2-amino-4 hidroksipterindir. NP guanozintrifosfat siklohidrolaz-1 vasıtasıyla GTP' den aktive olmuş monosit/makrofajdan üretilir. IFN- $\gamma$ , aktif-helper – T lenfosit tip-1 (Th-1) hücreleri tarafından salgınır [7, 29, 34, 35 ve 44]. Bu hücreler NP üretiminin en güçlü indükleyicileridir. NP konsantrasyonları vücut sıvılarında INF- $\gamma$  varlığını belirtir. Neredeyse tüm insan hücrelerinde GTP' den BH<sub>4</sub> üretilirken, monosit ve makrofajlarda 6-pirovoil tetrahidropterin sentetazın eksikliğinde 7,8 dihidroneopterin trifosfatın hidroliz ve oksidasyonun bir sonucu olarak da NP oluşur [25 ve 52]. Makrofajlarda diğer pteridinlerin sentezi için gerekli enzimler bulunmamaktadır. Neopterin makrofajlarda sentezini takiben plazmaya geçmektedir [7]. İnsanlarda neopterin sentezi şekil 2.2 de görülmektedir.





Şekil 2.3. İnsanda neopterin sentez basamakları [Fuchs'tan değiştirilerek]

### 2.3.2. Tetrahidrobiopterin (BH<sub>4</sub>)

BH<sub>4</sub>, GTP-siklohidrolaz-1 enzimin inhibitörüdür. BH<sub>4</sub>; memelilerde aromatik amino asit monooksijenaz, eter-lipidlerin oksidatif temizleyicisi ve NO sentetaz enziminin kofaktörü olarak fonksiyon görür. Triptofan, fenilalanin ve trozin hidroksilasyonunu yapan amino asit monooksijenazlar dopamin, norepinefrin ve serotonin gibi nörotransmitterlerin biyosentezini düzenler. BH<sub>4</sub> biyosentezi ve tekrar oluşumundaki bir engel fenil alanin birikimine ve nörotransmitter oluşumun azalmasına yol açar. Bu da nörolojik hastalıkla sonuçlanır [25 ve 53].

### 2.3.3. Neopterinin Vücuttaki Biyokimyasal ve Fizyolojik Rolü

Vücuttaki biyokimyasal ve fizyolojik rolü henüz tam olarak açıklanamamıştır. Sitokinler tarafından stimüle olan makrofajlar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, süperoksit, hidroksil radikalleri, reaktif oksijen metabolitleri ve diğer metabolitleri üretirler. NP radikal temizleyicisi değildir, ancak süperoxid serbest radikallerinin kaynaklayıcısı olan ksantin oksidazın non-kompetatif inhibitörü olarak davranır. Diğer taraftan NP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve kloraminin toksik etkilerini artırır [23 ve 52].

### 2.3.4. Neopterinin İmmünolojik Rolü

Molekülleri tanıma yeteneğinde olan canlının immün sistemi, patojenlere karşı sistemin oluşturduğu bütün reaksiyonlardır. Konak organizmaya giren yabancı patojenler, antijen sunucu hücreler (antigen presenting cells, APC) tarafından karşılanmakta ve T/B lenfositlere sunulmaktadır. Timusa bağımlı antijenler ile karşılaşan APC hücreleri, antijeni Th (T helper) lenfositlere sunarken, IL-1 salarak da bu lenfositlerin çoğalmalarına ve lenfokin salgılamalarına yol açmaktadır. Timusa bağımsız antijenler doğrudan B lenfositlere sunulmaktadır. APC tarafından uyarılan Th lenfokinler, T/B lenfositleri farklılaştırmakta ve immün cevap ürünlerinin açığa çıkmasını sağlamaktadır [3 ve 4].

Neopterin düzeyinin ölçülmesi, hücresele immün aktivasyonunu belirlemek için kullanılır. Çeşitli hastalıklarda NP konsantrasyonları tesbit edilmiş ve sTNF-R (soluble tümör nekroz faktör reseptörü), sIL-R (soluble interleukin reseptörü) ve IFN- $\gamma$  gibi diğer sitokin immün aktivasyon belirteçlerinin konsantrasyonlarıyla korelasyon olduğu bulunmuştur [29]. Malign hastalıklı ve viral enfeksiyonlu hastaların vücut sıvılarında artmış NP konsantrasyonları bulunması, immün sistem bağlantılı pteridin sentezini incelemeye başlanmasına yol açmıştır. Periferik kan hücrelerinin kullanılması ile aktive olmuş T lenfositlerden türetilen INF- $\gamma$  situmulasyonu ile makrofajlardan NP sentezi olduğu gözlenmiştir [54]. Ancak benign tümörlerdeki çalışmalarda normal NP düzeyleri bulunmuştur. Bu durum NP yüksekliğinin kaynak olarak malign hücreler veya virüslerle enfekte hücrelerden ziyade konakçının cevabı ile ilişkili olduğu görüşünü ortaya koymuştur [55].

NP düzeyi, hücresele immün sistemin aktivasyonunu belirlemek için kullanılabilir. Hücresele immün sistem, özellikle viral enfeksiyonlar, otoimmün hastalıklar, diğer inflamatuvar hastalıklar, trasplant reddi ve kanser gibi yaygın bir hastalık türünün sebebi ve gelişiminde merkezi bir faktördür. Son çalışma bulguları, redoks duyarlı metabolik yollarda NP türevlerinin muhtemel bir etkisini göstermiştir. Bu nedenle NP miktarlarında, hücresele immün cevap sırasında artış görülür. Yine NP oksidatif stresin önemli bir belirteçidir [56].

### 2.3.5. Vücut Sıvılarında Neopterin

NP vücut sıvılarında stabil olup immün cevap süresince tespit edilebilir. Bundan dolayı NP seviyelerini ölçmek zor değildir. NP düşük molekül ağırlığından dolayı başlangıçtaki yapısı değişmeksizin böbreklerden atılır. NP kleransı inülin kleransından daha yüksektir. Çünkü NP glomerüler filtrasyon yanında tübüler sekresyonla da böbreklerden atılır [52].

Serum NP konsantrasyonlardaki değişiklikler idrar NP konsantrasyonlarında paralel bir değişikliğe neden olur. İdrar NP ve serum NP düzeyleri arasında pozitif bir korelasyon gözlenmiştir. NP ışığa ve yüksek sıcaklığa duyarlı olduğundan saklama ve taşınma esnasında direkt güneş ışığından korunmalıdır. Ayrıca tekrar çözme dondurma durumlarında mevcut NP miktarlarında azalma görülmüştür. NP nin; serum, BOS, sinoviyal sıvı, idrar, pankreatik sıvı ve plazma gibi çeşitli vücut sıvılarında ölçümü yapılabilir [52].

### **2.3.5.1. Serumda Neopterin**

Sağlıklı erişkin bireylerde serum NP düzeylerinin üst limiti 10 nmol/l olarak kabul edilmektedir. Serum NP konsantrasyonları, yaşlı ve çocuklarda daha yüksek olmakla beraber cinsiyete bağlı olmadığı bildirilmiştir [22].

Fetal serum NP düzeyleri gebelik yaşı ile birlikte artmakta ve son trimesterde ise pik yapmaktadır. Yeni doğanlarda serum NP düzeylerinin, maternal serum düzeylerinden üç kat daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Çünkü gebelik boyunca monosit/makrofaj aktivasyonunda artış olur. Fetal ve maternal serum NP düzeylerinde önemli bir korelasyon gözlenmemiştir. Normal gebelikte maternal serum NP düzeyinde çok az bir artış olmakta fakat bu artış fetal değerlere ulaşamayacak kadar azdır. Çünkü fetal kompartman maternal metabolizmasından izoledir. Maternal serum NP düzeyleri 6–12 ay sonra normal değerlere döner [22].

Alınan venöz kan örneklerinden plazma veya serum ayırımı esnasında NP kaybı olmadığı tahmin edilmektedir. Serum ve plazma NP düzeyleri karanlık bir yerde oda ısısında üç güne kadar stabildir. Serum daha uzun süre için saklanacaksa -20 °C’de üç aya kadar, -80 °C’de ise bir yıla kadar stabildir [52].

### **2.3.5.2. İdrarda Neopterin**

Günlük NP atılımında çok önemli bir değişiklik olmadığı için sonuçların idrar kreatinin derişimleri açısından açıklanması şartıyla rastgele idrar örnekleri kullanılabilir. İdrar NP düzeyleri kreatinin düzeylerine göre belirlenir. İdrar NP normal değerleri 50–250 µmol NP/mol kreatinin’dir. Ortalama NP/kreatinin oranının erkeklerde kadınlara göre daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bu farkın erkeklerde kreatinin düzeylerinin kadınlara kıyasla daha yüksek olmasından kaynaklandığı bildirilmiştir [52].

İdrar örneklerinin çalışılmadan önce toplanması ve saklanması çok önemlidir. Bundan dolayı idrarı en iyi koruma yöntemi askorbik asit bulunan bir kaba boşaltarak toplamaktır. Eğer idrar küçük çocuklardan toplanacaksa askorbik asit doğrudan idrar toplama torbasına konulup

ışık geçirmeyen bir kaba aktarılarak en kısa zamanda çabucak dondurulmalıdır. Bu şekilde toplanan idrar örnekleri -20 °C birkaç ay -80 °C'de ise daha uzun süre stabil kalır [52].

