

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KALITSAL METABOLİK HASTALIKLARDA OTOFAJİ, OKSİDATİF STRES VE
İNFLAMASYON İLİŞKİSİ

EDA ÖZAYDIN

MOLEKÜLER METABOLİZMA
DOKTORA TEZİ

ANKARA
2023

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KALITSAL METABOLİK HASTALIKLARDA OTOFAJİ, OKSİDATİF STRES VE
İNFLAMASYON İLİŞKİSİ

EDA ÖZAYDIN

MOLEKÜLER METABOLİZMA
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ali DURSUN

ANKARA
2023

**KALITSAL METABOLİK HASTALIKLARDA OTOfAJİ, OKSİDATİF STRES VE
İNFLAMASYON İLİŞKİSİ**

Dr. Eda Özaydın

Danışman: Prof. Dr. Ali Dursun

Bu tez çalışması 02.08.2023 tarihinde jürimiz tarafından 'Moleküler Metabolizma Doktora Programı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof.Dr. Rıza Köksal Özgül
Hacettepe Üni. Tıp Fak. Çocuk Sağlığı Enstitüsü

Üye: Prof.Dr. Fatih Süheyl Ezgü
Gazi Üni. Tıp Fak. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD

Üye: Prof.Dr. Mehmet Karaca
Aksaray Üniversitesi Moleküler Biyoloji ABD

Üye: Doç.Dr. Basri Gülbakan
Hacettepe Üni. Tıp Fak. Çocuk Sağlığı Enstitüsü

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Didem Yücel Yılmaz
Hacettepe Üni. Tıp Fak. Çocuk Sağlığı Enstitüsü

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

Prof.Dr. Müge Yemişçi Özkan
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır. Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim. Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

* Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. (1)

* **Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir.** (2)

* Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmişti

..... /...../.....

Dr.Eda Özaydın

1 “Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir.

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında zgn olduğunu, Prof.Dr. Ali DURSUN danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Doç.Dr.Eda ÖZAYDIN

TEŞEKKÜR

Moleküler Metabolizma doktora eğitimimle birlikte ‘Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları’ uzmanı olarak devam ettiğim meslek hayatım boyunca bana değerli katkıları olan, akademisyenlik ve vizyon açısından gelişmemde rehberlik eden başta tez danışmanım Prof.Dr. Ali Dursun’a, değerli hocalarım Prof.Dr. Turgay Coşkun’a, Prof.Dr. Ayşegül Tokatlı’ya, Prof.Dr. Serap Sivri’ye, tezimin her aşamasında bana yardımcı olan değerli hocalarım Prof.Dr. Rıza Köksal Özgül, Doç.Dr. Basri Gülbakan, Dr.Öğr.Üyesi Didem Yücel Yılmaz ve Dr.Öğr.Üyesi Selda Ayhan’a, her zaman desteğini esirgemeyen sevgili Dr. Rukiye Karatepe başta olmak üzere tüm doktora arkadaşlarıma (Damla Aygün, Neşe Vardar Acar, Buket Yurteri, Hatice Esra Gürses Cila, Can Koşukçu), sevgili Esin ve Fatma’ya, Metabolizma Bölümünden güzel insanlar Ayşegül’e ve Efendi Bey’e, doktora süresi boyunca beni destekleyen Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Çocuk Hastanesi yöneticilerine ve değerli çalışma arkadaşlarıma, her zaman yanımda olan sevgili aileme çok teşekkür ederim.

Doktora tezimi destekleyen Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeler Koordinasyon Birimi’ne de çok teşekkür ederim.

ÖZET

Özaydın E., Kalıtsal Metabolik Hastalıklarda otofaji, oksidatif stres ve inflamasyon ilişkisi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Metabolizma Doktora Tezi, Ankara, 2023. Kalıtsal metabolik hastalıklarda, hastaların klinik izlemi sırasında epilepsi, katarakt, hepatik yetmezlik, kronik böbrek hastalığı gibi komplikasyonlar gelişebilir. Bu çalışmanın amacı bu komplikasyonların gelişmesinde otofajik disfonksiyon, inflamasyon ve oksidatif stresin rolünü araştırmaktır. Klasik galaktozemi, akça ağaç şurubu hastalığı (MSUD), herediter tirozinemi tip 1, lizinürik protein intoleransı (LPI) tanılı 48 hasta ve 10 sağlıklı çocuk çalışmaya dahil edildi. Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarında otofaji (*Beclin 1*, *LC3B-II*, *p62*) ve inflamazom (*NLRP3*, *ASC*, *Kaspaz 1*, *NF-K β*) yolağında yer alan gen ve protein ekspresyonlarının analizi, oksidatif stres biyobelirteçlerinin (total tiyol, nativ tiyol, disülfid, tiyol/disülfid denge, total antioksidan kapasite ve total oksidatif stres) ve sitokin düzeylerinin ölçümü, lenfosit alt grupları ve lenfosit aktivasyon belirteçleriyle immun fenotiplendirme, hedefsiz metabolomik analizle metabolomik profillemeye çalışmaları gerçekleştirildi. En yüksek total tiyol, nativ tiyol, TAS ve TOS değerleri MSUD grubunda gözlemlendi. En yüksek disülfid ve en düşük TAS değerleri LPI grubunda saptandı. Hasta ve kontrol grupları arasında sitokin düzeyleri belirgin farklılık göstermedi. Bütün gruplarda *NLRP3/p62* gen ekspresyonları yükselmişti. En yüksek kat değişimleri galaktozemi ve LPI gruplarında gözlemlendi. Otofaji disfonksiyonu tüm gruplarda mevcuttu. *p62*, molekülü, antioksidan, otofaji ve inflamasyon yollarını birbirine bağlayan önemli bir oyuncu olarak görünmektedir. Çalışmamızda *NLRP3* gen ekspresyonları, katarakt geliştiren galaktozemi, akciğer tutulumu olan LPI grubunda ve hepatik fibrozis geliştiren tirozinemi hastalarında daha yüksek bulundu. İmmün fonksiyonlar açısından yapılan incelemede T ve B lenfositlerle, DNT, NKT, CD3HLADR, klasik ve klasik olmayan monosit düzeyleri açısından hasta gruplarında göre istatistiksel olarak belirgin farklılık gözlemlendi. Yolak analizlerinin PLS-DA istatistik yöntemi ile değerlendirilmesinde hasta gruplarında sağlıklı kontrol gruplara göre belirgin farklılaşmış metabolitler tespit edildi. Özellikle steroid biyosentezi, lipid, pürin-pirimidin metabolizması, enerji metabolizması gibi genel metabolik yollarda yer alan metabolitlerin hasta grubunda normal gruba göre değişkenlik gösterdiği saptandı. LPI hastalarının metabolomik profillemesi kronik inflamatuvar hastalıklarda etkilenen yollara benzerlik göstermekteydi. Çalışmamız intoksikasyon tip kalıtsal metabolik hastalıklarda, aynı anda inflamazom ve otofaji gen ve protein ekspresyonlarını, oksidatif stres, otofaji ve inflamasyon ilişkisini, immun fonksiyonları ve metabolomik profillemeyi araştıran ilk çalışmadır. Çalışmanın sonuçları metabolik hastalıkların patogeneğinde otofajik disfonksiyon oksidatif stres, inflamasyon ve immun disregülasyonun önemli rol oynayabileceğini gösterdi.

Anahtar Kelimeler: İnflamazom, otofaji, oksidatif stres, hedefsiz metabolomik analiz, kalıtsal metabolik hastalıklar

Destekleyen kurum: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Koordinasyon Birimi

(Proje No: THD-2019-18088)

ABSTRACT

Özaydın E., The relationship between autophagy, oxidative stress and inflammation in inherited metabolic diseases, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, PhD thesis in Molecular Metabolism, Ankara, 2023. The complications such as epilepsy, cataract, hepatic failure, chronic renal disease may develop during the clinical follow-up of the patients with inherited metabolic diseases. The aim of this study is to investigate the role of autophagic dysfunction, inflammation and oxidative stress in the development of these complications. Forty-eight patients with the diagnosis of classic galactosemia, maple syrup urine disease, hereditary tyrosinemia type 1, lysinuric protein intolerance and ten healthy children were included in the study. Laboratory investigations were performed such as analysis of autophagy (*Beclin 1*, *LC3B-II*, *p62*) and inflammasome (*NLRP3*, *ASC*, *Caspase 1*, *NF-K β*) gene and protein expressions, measurement of oxidative stress biomarkers (total thiol, native thiol, disulphid, thiol/disulphide homeostasis, total antioxidant capacity and total oxidative stress), cytokine levels, immune phenotyping with lymphocyte subgroup and lymphocyte activation markers, metabolomic analysis with untargeted metabolomic profiling in the patient and healthy control group. The highest levels of total thiol, native thiol, TOS and TAS were observed in MSUD group. The highest disulphide, the lowest TAC levels were detected in LPI groups. The cytokine levels showed no significant difference between patient and control group. In all groups, *NLRP3/p62* gene expressions increased. The highest fold changes were observed in the patients of galactosemia and LPI groups. Autophagy dysfunction was detected in all groups. *NLRP3/p62* gene expressions were positively correlated. *p62* seems to be a key player which links the antioxidant (Nrf2), autophagy and inflammation pathways in the patient groups. *NLRP3* gene expressions were found to be higher with specific clinical phenotypes such as cataract in galactosemia patients, lung involvement in LPI group or hepatic fibrosis in tyrosinemi patients. Significant statistical differences were observed with respect to T and B lymphocyte, DNT, NKT, CD3HLADR, classic and non-classic monocyte levels in the patient groups. PLS-DA analysis revealed statistically significant different metabolites in the patient group compared with healthy control group. The metabolites enriched in general metabolic pathways such as steroid hormone and aminoacid biosynthesis, lipid, purine-pyrimidine metabolism, energy metabolism were principally detected by metabolomic analysis in the patient group. The metabolomic profiling of LPI patients were resembling with the pathways affected in chronic inflammatory diseases. This is the first study which investigates the inflammasome and autophagy gene and protein expressions, the relationship between oxidative stress, autophagy and inflammation, immun functions and metabolomic profiling simultaneously in intoxication type inherited metabolic diseases. The results of the study revealed that autophagic dysfunction, oxidative stress, inflammation, immun dysregulation might play an important role under the pathogenesis of metabolic diseases.

Key words: Inflammasome, autophagy, oxidative stress, untargeted metabolomic profiling, inherited metabolic diseases

Supported by: Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project No: THD-2019-18088)

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	iv
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xv
GRAFİKLER	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kalıtsal Metabolik Hastalıklar	3
2.2. Toksik Metabolitler ve Amino Asit Metabolizması Bozuklukları	5
2.2.1. Galaktozemi	5
2.2.2. Akçaağaç Şurubu İdrar Hastalığı (MSUD)	6
2.2.3. Tirozinemi Tip 1	7
2.2.4. Lizinürik Protein Intoleransı (LPI)	8
2.3. Reaktif Oksijen Türleri, Redoks Sinyalizasyon, Oksidatif Stres ve Belirteçleri	10
2.3.1. Reaktif Oksijen Türleri	10
2.3.2. Redoks Sinyalizasyonu	11
2.3.3. Oksidatif Stres	12
2.4. Otofaji	17
2.4.2. Otofaji-oksidatif Stres İlişkisi	21
2.5. İnflamazom	22
2.5.1. NLRP3 Sinyalizasyon ve Aktivasyon Mekanizmaları	23
2.5.2. Otofaji-inflamazom İlişkisi	25
2.6. İmmun Sistem Hücre Fonksiyonları	26
2.7. Metabolomik	28
3. YÖNTEM VE GEREÇLER	32

3.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Seçilmesi	32
3.2. Biyolojik Örneklerin Toplanması	33
3.2.1. Serum İzolasyonu	33
3.2.2. Plazma İzolasyonu	33
3.2.3. Periferik Kandan Mononükleer Hücre (PBMC) İzolasyonu	33
3.3. Kalıtsal Metabolik Hastalıklarda Oksidatif Stres ve Disülfid/Tiyol Homeostazis Araştırılması	34
3.3.1. Total Tiyol, Nativ Tiyol ve Disülfid Ölçümü	34
3.3.2. TOS (Total oksidatif stres) / TAS (Total Antioksidan Seviye) Analizleri	34
3.3.3. Hücre İçi ROS Ölçümü	35
3.4. Otofaji ve İnflamazom Gen Ekspresyonlarının ve Hücre İçi Protein Düzeylerinin Ölçülmesi	35
3.4.1. Otofaji ve İnflamazom Gen Ekspresyonlarının RT-PCR ile Analizi	35
3.4.2. Hücre içi Protein Analizi	40
3.5. İmmun Fenotiplerin Araştırılması	42
3.5.1. Hücrelerin Çözünmesi	42
3.5.2. Hücre Kültürü Örneğinden Lenfosit Alt Grubu Çalışması	42
3.5.3. Hücre Kültürü Örneğinden Blastik Transformasyon (Lenfosit Aktivasyonu) Çalışması	43
3.5.4. Sitokin Düzeyi Ölçümü	44
3.6. Metabolomik Analizler	44
3.6.1. Örneklerin Alınması ve Saklanması	44
3.6.2. Plazma Örneklerinden Metabolit Özütlemesi	45
3.6.3. RP Kolonlar ile Ayrım ve LC-qTOF-MS Analizler	45
3.6.4. Ters Faz (C18) Kolonlar ile Ayrım ve LC-qTOF-MS Analizler	46
3.7. İstatistik Analizler	47
4. BULGULAR	48
4.1. Hasta ve Kontrol Gruplarında Serum Örneklerinde Oksidatif Stres Durumunun Araştırılması	48
4.2. Hücre İçi ROS Değerlerin Akım Sitometri ile Ölçümü	50
4.3. Otofaji ve İnflamasyon İlişkili Gen Ekspresyon Analiz Sonuçları	51
4.4. Hasta ve Sağlıklı Kontrol Gruplarında Gen Ekspresyonlarının Kat Değişimi	56
4.4.1. Hücre İçi Protein Analizi	60

4.5. İmmun Fenotiplendirme	65
4.5.1. Lenfosit Alt Grupları (Yüzde ve Mutlak Değerler)	65
4.5.2. Hasta ve Kontrol Gruplarının Monosit Fenotipleri Açısından Karşılaştırılması	67
4.5.3. Blastik Transformasyon (Lenfosit Aktivasyon) Sonuçları	68
4.5.4. Hasta ve Sağlıklı Kontrol Gruplara Ait Sitokin Düzeyleri	69
4.6. Metabolomik Profilleme	69
4.6.1. Galaktozemi	70
4.6.2. MSUD	73
4.6.3. Tirozinemi	75
4.6.4. LPİ	78
5. TARTIŞMA	82
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	94
7. KAYNAKLAR	97
8. EKLER	106
EK-1. Galaktozemi ve Kontrol Gruplarında Anlamlı Düzeyde Farklılaşan Metabolitler	
EK-2. Tirozinemi ve Kontrol Gruplarında Anlamlı Düzeyde Farklılaşan Metabolitler	
EK-3. MSUD ve Kontrol grubunda Anlamlı Düzeyde Farklılaşan Metabolitler	
EK-4. LPİ ve Kontrol Grubunda Anlamlı Düzeyde Farklılaşan Metabolitler	
EK-5. Dijital Makbuz	
EK-6. Turnitin Raporu	
EK-7. Etik Kurul Kararı	
9. ÖZGEÇMİŞ	118

SİMGELER ve KISALTMALAR

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
K	Kappa
BCKDH	Dallı zincirli α -ketoasit dehidrogenaz
DAMP	Hasar ilişkili moleküler tetikleyici
ER	Endoplazmik retikulum
GALT	Galaktoz-1-fosfat uridil transferaz
HLH	Hemofagositik lenfositik lenfositosis,
ICIMD	Uluslararası Kalıtsal Metabolik Bozukluklar Klasifikasyonu
IFN-γ	Interferon γ
KEAP-1	Kelch like ECH associated protein 1
KIC	Keto izokaproik asit
KMH	Kalıtsal metabolik hastalıklar
LC3	The microtubule-associated protein 1 light chain 3
LC-MS	Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi
LPI	Lizinürik protein intoleransı
LPS	Lipopolisakkarit
MDA	Malondialdehit
MSUD	Akçağaç şurubu idrar hastalığı
mTORC	Mammalian target of rapamycin complex
NF-$\kappa\beta$	Nükleer faktör-kappa β
NLR	NOD benzeri reseptörler
NLRP3	Nod-like receptor pyrin domain-containing 3
Nrf2	Nükleer faktör eritroid 2 ilişkili faktör 2
NT	Nativ tiyol
OSi	Oksidatif stres indeksi

PAP	Pulmoner alveolar proteinosis
PAMP	Patojen ilişkili moleküler parçacıklar
PDH	Pirüvat dehidrogenaz
PI3K	phosphatidylinositol- 3-phosphate kinase
ROS	Reaktif oksijen türleri
RT-PCR	Real-time polimeraz zincir reaksiyonu
TAS	Total antioksidan seviye
TBARS	Tiyobarbitürik asid-reaktif substance
TCA	Trikarboksilik asit
TLR	Toll benzeri reseptörler
TOS	Total oksidatif stres
TT	Total tiyol
Q-TOF	Kuadrupol-uçuş zamanı

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Kalıtsal metabolik hastalıkların sınıflandırılması (7).	5
2.2. LPI hastalığında fizyopatolojik yollar. (HLH; hemofagositik lenfohistiyositozis, PAP; pulmoner alveolar proteinosis) (20)	9
2.3. Oksidatif stresde hidrojen peroksidin rolü (42). (SOD: Superoksit dismutaz, ER:Endoplazmik retikulum)	13
2.4. Akut oksidatif stresde görevli sinyal yolları ve kronik stres zemininde gelişen kronik hastalıklar (43)	15
2.5. Otofaji çeşitleri: makrotofaji, mikrotofaji, şaperon aracılı (61).	18
2.6. Otofaji basamakları: Başlangıç, fagofor çekirdekleşme, otofagozomal oluşum (uzama), otofagozom-lizozom birleşmesi (otofagolizozom) ve kargo parçalanması (61).	20
2.7. Nrf2, NF-κB, p62 ve inflamazom ilişkisi (74)	22
2.8. İnflamazom aktivasyon mekanizmaları (79).	24
2.9. Farklı omik katmanları ve metabolomik analizler (102-104).	30

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
3.1. cDNA Örnek Hazırlama Reaksiyon Malzemeleri	37
3.2. Çalışılan genler ve primer dizileri (F:ileri primer,R: geri primer)	39
3.3. RT-PCR reaksiyon karışımı	39
3.4. Termal döngü basamakları	40
3.5. Lenfosit alt grup ve Blastik Transformasyon testlerinde kullanılan antikolar.	44
4.1. Hasta gruplarında oksidatif stres belirteç değerleri.	48
4.2. MSUD ve kontrol gruplarının oksidatif stres belirteç değerleri.	48
4.3. Galaktozemi ve kontrol gruplarının oksidatif stres belirteçleri.	49
4.4. Tirozinemi tip 1 ve kontrol gruplarının oksidatif stres belirteçleri.	49
4.5. LPI ve kontrol gruplarının oksidatif stres belirteçleri.	50
4.6. Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarının ROS ortalama değerleri .	51
4.7. Galaktozemi ve sağlıklı kontrol gruplarının <i>GAPDH</i> genine göre normalize edilmiş gen ekspresyon değerleri.	52
4.8. Kontrol ve LPI hasta gruplarının <i>GAPDH</i> genine göre normalize edilmiş gen ekspresyon değerleri.	53
4.9. Sağlıklı kontrol ve MSUD hasta gruplarının <i>GAPDH</i> genine göre normalize edilmiş gen ekspresyon değerleri.	54
4.10. Sağlıklı kontrol ve tirozinemi tip 1 hasta gruplarının <i>GAPDH</i> genine göre normalize edilmiş gen ekspresyon değerleri.	55
4.11. Gen Ekspresyonlarının Spearman Korelasyon Analizleri	60
4.12. Hasta Gruplarında Lenfosit Alt Grupları Yüzde Değerleri.	66
4.13. Hasta gruplarında lenfosit alt grupları mutlak değerler.	67
4.14. Hasta ve kontrol gruplarının monosit fenotipleri.	68
4.15. Hasta gruplarında blastik transformasyon (lenfosit aktivasyon) testi sonuçları.	68
4.16. Hasta ve kontrol gruplarının sitokin düzeyi ortalamaları.	69

GRAFİKLER

Grafik	Sayfa
3.1. RT-qPCR Amplifikasyon Eğrisi	38
3.2. RT-qPCR erime eğrisi	38
4.1. Hasta ve sağlıklı kontrol grubunun ROS değerleri.	51
4.2. Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında <i>ASC</i> gen ekspresyonu kat değişimleri.	56
4.3. Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında <i>Beclin 1</i> gen ekspresyonu kat değişimleri.	57
4.4. Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında <i>Kaspaz 1</i> gen ekspresyonu kat değişimleri.	57
4.5. Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında <i>LC3B-II</i> gen ekspresyonu kat değişimleri.	58
4.6. Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında <i>NFKB</i> gen ekspresyonu kat değişimleri.	58
4.7. Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında <i>NLRP3 gen ekspresyonu</i> kat değişimleri.	59
4.8. Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında p62 gen ekspresyonu kat değişimleri.	59
4.9. Galaktozemi hastalarında bazal ve LPS+ATP ile uyarılmış protein ekspresyon düzeyleri.	61
4.10. Tirozinemi hastalarında bazal ve LPS+ATP ile uyarılmış protein ekspresyon düzeyleri.	62
4.11. MSUD hastalarında bazal ve LPS+ATP ile uyarılmış protein ekspresyon düzeyleri .	63
4.12. LPİ hastalarında bazal ve LPS+ATP ile uyarılmış protein ekspresyon düzeyleri.	64
4.13. Sağlıklı kontrol bireylere ait bazal ve LPS+ATP ile uyarılmış protein ekspresyon düzeyleri.	65
4.14. Galaktozemi ve kontrol hastalarında olası metabolitlerin hiyerarşik kümelenmesini gösteren ısı haritası.	70
4.15. Galaktozemi ve kontrol gruplarının PLS-DA grafiği.	70
4.16. Volkan grafiği: Galaktozemi-kontrol gruplarında metabolomik profillemeye.	71
4.17. Galaktozemi hastalarında en fazla etkilenen metabolomik yollar.	72
4.18. MSUD ve kontrol hastalarında olası metabolitlerin hiyerarşik kümelenmesini gösteren ısı haritası .	73

4.19. MSUD ve kontrol grubunun PLS-DA grafiği.	73
4.20. Volkan grafiği: MSUD-Kontrol gruplarında metabolomik profillemeye.	74
4.22. Tirozinemi ve kontrol hastalarında olası metabolitlerin hiyerarşik kümelenmesini gösteren ısı haritası.	75
4.23. Tirozinemi ve kontrol grubunun PLS-DA grafiği.	76
4.24. Volkan grafiği: Tirozinemi-Kontrol gruplarında metabolomik profillemeye.	76
4.25. Tirozinemili hastalarında en fazla etkilenen yollar.	77
4.26. LPI ve kontrol hastalarında olası metabolitlerin hiyerarşik kümelenmesini gösteren ısı haritası.	78
4.27. LPI ve kontrol grubunun PLS-DA grafiği.	78
4.28. Volkan grafiği: LPI-Kontrol gruplarında metabolomik profillemeye.	79
4.29. LPI grubunda en fazla etkilenen metabolik yollar	79
4.30. LPI'de etkilenen metabolik yollarla ilgili hastalık grupları.	80

1. GİRİŞ

Kalıtsal metabolik hastalıklarda (KMH) gelişen komplikasyonların patogenezi oldukça karmaşıktır. Bu hastalıklar tek gen hastalıkları olmasına karşın hücre içi molekül trafiği ve bilgi akışı kısmen ya da bütünüyle bozulmakta ve bu nedenle pek çok metabolik hastalıkta genotip-fenotip ilişkisi yeterince kurulamamaktadır. Öte yandan kalıtsal metabolik hastalıkların klinik izlemi boyunca özellikle kronik dönemde gelişen komplikasyonların altında yatan mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. Diyet tedavisiyle çok iyi metabolik kontrol altında olduğu düşünülen hastalarda bile zamanla farklı organ tutulumları ve fonksiyon bozuklukları gelişebilmektedir. Proteinden kısıtlı diyet tedavisi veya hastalığa özgü farklı besinlerin kısıtlanması farklı metabolik süreçleri etkileyerek hastalıkların prognozunu değiştirebilmektedir. Bu durum metabolik hastalıkların bilinen patogenezi yanında farklı patofizyolojik süreçlerin varlığını düşündürmektedir. Öte yandan metabolik hastalıklarda oksidatif stres ve inflamasyon gibi metabolik süreçlerdeki dengesizliklerin ve bozuklukların kalıtsal metabolik hastalıkların özellikle uzun süreli organ fonksiyon bozukluklarının patogenezinde rol oynayabileceği ve genotip-fenotip ilişkisinin değerlendirilmesinde dikkate alınması gerektiği son yılların gündeme gelen konularının başında gelmektedir. Ancak bu hücresel süreçleri kontrol eden mekanizmalar ve bu süreçlerin metabolik hastalıkların patogenezindeki rolü henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Metabolik hastalıklarda biriken toksik metabolitler hasar ilişkili moleküler tetikleyici (DAMP) etkileri göstererek inflamazom yolağını harekete geçirebilir ve hücrede biriken reaktif oksijen türleri (ROS) ile redoks sinyalizasyon yolağındaki ifade artışı daha oksidatif ve daha inflamatuvar bir ortam oluşturabilir ve bu süreçler kalıtsal metabolik hastalıklarda görülen organ yetmezliklerine neden olabilir. Bu metabolik süreçlerdeki yolakların ve bu yolaklarda rol alan gen, gen ürünleri ve metabolitlerin çeşitliliği ve ilişki yumağındaki karmaşıklar, Mendelyen kalıtım gösteren KMH' daki genotip-fenotip ilişkisinin kurulmasındaki zorluğun nedenlerinden olabilir (1-3).