### 2.3.5.3. Beyin Omurilik Sıvısında (BOS) Neopterin

BOS NP düzeylerinde cinsiyete göre fark bulunmamaktadır. Sağlıklı yetişkin bireylerde BOS NP düzeyleri  $4,2 \pm 1,0$  nmol/L'dir. BOS örneklerinin yanlış toplanması, saklanması ve işlenmesine bağlı olarak mevcut NP konsantrasyonlarında daha düşük değerlere neden olmaktadır. İçinde 1 mg/ml ditioeritritol (DTE) ve 1 mg/ml asetilen triamin penta asetik asit bulunan tüplere BOS örnekleri alınmak suretiyle bu problemin üstesinden gelinebilmektedir. Bu şekilde toplanan BOS dondurularak bir yıldan daha fazla stabil kalmaktadır [52].

### 2.3.5.4. Diğer Biyolojik Sıvılarda Neopterin

NP serum, idrar ve BOS vücut sıvıları dışında sinoviyal sıvı, pankreatik sıvı ve tükürükte de tayin edilebilir. Bunlara ilaveten lokal makrofaj aktivasyonunun bir göstergesi olarak NP diğer vücut sıvılarında da bulunmaktadır. Romatoid artiritli hastaların eklem sıvısı ve hamilelikte amniyotik sıvıda da NP düzeylerine bakılmıştır [35].

### 2.3.6. NP ve Serbest Radikaller

Sitokinler tarafından sitümüle olan makrofajlar  $H_2O_2$ , süperoksit, hidroksil radikalleri, reaktif oksijen metabolitleri ve diğer metabolitleri üretirler.  $H_2O_2$  ekstraselüler sitolize katılır. Ayrıca monosit/makrofajlar miyeloperoksidaz enziminin (MPO) salgılanmasını uyarırlar. MPO enzimi ise  $H_2O_2$  ve  $Cl^-$  reaktanlarını  $HOCl^-$  ve kloraminlere dönüştürürler. Bu bileşikler mikroorganizmalar için yüksek derecede toksik etkiye sahiptirler [38].  $IFN-\gamma$  ile sitümüle olan makrofajlar reaktif oksijen oluşumunun yanı sıra iki pteridin türevinin sekresyonunu da yaparlar. Bunlar redükleyici olmayan NP ve redükleyici olan 7,8-dihidroneopterinidir. İndirgeyici pteridin türevi olan NP radikal temizleyicisi değildir. Ancak süperoksit serbest radikallerinin kaynaklayıcısı olan ksantin oksidazın non-kompetatif inhibitörü olarak davranırlar. Diğer taraftan NP,  $H_2O_2$  ve kloraminin mikroorganizmalara karşı toksik etkilerini artırır [22].

NP serbest radikallerin oluşumunu indirekt olarak inhibe eder, ama onların sitotoksitesini güçlendirir. Dihidroneopterin NP ile birlikte makrofajlardan salınır ve serbest radikallerin inaktivasyonunu yaparlar. İn vivo olarak serbest radikaller üzerinde pteridin aktivasyon mekanizmalarından ikisi henüz açıklanamamıştır [22].

### 2.3.7. NP ve Hematopoezis

Demir atomu immüno kompetant hücrelerin farklılaşması ve üremesinde önemli bir rol oynar. Diğer taraftan yüksek toksisiteli hidroksil radikallerinin oluşumunu katalizler. İmmün cevap esnasında hücrelere daha fazla demir geçişi olur. Bu yüzden biyokullanılabilir demir miktarında azalma olur. Monosit/makrofaj aktivasyonu kandaki demir içeriğinin azalmasıyla birlikte görülür. Ayrıca ekstraselüler demir eksikliği NP salınımını sitümüle eder. Birçok hastalıkta aneminin varlığı ve NP arasında bir ilişki kurulamamasına karşılık NP'nin eritropoietin üretimini inhibe ederek anemi gelişmesine sebep olduğu gösterilmiştir [22 ve 52].

### 2.3.8. NP ve Üveit

Yapı olarak bir topa benzeyen gözün ortasında bulunan jel benzeri maddenin çevresini 3 tabakadan oluşan bir kılıf sarar. En dışta sklera adı verilen beyaz kısım, en içte retina adı verilen ve görmemizi sağlayan kısım, ortada ise uvea bulunur. Uveanın iltihabına üveit denir. Uvea gözü besleyen damarları bulundurmaktadır. Buranın iltihabı gözün tüm dokularını etkilemektedir. Bu durum görmeyi ciddi şekilde tehdit eden durumlara neden olmaktadır [35].

Üveitli olguların klinik olarak aktif olduğu dönemlerde, idrar neopterin seviyesinde yükselme olduğu tespit edilmiştir. Neopterinin bu özelliği ile üveitli olgularda klinik bulguları destekleyen, biyokimyasal bir aktivasyon göstergesi olarak kullanılabilceği düşünülmüştür [35].

### 2.3.9. NP ve Multiple Skleroz (MS)

Multiple skleroz hastalığı, özellikle periventriküler beyaz cevherde demiyelinizasyon, oligodendrosit kaybı ve reaktif astrogliazdan oluşan plaklarla karakterizedir. Hastalığın ilk dönemlerinden itibaren akson kaybı söz konusudur. Akson kaybı eşiği aştığında Sekonder Progressif Multiple Sikleroz (SP-MS)'e dönüşüm ve kalıcı nörolojik bulgu ortaya çıkar. Hastalığa yatkın kişinin viral ya da bakteriyel bir ajanla karşılaşması sonucu başta miyelin proteinleri olmak üzere tüm santral sinir sistemi (SSS) elemanlarına karşı otoimmün bir mekanizma gelişir. Bu gelişimde hücresel immün aktivasyonun ve özellikle T hücrelerinin tetik çekici olarak görev yaptığı kabul edilmektedir. Atak ve remisyonla seyreden MS'de atak dönemini belirleyici bir laboratuvar tetkiki halen bulunmamaktadır. Yapılan araştırmalarda serum neopterin düzeyinin MS hastalarının atak dönemini değerlendirmede objektif bir laboratuvar bulgusu olarak kullanılabilceği sonucuna varıldığı belirtilmiştir [22, 32 ve 52].

### **2.3.10. NP ve Malignant Hastalıklar**

Zayıf prognoz ile tümör safhaları arasında pozitif bir korelasyon gözlenir. Akciğer, ovaryum, meme, tiroid bezi, uterus, serviks, pankreas, kolon kanserleri, multiple myeloma ve Kaposi's sarkomu (HIV enfeksiyonsuz olsa bile)'nda artmış serum ve/veya idrar NP düzeyleri yüksek olduğu bildirilmiştir. Akciğer kanserinde artmış idrar NP düzeyi ile tümörün tipi, durumu ya da metastazı arasında bir ilişki yoktur [22 ve 49].

### **2.3.11. NP ve Otoimmün Hastalıklar**

Romatoid artirit, glomerülonefrit, Sjogren's sendromu ve Grave's hastalıklarında idrar ve/veya serum da artmış NP düzeyleri gözlenir. Otoimmün hastalıklarda NP infiltrat olmuş makrofajlar tarafından lokal üretilir. Romatoid artiritte hem serum hem de idrar NP düzeyleri hastalığın aktivasyonuna bağlı olarak artar. Serum NP düzeyleri ile IgM-romatoid faktör arasında bir korelasyon vardır. Otoimmün hastalıklarda lokal üretilen NP kana geçer ve aynı zamanda NP hastalığın gelişimindeki aktifliği belirtir [22 ve 52].

### **2.3.12. NP ve Renal Hastalıklar**

Renal yetmezlik, diabetik nefropati, glomerülonefrit, hepatit B, viral nefropati ile renal transplant rejeksiyonda serum ve idrarda artmış NP düzeyleri görülür. Renal hastalıklarda, NP konsantrasyonlardaki artıştan iki mekanizma sorumludur. Bunlar NP'nin atılımının zayıflaması ve inflamasyon süresince üretimidir [22].

### **2.3.13. NP ve Kardiyoloji**

İnsanlarda serum NP ile karotis ateroskleroz miktarı arasında bir korelasyon vardır. Kronik koroner arter gibi akut hastalarda serum NP düzeylerinde artma olur. Gurfinkel ve arkadaşları etkilenmemiş koroner arterilerin sayısı ile NP düzeyleri arasında pozitif bir korelasyon buldular [57]. Schumacher ve arkadaşların bir çalışmada ise MI'lı hastalarda artmış serum NP düzeylerinin trombolitik tedavi başladıktan sonra ilk dört saat esnasında NP düzeylerinde önemli derecede düşme olduğu daha sonra ise tekrar arttığını gözlemlediler [58 ve 59]. NP düzeyleri ile anjiyotensin enzimi (ACE) ve aldosteron düzeyleri arasında pozitif bir korelasyon vardır. Ancak ACE inhibitörleri NP konsantrasyonları üzerinde bir etkiye sahip değildir. Aktif makrofajlar tarafından salınan endotelin-1 ve NP arasında ise pozitif bir korelasyon olduğu belirtilmektedir [21 ve 36].

## 2.4. C-Reaktif Protein

Akut hastalığı olan bireylerin serumlarında *Streptococcus pneumoniae*'nin hücre duvarındaki C-polisakaride bağlanabilen bir maddedir [61 ve 65]. CRP'nin büyük bir kısım hepatositlerde sentezlenir. İmmünohistokimyasal olarak incelendiğinde, CRP'nin enflamasyon esnasında hepatik lobüllerde yerleşme şeklinin sentripedal olduğu gösterilmiştir [60].

İnsan CRP'si bir  $\beta$ -globulindir. Pentaksinler veya pretraksinler diye adlandırılan proteinlerin bir üst ailesi olarak sınıflandırılır. Globuler yapısına bakıldığında, birbirine nonkovalent olarak bağlı beş tane subunitten meydana gelmiş, elektron mikroskopunda disk şeklinde görülen, siklik, nonglikolize bir yapıdan oluşmuştur [8 ve 15]. Bu subunitler simetrik olarak yanyana dizildiğinde oluşan proteine (CRP'ye benzer protein) serum amiloid A proteini adı verilir [62]. Yine insan CRP geni, kromozom 1 üzerinde lokalize olmuştur. CRP'deki her bir subunit 206 aminoasit rezidüsünden oluşmuştur ve molekül ağırlığı rölatif olarak 23.017 olarak hesaplanmıştır [8, 10 ve 15].

İnvivo ve invitro çalışmaların sonuçlarında CRP'nin; konakçıda yabancı patojen ve hasarlı hücelere spesifik bir şekilde bağlanabildiği, kandaki humoral ve hücreseleffektör sistemlerle etkileşerek, yabancı olarak algılanan hüceleri ortadan kaldırmayı başlatmada ilgili olduğu gösterilmiştir. CRP'nin fibronektin ve kromatine bağlanması ilginçtir. Böylece, hücre nekrozu esnasında hasarlı kromatini ortadan kaldırdığı ifade edilmiştir [8 ve 63].

Sağlıklı insanda normal serum CRP konsantrasyonu 1mg/dl'den daha azdır. Enflamasyon esnasında hepatositlerde CRP'nin sentezi uyarılır ve hepatositlerden sekresyonu artar. Enflamasyon boyunca, CRP'nin artmış hepatik sentezi, transkripsiyonel indüksiyonu sonucu olur ve akut faz cevabının devamı için CRP molekülleri sekretuar yollara geçer ve enflamasyonlu yerlerdeki hasarlı dokulara Polimorfonükleer lökositlerin (PMNL) göçüyle birlikte daha yoğun lokalize olur [64 ve 65]. CRP, *Streptococcus pneumoniae* enfeksiyonunda konakçı tarafından antipnömokokkal antikorlar üretilinceye kadar fatal bir sonucu önlemeye yardımcı olur. CRP'nin normal serum yarı ömrü 19 saat civarındadır ve yine kısmi katabolik hızı, CRP'nin plazma seviyelerine bağlı değildir. Romatoid artritte CRP üretiminin kümülatif olarak göz önünde tutulması, hastalığın aktivite ve seyriinin değerlendirilmesinde önemlidir [66]. CRP'nin serum seviyesinin, birçok enflamatuvar durumda, hastalık aktivitesiyle korele olduğu gösterilmiş, ayrıca serum seviyelerinin IL-6'nın hem serum hem de sinovyal sıvı seviyeleriyle korelasyon gösterdiği ortaya konulmuştur [8].

#### 2.4.1 CRP'nin Görevi

Ca<sup>+2</sup> varlığında, CRP yalnız bir çok mantar, bakteri protozoal parazitte bulunan polisakarit değil, aynı zamanda fosfatidilkolin (lesitin), fosfolipidler (nükleik asitler) gibi polianyonları da bağlar. Ca<sup>+2</sup> yokluğunda, CRP histonlar gibi polikatyonları bağlar. Kompleks oluşunca, CRP C1q2dan başlamak üzere klasik kompleman yolunu aktive eder [8]. Antikorlar gibi, CRP opsonizasyon, fagositozis ile bakteri ve virüs gibi istilacı organizmaların lizisini başlatır. CRP aynı zamanda potansiyel olarak toksik hasarlı dokudan salınan otogen maddeleri de tanır, onları bağlar ve detoksifiye eder. CRP'nin kendisi opsonizasyondan sonra katabolize olur [8 ve 67].

#### 2.4.2. CRP'nin Klinik Önemi

CRP en duyarlı akut faz proteinlerden biri olarak uzun zamandır bilinmektedir. Plazma düzeyi genellikle miyokard infarktüsü, stres, travma, infeksiyon, cerrahi veya neoplastik proliferasyon sonrası dramatik olarak artar. Artış infarktın 6–12. saatlerinde başlar ve normalin 200 katına kadar ulaşılabilir. CRP'nin belirlenmesi organik hastalıkların taranmasında, inflamatuvar hastalığın aktivitesinin değerlendirilmesinde, sistemik lupus eritamatozus, lösemi veya cerrahi sonrası araya giren infeksiyonların belirlenmesi (plazma düzeyinde sekonder artış) ve bakteriyolojik inceleme için örnek alımının güç olduğu neonatal septisemi ve menenjit teşhisinde klinik olarak yararlıdır. Dolaşımdaki yüksek CRP düzeylerinin kardiyovasküler hastalıklar için bağımsız risk faktörü olabileceği belirtilse de fizyopatolojisi hala net değildir [4 ve 68].



### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. MATERYAL

Bu çalışmada Nisan 2005 ile Aralık 2005 tarihleri arasında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi rutin Biyokimya laboratuvarına gelen yaş ortalamaları  $47,98 \pm 22,64$  olan hastaların kan örneklerinden randomize seçilen 150 serumda neopterin ve CRP düzeylerine bakıldı. Örnekler CRP düzeylerine göre 0–5, 5–10, 10–30, 30–60 ve 60–üzeri mg/l olarak gruplandırıldı. Bu gruplar için ayrı ayrı NP düzeyleri ölçüldü.

##### 3.1.1. Kullanılan Cihaz ve Kimyasal Maddeler

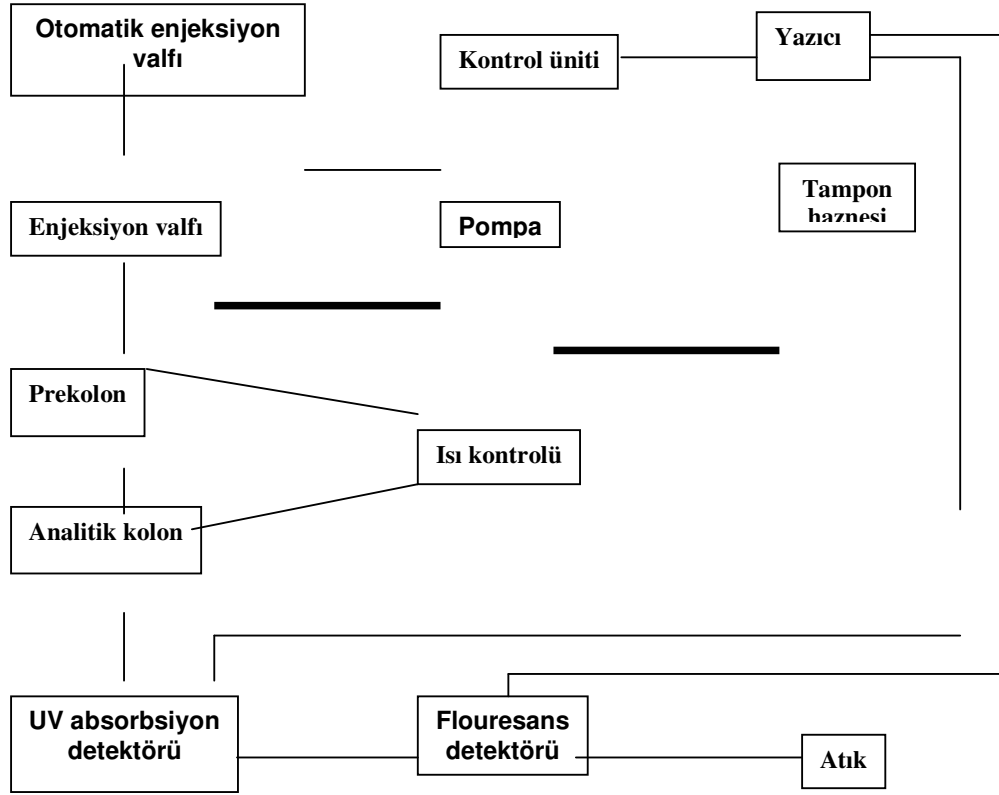
- Neopterin Sigma (ABD)
- Potasyum dihidrojen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) Sigma (ABD)
- Dipotasyum hidrojen fosfat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) Merck (Almanya)
- Ortofosforik asit ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) Riedel da Haen (Almanya)
- Metanol Merck (Almanya)
- Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Agilent 1100 series (Almanya)
- Floresans detektör
- Otomatik örnekleme sistemi (ChromSystems programmable autosampler CLC 200)
- Pompa
- Mikroişlemci
- Kromatografi programı (HP ChemStation for LC)
- 1. Kolon
  - Analitik kolon (Analytical Column):  $\text{C}_{18}$  hidrokarbon zincirine bağlı silika içeren, partikül büyüklüğü  $5\mu\text{m}$  olan,  $4,6 \times 250$  mm boyutlarındaki Allsphere ODS-2 reverse-Phase kolonu (HICHRON, Waters Spherisorb, U.K)
- 2. Vorteks (Heidolph REAX top)

3. Santrifüjler
4. Su arıtma cihazı (Mini Pure)
5. Değişik hacimlerde otomatik pipetler (Medisis)
6. Teraziler
  - Hassas terazi (SHIMADZU, Japonya)
  - Tek kefeli terazi (SCALTEC, Almanya )
7. Scheicher and Schuell örnek süzme filtresi (selüloz asetat 0,45 µm)
8. pH metre (inoLab pH 720, Almanya)
9. Derin dondurucu (Jouan , Danimarka)

### **3.2. Metod**

#### **3.2.1. HPLC Sistemi ve Gerekli Donanımlar**

Neopterin ölçümü için gerekli olan minimum HPLC sistemi izokratik pompa, enjeksiyon valfi, seperasyon kolonu, florometrik detektördür. Floresans ölçümü 353 nm eksitasyon ve 438 nm emisyon dalga boylarında yapıldı. Neopterin tayini Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Biyokimya laboratuvarında bulunan HPLC cihazında (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2) gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. HPLC sistem şeması



**Şekil 3.2.** HPLC cihazı

### 3.2.2. Kullanılan Çözeltiler

#### 1) Mobil Faz İçin Kullanılan Fosfat Tamponu Stok Çözeltisi:

102.1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 43.6 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  tartılarak bir miktar distile suda çözüldükten sonra son hacim 1000 mL'ye tamamlandı ve çalışılincaya kadar 4 °C'de buzdolabında saklandı.