Bu çalışmada kalıtsal metabolik hastalıklarda toksik metabolit birikiminin otofaji, inflamasyon ve oksidatif stres süreçleri ile ilişkisi genomik, biyokimyasal,

immünolojik, metabolomik analizlerle araştırılarak metabolik hastalıklardaki rolü araştırılmaya çalışılmıştır. Çalışma kalıtsal metabolik hastalıkların moleküler temellerinin daha iyi anlaşılması, yeni biyobelirteçlerin keşfi ve yeni tedavi modalitelerinin geliştirilmesi konularında domino etkisi yapabilecek bir potansiyele sahiptir. Çalışma kapsamında 4 intoksikasyon tipi metabolik hastalıkta (galaktozemi, tirozinemi tip I, lizinürik protein intoleransı (LPI) ve akça ağacı şurubu hastalığında (MSUD) oksidatif stres ile otofaji ve inflamasyon yolağı genetik, metabolomik ve immünolojik yöntemler ile araştırılmıştır. Çalışma kapsamında;

- a. Hasta serum örneklerinde oksidatif stres belirteçlerinden 7 parametre (Total antioksidan seviye-TAS, Total oksidatif stres-TOS, Total tiyol, Nativ tiyol, Disülfit ve Tiyol/Disülfit oranı, oksidatif stres indeksi-OSI)
- b. Hasta kan mononükleer hücre örneklerinde otofaji ve inflamazom yolağında rol alan 7 genin (NLRP3, ASC, Kaspaz1, NF-KB, LC3B-II, p62 ve Beclin 1) ekspresyonlarının Real-time polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemiyle ölçülmesi, akım sitometri ile hücre içi protein düzeylerinin normal ve lipopolisakkarit (LPS) -ATP ile indükledikten sonraki düzeylerinin ölçülmesi,
- c. Plazma sitokin düzeylerinin ölçülmesi,
- d. Lenfosit alt gruplarını ve blastik transformasyon süreçlerinin değerlendirilmesi,
- e. Hasta plazma örneklerinde yüksek çözünürlüklü LC-MS/MS (kuadropol-uçuş zamanı, Q-TOF) kullanılarak hedefsiz metabolomik yaklaşımı ile metabolomik profilleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Kalıtsal Metabolik Hastalıklar

Kalıtsal metabolik hastalıklar (KMH) genel olarak genetik defekte bağlı yeni oluşan toksik bir madde veya ara metabolitin birikimine neden olan veya esansiyel metabolitin sentezini engelleyen enzimopatilerdir. Kalıtsal metabolik/nörometabolik hastalıkların büyük bir kısmı otozomal çekinik kalıtım gösteren tek gen hastalıkları olup genelde çoklu sistem etkilenmesi ile bulgu verir, erken tanı ve tedavi yapılmadığı takdirde çoğu kez hastanın ölümüne ya da ağır morbiditesine yol açar. Metabolik hastalıklar intoksikasyon tip, enerji eksikliği ve kompleks molekül hastalıkları olmak üzere temel olarak üç ana gruba ayrılır (4-6).

En son 2021 yılında yayınlanan Uluslararası Kalıtsal Metabolik Bozukluklar Klasifikasyonunda (ICIMD) yaklaşık 1450 bozukluk 24 grupta kategorize edilmiştir. '**Bozukluk**' tanımının kullanılması tek bir genetik nedenden ziyade tüm metabolik değişiklikleri ve genel fonksiyon bozukluklarını kapsamaması nedeniyle 'hastalık' tanımından daha uygun bulunmuştur. ICIMD'in amacı klinik sonuçlarından bağımsız olarak biyokimyasal yollardaki primer değişiklikleri yansıtmak için bir sınıflama yapmaktır (7). Bunlar;

- 1) Amino asid metabolizması bozuklukları
- 2) Peptit ve amin metabolizması bozuklukları (Glutatyon biyosentez ve rejenerasyon bozuklukları, dipeptidaz eksiklikleri, metilamin ve poliamin bozuklukları)
- 3) Karbonhidrat metabolizması bozuklukları (Galaktoz ve fruktoz metabolizması bozuklukları, glukoneogenezis, glikojen metabolizması, glikoliz, pentoz/polyol yolağı, heksoz transmembran transport ve emilim bozuklukları)
- 4) Yağ asidi ve keton cismi metabolizması bozuklukları (Mitokondrial yağ asidi oksidasyonu, karnitin metabolizması, keton cisim sentezi, yıkımı ve transportu bozuklukları)

- 5) Enerji substrat metabolizması bozuklukları (Pirüvat metabolizması, Krebs döngüsü ve kreatin bozuklukları)
- 6) Mitokondriyal DNA-ilişkili bozukluklar (Mitokondriyal DNA'yı etkileyen delesyon ve nokta mutasyonlar, tRNA ve rRNA kodlayan gen defektleri)
- 7) Nükleer genom ile ilişkili oksidatif fosforilasyon bozuklukları
- 8) Mitokondriyal kofaktör biyosentez bozuklukları (Koenzim Q10, lipoik asid, demir-sülfür kümeler, sitokrom c eksikliği)
- 9) Mitokondriyal DNA devamlılığı ve replikasyon bozuklukları
- 10) Mitokondriyal gen ekspresyon bozuklukları (Mitokondriyal transkript işleme ve modifikasyon, aminoaçil tRNA sentetaz ve mitoribozom bozuklukları)
- 11) Diğer mitokondriyal fonksiyon bozuklukları (mitokondriyal mekik ve taşıyıcı bozuklukları, protein import bozuklukları, protein kalite kontrol ve diğer mitokondriyal bozukluklar)
- 12) Metabolit onarım "proofreading" bozuklukları
- 13) Ara metabolizma bozuklukları (Gliksilat ve oksalat metabolizması bozuklukları)
- 14) Lipit metabolizması bozuklukları (gliserolipidler, gliserofosfolipidler, sfingolipidler, sterol lipid metabolizması bozuklukları)
- 15) Lipoprotein metabolizması bozuklukları
- 16) Nükleobaz, nükleotit ve nükleik asid metabolizması bozuklukları (Pürin ve pirimidin metabolizması bozuklukları)
- 17) Tetrapirrol metabolizma bozuklukları (Porfiriler)
- 18) Konjenital glikozilasyon bozuklukları
- 19) Organel biyogenez, dinamik ve etkileşim bozuklukları
- 20) Kompleks molekül degradasyon
- 21) Vitamin ve kofaktör metabolizması bozuklukları
- 22) Eser element ve metal bozuklukları
- 23) Nörotransmitter bozuklukları
- 24) Endokrin metabolizması bozukluklar



Şekil 2.1. Kalıtsal metabolik hastalıkların sınıflandırılması (7).

2.2. Toksik Metabolitler ve Amino Asit Metabolizması Bozuklukları

İntoksikasyon tip metabolik hastalıklar metabolik blok önünde biriken toksik metabolitlerin neden olduğu semptom ve bulgularla karakterize olup aminoasit metabolizması bozuklukları (**MSUD**, **tirozinemi tip 1**), organik asidemiler (propionik, metilmalonik ve izovalerik asidemi), üre döngüsü enzim defektleri ve karbonhidrat metabolizması bozuklukları (**galaktozemi**, kalıtsal fruktoz intoleransı) bu gruptandır.

2.2.1. Galaktozemi

Galaktozemi nadir görülen, çoklu organ tutulumuyla seyreden, tedavi edilmediğinde ölümlü sonuçlanabilen, otozomal çekinik kalıtılan bir karbonhidrat

metabolizması bozukluğudur. Erken dönemde galaktozdan kısıtlı diyet başlansa bile hastalarda uzun dönem komplikasyonlar gelişmektedir.

Galaktozeminin patogenezinde toksik metabolitlerin, galaktozun, galaktitol ve GAL1P'nin birikimi sorumlu tutulmaktadır (8). Yenidoğan tarama testleriyle diyet tedavisi başlanarak karaciğer yetmezliği önlenabilir. Zihinsel yetersizlik, infertilite ve düşük kemik dansitesi gibi uzun dönem komplikasyonlar ise engellenememektedir. Yapılan çalışmalar galaktozemideki uzun dönem komplikasyonların gelişmesinde Leloir yolağının dışında harekete geçen sinyal yollarının da etkisi olduğunu göstermektedir. *In-vivo* ve *in-vitro* çalışmalar GALT fonksiyonundaki bozukluğun oksidatif stres artışına ve PI3K/Akt yolağında azalan ifadeye neden olduğunu göstermiştir (9). Ancak bu farklı mekanizmalar arasındaki kompleks ilişki henüz anlaşılammıştır.

Ekzojen galaktoz toleransındaki bireysel farklılıklar (genotiple ilişkili), bozulmuş protein glikozilasyonu, oksidatif stres, endoplazmik retikulum (ER) stres, epigenetik regülasyon ve inflamatuvar yolların aktivasyonu gibi faktörler komplikasyonların gelişiminden sorumlu tutulmaktadır. Bu komplikasyonları engelleyecek gen temelli tedaviler ve enzim inhibitörleriyle ilgili pre-klinik ve klinik çalışmalar devam etmektedir (10).

2.2.2. Akçaağaç Şurubu İdrar Hastalığı (MSUD)

Akçaağaç şurubu hastalığı (MSUD) dallı zincirli α -ketoasit dehidrogenaz (BCKDH) kompleks aktivitesi eksikliğinden kaynaklanan bir metabolik hastalıktır. Majör klinik bulgular arasında nöbetler, ketoasidoz, apne, hipoglisemi, koma, ataksi, psikomotor gerilik ve mental retardasyon sayılabilir. MSUD hastalığının patogenezinde lösin ve ketoasitler gibi nörotoksik metabolitlerin sorumlu olduğu düşünülmekle beraber tam olarak etiyopatogenez aydınlatılamamıştır.

Hücrede lösin ve alfa keto izokaproik asit (KIC) birikimi nörotoksiteyi tetikler. BCKDH eksikliği KIC birikimine, pirüvat dehidrogenaz (PDH) inhibisyonu ve α -

ketoglutarat dehidrogenazın inhibisyonuna, bu da Krebs döngüsünde akışın azalmasına ve ATP depleksiyonuna neden olur. Lösin birikimi kreatin kinaz aktivitesini azaltarak ve antioksidan enzimler olan katalaz ve glutatyon peroksidazı inhibe ederek enerji üretiminde düşüklüğe ve oksidatif stresde artışa neden olmaktadır. Lösin tirozin ve triptofanın beyne girişini engelleyerek nörotransmitter (dopamin ve serotonin) sentezini azaltır (11).

Literatürde MSUD oksidatif stres ilişkisini ortaya koyan çalışmalar mevcuttur. Barschak ve ark. (12) plazmada oksidatif stres parametreleri olan tiyobarbitürik asid-reaktif substance (TBARS), total antioksidan reaktivite ve total oksidan status çalışmışlar, TBARS düzeyinde yükseklik ve TAR düzeyinde düşüklük saptamışlar, dallı zincirli aminoasit (valin, lösin, izolösin) düzeyleriyle oksidatif stres parametreleri arasında korelasyon bulamamışlardır.

MSUD hastalığında gelişen nörolojik etkilenmenin inflamasyon ve immun sistem aktivasyonu ile ilişkisini gösteren çalışmaların sayısı son yıllarda artmıştır. Scaini ve ark. yaptığı bir çalışmada sıkı diyet tedavisindeki MSUD hastalarında kan proinflamatuvar sitokin düzeyleri ve adhezyon moleküllerini kontrol grubundan daha yüksek düzeyde bulmuşlardır (13). Bu hastaların dallı zincirli amino asit düzeylerinin normal sınırlarda bulunması ilerleyici beyin hasarının fizyopatolojisinde inflamatuvar mekanizmaların sorumlu olabileceği fikrini desteklemektedir. Meshka ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada inflamasyon belirteçleri olan IL-1 β , IL-6 ve interferon-gama (IFN- γ) ve oksidatif stres belirteci olan malondialdehit düzeylerinde antioksidan etkili karnitin tedavisi sonrasında belirgin düşme olduğu saptanmıştır (14).

2.2.3. Tirozinemi Tip 1

Hereditör Tirozinemi Tip 1 (HT1) en sık görülen ve klinik tablonun en şiddetli olduğu tirozin ilişkili metabolik bozukluklardan biridir (15). Tirozinemi, tirozin yolağının son enzimi olan fumarilasetoasetat hidrolaz eksikliğine bağlı hepatomegali, siroz, koagülopati, akut/kronik karaciğer yetmezliğine neden olan şiddetli nekrotik

karaciğer hastalığıyla karakterizedir. Kronik karaciğer hasarı hepatoselüler karsinoma gelişme riskini artırır (16).

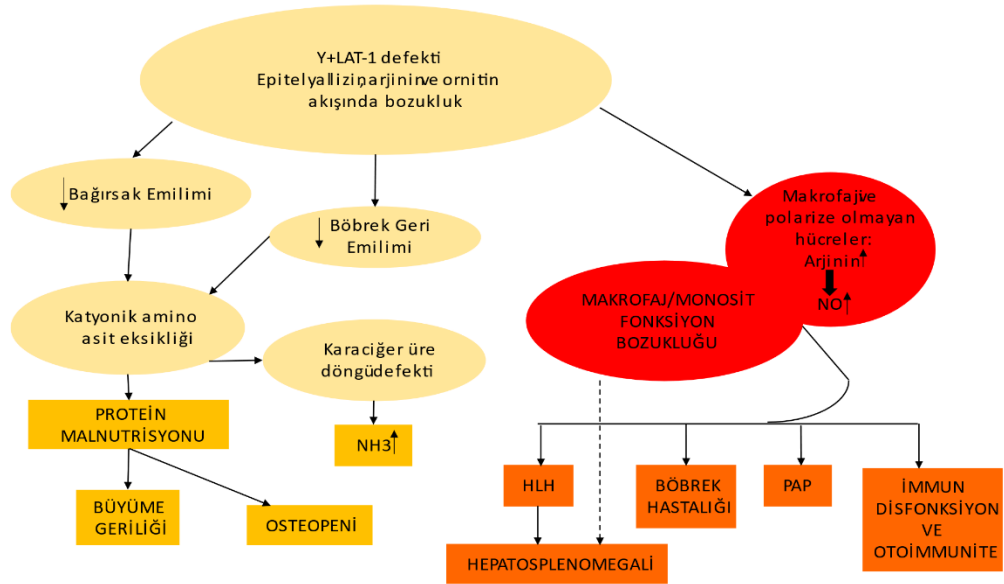
Tirozinemi ve oksidatif stres ilişkisini hayvan modellerinde araştıran makaleler literatürde mevcuttur. Yeni yapılan bir çalışmada NTBC tedavisine uyumsuzluğun Fah proteini negatif farelerde oksidatif stres, glutatyon metabolizması ve karaciğer rejenerasyonu ile ilgili yollara etkisi araştırılmıştır. Yedi günlük tedavi kesilmesinin süksinilaseton düzeyinde yükseklik, glutatyon deplesyonu ve hepatoselüler kanser gelişiminde önemli rolü olan Epcam proteininin düzeyinde artışa neden olduğu saptanmıştır. Kısa süreli tedavi kesilmesinin bile zararlı etkilerini ve NTBC 'nin koruyucu etkisini göstermesi açısından önemli bir çalışmadır (17). Aktuğlu ve ark. çalışmasında NTBC tedavisi altında tirozinemi tip 1 hastalarında disülfid/tiyol düzeylerinde yükseklik olmadığını göstermişler ve tedaviye uyumlu hastalarda oksidatif stresin önlenebileceğini belirtmişlerdir (18). NTBC tedavisi oksidatif stresi önleyici etkisine rağmen fibrozis ve hepatoselüler karsinom gelişmesini engelleyememektedir.

2.2.4. Lizinürik Protein Intoleransı (LPI)

Lizinürik protein intoleransı (LPI, OMIM 222700), katyonik amino asit transporteri γ -LAT-1'in hafif zincir alt ünitesi olan SLC7A7 geni tarafından kodlanan γ -LAT-1 protein eksikliği sonucu gelişir. Renal tübüller ve ince bağırsakta epitel hücrelerin basolateral membranında dibazik katyonik aminoasitler olan lizin, arjinin ve ornitin transportu bozulmuştur. LPI nadir görülen otozomal resesif geçişli bir hastalıktır (19).

γ -LAT-1 proteini renal tübüller ve ince bağırsak dışında akciğer, dalak, monositler ve makrofajlarda da ifadelenir. Hastalarda hematolojik ve immün sistem fonksiyon bozuklukları (sekonder hemofagositik lenfositosis, sitopeni) akciğer tutulumu (progresif alveolar proteinozis), renal problemler (mikroskopik hematüri, proteinüri, Fanconi sendromu, hipertansiyon ve hemodiyaliz gerektiren son dönem böbrek yetmezliği gibi), büyüme geriliği, protein intoleransı, hepatosplenomegali ve

osteoporoz görülür. Sekonder üre siklus bozukluğuna bağlı olarak nörolojik bozukluklar da bildirilmiştir (**Şekil 2.2**) (20).



Şekil 2.2. LPİ hastalığında fizyopatolojik yollar. (HLH; hemofagositik lenfositosis, PAP; pulmoner alveolar proteinosis) (20)

LPİ metabolik ve immünolojik mekanizmaların birlikte rol oynadığı bir hastalıktır. LPİ hastalarında klinik komplikasyonların gelişiminden transport defektinin ve hücre içi arjinin birikiminin sorumlu olduğu düşünülmektedir. Ancak immünolojik komplikasyonlar tam olarak açıklanamamıştır. SCL7A7 mutasyonlarının makrofaj fonksiyonlarını bozabileceği düşünülerek araştırmalar yapılmıştır. Barilli ve ark. (21) SLC7A7/y+LAT mutasyonlarının arjinin transport defekti dışında makrofaj fonksiyon bozukluğuna da neden olduğunu göstermişlerdir. Kurko ve ark.(22) yaptıkları çalışmada şeker, aminoasit, lipit ve enerji metabolizmasıyla ilgili yollarda metabolit düzeylerinde farklılıklar gözlemişlerdir. Özellikle kronik böbrek hastalığı (KBH) ile miyo-inozitol, treonik asit, galaktarik asit, 4-hidroksifenilasetik asit, indol-3-asetik asit ve beta-aminoizobütirik asit gibi metabolitler arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptamışlardır. Renal hücrelerde artmış oksidatif stres ve apoptozisin, üremik toksisitenin ve bağırsak mikrobiyotasındaki değişikliklerin KBH süreciyle ilişkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Aynı grubun yaptığı transkriptomik analiz çalışmasında katyonik ve nötral aminoasit taşıyıcılarını içine alan 926 genin farklı

ekspresyon gösterdiklerini tespit etmişlerdir (23). Fonksiyonel analizler bu farklılıkların inflamatuvar cevap, immun sistem ve apoptozis gibi biyolojik süreçlerle ilgili olduğunu göstermiştir. SLC7A7 dışındaki gen ekspresyon farklılıklarının LPI hastalarında farklı klinik tablolardan sorumlu olabileceği sonucuna varmışlardır.

2.3. Reaktif Oksijen Türleri, Redoks Sinyalizasyon, Oksidatif Stres ve Belirteçleri

2.3.1. Reaktif Oksijen Türleri

Reaktif oksijen türevleri (ROS) eşleşmemiş elektron taşıyıcıları nedeniyle oldukça reaktif ve oksijen taşıyan kısa ömürlü moleküllerdir. Süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksi radikal (OH^\cdot), hipoklorik asit, lipid peroksitler, “singlet” oksijen ve ozon en çok bilinen reaktif oksijen türevleridir. Süperoksit radikali ve hidrojen peroksit hücrel sinyalizasyonunda görev almaktadır. Süperoksit oluşuktan sonra hızlıca çevredeki moleküllerle reaksiyona girer veya spontan olarak veya süperoksit dismutaz yardımıyla hidrojen perokside dönüştürülür. Hidrojen peroksit daha kararlı, daha az reaktif molekül olması nedeniyle hücre membranlarını geçebilir, sistein ve methionin gibi aminoasitlerle reaksiyona girebilir veya Fenton reaksiyonu ile hidroksi radikale, myeloperoksidaz enzimi ile hipoklorik aside veya katalaz, peroksidaz veya peroksiredoksin ile suya dönüştürülür (24-26).

Hücredeki ana ROS kaynağı mitokondri olup elektron transfer zincirinde oluşan reaksiyonlar sonucu ortaya çıkar (27-28). Öte yandan sitokrom P-450 ve b5, lipoksigenaz, siklooksigenaz, α -ketoglutarat-dehidrogenaz, urat oksidaz, ksantin oksidaz, monoamin oksidaz, diamin oksidaz, poliamin oksidaz, aminooksidazlar gibi çok sayıda metabolik enzim reaksiyonları sonucu ROS ortaya çıkmaktadır (29). Bu enzimlerin çoğu mitokondri, ER, peroksizom ve sitozolde bulunur. Ayrıca NADPH oksidaz enzimleri de fagositik hücrelerde önemli ROS-üretici enzim grubudur.

ROS'un protein, lipit ve nükleik asitlere hasar yapıcı etkisi nedeniyle organizma evrimsel olarak özelleşmiş antioksidan enzimleri geliştirmiştir. Süperoksit dismutaz

(SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz, peroksiredoksinler, tiyoredoksinler, glutaredoksinler, sülfiredoksinler, glutatyon redüktazlar antioksidan enzimler yanında glutatyon, α -ketoglutarat, pirüvat, askorbat, oksaloasetat küçük enzimatik olmayan antioksidan moleküller de organizmada mevcuttur (30).

Hücre ROS düzeyi hücrenin fonksiyonlarının sağlıklı devam ettirilebilmesi açısından kritik bir öneme sahiptir. Fizyolojik düzeylerdeki ROS hücre için hayati öneme sahip pek çok yolakta görev almaktadır. Bu yollar kromatin dinamiğinin düzenlenmesi, NF- κ B, HIF- α , Nrf2 gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivitesinin kontrolü, apoptoz indüksiyonu ya da inhibisyonu, hücre içi sinyal aktivasyonu ya da inhibisyonu, hücrel etkileşim ve çapraz konuşmaya aracılık etme, fagositlerin patojenleri öldürmesi, hücre büyümesi, proliferasyon ve farklılaşma, ikincil habercilerin düzenlenmesi, otofaji indüksiyonu ya da inhibisyonuyla ilgili çok önemli sinyal yollarıdır (31).

2.3.2 Redoks Sinyalizasyonu

Fizyolojik konsantrasyonlarda ROS spesifik proteinleri modifiye ederek mesaj iletimini sağlayan ve hücrel yolları düzenleyen sinyal molekülleri olarak görev yapmaktadır, bu duruma *redoks sinyalizasyonu* denir (32). Oksidan ve antioksidan sistemler arasında dengesizlik olarak tanımlanan patolojik oksidatif stres kavramı, günümüzde moleküler veya hücrel düzeylerde *redoks sinyalizasyon bozuklukları* kavramına evrimleşmiştir. Sies ve Jones'a göre hücre metabolizması redoks koduna göre organize edilmektedir. Redoks kodu biyolojik sistemlerde uzaysal ve zamansal olarak nikotinamid adenin dinükleotit (NAD, NADP), tiyol/disülfid ve diğer redoks sistemlerini ve tiyol redoks proteomunu tanımlayan kurallar bütünüdür (33).