#### 2) Mobil Faz için Kullanılan Fosfat Tamponu Çalışma Çözeltisi (0.015 mol/L):

Stok çözeltinin 15 ml'sine 950 ml distile su ilave edildi. pH'ı 6.4'e konsantre  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ile ayarlandıktan sonra distile su ile son hacim 1 L'ye tamamlandı. 0.20  $\mu\text{m}$ 'lik mikrofiltreden süzüldü. Çalışma çözeltisi her gün taze olarak hazırlandı.

#### 3) Neopterin Standardı Stok Çözeltisi (0.039 mmol/L):

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

#### 4) Neopterin Standart Çözeltileri :

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

#### 3.2.3. Kromatografi

Numune içeriğindeki bileşiklerin bir destek ortamında mobil veya durağan faz göstermelerine göre yapılan bir separasyon tekniğidir. Bileşikler durağan fazda birbirlerine çok kuvvetle etki ederek uzun süre alıkoyarlar. Kromatografi teknikleri mobil fazlarına göre gaz ve sıvı kromatografi olarak sınıflanabilir.

##### 3.2.3.1 HPLC

HPLC yöntemi, geleneksel kromatografi metotlarına göre maddelerin ayrımını çok iyi bir düzeyde yapabilen bir yöntemdir. Kullanılan kolon teknolojisi ileri bir teknik olup, klinik kullanımı çok geniştir.

#### HPLC'nin Komponentleri

En basit HPLC' de bulunması gereken komponentler; solvent rezervuarı, pompa, enjektör, kolon, detektör, kayıt cihazı ve mikroişlemcidir.

**Solvent Rezervuarı;** solvent mobil fazı oluşturur. Solventin içine konduğu ve buradan sisteme aktarıldığı kaplara solvent rezervuarı denir. İzokratik sistemlerde tek rezervuar varken, gradient sistemlerde dört rezervuar bulunur.

**Pompa;** mobil fazı solvent rezervuarından aspire eder ve basınçlı bir şekilde kolona gönderir. Resiprokal pompa, gaz amplifiye edici pompa, gaz çıkartıcı pompa ve şırınga pompa olmak üzere dört tip pompa vardır. Resiprokal pompa ile 10000 psi ve 1-10 ml/dak hızda akım üretilebilir. İzokratik pompalarda tek bir mobil faz kullanılabilirken, gradient pompalarda iki veya daha fazla mobil faz kullanılabilir. Ayrıca gradient pompalara giden mobil faz kompozisyonu değiştirilebilir.

**Enjeksiyon Sistemi;** genellikle lup enjektör sistemi kullanılır. Kapalı pozisyondayken enjektör içine çekilen numune lup içine enjekte edilir. Lup'un sisteme göndereceği hacim sabittir ve bu hacmi tam olarak sisteme gönderir. Lup sisteminde numuneler tek tek enjekte edilir. Otosampler sistemleri de vardır. Bu sistemde ise numuneler arka arkaya otomatik olarak enjekte edilir.

**Kolon;** kromatografi sisteminin durağan fazını oluşturur. Durağan faz olarak; silika, alüminyum, mangal kömürü, organik polimerler kullanılabilir. Silika sıklıkla kullanılan bir durağan fazdır. 40 µm çaplı makropartiküller oluşturur. Pelliküler durağan faz ise 20–60 µm çaplı cam boncuklar ve durağan fazın dış kısmını saran bir ince zardan oluşur. Mikropartiküllü destek sistemi ise 3–10 µm çaplı sferik veya düzensiz şekilli gözeneklerden oluşur. Çoğunlukla mikropartiküllü silika kullanılır. Ancak pH 8 üzerinde ve pH 2 altında kullanılamaz.

Bonded Phase (bağlanmış faz) kolon teknolojisi; bu teknolojiye stasyoner faz (durağan faz) kimyasal olarak silika partiküllerinin yüzeyine bağlanmıştır (silika ester veya silikon polimerik bağlarla). Bağlanmış faz paketleri; mekanik ve kimyasal olarak stabil, uzun ömürlü, mükemmel kromatografik performansa sahiptirler.

İki tip bağlanmış faz vardır;

- Normal faz: Stasyoner faz mobil faza göre polardır.
- Reversed faz: Nonpolar stasyoner faz olarak en çok kullanılan tiptir.

Detektör;

HPLC sisteminde sıklıkla kullanılan dedektörler;

- Diod array absorbance dedector (UV ve görünen ışık spektrumu için kullanılır)
- Fluorometre detektör
- Elektrokimyasal detektör

Çoğu organik bileşikler UV spektrumdaki ışığı absorbe ederken daha az kısmı görünen spektrumdaki ışığı absorbe eder. Ayrıca dedektörlerin;

Sabit dalga boylu fotometre dedektörü,

Dalga boyu değişebilen fotometre dedektörü,

Diod array dedektör,

Elektrokimyasal dedektör,

Floresan dedektör, tipleri de vardır.

Biz çalışmamızda gradient pompa, otosampler sistem ve floresan dedektörü kullandık.

**Floresan dedektör**, floresan özelliği olan bileşiklerin ölçümünde floresan dedektör kullanılır. Biz çalışmamızda floresan dedektörü tercih ettik. Floresans tespit yöntemi, biyolojik numunelerdeki pterinlerin ölçülmesi için gerekli hassasiyete ve seçicilik özeliğine sahiptir. Burada sadece oksitli pterinler, hepsi olmasa da birçoğu floresans verir ve indirgenmiş olan formlarında endojen olarak var olmaları bir sorun oluşturur. İndirgenmiş olan pterinler bu açıdan analiz öncesinde kimyasal olarak okside forma dönüştürülmeleri gerekmektedir.

Asidik ve alkali koşullarında pterinlerin iyotla farklı şekilde oksitlendiği bir metot kullanılarak biopterinin üç oksidasyon durumu olan biyopterin, dihidrobiopterin ve tetrahidrobiopterin'i ölçülmesi mümkün olmaktadır.

Bu oksidasyon işlemi bütün doku ve sıvılar için kullanılabilir. Çünkü;

- Tam olarak oksitli olan biyopterin asit veya alkali iyot oksidasyonundan etkilenmez,
- Dihidrobiopterin ve tetrahidrobiopterin her ikisi de asit koşullarında iyotla kantitatif olarak biopterine dönüştürülür,
- Alkali şartlarında, dihidrobiopterin iyotla kantitatif olarak biyopterine dönüştürülür tetrahidrobiopterin etkilenmez.

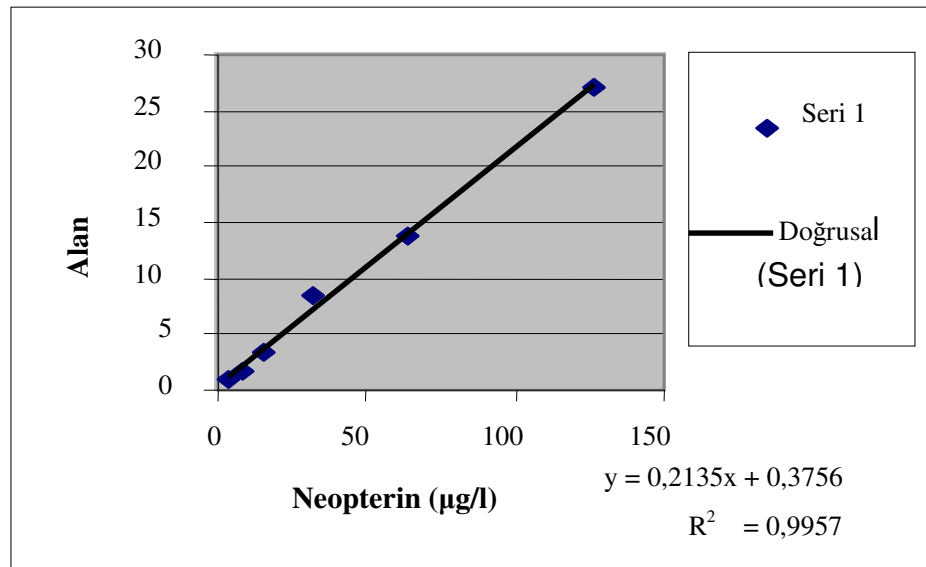
Bunun için, örneğin saflaştırma işlemi ve HPLC ayırışımından sonra, önceden oksidasyonu olmayan örneğin doğrudan enjeksiyonu ile endojen biopterin analizi, asit ile okside olmuş örneklerin enjeksiyonu ile total biopterin (biopterin + dihidrobiopterin + tetrahidrobiopterin) konsantrasyonları ölçülebilir. Dihidrobiopterin derişimleri ise örneğin alkali oksidasyonundan sonra bulunan biopterin derişimin total biopterinden çıkarılmasıyla bulunabilir.