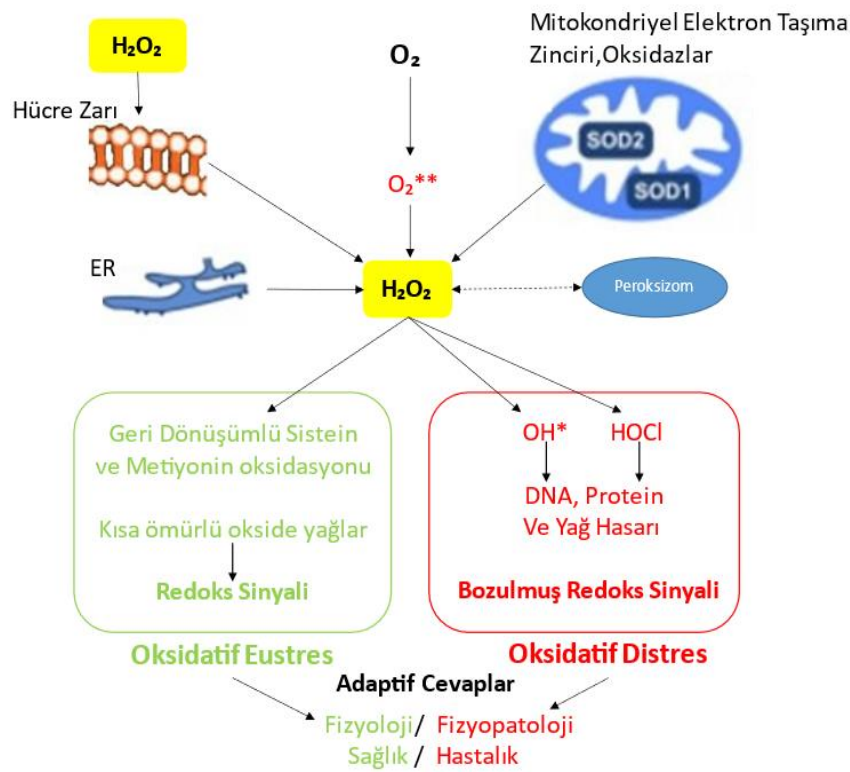
Hidrojen peroksit redoks sinyalizasyonda ve tiyol/disülfid reaksiyonlarında en fazla rol oynayan sinyal molekülüdür (34). H_2O_2 , antioksidan cevapta rol oynayan transkripsiyon faktör Nrf2 ve inflamasyonda görevli NF- κ B aracılığıyla enerji metabolizması ve inflamatuvar cevap arasında bağlantıyı sağlamaktadır (35).

Redoks sinyalizasyonunun moleküler, hücresel ve organ düzeyindeki etkileri uzun süredir bilinmektedir. Reaktif türler membranları geçerek ve/veya üretildikleri yerde proteinlerle etkileşime girerler. Redoks modifikasyonları geriye dönüşümsüz reaksiyonlarla hücre ölümüne ve organ fonksiyon bozukluğuna neden olurlar. Hücreler, redoks stresine karşı NADPH/NADP, GSH/GSSG ve Cys/Cys-SS oranını dengeleyerek ve enerji üretimini farklı yönler (glükoliz, yağ asidi oksidasyonu, pentoz fosfat oksidasyonu, aminoasit katabolizması) dönüştürerek oksidatif strese karşı adapte olmaya çalışırlar. Redoks sinyalizasyonu ve metabolik adaptasyonlar organ fonksiyonlarını etkileyen en önemli faktörlerdir (36).

Kalıtsal metabolik hastalıklarda oksidatif stres ile ilgili çalışmalar kısıtlı sayıdadır. Çalışmaların çoğu hayvan deneylerinde olup hastaların biyolojik örneklerinde yapılmış çalışmalar daha azdır. Homosistinüri, metilmalonik asidemi, propionik asidemi, glutarikasitüri oksidatif stresin literatürde dökümente edildiği başlıca kalıtsal metabolik bozukluklardır. Bozulmuş tiyol metabolizması ve mitokondriyal disfonksiyon bu hasta gruplarında kanıtlanmış ortak mekanizmalardır (2,37-41).

2.3.3. Oksidatif Stres

Redoks homeostazı olarak bilinen oksidan ve antioksidan reaksiyonlar arasındaki denge durumunun bozularak, biyolojik sistemde potansiyel hücresel hasara neden olması durumuna oksidatif stres denmektedir (42).



Şekil 2.3. Oksidatif stresde hidrojen peroksitin rolü (42). (SOD: Superoksit dismutaz, ER:Endoplazmik retikulum)

Fizyolojik düzeylerde ROS düzeylerinin olduğu oksidatif stres 'oksidatif eustres', olarak adlandırılırken aşırı ROS yüklenmesiyle organlarda oksidatif hasara ve hastalıklara neden olan durum için 'oksidatif distres' tanımlaması kullanılmaktadır (Şekil 2.3.)(42).

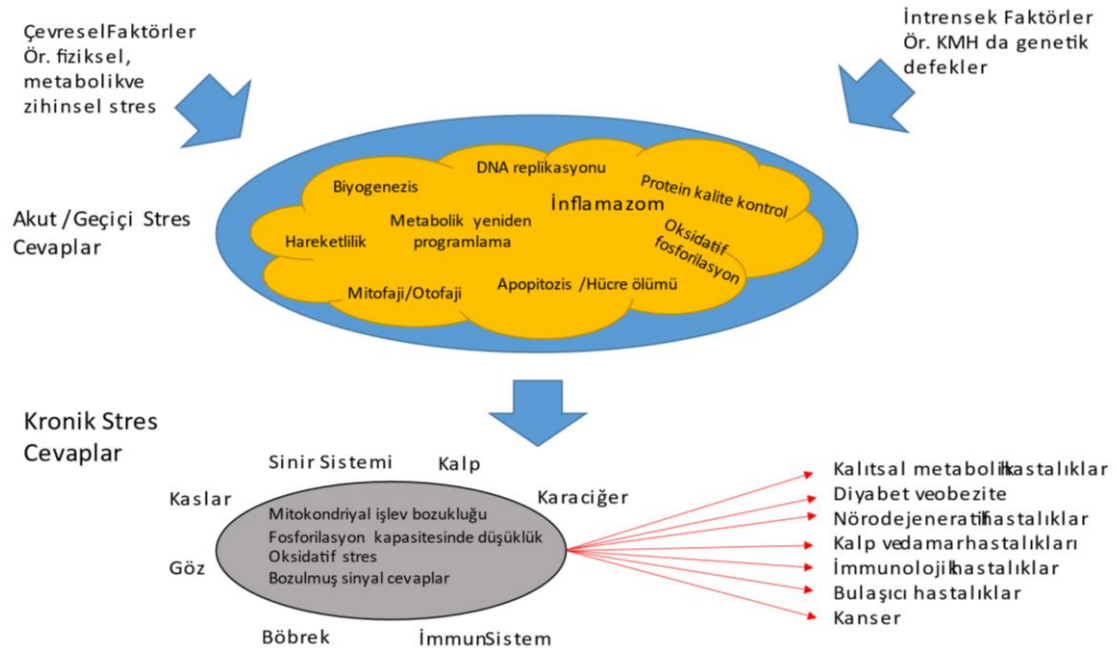
Hidrojen peroksit fizyolojik aralıklarda adaptif hücre cevabına, yüksek düzeylerde ise inflamatuvar cevap, büyüme duraklaması ve hücre ölümüne neden olmaktadır. Bu tabloların gelişmesine neden olan ROS veya H₂O₂ eşik düzeyleri bilinmemektedir. Bu konuyla ilgili çalışmalara ihtiyaç vardır.

Normal koşullarda hücre ROS düzeylerini kararlı hal seviyesinde tutmaya çalışmaktadır. Ancak ekzojen/endojen uyarılar ROS düzeylerini artırır ve akut oksidatif stres tablosu gelişir. Bu süreç antioksidan mekanizmalarla normal aralığa döndürülebilir ve önemli patolojiye neden olmaz. Sürekli ROS maruziyetinde ise

antioksidan mekanizmalar yeterli olmayacağı için kronik hastalıklara zemin hazırlamaktadır (43).

Organizmada hafif ve orta oksidatif stres durumlarında (kalori kısıtlaması, egzersiz gibi) mitokondriyal biyogenezis ve antioksidan, antiinflamatuvar, otofaji, protein kalite kontrol sistemleri gibi onarım mekanizmaları indüklenerek sağlıklı mitokondrilerin gelişmesine neden olurlar. Hücrenin düşük düzeylerde mitokondriyal hasara hücre savunma mekanizmalarını harekete geçirerek verdiği adaptif cevaba mitokondriyal hormezis veya *mitohormezis* denir. KMH gibi hücrenin sürekli yüksek ROS düzeylerine maruz kalması durumunda adaptif mekanizmalar yeterli gelmeyerek hücre inflamasyonu ve ölümü gerçekleşir. Bu durum KMH'da komplikasyonların gelişmesinde temel mekanizma olarak kabul edilmektedir (**Şekil 2.4**) (43).

Son yıllarda yapılan çalışmalar bazı kalıtsal metabolik hastalıkların (organik asitüriler, aminoasidopatiler, yağ asidi oksidasyon bozuklukları ve solunum zincir bozuklukları) fizyopatolojinde redoks dengesinin bozulmuş olabileceğini açıkça ortaya koymuştur. Genetik defektlerin neden olduğu metabolik yollarda veya hücresel işlevlerde bozuklukların spesifik olarak biyokimyasal profilde ortaya çıkardığı değişiklikler tanı koydurucudur (44-46). Toksik metabolitlerin birikimi mitokondriyal enzim ve süreçleri inhibe ederek mitokondriyal disfonksiyona, bozulmuş enerji metabolizmasına, ROS düzeylerinde artışa, antioksidan cevap yeteneğinde azalmaya ve oksidatif stres artışına neden olarak DNA, lipit ve proteinlerde hasara neden olmaktadır. Kalp ve beyin oksidatif strese daha duyarlı olmaları nedeniyle en fazla etkilenen organlardır (43). Literatürde oksidatif stres metabolik profillemesi yapılan hastalarda biyokimyasal ve klinik parametrelerle oksidatif stres belirteçleri arasında pozitif korelasyon saptanmıştır (47).



Şekil 2.4. Akut oksidatif streste görevli sinyal yolları ve kronik stres zemininde gelişen kronik hastalıklar (43)

Oksidatif stres belirteçleri

Biyolojik örneklerdeki oksidatif stresi karakterize eden klasik parametreler, DNA, lipitler ve proteinler gibi hücresel bileşenlerdeki oksidatif hasar, artan oksidan seviyelerindeki artış, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan düzeylerinde azalma ve hücresel redoks sistemindeki dengeler sayılabilir. Ekzojen antioksidanlar için A, C ve E vitaminleri örnek verilebilir. Endojen enzimatik olmayan antioksidanlar albümin, glutatyon, seruloplazmin, transferrin, laktoferrin, ürik asit, melatonin, haptoglobin, bilirubin, endojen enzimatik antioksidanlar arasında ise glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz, katalaz ve sitokrom oksidaz sayılabilir (48).

Oksidatif stres değerlendirilmesinde farklı belirteçler mevcuttur. Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan lipit hidroperoksitleri ve aldehitler TBARS (ThioBarbituric Acid Reactive Substances) olarak adlandırılır. Malondialdehit (MDA) eşdeğerleri olarak farklı metotlarla dokuda veya vücut sıvılarında ölçülebilirler. Hücre içi protein yapılar okside olduklarında yan zincirleri (prolin, arjinin, lizin ve treonin) üzerinde karbonil gruplar oluşur. Oksidatif stres sonucu oluşan protein karbonil

deriveleri (PCO) protein oksidasyonunun en yaygın kullanılan belirteçlerdir. DNA hasarını gösteren en önemli belirteçlerden birisi 8-hidroksi-2'-deoksiguanozindir (48).

Oksidatif stres ve antioksidan durum göstergesi olan parametreleri aynı anda ölçmek ve değerlendirmek çok zor ve masraflı olması nedeniyle genel durum göstergesi olabilecek laboratuvar parametreleri olan Total Antioksidan Kapasite (TAS) ve Total Oksidan Seviye (TOS) ölçümü tercih edilmektedir. Total Oksidan Seviye (TOS), TAS'a bölünerek Oksidatif Stres İndeksi (OSI) hesaplanmaktadır. TAS, TOS ve OSI değerleri organizmada oksidan/antioksidan terazisinin hangi yöne kaydığını göstermesi açısından da önem taşımaktadır.

Redoks sistemleri ile inflamasyon arasındaki bağlantının net olarak aydınlatılması için okside/redükte glutatyon (GSSG/GSH), disülfid/ nativ tiyol ve diğer redoks çiftleriyle yapılan çalışmalar son yıllarda önem kazanmıştır. Glutatyon hücredeki en önemli antioksidan savunma mekanizmasıdır. ROS düzeyindeki artışlar redükte glutatyon (GSH) düzeyinde azalmaya neden olacaktır. Okside glutatyonun (GSSG) redükte glutatyona oranı hücrel redoks dengesinin belirleyicisi olup farklı KMH'da oksidatif stres biyobelirteci olarak kullanılabilir (49).

Tiyoller (R-SH) karbon atomuna sülfür ve hidrojen bağlanmasıyla oluşan organik moleküllerdir. Oksidatif strese karşı aşırı duyarlıdır. Organizmadaki en önemli antioksidanlardan biridir. Albumin tiyoller, protein tiyoller, glutatyon, sistein, homosistein, gama-glutamil sistein tiyol havuzunu oluşturur (50).

Reaktif oksijen türleri fazla elektronlarını tiyol içeren bileşiklere aktararak disülfid bağlarını oluşturur. Oksidan-antioksidan dengenin sağlanması için disülfid bağları tekrar tiyollere indirgenir. Bu süreç **dinamik tiyol/disülfid dengesi** olarak tanımlanmaktadır. Tiyol/disülfid dengesinin sağlanması detoksifikasyon, antioksidan savunma, apoptozis, enzimatik aktivite, transkripsiyon faktörleri ve hücre sinyal iletimi gibi yolların düzgün çalışmasında önemlidir (51). Anormal tiyol/disülfid homeostazisi Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, Friedreich's ataksisi, multipl

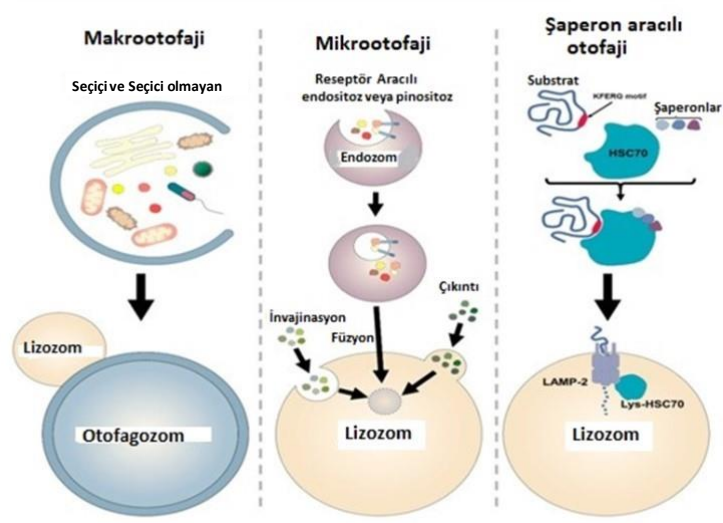
skleroz ve amiotrofik lateral sklerozis patogenezindeki nörolojik hasardan sorumludur.

Son yıllarda ülkemizden de KMH'da tiyol/disülfid dengesini araştıran çalışmalar yapılmıştır. MSUD hastalarında yapılan bir çalışmada serum disülfid/nativ tiyol, disülfid/total tiyol oranlarının kontrol grubundan farklılık göstermediği saptanmıştır (52). Cam ve ark. çalışmasında ortalama disülfid düzeyi, sülfid/nativ tiyol oranı ve disulfid/total tiyol oranlarını intoksikasyon tipi KMH'da (fenilketonüri, galaktozemi, üre siklus defekti) sağlıklı birey grubundan anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır (53).

2.4. Otofaji

Otofaji ökaryotik hücrelerde hayatın sürdürülebilirliği açısından çok önemli, evrimsel olarak iyi korunmuş hücrenin savunma mekanizmasıdır. Otofaji zararlı patojenleri, yaşlanmış-hasarlı organelleri, yanlış katlanmış ve mutant proteinleri otofagozom adı verilen çift membran kaplı veziküllerin içine alıp lizozomlara taşıyarak parçalanmasını sağlayan çok koordineli bir süreçtir (54-55).

Otofaji selektif olan ve selektif olmayan şeklinde iki gruba ayrılır. **Selektif olmayan otofaji**, indükleyici sinyal, etki zamanı, hedef tipi, lizozom transport yolağı gibi faktörlere bağlı olarak makrootofaji, mikrootofaji, şaperon aracılı olarak 3 gruba ayrılmaktadır(56).



Şekil 2.5. Otofaji çeşitleri: makrotofaji, mikrotofaji, şaperon aracılı (61).

Makrotofaji yaşlı ve agregre proteinleri veya hasarlı organelleri, intraselüler patojenleri selektif yok eden hücre kalite kontrol sistemidir. Otofajik yolak çift membranlı fagofor isimli yapının çekirdekleşmesi, uzaması ve otofagozom olarak isimlendirilen çift katlı vezikül oluşmasıyla karakterizedir. Otofagozom lizozomla birleşerek asidik ortamda parçalanmaktadır. Parçalanmış moleküller yeni hücre komponentleri oluşturmak üzere kullanılır (57,58).

Mikrotofajide, parçalanacak materyal lizozom zarından doğrudan alınarak parçalanmaktadır. Endozomal mikrotofajide endozomal sorting kompleks (ESCRT) sistemleri kritik rol oynamaktadır (59).

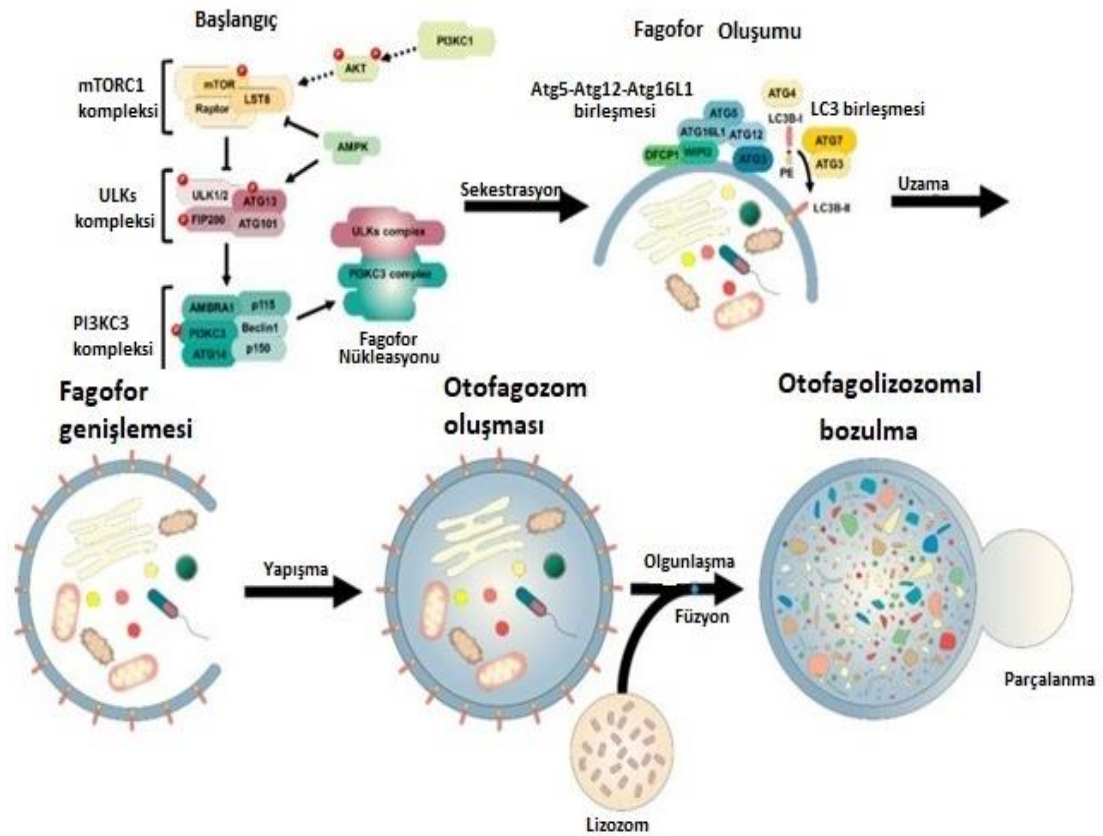
Şaperon aracılı otofaji sadece memeli hücrelerinde gerçekleşir, spesifik amino asit dizileriyle (KFERQ ilişkili pentapeptit içeren) proteinlerin spesifik olarak seçilerek parçalanmasını sağlar. "Heat shock cognate protein of 70 kDa" (HSC70) lizozom ilişkili membran protein-2A (LAMP-2A)'ya bağlanır ve hedef protein parçalanmak üzere lizozom içine alınır (**Şekil 2.5.**) (60,61).

Bu üç grup içerisinde otofajiyile sinonim kullanılan en aktif form makrotofajidir ve çok fazla sayıda hastalıkta çalışılmıştır. Beclin 1, p62, LC3 ve diğer korunmuş proteinler otofaji ilişkili proteinler olarak adlandırılmaktadır. Günümüze

kadar yaklaşık 31 otofaji ilişkili gen belirlenmiştir. Otofajinin ana düzenleyicileri mTOR (mammalian target of rapamycin) ve AMPK (adenosine monophosphate-activated protein kinase) sinyal yollarıdır. Beclin 1 otofajinin başlangıç aşamasında ve otofagozom oluşumunda kritik rol oynayan bir moleküldür (62).

LC3B proteini sitoplazmada ATG4 proteini tarafından glisin aminoasiti serbest kalacak şekilde enzimatik kesime uğrar ve sitoplazmada serbestleşir. LC3B-I olarak adlandırılan bu protein daha sonra ATG7 tarafından aktive edilerek, ATG3 proteini ve ATG5-ATG12-ATG16 kompleksi yardımıyla fosfatidiletanolamine (PE) kovalent bağlarla bağlanır. LC3B proteininin lipitlenmiş şekli LC3B-II olarak isimlendirilir. LC3B-II proteini otofagozomlar üzerinde yerleşir. Sitoplazmik LC3B-I proteininin otofagozoma bağlı LC3B-II'ye dönüşümüyle proteinin molekül ağırlığı değişir. LC3B-II'ye dönüşüm proteininin otofagozomlarda birikmesini ve otofaji uyarımını işaret ettiğinden dolayı, bu süreç bir otofaji belirteci olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (63).

Çok fonksiyonlu adaptör protein ve otofajik degradasyon belirteci olan p62; Nrf2 sinyalizasyonunu ve otofajiyi birbirine bağlamaktadır. p62 aracılığıyla otofajinin indüksiyonu mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stresin ortadan kaldırılması için çok önemlidir. Yapılan çalışmalar, aşırı ROS üretimi durumunda Nrf2 gen aktivasyonu ile p62'nin transkripsiyonunun ve ekspresyonunun düzenlenerek otofajinin indüklendiğini göstermektedir. p62 mRNA'sının ekspresyon seviyesi, seçici otofaji koşulları altında kademeli olarak artmaktadır. Nrf2'nin sürekli aktivasyonu sitotoksik olduğu için, Nrf2/Keap1/p62 yolu negatif olarak düzenlenerek pozitif bir geri besleme döngüsüne yol açar (64). Bir çalışmada p62 geninde fonksiyon kaybının çocukluk veya adolesan dönemde başlayan ilerleyici yürüme bozukluğu, ataksi, dizartri, distoni, yukarı bakış kısıtlılığıyla giden nörodejeneratif hastalığa neden olduğu göstermiştir (65).