**Sistem ve Data Kontrol;** pompa ayarlarını yapabilen, enjektör sistemindeki lup'un çevrilmesiyle numunenin kolona girmesini, mobil fazın akım hızı ve süresini ayarlayan bilgisayar sistemidir. Yine dedeksiyon sonucu kromatogramın oluşturulmasını, eldeki diğer datalarla karşılaştırılmasını ve sonuçların print edilmesini de sistem ve data kontrolünü sağlayan bilgisayar yönetir.

### 3.3. Deneyin Yapılışı

CRP düzeyleri APTEC CRP Ultra Sensitive kiti kullanılarak turibidimetrik immünoassay metoduyla gerçekleştirildi (KatalogNo: U2A013/U2A013).

Serum neopterin ölçümü için düz tüplere alınan kanlar ışıktan korumak amacıyla alüminyum folyoya sarıldı. Serumları ayrılarak kahverengi ependorf tüplere konup hemen çalışıldı. Analiz sonucunda Şekil 3.3. de görülen standart grafik tablosundan sonuçlar belirlendi. Bunu sonuçları elde etmek için HPLC cihazında alan olarak elde ettiğimiz sonuçları Excel Programına girip ve standart grafiğimiz üzerinden elde ettiğimiz sonuçları formülize ederek hesaplandı. Eğer analiz hemen yapılmayacaksa  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de çalışma saatine kadar deepfreeze saklanmalıdır. Çalışma sırasında serumdaki proteinleri deproteinize etmek için 0,5ml serum üzerine 0,1ml 2 mol/l TCA ilave edilerek vortekslenildi ve 10,000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant NP ölçümü için kullanıldı. Şekil 3.4, Şekil 3.5. ve Şekil 3.6. da görülmektedir.



Şekil 3.3. Neopterin standart grafiği





Şekil 3.4. Randomik Kan Seçimi



Şekil 3.5. Kanlara TCA katılması



**Şekil 3.6.** Kanların santrifüjlenip süpernatant elde edilmesi

### **3.4.İstatistiki Analiz**

NP konsantrasyonlarının değerlendirilmesi için seri olarak hazırlanmış olan standartlar ile yapılan çalışma sonucunda pik alanları hesaplandı. Çizilen kalibrasyon eğrisi ve elde edilen regresyon denklemi ile bilinmeyen örneklere ait pik alanlardan örnek konsantrasyonları hesaplandı. Buradan çıkan sonuçlar SPSS paket programında hesaplanarak istatistiki sonuçlar oluşturuldu.

#### 4. SONUÇLAR

Neopterin sonuçları CRP değerlerine göre gruplandırılarak (0–5, 5–9, 10–29, 30–59, 60 ve üzeri mg/l) incelenmiştir. Tüm örnek sonuçları değerlendirildiğinde, CRP düzeyleri ile neopterin düzeyi arasında anlamlı pozitif korrelasyon ( $p<0.012$ ) tespit edildi.

Tablo 4.1.'de NP, alan ve CRP tanımlayıcı istatistikleri görülmektedir. Tablo 4,1'de görüleceği gibi alan minimum değeri 0,380 maksimum değeri 136,57, ortalama değeri  $7,06 \pm 1,17$  çıktığı görülmektedir. Neopterin minimum değeri 0,021 maksimum değeri 637,91; ortalama değeri  $31,32 \pm 5,5$  çıktığı görülmektedir. CRP istatistik sonuçları ise minimum 0,1; maksimum 106,7; ortalama değeri  $30,96 \pm 2,29$  olarak bulundu.

**Tablo 4.1.** NP ve CRP düzeylerinin istatistiki sonuçları

Parametrelerimiz	N Sayısı	Minimum Değer	Maksimum Değer	Ortalama Değer	Standart Sapma (SD)	Standart Hata (SE)
ALAN	150	0,380	136,57	7,06	14,39	1,17
NEOPTERİN ( $\mu\text{g/l}$ )	150	0,021	637,91	31,32	67,43	5,5
CRP (mg/l)	150	0,1	106,7	30,96	28,00	2,29

Tablo 4.2.'den görüldüğü gibi CRP 5'in altındaki grupta ortalama değeri  $35,19 \pm 10,06$  ( $n=30$ ), 5–9 arası grupta ortalama değeri  $25,55 \pm 6,89$  ( $n=27$ ), 10–29 arası grupta ortalama değeri  $11,66 \pm 21,99$  ( $n=30$ ), 30–59 arası grupta ortalama değeri  $48,32 \pm 21,33$  ( $n=30$ ), 60 ve üzeri grubunda ortalama değeri  $34,96 \pm 10,83$  ( $n=33$ ) ve total olarak bütün gruplarımızda ise  $31,32 \pm 5,5$  ( $n=150$ ) olarak tespit edildi.

**Tablo 4.2.** CRP değerlerine göre oluşturduğumuz gruplarımızda NP düzeyleri

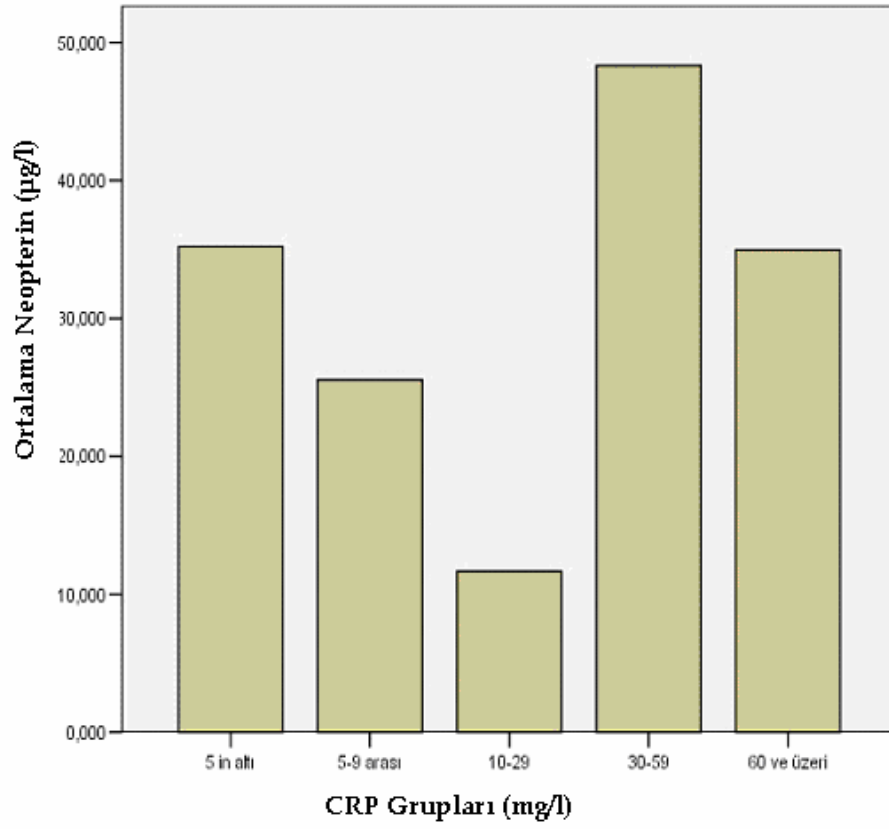
CRP Grupları (mg/l)	N Sayısı	Ortalama Değer	Standart Sapma (SD)	Standart hata (SE)
5'in altı	30	35,19	55,15	10,06
5-9 arası	27	25,55	35,81	6,89
10-29 arası	30	11,66	21,99	4,01
30-59 arası	30	48,32	116,85	21,33
60 ve üzeri	33	34,96	62,21	10,83
<b>Total</b>	150	31,32	67,43	5,5

Tablo 4.3.'dende görüleceği gibi CRP düzeyi 30-59 arasında olan grubumuzda anlamlı pozitif bir korelasyon ( $p < 0,012$ ) tespit edildi.

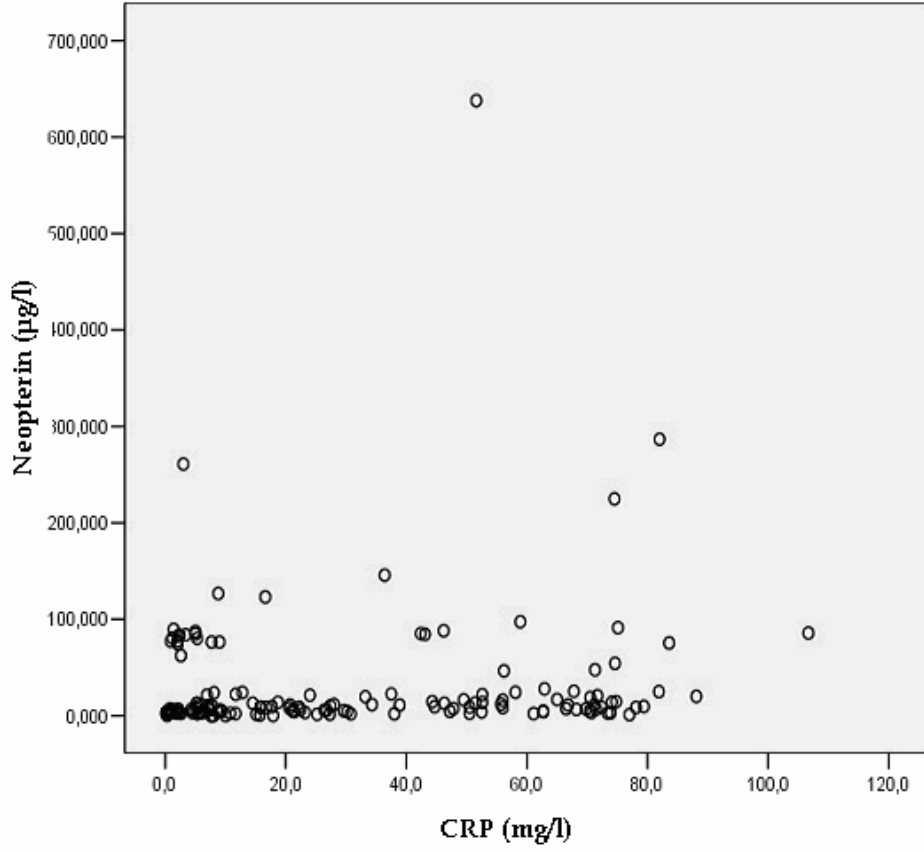
**Tablo 4.3.** NP ve CRP düzeyleri arasındaki korelasyon