Şekil 2.6. Otofaji basamakları: Başlangıç, fagofor çekirdekleşme, otofagozomal oluşum (uzama), otofagozom-lizozom birleşmesi (otofagolizozom) ve kargo parçalanması (61).

Selektif otofaji hücrenin yapısını ve hücre fonksiyonlarını koruyan temizleyici sistemdir. Mitofaji (mitokondri), lipofaji (lipidler), peroksifaji (peroksizom), ribofaji (ribozom), agrafaji (protein agregatları), retikülofaji (ER) selektif otofaji çeşitleridir. Mitofaji, inflamasyon ve inflamazomla en yakın bağlantısı olan otofaji şeklidir (66).

Fabry, Gaucher, Niemann–Pick A/B/C, mukopolisakkaridozların içinde bulunduğu lizozomal depo hastalıklarında bozulmuş otofaji yolağı bilinen bir mekanizmadır. Son yıllarda keşfedilen otofaji yolağındaki birçok tek-gen bozukluğu, “konjenital otofaji bozuklukları” olarak tanımlanmaktadır. Beyin malformasyonları, gelişme geriliği, zihinsel yetersizlik, epilepsi, immun ve hematolojik bozukluklar ortak klinik bulgulardır. Vici sendromu, herediter spastik paraplejiler, otozomal resesif ataksi sendromları, p62-ilişkili çocukluk veya adolesan çağında başlayan

nörodejenerasyon ve TBCK (TBC1 domain containing kinase) ensefalonöropatisi konjenital otofaji bozuklukları içerisinde yer alır (67).

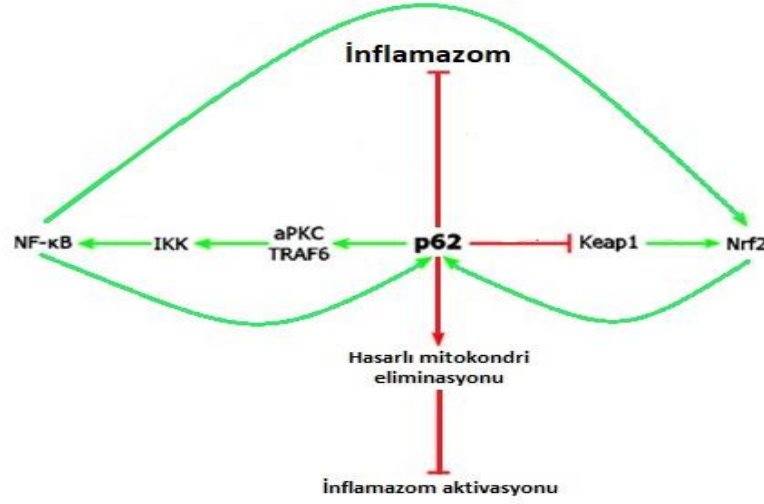
2.4.2. Otofaji-oksidatif Stres İlişkisi

Otofaji ile ROS arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalar sürmekle birlikte iki yönlü ilişki ve karşılıklı konuşmaların varlığı bilinmektedir. Hücrede redoks dengesinin sağlanması amacıyla ROS'un otofajiyi indükleyebildiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Tüm hücrelerde bazal düzeyde otofaji mevcuttur. Yanlış katlanmış/katlanmamış anormal protein agregatları, azalan mitokondri membran potansiyeli, ATP, enfeksiyon ve besin eksikliği gibi stres durumlarında ROS'un aşırı artışına cevap olarak otofaji yolağı hızlı şekilde aktive edilir (68-69). ROS, PI3K/Akt/mTORC1 sinyal yolağını farklı mekanizmalarla hem etkinleştirir hem de baskılamaktadır. ROS tarafından PI3K/Akt/mTORC1 yolağının baskılanması, otofaji aktivasyonuna neden olur. Mitokondriyal ROS (mROS), otofajik sinyalizasyonu yalnızca aktive etmez aynı zamanda inhibe eder. Otofaji, oksidatif strese karşı hücreyi ölümden korur, ancak otofajinin bozulmasıyla oksidatif stres tetiklenir.

Nükleer faktör eritroid 2 ilişkili faktör 2 (Nrf2) oksidatif strese ve doku hasarına karşı antioksidan enzimlerin ekspresyonunu düzenleyen anahtar transkripsiyon faktördür (70). KEAP-1, Nrf2'nin proteozomal yolla parçalanmasını sağlayan adaptör proteindir (71). Oksidatif strese yanıt olarak Nrf2, KEAP1'den ayrılarak antioksidan cevap elemente (ARE) bağlanır ve çekirdekteki hedef genleri aktive ederek antioksidan sistemi harekete geçirir. Otofajide Nrf2, oksidatif strese karşı p62 gen ekspresyonunu indükler ve p62 daha fazla Nrf2'yi aktive ederek, pozitif geri besleme döngüsünü oluşturur (72-74).

p62 antioksidan sistemin şefi Nrf2 ile inflamasyon sistemiyle ilişkili NF-κB arasındaki bağlantıyı sağlayan adaptör proteindir (Şekil 2.7). NF-κB proteini Nrf2'yi indükler. p62 normal şartlarda inflamazom bileşenlerini otofagozom içine alarak parçalar ve inflamasyonu baskılar. p62 hasarlı mitokondrilerin eliminasyonunu sağlayarak da inflamazom aktivasyonunu inhibe eder (74). P62 normal şartlarda

inflamazom oluşumunu önlemekle birlikte hastalık durumlarında aşırı oksidatif stres nedeniyle aberan p62 ekspresyonu p62-mitofaji dengesini bozar, hasarlı mitokondrilerin birikimine ve inflamazom aktivasyonuna neden olabilir.



Şekil 2.7. Nrf2, NF-κB, p62 ve inflamazom ilişkisi (74)

2.5. İnflamazom

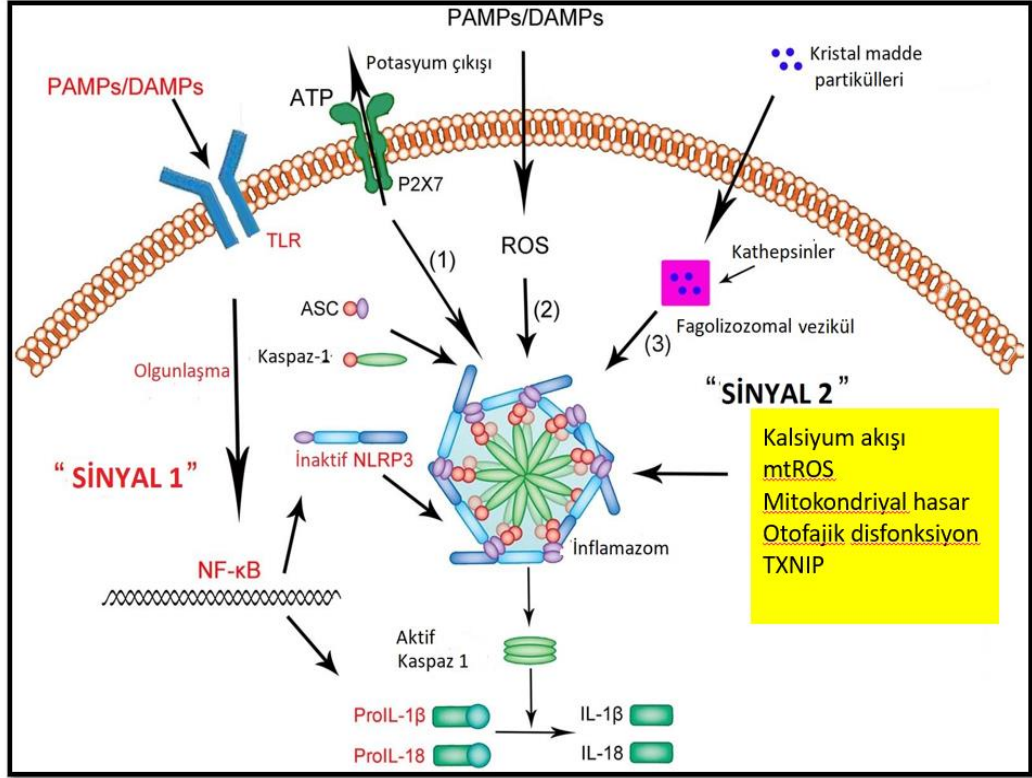
İnflamasyon zararlı patojenlere veya iritanlara cevap olarak evrimsel olarak korunmuş doğal bağışıklık sisteminin savunma mekanizmasıdır. Yetersiz inflamatuvar cevap persistan enfeksiyona neden olurken aşırı inflamatuvar cevap kronik inflamasyon ve hastalıklara neden olmaktadır. Hücre hasarına karşı inflamatuvar cevap enfeksiyonlardaki cevaba benzer olduğundan mikroorganizmalara karşı savunmada görev alan aynı konakçı reseptörler steril inflamasyon başlamasında da görev almaktadır. Patern tanıma reseptörleri (PRR) doğal bağışıklığın temel molekülleri olup, monositler, makrofajlar, nötrofiller ve dendritik hücrelerde eksprese edilirler. PRR arasında Toll benzeri reseptörler (TLR) ve NOD benzeri reseptörler (NLR) sayılabilir. PRR'ler mikroorganizmalardan kaynaklanan lipopolisakkarit (LPS) gibi patojen ilişkili moleküler parçacıkları (PAMP'ları) veya ATP gibi hücre hasarı sonucu açığa çıkan hasar ilişkili moleküler parçacıkları (DAMP'ları) tanır, mikrobiyal enfeksiyonu ortadan kaldırmak ve hasarlı dokuyu onarmak için inflamatuvar yolları indükler (3,75).

İlk kez 2002 yılında keşfedilen inflamazomlar mikrobiyal enfeksiyon ve hücre hasar gibi tehlikeli sinyallere karşı konak hücre tarafından oluşturulan sitozolik protein kompleksleridir (76). İnflamazom oluşumu için sensör olarak PRR, adaptör protein ASC (bir CARD içeren apoptozis ilişkili benek benzer protein) ve kaspaz 1'in birleşmesi gereklidir. Son yıllarda inflamazomlarla ilgili çalışma sayısı giderek artmaktadır. Literatürde iyi çalışılmış 4 tip inflamazom vardır: NLRP1, NLRP3, NLRC4, 'absent in melanom 2' (AIM2). İçlerinde en fazla dikkat çekici olan ve enfeksiyöz olmayan hastalık gruplarında çalışma yapılmış inflamazom tipi NLRP3 inflamazomdur. NLRP3, ASC ve kaspaz 1 proteinleri bir araya gelerek, ASC'nin NLRP3 proteinini çevrelediği, kaspaz 1'in ASC'ye tutunduğu konsantrik bir yapı oluşturur. Bu konsantrik organizasyona *NLRP3 inflamazom* adı verilir (77,78).

İnflamazomlar, tehlike sinyallerine yanıt olarak kaspaz-1'i aktiveleştirerek substratları pro-IL-1 β ve pro-IL-18'i parçalayabilen ve aktif formları olan interlökin-1 (IL-1) ve interlökin-18 (IL-18) sitokinlerin salgılanmasına neden olan protein kompleksleridir. İnflamazomlar aktif kaspaz-1 yoluyla pro-IL-1 β ve pro-IL-18 substratlarının yanında gasdermin-D olarak bilinen bir sitozolik proteini de aktive etmekte ve bu substratların her birini aktif formlarına ayırabilmektedir. Gasdermin'in aktivasyonu hücre zar bütünlüğü bozularak "piroptozis" olarak bilinen hücre ölüm süreci başlamaktadır. Piroptozis, apoptozisten farklı olarak komşu hücrelerde daha fazla inflamasyona neden olarak kronik inflamasyon sürecini tetikler (3,75).

2.5.1. NLRP3 Sinyalizasyon ve Aktivasyon Mekanizmaları

İmmün hücrelerde inflamazom oluşumunun başlatılabilmesi için 'priming' birincil sinyali (sinyal 1) gereklidir. Birinci aşamada PAMP veya DAMP'lar TLR'ler tarafından tanınır ve daha sonra inflamazomla ilgili bileşenlerin (NLRP3, pro-IL-1 β , pro-IL-18) transkripsiyonlarını tetikleyen NF- κ B aracılı sinyalizasyon gerçekleşir. Bu hazırlık aşaması genellikle *in vitro* deneylerde lipopolisakkarit (LPS) kullanılarak çalışılmaktadır. İkinci sinyalizasyonla inaktif durumdaki NLRP3 inflamazomun aktivasyonu gerçekleşir (79).



Şekil 2.8. Inflamazom aktivasyon mekanizmaları (79).

Literatürdeki bilgiler doğrultusunda, NLRP3 aktivasyonunun 3 yolla gerçekleştiği ileri sürülmektedir (80,81).

- 1) İyonik akış: K hücre dışına çıkması NLRP3 inflamazom oluşumunu tetiklemektedir. Kalsiyum mobilizasyonu, Na ve Cl akışlarının da etkili olduğunu gösteren çalışmalar olmakla birlikte kesin olarak kanıtlanmamıştır.
- 2) ROS ve mitokondriyal disfonksiyon: Mitokondriyal solunum zincirinin inhibisyonu ile üretilen mtROS'un NLRP3 inflamazomunu aktive edebildiği literatürde bildirilmiştir. ROS inflamazom aktivasyonu için ortak bir sinyal olarak önerilmektedir.
- 3) Lizozomal disfonksiyon: Hücre içine giren uyarıcı moleküller (kolesterol, amiloid-β, monosodyum urat, kalsiyum kristalleri) lizozom membran potansiyelini değiştirerek stabilitesini bozarlar. Lizozomal hasar sonucunda

sitoplazmaya çıkan katepsin B ve diğer lizozomal enzimlerin inflamazomları aktive ettiği düşünülmektedir. Ancak bu mekanizmanın da aydınlığa kavuşması gerekmektedir.

Ateroskleroz, diabet, Alzheimer gibi hastalıklar NLRP3 aktivasyon bozuklukları olarak bilinmektedir. NLRP3 genetik bozuklukları arasında ise eski ismiyle periyodik ateş sendromları, günümüzde kriyopirin ilişkili periodik sendromlar (CAPS) olarak bilinen otoinflamatuvar hastalıklar sayılabilir (82). Bu hastalık grubu için 'inflamazomopatiler' adlandırılması da kullanılmaktadır.

Son on yıldır, NLRP3 inflamazom aktivasyon mekanizmasının aydınlatılması için yoğun araştırmalar sürdürülmektedir. Ancak inflamazom aktivasyon mekanizması henüz tam olarak anlaşılammıştır. NLRP3 inflamazomun aşırı aktivasyonu zararlı kronik inflamasyonun ve buna bağlı organ hasarının başlıca nedenidir. Bu nedenle önemli bir terapötik hedef durumuna gelmiştir.

2.5.2. Otofaji-inflamazom ilişkisi

İnflamatuvar hastalıkların gelişiminde en önemli mekanizmalardan biri inflamazom aktivasyonudur. Son 10 yılda otofaji-inflamazom ilişkisini araştıran çalışmalar büyük ivme kazanmıştır. Otofaji hücre içi hasarlı organellerin ve proteinlerin parçalanmasını sağlayan önemli bir koruyucu mekanizmadır. Otofajik fonksiyon bozuklukları aşırı inflamasyon ve inflamazom aktivasyonuna neden olarak inflamatuvar hastalıklara zemin hazırlar. NLRP3 inflamazom çok fazla hastalığın ortaya çıkması, gelişmesi ve prognozunda önemli rol oynamaktadır. Hepatit, intestinal inflamasyon, nefropati, inflamatuvar akciğer hastalıkları, santral sinir sistemi hastalıkları, sepsis, osteoartrit ve obesite bu hastalıkların içersindedir.

Literatürde kalıtsal metabolik hastalıklarda inflamazom gen ekspresyonlarını araştıran makale sayısı yok denecek kadar azdır. Aflaki ve ark. çalışmasında Gaucher hastalarının makrofajlarında bozulmuş otofajiye bağlı inflamazom aktivasyonunu göstermiştir (83). Gaucher makrofajlarında otofajik adaptör p62 düzeylerindeki

artışın inflamazomların otofagozom içine alınarak parçalanmasını engellediği gösterilmiştir. Ayrıca p62'deki bu artış NF- κ B aktivasyonuna yol açarak inflamatuvar sitokinlerin artışına ve IL-1 β 'nin salgılanmasına neden olmuştur. Bu yeni mekanizmayla lizozomal işlev bozukluğunun inflamazom aktivasyonu ile ilişkisi gösterilmekle birlikte masif organomegali, kemik tutulumu ve Gaucher hastalarında görülen bazı malignitelere karşı yatkınlığın da bu mekanizmayla ilişkili olabileceğini ortaya koymuşlardır. Ayrıca lizozomal depolama, bozulmuş otofaji ve inflamasyon arasındaki bu bağlantının hem Parkinson hastalığı hem de yaşlanma süreci ile ilgili etkileri olabilir. Bu temel hücresel işlemlerdeki kusurların aydınlatılması yeni terapötik hedeflerin keşfi açısından önem taşımaktadır.

İntoksikasyon grubu KMH'da inflamazom-otofaji ilişkisini araştıran çalışma literatürde bulunmamaktadır.

2.6. İmmun Sistem Hücre Fonksiyonları

Periferik kan mononükleer hücreler (PKMH) tek yuvarlak nükleus taşıyan kan hücreleridir. PKMH'ler farklı sınıflardaki immün hücrelerden oluşmaktadır. T hücreleri %70, B hücreleri %15, monosit %5, dendritik hücreler %1 ve doğal öldürücü hücreler %10 civarında bulunmaktadır (84).

Double-negatif T hücreleri (DNT) (CD3+CD4-CD8-) olgun T hücrelerinin alt grubu olup immünolojik ve inflamatuvar dengeyi düzenleyici önemli rolleri vardır. Otoimmün ve inflamatuvar hastalıklarla ilişkisi bilinmektedir (85). Literatürde intoksikasyon grubu KMH'da DNT düzeylerini araştıran çalışma mevcut değildir.

Doğal öldürücü hücreler (NKT) doğal ve adaptif immün sistem hücrelerinin özelliklerini taşır. Karaciğer, dalak, lenf nodu ve yağ dokusunda farklılaşarak spesifik özellikler kazanarak pro-inflamatuvar veya immünmodulator özellikleri kazanırlar. NKT hücrelerinin otoimmün hastalıklarda, astım, enfeksiyonlarda ve antitümör cevapta önemli rolleri deneysel modellerde ve insanlarda yapılan çalışmalarla ortaya

konmuştur (86). Literatürde NKT hücreleriyle lizozomal depo hastalıklarının bağlantısını gösteren çalışmalar mevcuttur.

Monositler doğal immun sistemde önemli rolleri olan hücrelerdir. Monositlerin heterojen doğası ve makrofajlara veya dendritik hücelere farklılaşma kabiliyeti doğal ve adaptif immun sistem arasında önemli köprü görevleri vardır. İnsanlarda CD14 ve CD16 yüzey protein ekspresyon düzeylerine bağlı olarak 3 tip monosit alt grubu vardır: Klasik monosit (CD14⁺⁺, CD16⁻), intermediate (CD14⁺⁺, CD16⁺) ve klasik olmayan monosit (CD 14⁺, CD16⁺⁺). Transkriptomik analizlerle bu hücrelerin farklı fonksiyonel özellikleri tanımlanmıştır (87,88).

Klasik monositler periferik kandaki monositlerin %85-90'ını oluşturan yüksek derecede fagositik ve önemli çöpçü hücrelerdir. Intermediate hücreler %8-10 oranında bulunur. Bu hücreler ROS sentezi, antijen sunumu, inflamasyon, T hücrelerin proliferasyonu ve aktivasyonunda, angiogenezisde görev almaktadırlar. Klasik olmayan monositler ise dolaşımda %2-11 oranında bulunur. Zedelenme sonrasında endotele yapışırlar ve inflamatuvar sitokinlerin salınımına neden olurlar. Antijen sunulmasında ve T hücre aktivasyonunda görev almaktadır (89). Literatürde KMH'da monosit fenotiplerinin araştırıldığı çalışmaya rastlanmamıştır. LPI hastalarında monosit ve makrofaj fonksiyonlarıyla ilgili çalışmalar mevcuttur.

T lenfositlerin biyolojisinde ROS büyük önem taşımaktadır. Nötrofillerden veya makrofajlardan üretilen ROS, T lenfositlerin sinyalizasyonunu, aktivasyonunu, proliferasyonunu ve canlılığını negatif yönde etkiler. Bunun infeksiyon bölgesinde aşırı inflamasyonu önlemek için bir adaptasyon mekanizması olup olmadığı tam anlaşılamamıştır. Hidrojen peroksit uygulanan T hücrelerinde en dirençli hücreler efektör ve regülatör T hücreler, en duyarlı ise naif ve hafıza T hücreler olarak tespit edilmiştir. Makrofajlar ve dendritik hücreler T lenfositleri ROS'dan korumak amacıyla kronik inflamasyon sürecinde glutasyon prekürsörü olan sistein salgılar. ROS ve antioksidanlar arasındaki denge T hücrelerin düzgün fonksiyon görmesi için çok

önemli olup, dengenin bozulması T hücrelerinde aktivasyon artışına veya azalmasına neden olmaktadır (89-90).

2.7. Metabolomik

Hücrelerde, organlarda ve organizmalarda oluşan kimyasal reaksiyonların toplamına 'metabolizma' adı verilmektedir. **Metabolit**; insan vücudunda meydana gelen biyokimyasal reaksiyonlara katılan veya bu reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan düşük molekül ağırlıklı kimyasal bileşenlere verilen genel addır. Metabolomik kavramı "omics" dünyasına genomik, transkriptomik ve proteomik arkasından en son eklenmiş alan olmakla birlikte gerçek fenotipe en yakın olan bilimdir. Genomik ve çevresel etkileri çok iyi yansıtabilmesi nedeniyle sadece hastalık mekanizmalarıyla ilgili bilgi vermekle kalmayıp ayrıca tanı ve tedavi konusunda da yol göstericidir (Şekil 2.9) (91-93).

Vücutta bulunan metabolitlerin tümü metabolom terimi ile ifade edilir. Metabolomik mümkün olduğunca fazla sayıda metabolitin ileri analitik tekniklerle ölçülmesidir. Metabolomik profillemede altın standart yöntem yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisidir. Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi yönteminin örnek hazırlanmasının kolaylığı, kesin yapısal özellikleri göstermesi gibi avantajları vardır ancak mikromolar düzeyinde metabolitleri profilleyebilir. Düşük sensitivitesi ve sınırlı sayıda metabolit tanımlaması nedeniyle kütle spektrometri (MS) yöntemi NMR'a tercih edilmektedir. MS; nanomolar düzeyinde metabolitlerin ölçümünü yapabilir. Sıvı kromatografi veya gaz kromatografi yöntemleriyle metabolitlerin ayrımını polaritesine veya uçuculuğuna göre gerçekleştirebilir. Kütle spektrometri (MS/MS) ise fragman analiziyle metabolitlerin tanımlanmasına yardımcıdır (94,95).

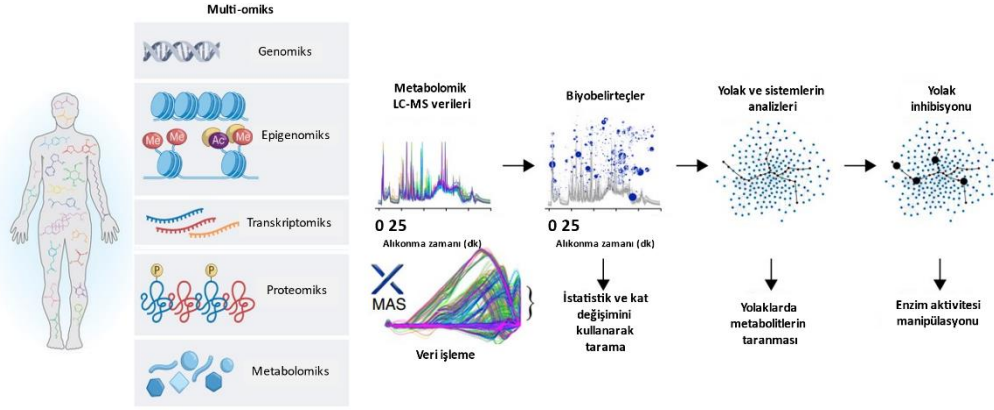
Kütle spektrometri tabanlı metabolomik 3 basamakta gerçekleştirilir: örnek hazırlanması, verilerin elde edilmesi ve verilerin yorumlanması (96). Bu basamakların hepsi deney planına uygun olarak optimize edilmelidir. Hedefli ve hedefsiz metabolomik olarak 2 yöntem vardır. Hedefsiz metabolomiğin majör avantajı beklenmedik metabolik değişikliklere karşı tarafsız yaklaşımı mümkün kılmasıdır. Bu

durum yeni biyobelirteçlerin keşfi açısından büyük önem taşımaktadır. Ancak çok fazla metabolit tanımlanamayabilir ve her metabolit için uygun ekstraksiyon protokolü olmayabilir. Hedefli metabolomik için önceden tanımlanmış metabolit seti mevcuttur. Bu metaboliklerdeki bozukluklar ve etkilenen yollar bilindiği için ekstraksiyon protokolü de buna uygun olarak optimize edilebilmektedir. Internal standartların kullanılmasıyla hedefli metabolomik ölçümleri yarı kantitatif olabilmektedir (97-99).

2005 yılında İnsan Metabolom Projesi Dr. Wishart (Alberta Üniversitesi,Kanada) tarafından başlatılmıştır. 2005 yılında ilk veri bankası METLIN Scripps Araştırma Enstitüsü tarafından kullanıma açılmıştır, bu dönemde 10.000'den fazla metabolit ve kütle spektrometri verisi bulunmaktaydı. 2016 Nisan ayında METLIN veri tabanında metabolit sayısı 242.032'ye ulaşmıştı (100).

Klinisyenler için tanısal testlerin birincil amacı etkili tedavisi bulunan hastalıkların tanısının en kısa sürede konulmasıdır. Bu tedavi yöntemleri ise genellikle spesifik metabolik boğun neden olduğu metabolik defektin tedavisi etmeye yöneliktir. Bu metabolik regülasyon bozukluğunun neden olduğu sekonder hücrel adaptasyonlar ise dikkate alınmamaktadır.

Günümüzde enzim eksikliğinin etkilediği çoklu yollarla ilgili bilgi seviyesi metabolomik analizler sayesinde artmaktadır. Özellikle hastalar, model organizmalar ve hücre modelleriyle yapılan çalışmalarda kararlı izotopların da kullanılmasıyla mekanizmalar daha iyi aydınlatılabilmektedir (101).



Şekil 2.9. Farklı omik katmanları ve metabolomik analizler (102-104).

İn vivo ve in vitro metabolomik çalışmalar farklı örnek tipleri, örnek hazırlama metodları, deney kurulumu ve sonuç verilerine dayanmaktadır. Bunlar bir metabolomik araştırmanın sütunlarıdır. İki çalışma metodundan da farklı bilgilerin kazanılması mümkündür (105).

Hastalar üzerinde yapılan metabolomik çalışmalar biyobelirteç keşfedilmesinde oldukça önem taşımakla birlikte mekanizmaların aydınlatılmasında çok uygun olmamaktadır. Çünkü bu mekanizmaların bütün olarak anlaşılmasında gerekli bilgileri kan, idrar ve beyin omurilik sıvısı örneklerinden elde etmek mümkün değildir. Ancak insan örneklerinden yapılan araştırmalar tanı, hastalığın progresyonu, tedavi etkinliği veya uyumuyla ilgili çok etkili ve doğru bilgileri sağlaması nedeniyle son derece değerlidir. Ayrıca hedefsiz metabolomik sonrası yapılan yolak analizleri hastalıklarda en şiddetli etkilenen yolları tanımlayabilmektedir. Kararlı izotoplarla yolların izlenmesi (fluksomik) fizyopatolojinin anlaşılmasında çok daha faydalı bir süreçtir (105).

Metabolomik analizler biyobelirteçlerin keşfedilmesinde kullanılabilir. Ulusal Tarama programlarında veya tanısal belirteç olarak metabolomik yöntemlerden faydalanılmaktadır. Çok geniş kapsamlı sonuç vermesi nedeniyle plazma örneklerinde hedefsiz metabolomik analizler tercih edilmektedir (105).

Metabolomik analizlerin tedavi protokollerinin belirlenmesinde de önemli rolleri bulunmaktadır. Çalışmalardaki amaç hastalığın şiddetiyle ilişkili biyobelirteçleri bulmak ve aynı zamanda tedavinin izlenmesi için uygun biyobelirteçleri keşfetmektir. Glukoz transport tip 1 (GLUT 1) eksikliği olan hastalarda plazma, idrar ve BOS örnekleri ketojenik tedavi öncesi ve tedavi sırasında yapılan hedefsiz metabolik profillemede kontrol hastalarına göre belirgin farklılık bulunmuştur. Karbonhidrat ve lipid metabolizmasında en fazla etkilenme saptanmakla birlikte aminoasit profillerinde büyük değişiklikler gözlenmiştir. Ayrıca tedavi sırasında TCA döngüsündeki ara ürünleri etkileyen serbest karnitin düzeyleri çok düşük bulunmuş ve ketojenik diet uygulanan hastalara L-karnitin tedavisinin eklenmesi önerilmiştir (105).

Metabolomik farklı model sistemlerde hastalık mekanizmalarını araştıran kuvvetli bir tekniktir. Bu mekanizmalara dayanarak önceden tedavi edilmeyen bozukluklar için yeni tedaviler önerilebilir ve metabolomik profilleme ile tedavinin etkinliği ve tedaviye cevabı değerlendirmek için kullanılabilir. Farklı verilerin entegrasyonu genotip-fenotip korelasyonundan çok daha fazla bilgiye ulaşmamızı sağlar.

Günümüzde kalıtsal metabolik bozukluklarda altta yatan fizyopatolojisinin aydınlatılmasında bilgi eksikliği mevcuttur. Multiomik yaklaşım; metabolomiği genomik veya transkriptomik gibi farklı omiklerle birleştirerek metabolik hastalık tablosundaki resmin tüm parçalarını tamamlamamızı sağlayacaktır.

3. YÖNTEM VE GEREÇLER

Bu çalışmada;

1. Oksidatif stresi değerlendirmek için, hasta serum örneklerinde yedi oksidatif stres belirteci (total antioksidan seviyesi-TAS, Total oksidatif stres-TOS, Total tiyol, Nativ tiyol, Disülfid ve Tiyol/Disülfid oranı düzeyleri) ile periferik mononükleer hücrelerde hücre içi ROS düzeyleri akım sitometri ile değerlendirildi
2. Otofaji ve inflamasyon yolağını değerlendirmek için, periferik kan mononükleer hücre örneklerinde Real-time PCR (RT-PZR) yöntemiyle otofaji ve inflamazom yolağında rol alan 7 genin (*NLRP3*, *ASC*, *Kaspaz1*, *NFKB*, *LC3B-II*, *p62* ve *Beclin 1*) ekspresyon analizleri ile aynı genlerin protein düzeyleri normal ve LPS-ATP ile indüklenmiş hücrelerde bakıldı. Ek olarak plasmada sitokin düzeylerine bakıldı.
3. İmmun fenotiplendirme amacıyla periferik mononükleer hücrelerde lenfosit alt grupları analizi ve fitohemaglutinin ile lenfosit aktivasyon deneyleri gerçekleştirildi.
4. Metabolomik profillemeye ile hasta plasma örneklerinde yüksek çözünürlüklü LC-MS/MS (kuadropol-uçuş zamanı, Q-TOF) kullanılarak hedefsiz metabolomik yaklaşımı ile gerçekleştirildi.

3.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Seçilmesi

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Çocuk Metabolizma Bölümü'nde takip edilen, biyokimyasal ve genetik analizlerle MSUD, klasik galaktozemi, lizinürik protein intoleransı ve tirozinemi tip 1 tanısı konan hastalar çalışma grubunu oluşturdu. Akut metabolik kriz tablosunda veya aktif enfeksiyonu olan hastalar çalışma haricinde tutuldu. Kronik hastalığı ve akut

enfeksiyon tablosunda olmayan, kontrol amaçlı poliklinik başvurusu yapan bireyler kontrol grubunu oluşturdu.

Doktora tezi çalışması için Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan (05.12.2017 tarihi, GO 17/924 kayıt numaralı) etik kurul izni alındı. Tüm hasta ve sağlıklı kontrol bireylerden çalışmaya özel olarak hazırlanmış gönüllü katılımcı onam formu alındı.

3.2. Biyolojik Örneklerin Toplanması

Fizik muayeneleri yapıldıktan sonra enfeksiyon bulgusu olmayan hastalardan ve sağlıklı bireylerden EDTA'lı ve antikoagülan içermeyen tüplere periferik kan örnekleri alındı. Örneklerden, en geç bir saat içerisinde serum ve plazma izolasyonu, 4 saat içerisinde periferik mononükleer hücre izolasyonu gerçekleştirildi.

3.2.1. Serum İzolasyonu

EDTA içermeyen tüplere alınan 3-4 ml kan örnekleri 4°C, 1200 x g, 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası serum 500µl olacak şekilde 1,5ml'lik ependorflarda alikotlandı. İleri çalışmalar için örnekler -80°C'de saklandı.

3.2.2. Plazma İzolasyonu

EDTA'lı tüplere 8-10 ml periferik kan alındıktan sonra 4°C'de 10 dakika 1800 rpm' de santrifüj edildi. Plazma örneği 1,5ml'lik ependorfların içine 500 µl olacak şekilde alikotlandı. Çalışma yapılana kadar -80°C'de saklandı.

3.2.3. Periferik Kandan Mononükleer Hücre (PBMC) İzolasyonu

Plazması uzaklaştırılmış kan örneğine 5ml PBS eklenerek karıştırıldı. Ayrı bir falkona, kan örneği ile eşit miktarda fikol, steril pastör pipeti yardımı ile eklendi. Fikol üzerine PBS ilave edilmiş kan yavaş bir şekilde yayıldı.

Örnekler +20°C 'de 20 dak. 600 x g 'de santrifüj edildikten sonra frensiz olarak durduruldu. Santrifüj sonrası plazma/PBS ve fikol arasında bulutsu olarak gözükten

mononükleer hücreler (PBMC), pastör pipeti yardımı ile toplandı. Örneklerin üzerine 5ml PBS ilave edilerek +4°C'de 5 dak. 1500rpm' de santrifüj edildikten sonra altta kalan pelet, falkonun tabanından yavaş hareketlerle tamamen kaldırıldı. Beckman-Coulter cihazında hücre sayımı yapıldı.

Hücre peleti oluşturmak için hücreler 10 ml'ye PBS ile tamamlandıktan sonra +4°C, 1500 rpm, 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası 5 milyon hücre, DNaz-RNaz içermeyen 1,5ml'lik ependorflara 500 µl RNAprotect Cell Reagent (Qiagen; Cat No: 76526) ilave edilerek alıktlandı. Alıktlanan örnekler -80°C'de ileri RNA çalışmalarına kadar saklandı.

Hücreler DMSO, FBS ve DMEM içeren çözelti içerisinde kriyotüplere alıktlandı. Mr. Frosty dondurma kabına alınarak -80°C'de 24 saat bekletildikten sonra hücreler ileri çalışmalarda kullanılmak üzere -196°C'de azot tankına yerleştirildi.

3.3. Kalıtsal Metabolik Hastalıklarda Oksidatif Stres ve Disülfid/Tiyol Homeostazis Araştırılması

3.3.1. Total Tiyol, Nativ Tiyol ve Disülfid Ölçümü

Serum tiyol/disülfid düzeyi için alınan kan örnekleri 1600 g'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra analizler yapılınca kadar -80 C saklandı.

Tiyol/ disülfid denge ölçümleri; nativ tiyol , dinamik disülfid , total tiyol [(-SH)+(-S-S-)] düzeylerinin dinamik "-SH/-S-S-" homeostazisinin değerlendirilmesinde kullanıldı Disülfid düzeyi (serum total tiyol - serum native tiyol)/2 formülü ile hesaplandı.

3.3.2. TOS (Total oksidatif stres) / TAS (Total Antioksidan Seviye) Analizleri

TOS ve TAS düzeyleri üretici firmanın (Relassay,Gaziantep,Türkiye) protokolüne uygun olarak ölçüldü.

Oksidatif stres indeksi: OSI; TOS düzeylerinin TAS düzeylerine oranının yüzde olarak ifade edilme şeklidir.

3.3.3. Hücre İçi ROS Ölçümü

Hücre içi ROS seviyesinin tespiti için ROS'a duyarlı prob olan 2',7'-diklorodihidroflorescein diasetat (H2DCFDA, Invitrogen,D-399) kullanıldı.

10 mM'lik bir stok çözelti H2DCFDA DMSO içinde hazırlandı. Mononükleer hücreler, karanlıkta 37 °C'de 30 dakika boyunca PBS içinde 5 uM boyama solüsyonu ile inkübe edildi.

Hücreler %0.05 tripsinEDTA çözeltisi ile toplandı. Toplanan hücreler akım sitometri (Novocyte, Agilent, ABD; 488nm lazer) cihazında analiz edildi.

3.4. Otofaji ve İnflamazom Gen Ekspresyonlarının ve Hücre İçi Protein Düzeylerinin Ölçülmesi

3.4.1. Otofaji ve İnflamazom Gen Ekspresyonlarının RT-PCR ile Analizi

Bu deneyler RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve RT-PCR olmak üzere 3 aşamada gerçekleştirildi.

Total RNA izolasyonu

Total RNA izolasyonu için alikotlanan 5 milyon PBMC'den RNA izolasyon kiti RNeasy Minikit (Kiagen, Kod no: 74104) kullanılarak üretici firmanın protokolüne uygun bir şekilde total RNA izolasyonu yapıldı.

Deneylere başlarken 1 ml tampon RLT içersine 10 µl merkaptetanol eklenerek lizis tamponu hazırlandı.

Lizis tampon ve β-merkaptetanol homojenize edilerek lizat elde edildi. Örnekler çözülerek, DNAaz-RNAaz içermeyen 2 ml'lik ependorflara aktarıldı.

Üzerlerine 1 ml PBS eklendikten sonra +4°C, 5000 x g, 5 dakika santrifüj edildi, hücreler çöktürüldü, süpernatant kısım döküldü.

Pelet üzerine 350 µl lizis tampon ve 350 µl %70'lik etanol eklenerek pipetle iyice karıştırıldı, santrifüj edilmedi. Peletin üzerine 700 µl karışım eklendikten sonra kolona yüklendi, 13000 g 20 saniye santrifüj edildi. 700 µl RW1 tampon eklenerek 13000 g de çevrilerek kolonun alt kısmı döküldü.

Örneklerin üzerine 500 µl RPE tampon eklenerek 15 sn 13000 g'de santrifüj edildi. Kolonun altındaki sıvı atıldı. 500 µl RPE 2 dakika 13000 g'de santrifüj edildi.

Temiz toplama kolonuna 2 ml örnek alınarak en yüksek hızda 1 dakika çevrildi. Pembe kolon 1,5 ml'lik temiz toplama tüpüne yerleştirildi. 30 µl RNaz içermeyen su eklenerek 1 dakika 13000 g'de santrifüj edildi. RNA'lar yaklaşık 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. İkinci yıkamada 20 µl RNaz içermeyen su eklenerek 13000 g 1 dakika santrifüj edildi. Toplam elüsyon hacmi 50 mikrolitre olacak şekilde ayarlandı.

RNA örnekleri buz üzerine alındı. NanoDrop spektrofotometre ile her bir örnekten 1,5 µl kullanılıp RNA miktar tayini yapıldı cDNA eldesine kadar tüm izole edilen total RNA örnekleri -80°C'de saklandı.

Reverse Transkriptaz (cDNA) İşlemi

Revers transkriptaz işlemi oligo(dT) ve random heksamer primerleri ile gerçekleştirildi. Reverse transkripsiyon kiti (Thermo Sci., High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Cat No: 4368813) kullanılarak protokole uygun şekilde deneyler yapıldı.

Birinci basamak için buz üzerinde steril tüp içerisinde aşağıdaki reaksiyon karışımı kullanıldı.

Tablo 3.1. cDNA Örnek Hazırlama Reaksiyon Malzemeleri

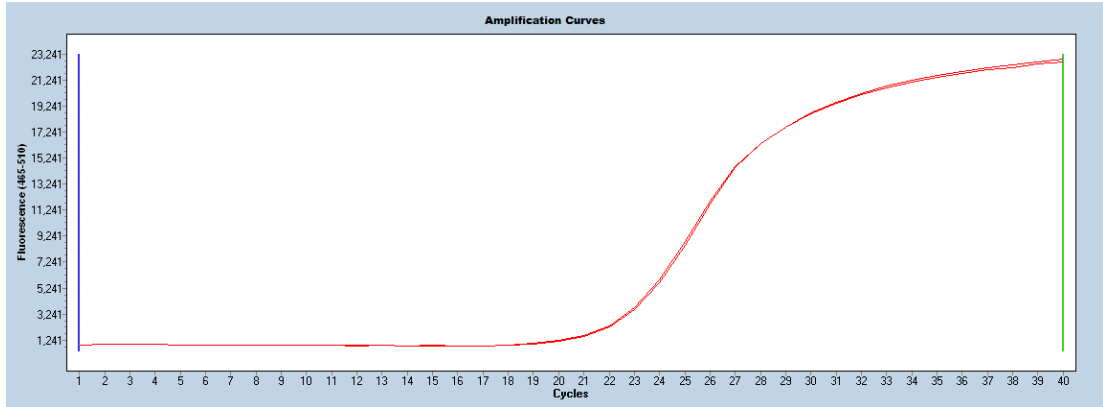
Komponentler	Miktar
10XRT buffer	2 µlt
dNTP	0,8 µlt
Random primerler	2 µlt
Reverse transkriptaz	1 µlt
RNA	14,2 µlt
Toplam hacim	20 µlt

PCR cihazında yaklaşık 2 saat sonunda reaksiyon gerçekleştikten sonra cDNA'lar, tekrar buz üzerine alındı. NanoDrop spektrofotometre ile tüm örnekler okutuldu. RT-PCR işlemine kadar cDNA'lar -20°C'de muhafaza edildi.

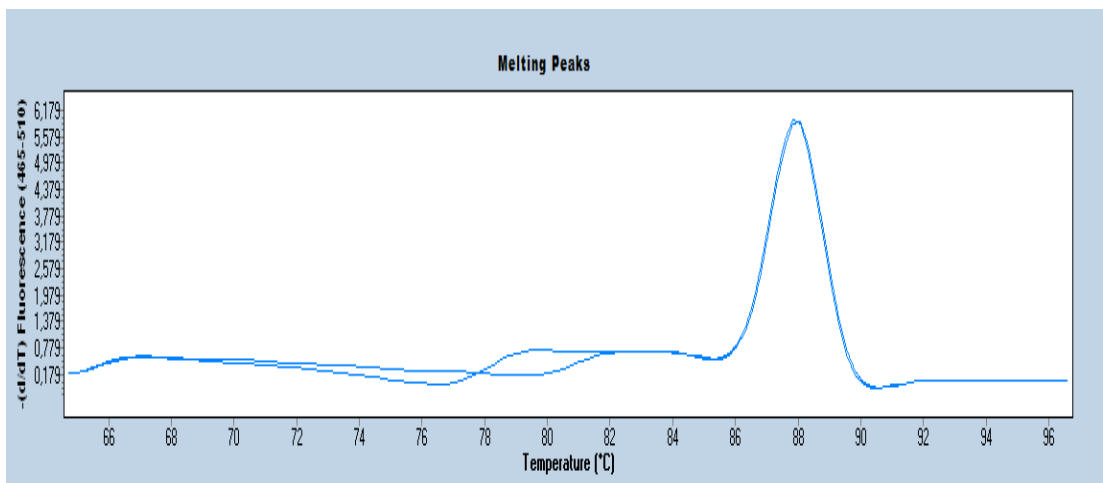
Gen Ekspresyon Analizi

Bu çalışmada RT-qPCR yöntemiyle *ASC*, *Beclin-1*, *Kaspaz-1*, *LC3B-II*, *NF-KB*, *NLRP-3*, *p62* ve housekeeping gen olarak *GAPDH* genlerinin ekspresyon seviyeleri saptandı. Primer tasarımı 'Primer3Plus' programı kullanılarak veya literatür bilgisi kullanılarak gerçekleştirildi.

RT-PCR işlemiyle işaretleme için RNA'lardan çift iplikli yapıya dönüştürülen cDNA zincirleri arasına girerek floresan ışığa veren SYBR Green I boyası (SensiFAST SYBR No-ROX Kit Lot No SF883-B101160) kullanıldı. RT-qPCR analizleri için LightCycler 480 (Roch, Switzerland) termal döngü cihazı kullanıldı. Her gen bölgesi için uygun Tm sıcaklığı belirlenerek, deney kurulumu gerçekleştirilerek döngü eğrileri ve erime eğrisi (Melting curve) verileri incelendi. Tüm genler için uygun primer Tm sıcaklık 60°C olarak optimizasyon sağlandı.



Grafik 3.1. RT-qPCR Amplifikasyon Eğrisi



Grafik 3.2. RT-qPCR erime eğrisi

Tablo 3.2. Çalışılan genler ve primer dizileri (F:ileri primer,R: geri primer)

Hedef Gen	Primer Dizileri (5'-3')
<i>NLRP3</i>	F: CCCAGGGATGAGAGTGTTGT R: CAAGGAGATGTCGAAGCAGC
<i>ASC</i>	F:CTGGTACTGCTCATCCGTCA R: CTGGTACTGCTCATCCGTCA
<i>Kaspaz 1</i>	F:CCACAATGGGCTCTGTTTTT R:CATCTGGCTGCTCAAATGAA
<i>NF-Kb</i>	F:ATCCCATCTTTGACAATCGTGC R:CTGGTCCCGTGAAATACACCTC
<i>LC3B-II</i>	F: AGC AGC ATC CAA CCA AAA TC R: CTG TGT CCG TTC ACC AAC AG
<i>p62</i>	F:GTG AAT TCG CTC GCC GCT CGC TAT R:CGT CTC GAG TGC CTG CTG ACA ACA CCT A
<i>Beclin 1</i>	F: AGGAACTCACAGCTCCATTAC R: AATGGCTCCTCTCCTGAGTT
<i>GAPDH</i>	F: GGCTGCTTTTAACTCTGGTA R: CTTGACGGTGCCATGGAATT

RT-PCR reaksiyonu için kullanılan malzemeler listesi ve reaksiyon karışımı Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3.3. RT-PCR reaksiyon karışımı

İçerik	Derişim	Miktar 1X
BrightGreen 2X qPCR Master Mix	1X	10 µl
Mix B (F veR Primerler) (2,4 mM)	400 nM/µl	2,5 µl
Nükleaz içermeyen H ₂ O	-	5,5 µl

Tablo 3.4. Termal döngü basamakları

PCR Aşaması	İşlem	Sıcaklık-Derece	Tekrar
İlk Denatürasyon	Denatürasyon	95 °C 5 dk	1
PCR Amplifikasyon	Denatürasyon	95 °C 10 sn	40
	Bağlanma	60 °C 30 sn (Okuma)	
Erime eğrisi	Denatürasyon	95 °C 5 sn	1
	Uzama	72 °C 1 dk	
	Denatürasyon	95 °C sürekli	
Final	Soğutma	40 °C 30 sn	1

İşlem sonucunda cihazdan alınan veriler $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ Livak metodu ile değerlendirilip toplam 40 döngü üzerinden yapılan çalışmalarda florasan değerinin eşik değerini geçtiği (Threshold çizgisini kestiği) noktadan alınan eşik değeri (Ct, Cp, Cq) hesaplamalarda kullanıldı.

3.4.2. Hücre içi Protein Analizi

DMEM

L-Glutamin (Biochrome)

Fetal Dana Serumu (FBS) (Biochrome)

Streptomisin/Penisilin (Biochrome)

LPS (Sigma Aldrich)

ATP (Sigma Aldrich)

Azot tankından çıkarılan hücre örnekleri hızlıca çözdürüldükten sonra FBS+PBS içeren yıkama çözeltisi ile santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra DMEM, %1 glutamin, % 1 streptomisin/penisilin, FBS içeren besiyeri eklenerek 12 kuyucuklu platelerde, 37°C ve %5 CO2 ortamında hücreler dinlenmeye bırakıldı. Bazal protein düzeylerini ölçmek amacıyla kuyucuklardan birine LPS ve ATP uygulanmadı. Diğer kuyucuklara 4 saat LPS (100 ng/ml), 30 dakika 1mM ATP eklendi. 4 saatlik inkübasyon sonrasında hücrelerden protein ölçümü yapılmak üzere akım sitometri analizleri için hazırlandı.