KORELASYON				
		ALAN	NEOPTERİN	CRP
Alan	Korelasyon Katsayısı	1,000	1,000	0,205
	Önemlilik Derecesi	-	-	0,012
	N Sayısı	150	150	150
Neopterin	Korelasyon Katsayısı	1,000	1,000	0,205
	Önemlilik Derecesi	-	-	0,012
	N Sayısı	150	150	150
CRP	Korelasyon Katsayısı	0,205	0,205	1,000
	Önemlilik Derecesi	0,012	0,012	-
	N Sayısı	150	150	150

Bütün gruplarımıza ait NP ve CRP düzeyleri Şekil 4.1'de ve korelasyon çalışmamıza ait serpiştirme diyagramı ise Şekil 4.2'de görülmektedir.



Şekil 4.1 NP ile CRP grupları değerlerini gösteren şema



**Şekil 4.2. NP ve CRP arasında yaptığımız korelasyon değerlerimiz**

Çalışma sonuçları ışığında, neopterin düzeylerinin genelde CRP düzeyleri ile korrele olduğu ama bu korelasyonun CRP değer gruplarına göre farklı olduğu ve her gruba uygulanamayacağı anlaşılmıştır.

## 5. TARTIŞMA

Neopterin, guanozin trifosfattan biopterinin denovo sentezinde rol alan ve insan monosit makrofajlarının interferon- $\gamma$  ile uyarılması sonucu salgılanan bir metabolittir. IFN- $\gamma$ , T hücrelerinin uyarılmasının derecesine bağlı olarak salgılanır. Bu nedenle biyolojik fonksiyonu tam olarak bilinmemesine rağmen, neopterin uyarılmış hücrel immün yanıtın özgül olmayan bir biyokimyasal belirteci olduğu kabul edilmektedir [37].

Değişik kanser hastalarının idrarlarında NP artışının belirlenmesi immünolojik aktivasyon belirteci olarak NP'e ayrı bir önem verilmesine neden olmuştur. Serum NP düzeyleri, enfeksiyonlar, cerrahi girişimler ve malign hastalıkların yanı sıra IFN tedavisi alanlarda da yükselmektedir [37 ve 69]. NP son yıllarda özellikle viral enfeksiyonların işaretçisi olarak gösterilmektedir [41, 70, 71 ve 72]. Hücre içi bakteriyel enfeksiyonlarda ve ciddi bakteriyel enfeksiyonlarda da arttığı gözlenmiştir [41, 73, 74 ve 75].

Günümüzde pterinlerin özellikle NP ve biopterinlerin ölçümünde HPLC (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi) tekniklerinden yararlanılmaktadır. Çoğunlukla elektrokimyasal ve floresans deteksiyon yöntemleri kullanılmaktadır. Değişik araştırmacılar tarafından önerilen metotlardaki bazı küçük farklılıklara rağmen günümüzde tercih edilen en hassas ve pratik yöntem floresans yöntemidir [32]. Bizde birçok araştırmacının da tercih ettiği gibi [35, 37, 41 ve 48] serum NP düzeyini HPLC ve floresan detektör yöntemiyle tespit ettik.

NP düzeyleri ayrıca ELISA (Enzim Linked İmmüno Assay), [38, 41, 43 ve 46] ve RIA (Radyoimmünoassay) [44 ve 47] metotları ile de tayin edilebilmektedir. ELISA tekniği diğerlerine göre kitlerinin ucuzluğu, uzun raf ömürlü oluşları ve otomasyona uygun olmalarının yanında, dezavantajlarında ise deneylerinin sayıca fazla ve uzun olmasından dolayı tarafımızdan tercih edilmemiştir. Yine RIA tekniğinin radyoaktif madde kullanıldığından ve radyasyon riskinden dolayı birçok araştırmacı gibi biz de çalışmamızda tercih etmedik. Bunlara ilaveten elektroforez, GC-MS (Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi), kolon ve kağıt kromatografisi ve TLC (İnce Tabaka Kromatografisi) cihazlarında kullanılabilir [23, 57 ve 76].

CRP düzeyi bakteriyel ve viral enfeksiyonların ayırımında ve tedavinin izlenmesinde yıllardır kullanılan bir parametredir. Ancak özgüllüğünün düşük olması nedeniyle gereksiz antibiyotik kullanımına neden olmaktadır. CRP tayini RID (Radyal İmmünodifüzyon), RIA, nefelometri, HIA (Homogeneous İmmün Assay) ve immünoturbidimetri metotları ile yapılmaktadır. Yüksek doğruluk, tekrarlanabilirlik, izotop ve özel cihaz gerektirmeyen,

uygulanması kolay ve hızlı bir metod olmasından dolayı biz de immünotürbidimetrik yöntemle çalışmayı tercih ettik.

Bozkurt ve arkadaşlarının [37] AKS'li (Akut Koroner Sendrom) hastalar üzerinde yaptıkları bir çalışmada CRP ve NP düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış olduğunu bulmuşlardır. Serum NP düzeyinin CRP'ye göre daha spesifik olduğunu sonuç olarak aktive makrofajlardan salınan NP'nin akut koroner sendromlu olgularda aterosikloratik plak inflamasyon göstergesi olarak kullanılabileceği kanaatine varmışlardır. Gurfingel ve arkadaşları [37 ve 58] ise yaptıkları çalışmada serum NP seviyesiyle koroner arter hastalığının arasında anlamlı bir ilişkinin olduğunu göstermişlerdir. Schumacher ve arkadaşları [37 ve 77] da akut miyokart infarktüsli 21 hastada yaptıkları çalışmada serum NP düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığını göstermişlerdir. Yine Garcia Moll ve arkadaşlarının [37 ve 78] koroner arter hastalığı olan 114 kadın üzerinde gerçekleştirdiği çalışmada serum NP seviyesinin anlamlı derecede arttığını ileriye sürmüşlerdir. Siherdon ve arkadaşlarının [41 ve 79] yetişkin yoğun bakım hastalarında yaptıkları bir çalışmada ise CRP ve NP düzeylerinin enfeksiyonlu hastalarda arttığını, CRP'nin ise bu hastalarda enfeksiyonların izlenmesinde kullanılabileceğini ileriye sürmüşlerdir.

NP IFN- $\gamma$  ile aktive olmuş makrofajlar tarafından üretilmekte olup, inflamasyonun serum, BOS ve idrarda olup olamayacağını araştıran çalışmalar da yapılmıştır [48, 78 ve 80].

Son yıllardaki bu gelişmelerin sonucunda hem biopterin hem de NP'nin ölçümü çeşitli klinik durumlarda değerlendirilmesinde kullanım alanı bulmuştur [48, 80, 81, 82 ve 83]. Hücrel immünitinin aktivasyonu, NP üretimi ile yakından ilişkili olduğundan Behçet hastalığında da immün cevaplarda değişimlerin oluşması NP konsantrasyonunu idrar ve serumda arttırmakta ve hastalığın seyrinin izlenmesinde bir belirteç olarak NP ölçümünün yapılabileceğini düşündürmektedir [48 ve 84]. Yine kronik hepatit hastalarında da benzer durum olduğu [48, 80 ve 84] belirtilmektedir. Biz de yapmış olduğumuz çalışmada neopterin düzeyleri ile CRP düzeyleri arasında anlamlı pozitif bir korelasyon bulduk ( $p < 0.012$ ). Bu korelasyonun değişik düzey CRP gruplarında farklı olduğu ve en yüksek neopterin düzeylerinin olduğu CRP grubunun 30–59 mg/l olan grup olduğu gözlemlendi. En düşük neopterin düzeyi 10–20 mg/l CRP grubunda gözlemlendi. NP ve CRP düzeyleri her grupta anlamlı bir korelasyon göstermedi. Ancak sonuçlarımız CRP düzeylerine göre değerlendirildiğinde anlamlı bir pozitif korelasyon tespit edildi.

Sonuç olarak NP ve CRP düzeylerinin korrele olduğu ama bu korelasyonun tüm gruplarda değil de bazı gruplarda daha belirgin olduğu anlaşılmaktadır. CRP klinik seyir takibi



yönünden çok daha fazla kullanılan bir markır olduğundan ve birçok patofizyolojik olayda etkilendiğinden enfeksiyon göstergesi olarak da NP ile birlikte kullanımı hastalığın viral ya da bakteriyel kaynaklı olup olmadığı konusunda daha net bilgi verebilir.

İki analizin birlikte çalışılması durumunda birçok hastalıkta marker olabileceği kanaatine varıldı.

### KAYNAKLAR DİZİNİ

- [1] Junquera, L., C., Carneiro, J., Kelley, R., O., 1993, Temel Histoloji Editör: Aytekin, Y., Solakoğlu, S., Barış Kitabevi, İstanbul.
- [2] Akay, M., T., 2001, Genel Histoloji, Palme Yayıncılık, Ankara.
- [3] Erganiş, O., İstanbulluoğlu, E., 1993, İmmünoloji, Mimoza Yayınları, Konya.
- [4] Müftüoğlu, E., Bolaman, Z., Bilgir, O., Ertop, Ş., 1993, İmmünoloji, Saray Medikal Yayıncılık, İzmir.
- [5] Bilgehan, H., 1987, Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi, Barış Yayınları, İzmir.
- [6] Baban, N., 1995, Klinik Biyokimya 1. Bölüm Biyokimyaya Giriş ve İmmünoloji, İ. Ü. Basımevi, Üniversite Yayın No: 3901, Cerrahpaşa Tıp Fak. Yayın No: 190, İstanbul.
- [7] Zvetkova, E., Wirleitner, B., Tram, N., T., Schennach, H., Fuchs, D., 2001, Aqueous extracts of *Crinum latifolium* (L.) and *Camellia sinensis* show immunomodulatory properties in human peripheral blood mononuclear cells, International Immunopharmacology 1, 2143- 2150,.
- [8] Ay, M., 1998, Romatoid artrit ve osteoartritli hastalarda serum ve sinovyal sıvı CRP, alfa-1 antitripsin, alfa-1 asidglikoprotein, haptoglobin, prealbumin ve alfa-2 makroglobulin seviyelerinin araştırılması (Uzmanlık Tezi), 49 s.
- [9] Emery, P., Luqmani, R., 1993, The validity of surrogate markers in rheumatic disease, Brith. J. of Rheum, 32 (Supp), 3-8.
- [10] Volanakis, J., E., 1993, Acute-phase proteins in rheumatic disease, In Mc Carty, D., J., Koopman, W., J., editors, Arthirtis and Allied Conditions, Philadelphia, Lea-Febiger, 469-475.
- [11] Sivas, A., 1996, Aminoasitler ve proteinler, In Onat, T., Emerk, K., Temel Biyokimya, Başsaray Yayınevi, İzmir, 150 s.
- [12] Schultz, D., R., Arnold, P., I., 1990, Properties of four acute phase proteins: C-Reactive protein, serum amyloid A protein, a1-acid glycoprotein and fibrinogen, Sem. İn Arth and Rheum, 20:29-147.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)**

- [13] Lowry, S., F., 1993, Cytokine mediators of immunity and inflammation, Arch. Surg, 128: 1235-1241.
- [14] Sönmez, E., 1992, Protein-enerji malnütrisyonu olan çocuklarda akut faz cevabının değerlendirilmesi (Uzmanlık Tezi), İstanbul, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Fakültesi.
- [15] Dowton, S., B., Colten, H., R., 1988, Acute phase reactants in inflammation and infection, Sem. in Hemat, 25: 84-90.
- [16] Hill, A., G., Siegel, J., Rounds, J., 1997, Metabolic responses to interleukin-1, Centrally and peripherally mediated, Annals of Surg, 225: 246-251.
- [17] Akkuş, İ., Gürbilek, M., Çağlayan, O., 1997, Klinik biyokimya laboratuvarı el kitabı, İstanbul, 126-139.
- [18] Tiftik, A., M., 1996, Klinik biyokimya, Konya, Mimoza A.Ş., 279-290.
- [19] Jahoor, F., Sivakumar, B., Rosario, M., D., 1996, Isolation of acute-phase proteins from plasma for determination of fractional nsynthesis rates by a stable isotop tracer technique, Analyt, Biochem, 236: 95-100.
- [20] Kushner, I., 1993, Erythrocyte sedimentation rate and acute phase reactants, In, Mc Carthy, D., J., Koopman, W., J., editors, Arthirits and allied conditions, Philadelphia, Lea-Febiger, 720-725.
- [21] <http://en.wikipedia.org/wiki/Interferon>.
- [22] Yeğen, A., 2004, Aktif akciğer tüberkülozlu ve sekel akciğer tüberkülozu ayrımında neopterinin yeri (Uzmanlık Tezi), T.C. Sağlık Bakanlığı Yedikule Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi 6. Klinik, İstanbul.
- [23] Hyland, K., Howells, D., W., 1988, Analysis and clinical significants of pteridins, Journal of Chromotography, 429:95-121.
- [24] Watcher, H., Fuchs, D., Hausen, A., 1989, Neopterin as a marker for activated cell-mediated immunity: immunologic basis and clinical application, Adv. Clin. Chem., 27: 81-141.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)**

- [25] Engin, A., B., Ergun, M., A., Yurtcu, E., Kan, D., Sahin, G., 2005, Effect of ionizing radiation on the pteridine metabolic pathway and evaluation of its cytotoxicity in exposed hospital staff, *Mutation Research*, 585, 184-192.
- [26] Murr, C., Schröcksnadel, K., Schönitzer, D., Fuchs, D., Schennach, H., 2005, Neopterin concentrations in blood donors differ between ABO blood group phenotypes, *Clinical Biochemistry* 38: 916-919.
- [27] Beigel, J., 2005, The emerging utility of neopterin?, *Clinical Immunology* 116: 1-2.
- [28] Zimmerman A., W., Jyonouchi, H., Comi, A., M., Connors, S., L., Milstien, S., Varsou, A. and Heyes, M., P.: Cerebrospinal fluid and serum markers of inflammation in autism, *Pediatric Neurology* 33 (3): 195-201, 2005.
- [29] Widner, B., Laich, A., Sperner-Unterveger, B., Ledochowski, M. and Fuchs D., 2002, Neopterin production, tryptophan degradation, and mental depression-What is the link?, *Brain, Behavior and Immunity* 16, 590-595.
- [30] Baird, S., K., Reid, L., Hampton, M., B., Giese, S., P., 2005 OxLDL induced cell death is inhibited by the macrophage synthesised pterin, 7,8-dihydroneopterin, in U937 cells but not THP-1 cells, *Biochimica et Biophysica* 1745, 361-369.
- [31] Kiliç, D., Boyunağa, H., Kaygusuz, S., Akgül, Ö., E., Rashed, El, M., Kenar, L., Erbil, K., Kutluay, T., 2002, Neopterin levels in nonreplicative HBV carriers, *Hepatology Research* 24, 18-22.
- [32] Akbulut, H., H., Bulut, S., Berilgen, M., S., Kansız, F., 2005, Serum neopterin levels in the patients of multiple sclerosis, *Türkiye Klinikleri J. Med.*, 25: 178-182.
- [33] Kökçam, I., Nazıroğlu, M., 2002, Effects of vitamin E supplementation on blood antioxidants levels in patients with Behçet's disease, *Clinical Biochemistry*, 35, 633-639.
- [34] Razumovitch, J., A., Semenkova, G., N., Fuchs, D., Cherenkevich, S., N., 2003, Influence of neopterin on the generation of reactive oxygen species in human neutrophils, *FEBS LETTERS*, 549, 83-86,.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)**

- [35] Durukan, H., A., Hürmeriç, V., Akgül, E., Ö., Erdem, Ü., Kılıç, S., Erbil, K., Bayraktar, Z., 2004, Üveitli olgularda idrar neopterin seviyesi ile hastalık aktivitesi arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi, *Medikal Network Oftalmoloji*, 11 (3), 238-242.
- [36] Mehta, P., D., Patrick, B., A., Dalton, A., J., Patel, B., Mehta, S., P., Pirttila, T., Coyle, P.K., 2005, Increased serum neopterin levels in adults with Down syndrome, *Journal of Neuroimmunology*, 164, 129-133.
- [37] Bozkurt, E., Gödekmerdan, A., Elbasan, Z., Alp, N., 2002, Akut koroner sendromlu hastalarda yeni bir inflamasyon göstergesi olan serum neopterin seviyeleri, *Türk Kardiyoloji Derneği Araştırması*, 30: 473-477.
- [38] Schroecksnadel, K., Winkler, C., Fuith, L., C., Fuchs, D., 2005, Tryptophan degradation in patients with gynecological cancer correlates with immune activation, *Cancer Letters* 223, 323-329.
- [39] Rieder, J., Lirk, P., Hoffman, G., 2003, Neopterin as a potential modulator of tumor cell growth and proliferation, *Medical Hypotheses*, 60: 531-534.
- [40] Razumovitch, J., A., Fuchs, D., Semenkova, G., N., Cherenkevich, S., N., 2004, Influence of neopterin on generation of reactive species by myeloperoxidase in human neutrophils, *Biochimica et Biophysica* 1672, 46-50.
- [41] Ayata, A., Genç, H., Sütçü, R., 2004, Çocukluk çağı enfeksiyonlarının tanı ve takibinde prokalsitonin, neopterin ve C-reaktif proteinin rolü, *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 2 (1): 11-17.
- [42] Kiepiela, P., Smith, A., N., Rosenberg, E., 2005, Laboratory markers associated with progression of HIV infection, *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 19 (2), 243-254.
- [43] Zangerle, R., Widner, B., Quirchmair, G., Neurauter, G., Sarcletti, M. and Fuchs, D., 2002, Effective antiretroviral therapy reduces degradation of tryptophan in patients with HIV-1 infection, *Clinical Immunology*, 104 (3): 242-247.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- [44] Altındağ, Z., Şahin, G., Kansu, E., Duru, S., 1995, Urinary neopterin levels in patient with leukemia, *New Journal of Medicine*, 29-32.
- [45] Walsh, D., S., Thavichaigarn, P., Pattanapanyasat, K., Siritongtaworn, P., Kongcharoen P., Tongtawe, P., Yongvanitvhit, K., Jiarakul, N., Dheeradhada, C., Pearce, F., J., Wiesmann, W., P. and Webster, H., K., 2005, Characterization of circulating monocytes expressing HLA-DR or CD71 and related soluble factors for 2 weeks after severe, non-thermal injury, *Journal of Surgical Research*, XX.
- [46] Soos, J., M., Polsky, R., M., Keegan, S., P., Bugelski, P., and Herzyk, D., J., 2003, Identification of natural antibodies to interleukin-18 in the sera of normal humans and three nonhuman primate species, 109, 188-196.
- [47] Pichler, R., Berg, J., Maschek, W., Schimetta, W., Steinwender, C., Hofmann, R., Leisch, F., 2004, Proinflammatory parameters as CRP and IL-6 do not discriminate between post-PCI cardiac patients with and without exercise-induced ischemia as indicated by TI-201 myocardial scintigraphy, *Cardiovascular Pathology*, 13, 299-305.
- [48] Alrashed, M., Abugoush, M., Akgül, E., Ö., Erbil, K., Boyunağa, H., Almarafi, A., Akman, Ş., Kutluay, T., 2002, Serum ve idrar neopterin düzeylerinin yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile saptanması ve klinik uygulaması, *Gülhane Tıp Dergisi*, 44 (3): 273-277.
- [49] Bayram, M., Bayram, O., Boyunaga, H., Ozer, G., 2004, A research on the level of urine neopterin to see if it may provide a vital clue for a provisional diagnosis of breast cancer in menopausal women, *Maturitas* 48, 432-437.
- [50] Wirleitner, B., Obermoser, G., Böck, G., Neurauter, G., Schennach, H., Sepp, N., Fuchs, D., 2003, Induction of apoptosis in human blood T cells by 7,8-dihydroneopterin: the difference between healthy controls and patients with systemic lupus erythematosus, *Clinical Immunology* 107, 152-159.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)**