Primer Antikorlar

Anti-Kaspaz 1 FITC (Anti-rabbit)

Anti-NLRP3 FITC (Anti-rabbit)

Anti-ASC FITC (Anti-rabbit)

Anti-p62 FITC (Anti-rabbit)

Anti-Beclin 1 PE (Anti-mouse)

Anti-NF- κ B PE (Anti-mouse)

Anti-LC3-II PE (Anti-mouse)

Sekonder Antikorlar

Goat anti-rabbit IgG FITC

Goat anti-mouse IgG, PE

Deney protokolü

1. Hücre sayımı yapılarak yaklaşık 5×10^5 hücre olacak şekilde her tüpe hücreler alındı.
2. FACS çözeltisi eklenerek yaklaşık 1-1.5 ml'ye tamamlanarak 1200-1400 rpmde 5 dk santrifüj edilerek, süpernatant atıldı.
3. Her tüpe 300 μ l fiksasyon- permeabilizasyon buffer (Thermo) eklendi, vortekslendi ve 15 dk $+4^\circ\text{C}$ 'de bekletildi.
4. Her tüpe 1 ml FACS çözeltisi eklenerek 1400 rpm de 5 dk santrifüj edildi.
5. 1 μ l primer antikor eklenerek (antikor dilusyon oranına göre değişiklik gösterebilir) 4°C de 30 dk inkübe edildi.
6. 1 μ l sekonder antikor eklenerek 30 dk inkübe edildi.
7. 500 μ l FACS çözeltisi ile yıkandıktan sonra 1400 rpmde 5 dk santrifüj edildi.
8. Hücreler 300 μ l FACS çözeltisi içinde süspanse edildi ve akım sitometride analiz edildi.

3.5. İmmun Fenotiplerin Araştırılması

3.5.1. Hücrelerin Çözünmesi

Sıvı azot tankında saklanan PBMC'ler çok hızlı olarak % 50 PBS ve % 50 FBS içeren yıkama çözeltisi ile çözüldükten sonra hücrelerin yarısı lenfosit alt grubu analizi çalışılmak üzere akım sitometri laboratuvarına transfer edildi.

Blastik transformasyon çalışılacak hücreler 100 mikrolitre fitohemaglütinin ile stimüle edildikten sonra 72 saat süre ile 37°C ve %5 CO₂'li etüv içinde inkübe edildi.

Flow sitometri analizlerinde SYTO ile yapılan analiz sonuçlarında lenfosit alt grup çalışılan hücrelerde % 85-97 arasında canlılık hesaplandı. Blastik transformasyon çalışılan hücre grubunda % 50'nin üzerinde canlılık saptandı.

3.5.2. Hücre Kültürü Örneğinden Lenfosit Alt Grubu Çalışması

Çalışma tüplerine çalışılacak paneller için belirlenen antikorlar eklendi

Örneklerin üzerine 100 mL hücre süspansiyonu pipetlenerek 1200 rpm' de 5 dak santrifüj edildi. Tüplerdeki pelletten 100 µl örnek alınarak, antikorlar eklendi.

Oda sıcaklığında karanlık ortamda 15 dakika inkübasyona bırakıldı.

Tüplere 1 mL VersaLyse eklendi

Oda sıcaklığında 10 dakika süreyle karanlıkta inkübe edildi

Lizis yapılan örnekler akım sitometride okundu.

3.5.3. Hücre Kültürü Örneğinden Blastik Transformasyon (Lenfosit Aktivasyonu) Çalışması

Çalışma tüplerine çalışılacak paneller için belirlenen antikorlar eklendi.

Üzerlerine 100 µl hücre süspansiyonu pipetlendi. Örnekler 1200 rpm' de 5 dak santrifüj edildi. Tüplerdeki pelletten 100 µl örnek alınarak, antikorlar eklendi.

Oda sıcaklığında 15 dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldı.

Tüplere 1 mL VersaLyse eklenerek vortekslendi.

Oda sıcaklığında 10 dak karanlıkta inkübe edildi

Lizis yapılan örnekler akım sitometride okundu.

İnkübasyon sonunda 5 µl SYTO16 eklenerek 5 dakika süreyle karanlıkta inkübe edildi.

Tüpler cihazda okundu.

Tablo 3.5. Lenfosit alt grup ve Blastik Transformasyon testlerinde kullanılan antikorlar.

LAG (ANTIBODIES)	FLUOROCHROMES	MARKA	KLON	REF
HLA	FITC	BECKMAN COULTER	immu-357	B96758
CD56	PE	BECKMAN COULTER	N901	A07788
CD4	ECD	BECKMAN COULTER	SFC12T4D11	6604727
CD19	PC5	BECKMAN COULTER	B-119	A07771
CD8	PC7	BECKMAN COULTER	SFC121Thy2D3	737661
CD3	APC	BECKMAN COULTER	UCHT1	IM2467
CD14	APC-A700	BECKMAN COULTER	RMO52	A99020
CD16	APC-A750	BECKMAN COULTER	3G8	A66330
CD45	KrO	BECKMAN COULTER	J33	B36294

BLASTIK TRANSFORMASYON (ANTIBODIES)	FLUOROCHROMES	MARKA	KLON	REF
SYT016	FITC	INVITROGEN BY THERMO FISHER SCIENTIFIC	-	S7578
CD4	ECD	BECKMAN COULTER	SFC12T4D11	6604727
CD69	PC5	BECKMAN COULTER	TP1.55.3	IM2656
CD25	APC-A700	BECKMAN COULTER	B1.49.9	A86356
CD3	APC-A750	BECKMAN COULTER	UCHT1	A94680
HLA DR	PB	BECKMAN COULTER	immu-357	B36291
CD45	KrO	BECKMAN COULTER	J33	B36294

3.5.4. Sitokin Düzeyi Ölçümü

Cytokine Human Magnetic 10-Plex Panel for Luminex Platform (Katalog No: LHC0001M) (Lot No: 213047006 ThermoFisher Sci) kullanılarak örneklerdeki plazma IFN-G, IL-1B, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TNF-A, GM-CSF, IL-10 ve IL-8 düzeyleri saptandı.

3.6. Metabolomik Analizler

3.6.1. Örneklerin Alınması ve Saklanması

Hacettepe Üniversitesi Çocuk Metabolizma kliniğinde takip edilen ve tez konusu olan hastalıklar açısından tanımlı 48 hasta birey (17 Galaktozemi, 16 MSUD,

9 Tirozinemi, 6 LPI) ve yaş eşleşmiş 10 sağlıklı bireyden periferik kan örnekleri alındı. Bu örneklerden BBMRI-ERIC standart işlem yönergesine göre plazma ve serum örnekleri ayrıştırıldı ve 100 µL hacimlerde bölütlendi ve daha sonra kullanılmak üzere -80 °C sıcaklıkta saklandı.

Sağlıklı kontrol örnekleri bir araya toplanarak literatürde önerildiği şekliyle referans plazma havuzu oluşturularak, bu örnekler daha sonra kalite kontrol olarak kullanıldı.

3.6.2. Plazma Örneklerinden Metabolit Özütlemesi

Çalışmada örneklerden metabolit özütlemesi için soğuk metanol ile çöktürme yöntemi kullanıldı. Bunun için 100 µL hacimde plazma örneği içine 400 µL hacimde -20 °C'de soğutulmuş metanol eklendi ve elde edilen karışım 10 dk boyunca sürekli bir biçimde vorteks karıştırıcı ile karıştırıldı ve daha sonra -20 °C'de 2 saat boyunca bekletildi. Daha sonra bu örnekler 14000xg hızda +4 °C'de santrifüj edildi ve santrifüj sonrası eppendorf tüplerde çökmeden arda kalan üst fazdaki sıvı kısım dikkatli bir şekilde başka bir eppendorf tüpüne transfer edildi ve azot altında uçurularak kurutuldu. Örnekler daha sonra 120 µL metanol:su (1:1 v/v) içerisinde çözüldü ve LC-HR-MS ile analiz edildi. Aynı işlem plazma yerine 100 µL metanol kullanılarak boş örnek ile tekrarlandı.

3.6.3. RP Kolonlar ile Ayrım ve LC-qTOF-MS Analizler

Plazmadan elde edilen metabolit karışımı A = 0.1% formik asit/ 99.9% su ve B = 0.1% formik asit 99.9% asetonitrilden oluşan mobil faz içinde ve Poroshell 2.7 µm, 50 mm, 2.1 mm boyularında C18 kolonu (Agilent) takılı HPLC sistemi (1200 serisi, Agilent Technologies) ve 6530 UHD Accurate-Mass Q-TOF (Agilent Technologies) ile pozitif iyon modunda analiz edildi. Kromatografik ayırma için 100% A (0-5 dk) ile başlayan ve 100% B (5-25 dk), 100 % A (25-40 dk) ve 100%A (40-55 dk) ile biten değişken hareketli faz programı kullanıldı. Negatif iyon modunda çalışırken ise daha

önce daha fazla metabolitin tayinine imkân verdiği rapor edilen A = 1 mM amonyum flüorür, B = asetonitril mobil fazı kullanıldı.

3.6.4. Ters Faz (C18) Kolonlar ile Ayrım ve LC-qTOF-MS Analizler

Plazmadan elde edilen metabolit karışımı ve boş örnekler A = 0.1% formik asit / 99.9% su ve B = 0.1% formik asit 99.9% metanolden oluşan mobil faz içinde ve Xbridge HSS T3 μ m, 100 mm, 2.1 mm boyularında C18 kolonu (Waters) takılı UHPLC sistemi (1290 serisi, Agilent Technologies) ve 6546 UHD Accurate-Mass Q-TOF (Agilent Technologies) ile pozitif iyon modunda yüksek çözünürlük modunda analiz edildi. Kromatografik ayırma için 100% A (0-5 dk) ile başlayan ve 100% B (5-25 dk), 100 % A (25-40 dk) ve 100%A (40-55 dk) ile biten değişken hareketli faz programı kullanıldı. Aynı kromatografik analiz programı kullanılarak veriye bağlı tekrarlı analiz moduna (data dependent iterative MS) en yüksek pik şiddetindeki 10 iyon için MS/MS spektrumları elde edildi.

3.6.5. Metabolik Profileme Deneyleri Verilerinin MS-DIAL ile Analizi

Ham LC/MS verileri MS-DIAL (sürüm 4.9.221218) online yazılım programında tarandı.

Bunun için elde edilen ham veriler MSConvert programı kullanılarak ".d" dosya formatından "mzml" dosya formatına çevrildi. Kontrol, hasta, boş özütleme ve kalite kontrol grupları ve kalite kontrol grubuna ait MS/MS dosyaları seçildikten sonra bu veriler İnsan Metabolome Veri Tabanı msp dosyası kullanılarak MSDIAL default parametreleri kullanılarak $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+K]^+$ iyonları için tarandı. Hizalama yapıldıktan sonra farklılık gösteren metabolitlerden kat değişimi >2 , $p < 0.05$ ve $S/N > 6$ olanlar seçilerek filtreleme yapıldı.

Daha sonra seçili ölçütlere uygun şekilde filtrelenen ve hasta ve kontrol gruplarında farklılaşan metabolitler Metaboanalyst 5 sürümü yolak analizi modunda tarandı, Human Metabolome Database (HMDB) veri bankası kullanılarak metabolomik yolak analizleri yapıldı.

Metabolomik verilerin istatistiksel analizleri için MZMine 2.53 versiyonu kullanıldı. Parametre seti için literatürdeki optimize edilmiş parametreler kullanıldı

Filtrelenen veriler .csv Metaboanalyst dosyası olarak MetaboAnalyst web tabanlı analiz programına yüklendi ve istatistiksel analize tabi tutuldu. Metabolomik analizlerden elde edilen veriler en küçük kareler farklılaştırma analizi (PLS-DA) yöntemleri kullanılarak; hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı fark olup olmadığı istatistiksel olarak tespit edildi.

3.7.İstatistik Analizler

Çalışmanın istatistiksel analizlerinin gerçekleştirilmesi amacıyla SPSS 25 paket programı kullanıldı. Çalışmada elde edilen sayısal verilerin ortalama, standart sapma ve ortanca değerleri hesaplandı. Üç ve daha fazla grup ortalamaları arasındaki farklılıklar normal dağılım sağlanmadığı için parametrik olmayan test Kruskal-Wallis ile analiz edildi. İki grup ortalaması arasındaki farklılık Mann-Whitney U testi kullanıldı. $P < 0.05$ değerleri istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi.

Gen ekspresyon analizleri; RT-qPCR analizleri ile elde edilen gen ekspresyon seviyeleri hesaplanmasıyla elde edilen veriler kontrol-kontrol grup ortalamasına karşı test edildi. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma şeklinde özetlendi. Grup analizlerinin normal dağılımı sağlamamasından dolayı kıyaslamalar için Mann-Whitney Test ve Kruskal-Wallis test kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Hasta ve Kontrol Gruplarında Serum Örneklerinde Oksidatif Stres Durumunun Araştırılması

Çalışmada 14 galaktozemi, 15 MSUD, 6 LPI ve 7 tirozinemi tip 1 tanılı hastanın ve 10 sağlıklı bireyin oksidatif stres analizleri 7 parametre ölçülerek değerlendirildi. Hasta gruplarının toplu sonuçları Tablo 4.1' de verilmiştir.

Tablo 4.1. Hasta gruplarında oksidatif stres belirteç değerleri.

TANI	Total_ Tiyol (TT)	Nativ_ Tiyol (NT)	Disülfid	Disülfid/Nativ Tiyol	TAS	TOS	OSI
MSUD	460,40	422,60	18,90	5,02	1,43	18,21	1,27
Tirozinemitip 1	426,33	398,90	13,71	3,55	1,38	12,62	0,93
Galaktozemi	414,74	376,12	19,31	5,27	1,34	12,75	0,97
LPI	388,49	348,08	20,20	6,84	1,17	8,76	0,75
Sağlıklı kontrol	370,60	339,41	14,39	4,11	1,43	7,90	0,56

Tüm hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında TT, TAS, TOS ve OSI düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p<0,05$).

Tablo 4.2. MSUD ve kontrol gruplarının oksidatif stres belirteç değerleri.

	MSUD	Kontrol	p değeri
Total_tiyol (TT)	460,40 ± 91,24	384,66 ± 25,11	0,002
Nativ_tiyol (NT)	422,60 ± 96,56	355,98 ± 30,42	0,009
Disülfid	18,90 ± 9,59	14,34 ± 4,20	0,253
Disülfid/native_tiyol	5,03 ± 3,64	4,12 ± 1,45	0,639
TAS	1,44 ± 0,17	1,46 ± 0,15	0,639
TOS	18,22 ± 8,52	7,98 ± 2,31	0,000
OSI	1,27 ± 0,57	0,56 ± 0,19	0,001

*Veriler ortalama ± standart deviasyon şeklinde gösterildi.

** $p<0,05$, istatistiksel açıdan anlamlı.

MSUD ve kontrol grupları arasında TAS, TOS, TT ve NT açısından istatistiksel anlamlı ilişki saptandı ($p<0,05$). **MSUD hastaları en yüksek TOS, TT ve NT değerlerine sahip grup olarak tespit edildi.** 15 hastanın 8'inde disülfid ve disülfid/nativ tiyol oranı

kontrol grubundan belirgin seviyede yüksek olarak saptandı ancak istatistiksel olarak anlamlı değişiklik bulunmadı.

Tablo 4.3. Galaktozemi ve kontrol gruplarının oksidatif stres belirteçleri.

	Galaktozemi	Kontrol	p değeri
Total_tiyol (TT)	414,75 ± 50,77	384,66 ± 25,11	0,05
Nativ_tiyol (NT)	376,12 ± 48,10	355,98 ± 30,42	0,17
Disülfid	19,31 ± 11,30	14,34 ± 4,20	0,41
Disülfid/native_tiyol	5,28 ± 3,30	4,12 ± 1,45	0,70
TAS	1,34 ± 0,13	1,46 ± 0,15	0,08
TOS	12,75 ± 6,92	7,98 ± 2,31	0,14
OSI	0,98 ± 0,60	0,56 ± 0,19	0,08

*p<0,05, istatistiksel olarak anlamlı.

Galaktozemi hastalarında TOS ve OSI düzeyleri kontrol grubundan belirgin yüksek bulundu. Total tiyol düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yükseklik saptandı(p<0,05).

Tablo 4.4. Tirozinemi tip 1 ve kontrol gruplarının oksidatif stres belirteçleri.

	Tirozinemi	Kontrol	p değeri
Total_tiyol (TT)	426,33 ± 53,96	384,66 ± 25,11	0,10
Nativ_tiyol (NT)	398,91 ± 56,16	355,98 ± 30,42	0,05
Disülfid	13,71 ± 5,97	14,34 ± 4,20	0,49
Disülfid/nativ_tiyol	3,56 ± 1,82	4,12 ± 1,45	0,33
TAS	1,38 ± 0,16	1,46 ± 0,15	0,49
TOS	12,63 ± 5,70	7,98 ± 2,31	0,07
OSI	0,93 ± 0,45	0,56 ± 0,19	0,06

*p<0,05, istatistiksel olarak anlamlı.

NT değeri istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Tirozinemi tip 1 grubunda total tiyol ve nativ tiyol düzeyleri kontrol grubundan yüksek saptandı. Disülfid ve disülfid/nativ tiyol düzeyleri kontrol grubundan düşük olan tek hastalık grubuydu. TOS ve OSI değerleri de kontrol grubundan çok daha yüksek seviyede bulundu.

Tablo 4.5. LPİ ve kontrol gruplarının oksidatif stres belirteçleri.

	LPİ	KONTROL	P değeri
Total_tiyol (TT)	388,49 ± 87,93	384,66 ± 25,11	0,83
Nativ_tiyol (NT)	348,09 ± 100,79	355,98 ± 30,42	0,91
Disülfit	20,20 ± 9,13	14,34 ± 4,20	0,19
Disülfit/nativ_tiyol	6,85 ± 4,98	4,12 ± 1,45	0,52
TAS	1,17 ± 0,92	1,46 ± 0,15	0,01
TOS	8,77 ± 3,01	7,98 ± 2,31	0,59
OSI	0,75 ± 0,25	0,56 ± 0,19	0,08

*p<0,05, istatistiksel olarak anlamlı.

LPİ grubu TAS düzeyinin istatistiksel olarak kontrol grubundan düşük olduğu tek gruptur. Ayrıca TAS tüm hasta gruplarından daha düşük saptandı.

En yüksek disülfit ve disülfit/nativ tiyol düzeyleri LPİ grubunda saptandı ancak kontrol grubuyla istatistiksel açıdan anlamlı farklılık saptanmadı.

Tüm hasta gruplarını içine alarak ***Spearman korelasyon analizi yapıldığında total tiyol, nativ tiyol, disülfit/nativ tiyol oranı, TAS, TOS, OSI arasında kuvvetli pozitif korelasyon saptandı.**

Nativ tiyol; disülfit ve disülfit/nativ tiyol oranı ile ters korelasyon, total tiyol, TAS, TOS, OSI ile pozitif korelasyon mevcuttu.

Disülfit düzeyinin nativ tiyol, disülfit/nativ tiyol oranı, OSI ile pozitif korelasyon gösterdiği saptandı.

MSUD hastalarında disülfit ve lösin düzeyleri arasında pozitif korelasyon mevcuttu.

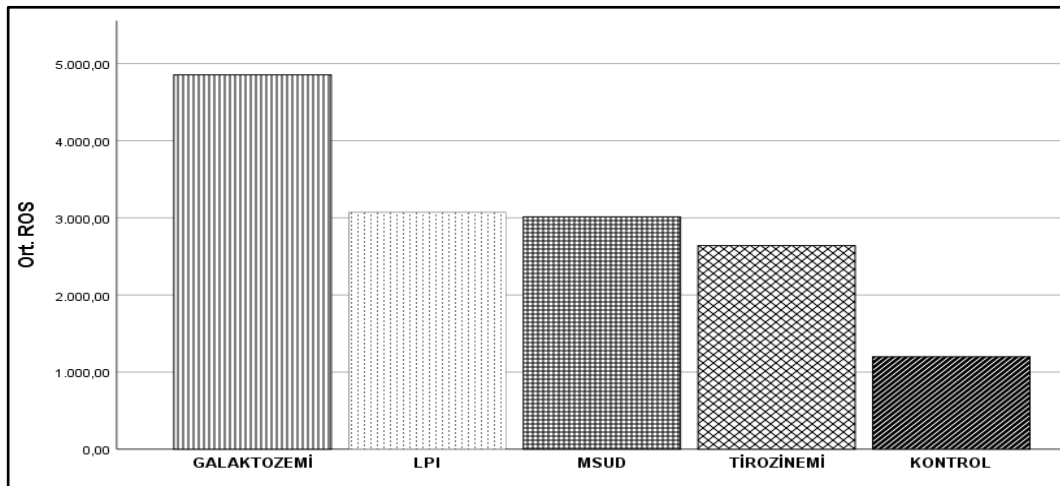
4.2. Hücre İçi ROS Değerlerin Akım Sitometri ile Ölçümü

Galaktozemi, MSUD, Tirozinemi tip 1 ve LPİ hastalarının hücre içi flow sitometir ile bakılan ROS düzeyi ortalamaları kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptandı (**p<0,05**). En yüksek hücre içi ROS düzeyi ortalaması galaktozemi hasta grubunda saptandı.

Tablo 4.6. Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarının ROS ortalama değerleri .

Tanı	ROS	Sağlıklı Kontrol	p değeri
Galaktozemi	4852 ± 2631	1200,25 ± 194,3	0,01
MSUD	3012 ± 567,7	1200,25 ± 194,3	0,01
Tirozinemi Tip 1	2640 ± 233,5	1200,25 ± 194,3	0,03
LPI	3071 ± 317,2	1200,25 ± 194,3	0,03

*p<0.05 değerleri istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi.

**Grafik 4.1.** Hasta ve sağlıklı kontrol grubunun ROS değerleri.

4.3. Otofaji ve İmflamasyon İlişkili Gen Ekspresyon Analiz Sonuçları

On iki Galaktozemi, 14 MSUD, altı tirozinemi tip 1 ve beş LPI tanılı hasta ve yedi sağlıklı bireyde toplam 7 gen ekspresyon analizi gerçekleştirildi. Bu genlerin üçü otofajiyile ilişkili (*p62*, *Beclin 1*, *LC3B-II*), diğerleri *NLRP3*, *ASC*, *Kaspaz 1*, *NF-KB* inflamasyonla ilişkiliydi.

Galaktozemi, MSUD, Tirozinemi tip 1 ve LPI gruplarıyla kontrol grubu arasında gen ekspresyon ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı. Ancak hasta grupları içerisinde gen ekspresyonlarında önemli artışlar veya azalmalar gözlemlendi.

Tablo 4.7. Galaktozemi ve sağlıklı kontrol gruplarının *GAPDH* genine göre normalize edilmiş gen ekspresyon değerleri.

ÇALIŞMA GRUBU	OTOFAJİ			İNFLAMASYON			
	BECLİN 1	LC3B-II	p62	NFKB	NLRP3	ASC	KASPAZ 1
SAĞLIKLI	100	100	100	100	100	100	100
HASTA 1	175	2	154	73	83	329	18
HASTA 2	23	131	38	34	74	29	25
HASTA 3	79	250	65	64	130	38	75
HASTA 4	111	41	98	69	129	30	97
HASTA 5	76	-	59	72	104	45	53
HASTA 6	96	371	203	88	87	138	70
HASTA 7	68	169	78	56	47	55	55
HASTA 8	173	11	400	348	541	72	315
HASTA 9	101	2	168	168	264	52	240
HASTA 10	271	477	309	94	278	272	48
HASTA 11	75	187	87	44	65	148	15
HASTA 12	112	7	82	42	82	402	18
ORTALAMA	113	137	145	96	157	134	86

NLRP3, *p62*, *Beclin 1* ve *ASC* gen ekspresyonlarında sağlıklı birey grubuna göre hastalarda % 57, %45, % 34, % 13 oranında yükseklik saptandı ortalama olarak mı hesaplandı. Üç hastada *NLRP3*, *p62* ve *Kaspaz 1* gen ekspresyon yüksekliği dikkat çekiciydi. *LC3B-II* gen ekspresyonlarında bazı hastalarda arasında önemli farklılıklar bulundu.

8 No'lu hasta 3 yaşında, erkek, 2 aylıkken katarakt nedeniyle opere edilen hastanın gelişim basamaklarında gerilik mevcut, idrarda redükten madde pozitif saptandı.