- [51] Ormazabal, A., Cazorla, A., Fernandez, Y., Alvarez, E., Campistol, J., Artuch, R., 2005, HPLC with electrochemical and fluorescence detection procedures for the diagnosis of inborn errors of biogenic amines and pterins, *Journal of Neuroscience Methods* 142, 153-158,.
- [52] [www.neopterin.net/index.php?ContentCategoryId=53](http://www.neopterin.net/index.php?ContentCategoryId=53).
- [53] Lercher-Hammerer, A., Puschendorf, B., 2005, Possible placental exchange of neopterin as indicated by significant correlations in matched maternal neonatal blood samples at delivery, *Clinica Chimica Acta*, xx, xxxx.
- [54] Werner, E., R., Werner-Felmayer, G., Fuhs, D., Hausen, A., Reibnegger, R., Yim, J., J., Wachter, H., 1991, Biochemistry and function of pteridine synthesis in human and murine macrophages, *Pathobiology*, 59(4), 276-279.
- [55] Conard, F., Bodner, E., Fuchs, D., 1984, Determination of neopterin a marker of cellular immunity in gastrointestinal and pancreatic carcinoma, In: Pfeleiderer, W., Wachter, H., Curtius, H., C., *Biochemical and Clinical Aspects of Pteridines*, 357-366.
- [56] Çaksen, H., Üstündağ, H., B., Çiftçi, A., 1998, Neopterin ve klinik tanıdaki önemi, *Türk klinikleri pediatri*, 7: 206-213.
- [57] Gurfinkel, E., P., Scirica, B., M., Bozovich, G., Macchia, A., Manos, E., Mautner, B., 1999, Serum neopterin levels and the angiographic extent of coronary arterial narrowing in unstable angina pectoris and in non Q wave acute myocardial infarction, *Am J Cardiol* 83: 515-518.
- [58] Schumacher M, Halwachs G, Tatzber F, 1997, Increased neopterin in patients with chronic and acute coronary syndromes. *Journal of the American Collage of Cardiology*, 30, 703-707.
- [59] Anwaar, I., Gottasater, A., Lindgarde, F., Mattiasson, I., 1999, Increasing plasma neopterin and persistent plasma endothelin during follow-up after acute cerebral ischemia, *Angiology* 50: 1-8.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- [60] Mitaka, C., 2005, Clinical laboratory differentiation of infectious versus non-infectious systemic inflammatory response syndrome, *Clinica Chimica Acta*, 351, 17-29.
- [61] Mehmetođlu, İ., Gürbilek, M., Çağlayan, O., Koçyiđit, A., 2004, Klinik biyokimya laboratuarı el kitabı, Editör: Mehmetođlu, İ., Yelken Basım Yayım, Konya,.
- [62] Robey, F., A., 1984, Binding of the c-reactive protein to chromatin and nucleosome core particles possible physiological role of C-reactive protein, *J. Biol. Chem.*, 259: 7311-7316.
- [63] Goldberger, G., Bind, D., H., Sipe, J., D., 1987, Transcriptional regulation of genes encoding the acute phase proteins CRP, SAA and C<sub>3</sub>, *J. Immunol.*, 138: 3644-3648.
- [64] Cramer, E., B., Milks, L., C., Brontoli, M., J., 1986, Effect of human serum and some of its components on neutrophil adherence and migration across an epithelium, *J. Cell Biol.*, 102: 1868-1877.
- [65] Pebys, M., B., 1993, Rheumatoid arthirits: The role of acute phase proteins, *British J. of Rheum*, 32 (supp3): 1-2.
- [66] Volanakis, J., E., Narkates, A., J., 1983, Binding of human C<sub>4</sub> to C-reactive protein-pneumococcal C polysaccharide complexes during activation of the classical complement pathway, *Mol. Immunol.*, 20: 1201-1207.
- [67] Kilpatrick, J., M., Virella, G., 1985, Inhibition of platelet activating factor by rabbit C-reactive protein, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 337: 276-281.
- [68] Swaak, A., J., Van Royen, A., 1988, Niewenhuis, E., et al., Interleukin-6 (IL-6) in snovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis, *Scand. J. Rheum*, 17: 469-473.
- [69] Ellaurie, M., Calvelli, T., Rubinstein, A., 1992, Neopterin concentrations in pediatric human immunodeficiency virus infection as predictor of disease activity, *Pediatr Infect Dis*, 11: 286-289.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)**

- [70] Fuchs, D., Huasen, A., Reibnedder, G., 1988, Neopterin as a marker for activated cell-mediated immunity: application in HIV infection, *Immunology Today*, 9: 150-156.
- [71] Reibnegger, G., Auhuber, I., Fuchs, D., 1988, Urinary neopterin levels in acute viral hepatitis, *Hepatology*, 8: 771-774.
- [72] Horak, E., Gassner, I., Sölder, B., 1998, Neopterin levels and pulmonary tuberculosis in infants, *Lung*, 176: 337-34.
- [73] Yao, Y., M., Yu, Y., Wang, Y., P., 1996, Elevated serum neopterin level: its relation to endotoxaemia and sepsis in patients with major burns, *J. Clin. Invest.*, 26: 224-30.
- [74] Ruokonen, E., Ilkka, L., Niskanen, M., 2002, Procalcitonin and neopterin as indicators of infection in critically ill patients, *Acta Anaesthesiol Scand* 46: 398-404.
- [75] Tilg, H., Margreiter, R., Scriba, M., 1987, Clinical presentation of CMV infection in solid organ transplant recipients and its impact on graft rejection and neopterin excretion, *Clinical Transplantation*, 48: 37-43.
- [76] William, J., Saad, N., Salib, M., 1998, The acute effect of intravenously administered recombinant human erythropoietin on the immune response of uremic patients maintained on regular hemodialysis, *Artificial Organs*, 22: 192-96.
- [77] Garcia-Moll, X., Cole, D., Zouridakis, E., Kaski, J., C., 2000, Increased serum neopterin: a marker of coronary artery disease activity in women, *Heart*, 83: 346-355.
- [78] Sheldon, J., Riches, P., G., Soni, N., 1991, Plasma neopterin as an adjunct to C-reactive protein in assessment of infection, *Clin Chem*, 37: 2038-2042.
- [79] Fukushima, T., Nixon, J., C., 1980, Analysis of reduced forms of biopterin in biological tissues and fluids, *Anal Biochem* 102: 176-188.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)**

- [80] Fuchs, D., Möller, A., A., Reibnegger, G., 1990, Decreased serum tryptophan in patients with HIV-1 infection correlates with increased serum neopterin and neuroloic/psychiatric symptoms, *J Acquir Immune Defic Syndr*, 3: 873-876.
- [81] Hausen, A., Fuchs, D., Reibnegger, G., 1989, Neopterin in clinical use, *Pteridnes*, 1: 3-10.
- [82] Granditch, G., Fuchs, D., Hausen, A., 1990, Urinary neopterin as a marker for disease activity in children and adolescents with chron's disease pteridines, 2: 23-27.
- [83] Kawasaki, H., Watanebe, H., Yamada, S., 1988, Prognosic significance of urinary neopterin levels in patients with hepatocellular carcinoma, *Tohoku J. Exp Me*, 155: 311-318.
- [84] Prior, C., Fuchs, D., Hausen, A., 1987, Potential of urinary neopterin excretion in differentiating chronic non-A, non-B hepatitis from faty liver, *Lancet*, 2: 1235-1237.