9 No'lu hasta 13 yaşında, erkek, 2 günlükken tanı almış, ağır büyüme geriliği mevcut, derslerde başarısız, Çocuk Ruh Sağlığı bölümünde kaygı bozukluğu nedeniyle tedavi ediliyor.

10 No'lu hasta 14 yaşında erkek, katarakt ve nörolojik gerilik mevcut, diyetle uyumsuz ve idrar redüktan madde pozitifliği vardı.

İnflamazom gen ekspresyonları yüksek hastalarda katarakt, primer over yetmezliği, nörolojik disfonksiyon gözlenmiştir. Oksidatif stres belirteçleri yüksek saptanan hastanın p62 düzeyindeki artış adaptasyon cevap olarak düşünüldü. Ancak yetersiz gelmesine bağlı inflamazom yolağının aktifleştiği gözlenmektedir.

Tablo 4.8. Kontrol ve LPI hasta gruplarının *GAPDH* genine göre normalize edilmiş gen ekspresyon değerleri.

ÇALIŞMA GRUBU	OTOFAJİ			İNFLAMASYON			
	BECLİN 1	LC3B-II	p62	NF-KB	NLRP3	ASC	KASPAZ 1
SAĞLIKLI	100	100	100	100	100	100	100
HASTA 1	88	1	389	263	626	142	35
HASTA 2	31	150	162	81	106	143	24
HASTA 3	143	1	485	51	367	228	47
HASTA 4	38	298	99	74	71	85	46
HASTA 5	39	-	59	88	126	113	20
Ortalama	68	90	239	111	259	142	34

Hasta grubunda **NLRP3** gen ifadesi ortalaması sağlıklı birey grubuna göre yaklaşık **2,5 kat artış** saptanmıştır. Özellikle 2 hastada *NLRP3* ve p62 gen ifadelerinde yükseklik saptandı. *Beclin 1* ve özellikle *Kaspaz 1* gen ekspresyon düzeylerinde belirgin düşüklük göze çarpmaktaydı.

1 No'lu hasta 21 yaşında, kadın, akciğer tutulumu, kreatin yüksekliği, medüller nefrokalsinozis, kemik iliğinde hemofagositoz bulguları, lenfopenisi ve boy kısalığı mevcut.

3 No'lu hasta 31 yaşında, erkek, kronik böbrek hastalığı, akciğer tutulumu, mental retardasyonu, epilepsisi, boy kısalığı ve osteoporozu mevcut.

Tablo 4.9. Sağlıklı kontrol ve MSUD hasta gruplarının *GAPDH* genine göre normalize edilmiş gen ekspresyon değerleri.

ÇALIŞMA GRUBU	OTOFAJİ			İNFLAMASYON			
	BECLIN 1	LC3B-II	p62	NFKB	NLRP3	ASC	KASPAZ 1
SAĞLIKLI	100	100	100	100	100	100	100
HASTA 1	61	1	134	200	61	73	177
HASTA 2	89	-	91	49	137	194	63
HASTA 3	39	-	68	50	58	81	59
HASTA 4	39	377	54	43	178	31	61
HASTA 5	159	33	192	90	125	222	35
HASTA 6	64	270	67	61	59	54	56
HASTA 7	88	13	126	86	72	42	54
HASTA 8	98	5	138	73	176	37	75
HASTA 9	184	1	90	128	200	152	10
HASTA 10	17	-	16	10	11	165	4
HASTA 11	62	59	165	43	200	29	43
HASTA 12	88	43	57	51	99	28	33
HASTA 13	26	16	54	30	95	49	41
HASTA 14	118	139	205	271	233	29	47
ORTALAMA	81	68	104	85	122	85	54

Bu grupta da **NLRP3 ve p62** genlerinde sağlıklı birey grubuna göre daha yüksek gen ekspresyon seviyeleri saptandı. Hastaların yarısında NLRP3 gen ekspresyonlarında önemli artış saptandı.

2 No'lu hasta 6 yaşında, erkek, 13 günlükken tanı alıyor, özel eğitime gidiyor, lösin düzeyi 628 ölçüldü.

4 No'lu hasta 9 yaşında, erkek, 23 günlükken tanı almış, mental retarde, okuma yazma bilmiyor, özel eğitim alıyor, destekli yürümesi mevcut, anlamsız konuşmaları mevcut, lösin düzeyi 487 ölçüldü.

5 No'lu hasta, 11 yaşında, erkek, 11 günlükken tanı almış, özel eğitim alıyor, fizik tedavi alıyor, lösin düzeyi 724 ölçüldü.

9 No'lu hasta, 14 yaşında, erkek, 3 günlükken tanı almış, büyüme geriliği, epilepsi ve dikkat eksikliği hiperaktivite sendromu nedeniyle tedavi alıyor, yürüyemiyor, konuşamıyor, lösin düzeyi 238 saptandı.

11 No'lu hasta, 13 yaşında, kız, ağır büyüme geriliği mevcut, 3 kelimeli cümleler kuruyor, yürüteç yardımıyla yürüyor, özel eğitim ve fizik tedavi alıyor, lösin düzeyi 455 ölçüldü.

14 No'lu hasta, 10 yaşında, kız, 4 aylıkken tanı almış, mental retarde, okuma yazma bilmiyor, lösin düzeyi 282 ölçüldü.

Tablo 4.10. Sağlıklı kontrol ve tirozinemi tip 1 hasta gruplarının *GAPDH* genine göre normalize edilmiş gen ekspresyon değerleri.

ÇALIŞMA GRUBU	OTOFAJİ			İNFLAMASYON			
	BECLİN 1	LC3B-II	p62	NFKB	NLRP3	ASC	KASPAZ 1
SAĞLIKLI	100	100	100	100	100	100	100
HASTA 1	83	1	181	90	63	243	55
HASTA 2	86	1	243	188	35	189	80
HASTA 3	41	25	38	47	28	31	16
HASTA 4	146	31	115	98	157	45	95
HASTA 5	80	61	93	56	147	30	72
HASTA 6	181	7	155	67	247	296	26
ORTALAMA	103	21	138	91	113	139	57

ASC, Beclin 1, NLRP3 ve p62 genlerinde sırasıyla % 39, % 3, % 13 ve % 38 yükseklik saptanmıştır. LC3B-II düzeyinde belirgin düşüklük mevcuttu. Üç hastada NLRP3 geninde belirgin yükseklik saptandı.

4 No'lu hasta, 14 yaşında, erkek, 7 aylıkken tanı almış, mikronodüler siroz nedeniyle izlemde, idrarda protein mevcut, NTBC kullanıyor.

5 No'lu hasta, 12 yaş, erkek, 3 aylıkken tanı almış, abdominal ultrasonografisinde karaciğer heterojen görünümde, NTBC kullanıyor, alfa-fetoprotein düzeylerinde yükselme nedeniyle yakın takip ediliyor.

6 No'lu hasta, 13 yaşında,erkek, karaciğerde nodüller nedeniyle izlemde, nefrokalsinozis ve hipertansiyon mevcut. NTBC kullanıyor.

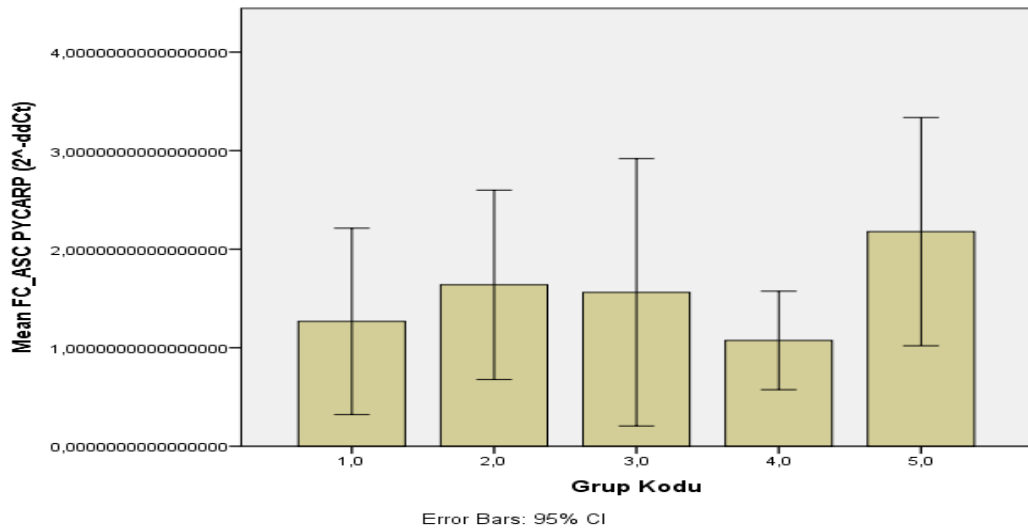
Karaciğerde inflamasyon ve fibrozis gelişen hastalarda hastalarda NLRP3 gen ifadesinde yükselme gözlenmektedir.

4.4. Hasta ve Sağlıklı Kontrol Gruplarında Gen Ekspresyonlarının Kat Değişimi

Bu grupta yapılan çalışmalarda sağlıklı kontrol bireylerinin gen ekspresyon değerleri baz alınarak hastaların gen ekspresyon sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda ortaya çıkan değerler kat değişimi olarak adlandırılmıştır.

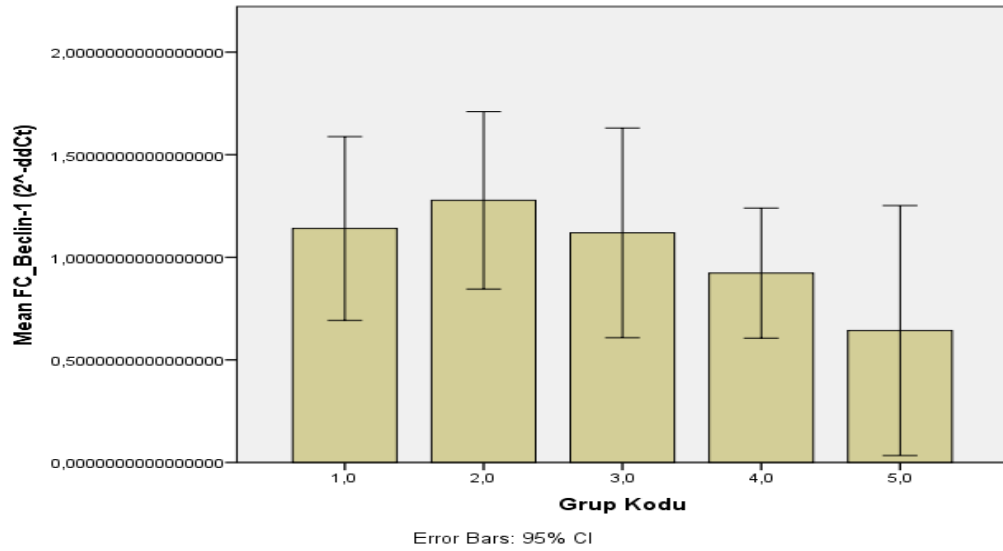
Grup Kodları

1: Sağlıklı kontrol 2: Galaktozemi 3:Tirozinemi tip 1 4: MSUD 5: LPİ



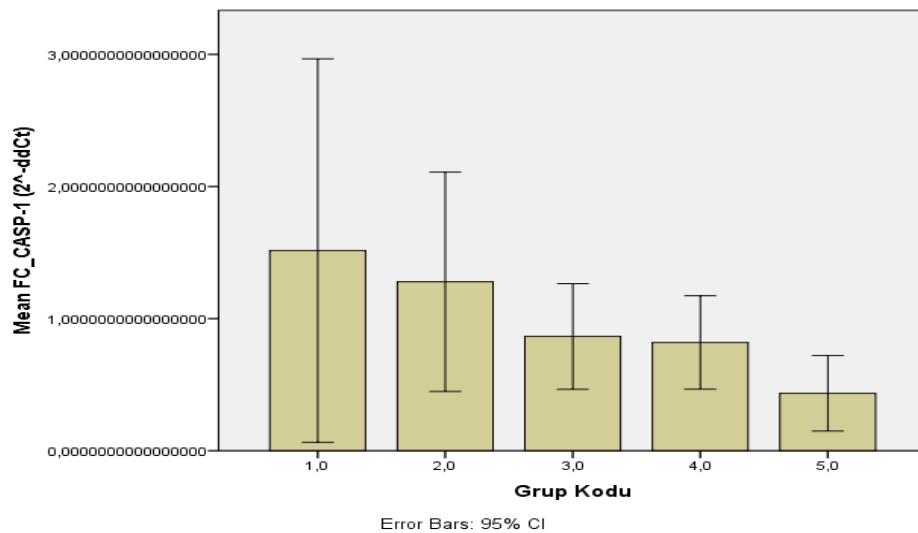
Grafik 4.2. Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında ASC gen ekspresyonu kat değişimleri.

Bu grafikte en yüksek ASC gen ekspresyonu LPİ grubunda gözlenmektedir. Galaktozemi ve Tirozinemi grubunda da kontrol grubundan yüksek değerler gözlenmektedir.



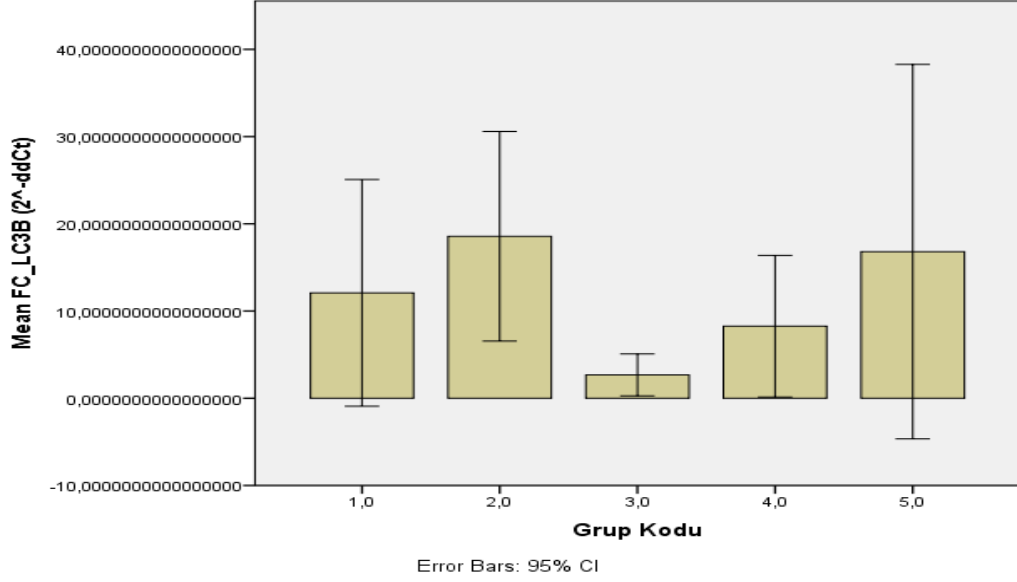
Grafik 4.3. Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında *Beclin 1* gen ekspresyonu kat değişimleri.

LPİ hastalarında *Beclin 1* gen ekspresyonlarındaki düşüklük mevcuttur. Galaktozemi grubunda ekspresyon seviyesi kontrol grubundan daha yüksektir.



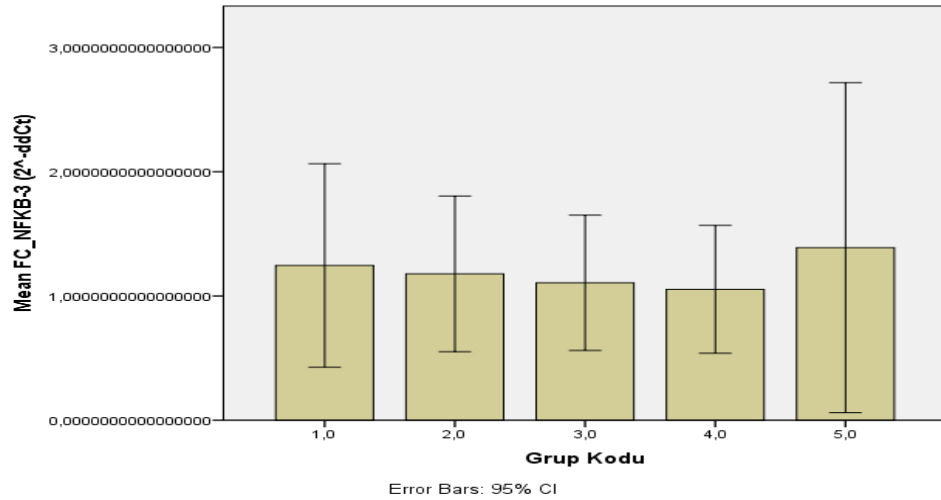
Grafik 4.4. Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında *Kaspaz 1* gen ekspresyonu kat değişimleri.

Kaspaz 1 gen ekspresyonları açısından gruplar arasında farklılık gözlemlendi. LPI grubu en düşük *Kaspaz 1* gen ekspresyonları LPI hastalarında gözlemlendi.



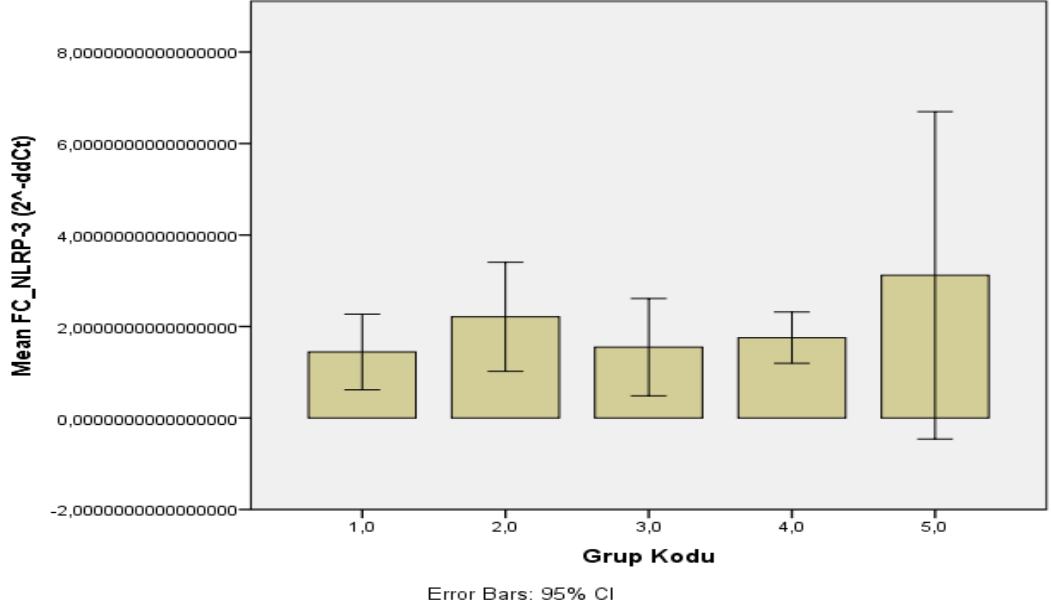
Grafik 4.5. Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında *LC3B-II* gen ekspresyonu kat değişimleri.

LC3B-II gen ekspresyonları gruplar içerisinde önemli farklılıklar göstermektedir. Çok düşük ve yüksek değerler görülmektedir. Tirozinemi hastalarında belirgin düşüklük mevcuttur.

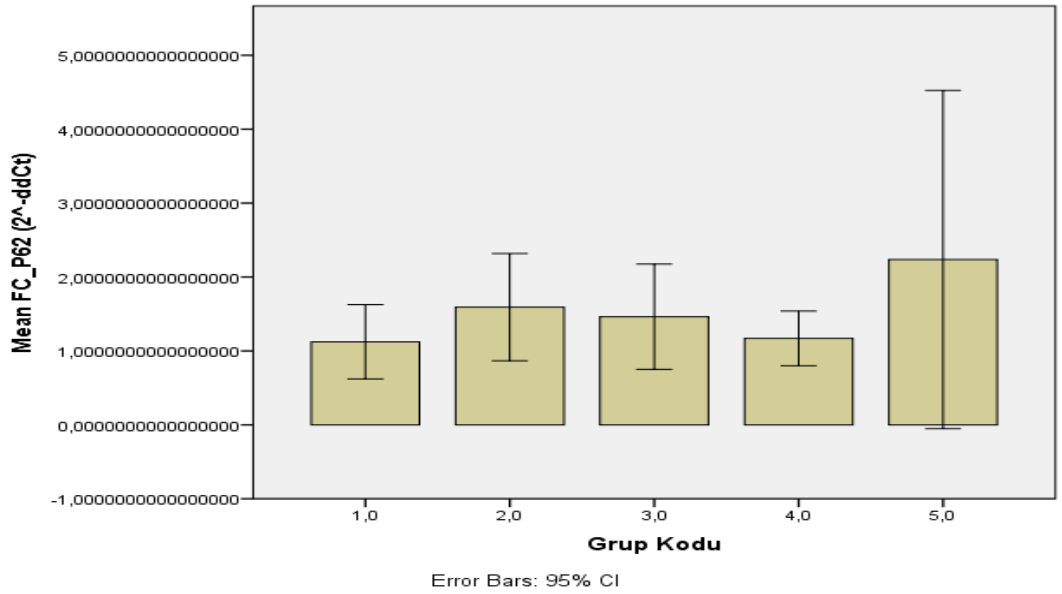


Grafik 4.6. Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında *NFKB* gen ekspresyonu kat değişimleri.

Hasta ve sağlıklı gruplar arasında önemli farklılık göstermemektedir. En yüksek değerler LPI grubunda saptandı.



Grafik 4.7. Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında *NLRP3* gen ekspresyonu kat değişimleri.



Grafik 4.8. Sağlıklı kontrol ve hasta gruplarında p62 gen ekspresyonu kat değişimleri.

Tablo 4.11. Gen Ekspresyonlarının Spearman Korelasyon Analizleri

	BECLIN 1		LC3B-II		p62		NFKB		NLRP3		ASC		Kaspaz 1	
	R	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P
<i>Beclin 1</i>	1	0	-0,121	0,469	0,645**	0	0,535**	0,001	0,604**	0	0,26	0,115	0,222	0,179
<i>LC3B-II</i>	-0,121	0,469	1	0	-0,086	0,607	-0,176	0,29	-0,01	0,951	-0,239	0,149	-0,035	0,836
<i>p62</i>	0,645**	0	-0,086	0,607	1	0	0,709**	0	0,530**	0,001	0,277	0,093	0,366*	0,024
<i>NFKB</i>	0,535**	0,001	-0,176	0,29	0,709**	0	1	0	0,383*	0,018	0,088	0,598	0,421**	0,008
<i>NLRP3</i>	0,604**	0	-0,01	0,951	0,530**	0,001	0,383*	0,018	1	0	-0,117	0,483	0,251	0,128
<i>ASC</i>	0,26	0,115	-0,239	0,149	0,277	0,093	0,088	0,598	-0,117	0,483	1	0	-0,337*	0,039
<i>Kaspaz 1</i>	0,222	0,179	-0,035	0,836	0,366*	0,024	0,421**	0,008	0,251	0,128	-0,337	0,039	1	0

Spearman korelasyon testi ile gen ekspresyonlarının birbirleriyle olan ilişkileri tüm hasta gruplarında incelendiğinde; **NLRP3 inflamazom gen ekspresyonunun Beclin 1 ve p62 otofaji genleriyle yüksek düzeyde pozitif korelasyon gösterirken, NF-KB geniyle de pozitif korelasyon gösterdiği saptandı.**

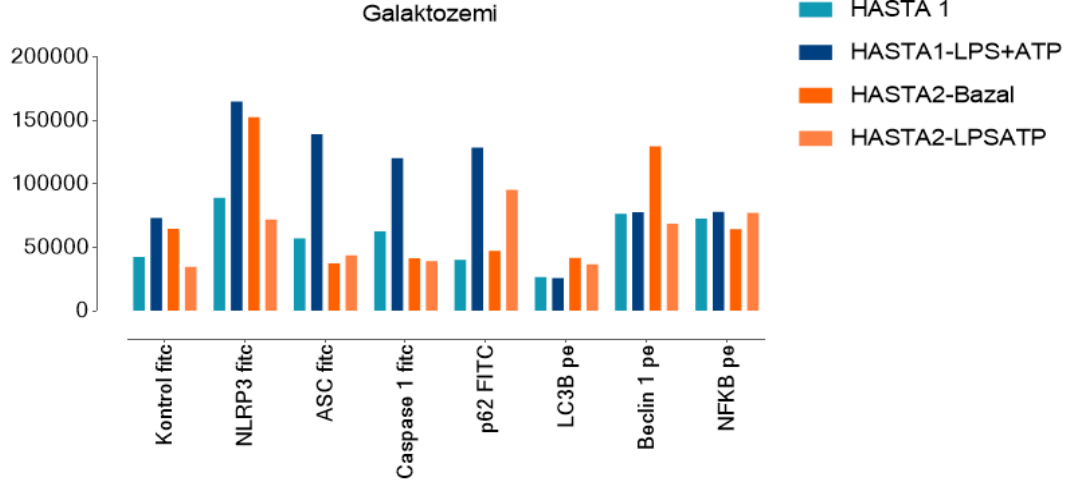
NF-KB; Beclin 1, kaspaz 1, NLRP3 ve p62 ile kuvvetli pozitif korelasyon göstermektedir. **Kaspaz 1; ASC** ile ters korelasyon, **NFKB ve p62** ile pozitif korelasyon bulundu. Adaptör protein **p62'nin Beclin 1, kaspaz 1, NFKB ve NLRP3** genleriyle pozitif korelasyon bulundu.

Kontrol grubunda; Beclin 1 ve p62 arasında çok yüksek pozitif korelasyon saptandı (**r:0,985****, **p=0,000**). Her iki otofaji geninin hasta gruplarından farklı olarak **LC3B** ile istatistiksel açıdan anlamlı olmasa da pozitif korelasyon gösterdiği saptandı (**r: 0,659**, **p=0,07**). Sağlıklı grupta **NLRP3** geninin hiçbir genle pozitif korelasyonu bulunmadı. **NFKB** geni, **ASC ve kaspaz 1** genleriyle pozitif korelasyon gösterildi.

4.4.1. Hücre İçi Protein Analizi

Hücre içi protein düzeyi ölçümleriyle ilgili deneyler biyolojik ürünlerimizin ve hücre sayılarımızın yeterli olmaması nedeniyle 2 galaktozemi, 2 tirozinemi, 2 LPİ, 3 MSUD, 2 sağlıklı kontrol bireyinin mononükleer hücreleri kullanılarak gerçekleştirildi.

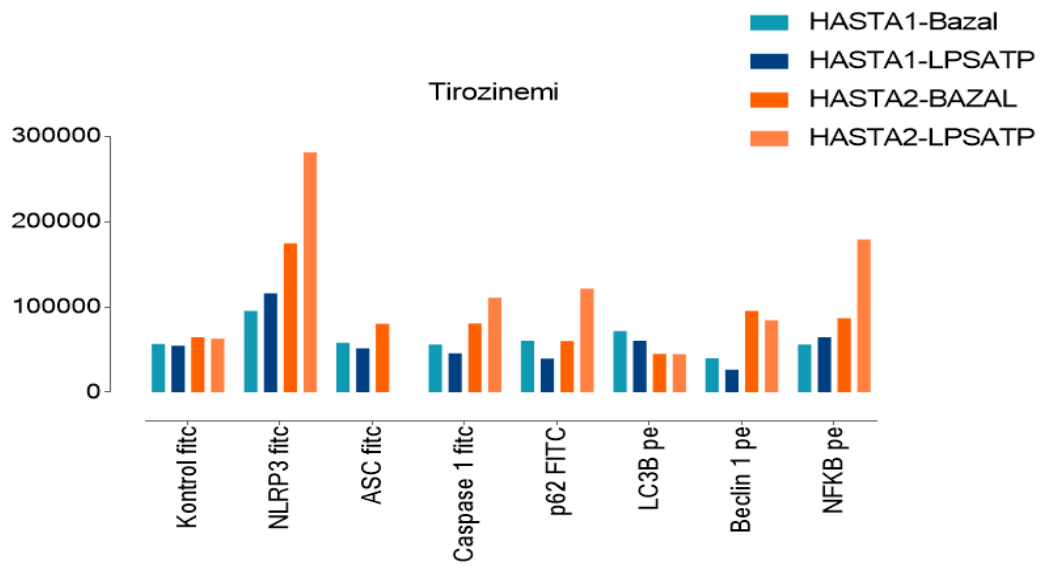
Tüm hasta ve kontrol gruplarında bazal protein düzeyleri ve LPS+ATP indüksiyonu sonrasında protein düzeyleri akım sitometri ile ölçüldü. Üç numaralı MSUD hastasında bazal protein düzeyleri ölçüldü. Bu hasta tüm gruplar içerisinde en yüksek nativ tiyol düzeyine sahipti. *P62* protein ekspresyonunun ölçülmesi amacıyla çalışmaya dahil edildi.



Grafik 4.9. Galaktozemi hastalarında bazal ve LPS+ATP ile uyarılmış protein ekspresyon düzeyleri.

1 No'lu hasta 3 yaşında erkek, 2 aylıkken katarakt operasyonu geçiren, inflamazom gen ekspresyonları en yüksek hastadır. LPS+ATP indüksiyonuyla inflamazom ve *p62* genlerinde yükselme mevcut, ancak *Beclin 1* ve *LC3B* uyarıya cevap vermediği gözlemlendi. İnflamasyon yolağı aktifleşirken, otofajik akışta baskılanma olduğu düşünüldü. Kaspaz 1 protein düzeyinde yükselme hücre ölüm yollarında aktifleşmeyi göstermektedir.

2 No'lu hasta, 11 yaşında kız, katarakt, overyen yetmezlik, dikkat eksikliği hiperaktivite sendromu nedeniyle izleniyor. Serum oksidatif stres belirteçleri çok yüksek olan hastanın inflamazom protein düzeylerinde yükselme mevcut. *Beclin 1* ve *LC3B-II* düzeyinde uyarıyla belirgin düşüklük bu hastalarda otofaji düzeylerinde düşme gözlenmiştir.

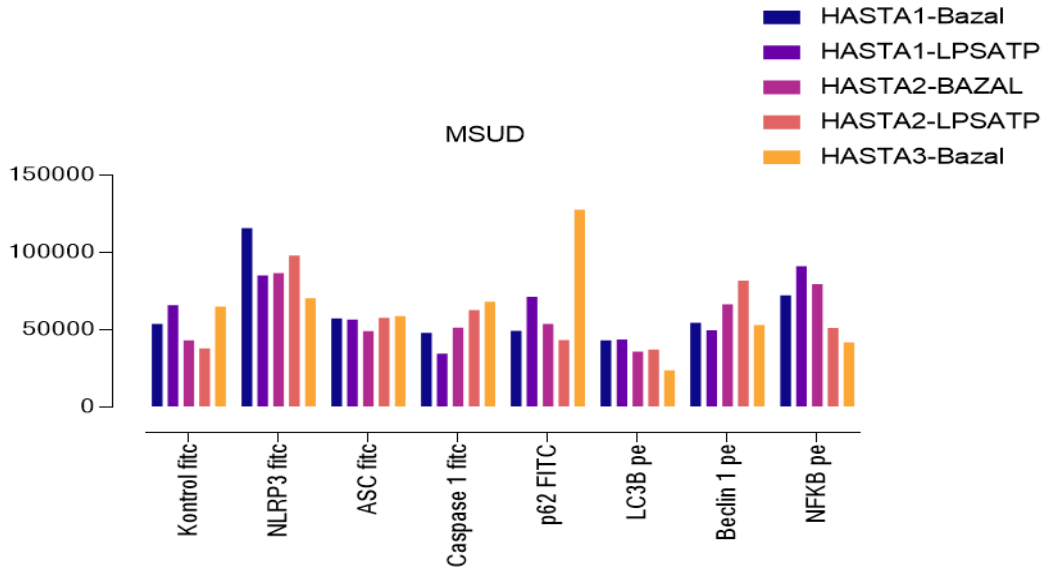


Grafik 4.10. Tirozinemi hastalarında bazal ve LPS+ATP ile uyarılmış protein ekspresyon düzeyleri.

1 No'lu hasta 8 yaşında erkek hasta, iyi kontrollü, *NLRP3* ve *NF-KB* protein düzeylerinde artış saptanırken, *Beclin 1* ve *LC3B-II* proteinlerinde düşüklük saptandı.

2 No'lu hasta 12 yaşında erkek, hepatomegali, karaciğerde yaygın heterojenite saptanan ve alfa-fetoprotein düzeylerinde yükselme nedeniyle izlenen hastanın bazal *NLRP* protein ekspresyon değerleri yüksek bulundu. Bu hastamızda indüksiyon sonrasında *NLRP3*, *p62*, *NF-KB* düzeylerinde ve *kaspaz 1* düzeylerinde artış, *LC3B-II* ve *Beclin 1* düzeylerinde düşüklük saptandı. Kaspaz 1 protein düzeyindeki yükseklik literatürle uyumlu olarak karaciğer fibrozisinde ilerlemeyle korelasyon gösterdiği düşünüldü. Bu hastamızda da otofajik akışta bozukluk mevcuttur.

İki hastamızda da inflamazom yollarının aktif olduğu, ancak yeterli otofajik cevabın olmadığı gözlenmektedir. İkinci hastada *NLRP3* ve *NF-KB* protein düzeyinde daha fazla artışın gözlenmesi hepatik inflamasyonun bu hastada ileri düzeyde daha fazla olmasıyla ilgili olabileceği düşünüldü.

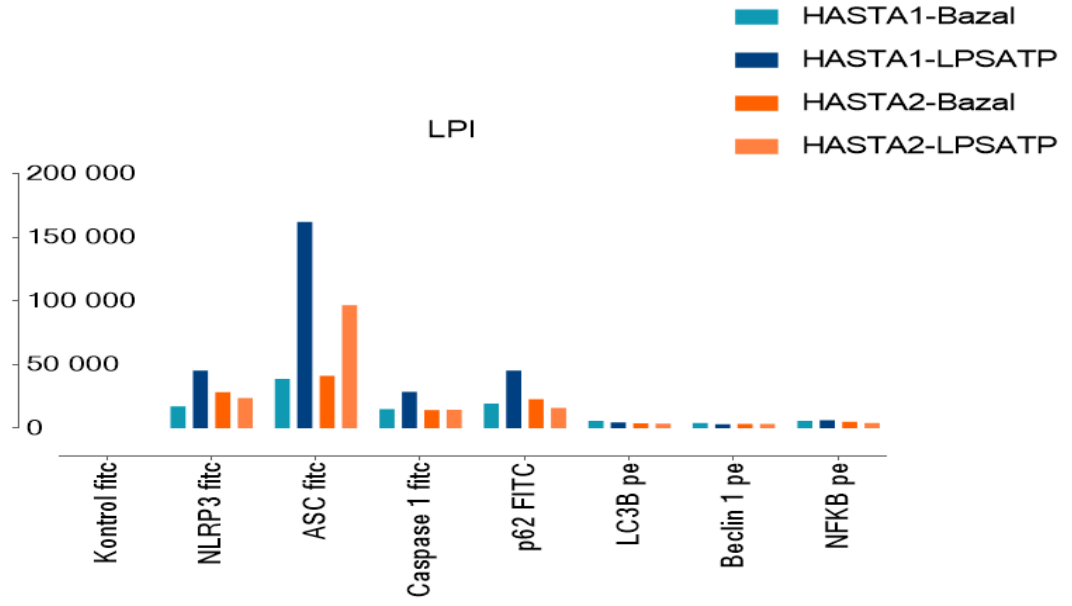


Grafik 4.11. MSUD hastalarında bazal ve LPS+ATP ile uyarılmış protein ekspresyon düzeyleri .

1 No'lu hasta 9 yaşında, mental gerilik, yüksek disülfid oranı, *NLRP3* düzeyinde düşüklük, *p62* protein ekspresyonlarında artış bulundu. P62 düzeyinde yükselme gözlenirken LC3B-II ve Beclin 1 ifadelerinde düşme gözlemlendi. Otofajik akışta bozukluk olarak değerlendirildi. P62 düzeyinde yükselme Nrf2 üzeinden antioksidan cevabın baskın olduğu düşünülebilir.

2 No'lu hasta 14 yaşında, erkek, ağır nörolojik bozukluk ve büyüme geriliği, vitiligo, epilepsi, dikkat eksikliği hiperaktivite hastalığı mevcut. bazal inflamazom gen ekspresyonu yüksek hasta, uyarıyla inflamazom protein ekspresyonlarında (*NLRP3*, *ASC*, *Kaspaz 1*) hafif artış, *Beclin 1* ifadesinde artış, *LC3B* düzeyinde farklılık gözlenmedi, *p62* ve *NF-KB* protein ekspresyonunda azalma saptandı.

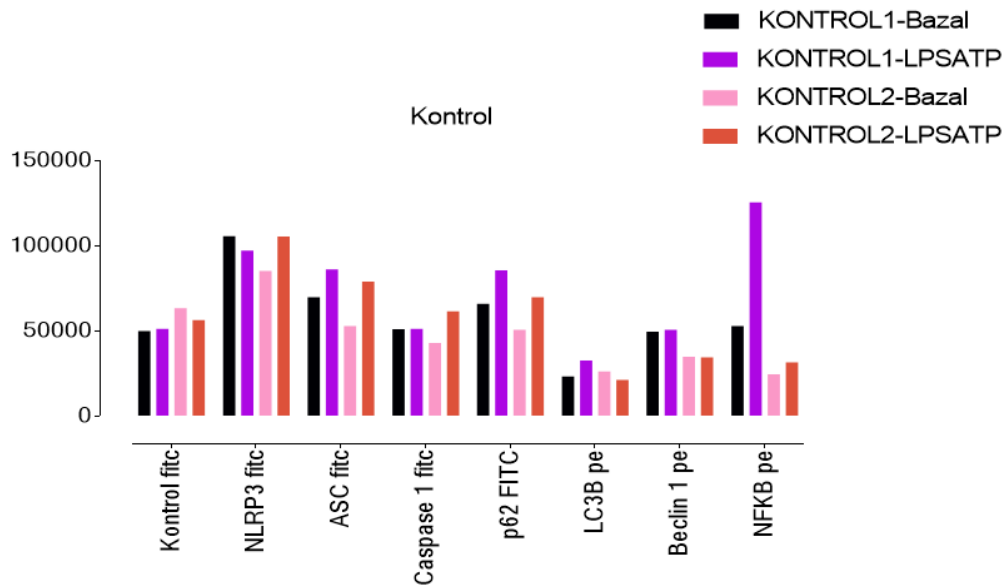
3 No'lu kız, 7,5 yaşında nörolojik bozukluğu olan hasta, kendi ihtiyaçlarını gideremiyor, özel eğitim alıyor, lösin düzeyi 217. *p62* protein düzeyinde belirgin artış saptandı. TAS ve nativ tiyol düzeyi en yüksek hastaydı. *p62*'nin Nrf2 yolağıyla antioksidan düzeyleri yükselttiği düşünüldü.



Grafik 4.12. LPI hastalarında bazal ve LPS+ATP ile uyarılmış protein ekspresyon düzeyleri.

1 No'lu hasta 11 yaşında kız, boy kısalığı, bisitopeni, osteopeni, kemik iliğinde hemofagositoz, tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonu mevcut. LPS+ATP uyarısıyla inflamazom gen ekspresyonlarında artış gözlenen hastanın *Beclin 1* ve *LC3B-II* otofaji protein ekspresyonlarında belirgin düşüklük saptandı.

2 No'lu hasta, 31 yaşında, erkek, kronik böbrek hastalığı, epilepsi, mental geriliği, osteoporozu, akciğer tutulumu mevcuttu. Bazal *NLRP3* ve *p62* gen ekspresyon düzeyleri yüksek bulundu. *NLRP3* düzeylerinde uyarıya düşüş şeklinde cevap gözlemlendi. Otofaji genlerinde de düşüklük saptandı.



Grafik 4.13. Sağlıklı kontrol bireylere ait bazal ve LPS+ATP ile uyarılmış protein ekspresyon düzeyleri.

1 No'lu sağlıklı bireye (15 yaşında, erkek) ait hücrelerde yapılan uyarıyla, *p62*, *LC3B*, *Beclin 1* protein seviyesinde artış saptandı. *NLRP3* protein de ise azalma mevcuttu. *NF-KB* düzeylerinde belirgin yükselme mevcut. Sağlıklı bireyde otofaji genleri arasında kuvvetli olmasa da pozitif korelasyon gözlenmektedir.

2 No'lu sağlıklı bireyde (13 yaşında, kız) inflamazom protein ekspresyon seviyelerinde yükselme gözlenmektedir. Bu sonuçlarla oksidatif strese ve inflamasyona yatkın bir birey olduğu anlaşılmaktadır.

4.5. İmmun Fenotiplendirme

4.5.1. Lenfosit Alt Grupları (Yüzde ve Mutlak Değerler)

Bu bölümde 10 galaktozemi, 10 MSUD, 6 Tirozinemi ve 3 LPI hastasının immün fonksiyonları araştırıldı. Tüm hasta grupları arasında lenfosit alt tipleri olan B lenfosit, NKT, CD4/CD8 ve HLADR3 yüzdeleri açısından karşılaştırıldığında anlamlı farklılıklar saptandı ($p < 0.05$) (**Tablo 4.12**).

Tablo 4.12. Hasta Gruplarında Lenfosit Alt Grupları Yüzde Değerleri.

Yüzde	Galaktozemi	MSUD	Tirozinemi	LPİ	P değeri
T lenfosit	69,8±6,8	61,8±7,2	61,8±7,9	56,3±19,8	0,11
B lenfosit	15,7±5,7	17,1±6,9	16,8±6,1	5,4±1,3	0,07
NK	9,9±4,9	14,9±8,2	13,3±4,5	27,8±21,2	0,17
NKT	3,3±3,4	6,4±5,2	6,2±4,3	9,5±3,3	0,02
DNT	8,2±2,6	8,6±3,4	12,5±3,6	7,3±5,6	0,14
CD4	56,4±8,4	56,1±5,5	55,7±5,4	58,3±13,3	0,99
CD8	34,7±6,2	34,1±5,6	31±3,7	33,3±8,3	0,48
CD4/CD8	0,52±0,17	0,92±0,46	0,7±0,1		0,04
CD3HLADR	5,06±2,3	13,1±8,4	6,7±3,1	10±0,88	0,01

***p<0.05** değerleri istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi

En düşük T ve B lenfosit düzeyleri LPİ grubunda saptanırken, NK ve NKT düzeyi en düşük galaktozemi, en yüksek LPİ grubundaydı.

T lenfosit yüzdelerinin en yüksek olduğu grup galaktozemi, en düşük LPİ grubuydu.

NK ve NKT düzeyleri en yüksek LPİ grubunda, en düşük galaktozemi grubunda saptandı.

DNT düzeyi tirozinemi grubunda en yüksek olup tüm gruplarda yüksek saptandı.

CD3HLADR (Aktive T lenfosit) düzeyi MSUD grubunda en yüksek düzeyde saptandı.

NKT yüzdesi açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edildi ($p<0,05$).

Yaş uyumlu sağlıklı Türk çocuklarıyla karşılaştırıldığında; T lenfosit yüzdeleri açısından LPİ grubunda bir, Tirozinemi grubunda iki, MSUD grubunda bir hastada düşüklük tespit edildi.

En düşük B lenfosit düzeyleri LPI grubunda saptandı.

CD3HLADR3 düzeyi; galaktozemi hastalarının yedisinde düşük, MSUD hastalarının dördünde düşük, 2 hastada yüksek, diğerlerinde normal aralıkta, tirozinemi hastalarının beşinde düşük, bir hastada normaldi. LPI hastalarının hepsinde normal bulundu.

Spearman korelasyon analiziyle; CD4+ lenfosit düzeyiyle NLRP3 ve Beclin 1 gen ekspresyonları arasında kuvvetli pozitif korelasyon saptandı.

Tablo 4.13. Hasta gruplarında lenfosit alt grupları mutlak değerler.

Mutlak değer	Galaktozemi	MSUD	Tirozinemi	LPI	p değeri (p<0,05)
T lenfosit	2622±901	1878,9±1092,6	1588±218,9	1320±727,7	0,01
B lenfosit	620,5±344,2	545,1±438,5	444,6±199,2	126,6±62	0,06
NK	360,4±151	415,6±251,4	352,3±161,3	536±262,6	0,69
NKT	123±124,8	181±125,8	167,5±126,3	213,6±93,4	0,29
DNT	198,8±40,3	180,5±178,9	202,3±77,3	94±82,5	0,06
CD4	1506,4±	1077±660,7	880,8±136,1	781,6±548,1	0,04
CD8	900,4±	604,3±268,9	490,3±80,6	416,3±212,8	0,002
CD4/CD8	13,4±5,4	18,3±12,4	11,3±1		0,26
HLADR3	126,1±54	237,6±169,2	112±65,4	128,2±62,4	0,26

T lenfosit, CD4 ve CD8 pozitif T lenfosit mutlak sayıları açısından tüm hasta grupları arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptandı (**p<0.05**). Galaktozemi ve MSUD gruplarında daha yüksek değerler saptandı. Aktive T lenfosit CD3HLADR; MSUD grubunda en yüksek saptandı.

4.5.2. Hasta ve Kontrol Gruplarının Monosit Fenotipleri Açısından Karşılaştırılması

Hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldığında klasik monosit grupları açısından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılıklar bulundu (p<0,05). Intermediate

monosit açısından gruplar arasında farklılık gözlenmedi ancak Galaktozemi ve MSUD hastalarında yüksek değerlere sahip hastalar mevcuttu (**Tablo 4.14**).

Tablo 4.14. Hasta ve kontrol gruplarının monosit fenotipleri.

	Galaktozemi	LPI	Tirozinemi	MSUD	p değeri (p<0,05)
Klasik monosit	90,5±6,5	95,5±2,8	95±2,2	88,2±6,1	0,04
Intermediate Monosit	6±4,8	3,9±2,4	3,1±1,2	5,7±2,8	0,285
Klasik olmayan monosit	2,7±2,3	0,53±0,4	1,6±1,2	5,1±4,1	0,02

*p<0.05 değerleri istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi.

4.5.3. Blastik Transformasyon (Lenfosit Aktivasyon) Sonuçları

Fitohemaglütinin (PHA) ile uyarıldıktan 72 saat sonra T lenfosit aktivasyon belirteçlerine ait ekspresyon değerlerinin ortalaması aşağıdaki şekilde bulundu.

Tablo 4.15. Hasta gruplarında blastik transformasyon (lenfosit aktivasyon) testi sonuçları.

	Galaktozemi	LPI	Tirozinemi	MSUD	p değeri
CD4CD69	15,4±9,7	31,1±6,3	15,0±7,6	14,3±9,7	0,111
CD4CD69	28,05±10,7	30,7±11,8	16,6±11,6	25,9±9,3	0,186
CD4HLADR	10,2±9,0	12,0±9,0	1,95±1,07	15,1±12,2	0,004

*p<0.05 değerleri istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi.

Sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında CD4+CD25+ lenfositler galaktozemi grubunda 5 /12 hastada, MSUD grubunda 6/10 hastada, tirozinemi grubunda 5/6 hastada düşük saptandı.

CD4⁺CD69⁺ lenfositler galaktozemi grubunda 2 hastada, MSUD grubunda 1 hastada düşük saptanırken, tirozinemi grubunda tüm hastalarda normaldi.

CD4+HLADR+ galaktozemi grubunda 6 hastada, MSUD grubunda 5 hastada, tirozinemi grubunda 2 hastada düşük bulundu.

LPI grubunda tüm hastaların blastik transformasyon sonucu normaldi.

4.5.4. Hasta ve Sağlıklı Kontrol Gruplara Ait Sitokin Düzeyleri

On yedi galaktozemi, 16 MSUD, 9 Tirozinemi ve 6 LPI hastasının sitokin düzeyleri ölçüldü.

Tablo 4.16. Hasta ve kontrol gruplarının sitokin düzeyi ortalamaları.

	Galaktozemi	MSUD	Tirozinemi	LPI	Kontrol	P değeri
IFN_G	7,35±1,75	6,53±1,74	6,78±1,20	7,75±1,08	6,57±1,61	0,42
IL_1B	7,00±1,24	7,83±1,24	9,44±6,73	6,75±1,54	7,21±1,63	0,49
IL_2	7,12±2,01	7,11±1,31	11,61±13,31	7,50±1,48	6,71±1,22	0,28
IL_4	8,79±3,20	7,56±3,34	26,11±57,37	8,50±1,22	7,07±2,42	0,64
IL_5	7,06±2,30	6,47±2,04	6,72±2,20	5,33±3,99	6,21±3,26	0,68
IL_6	14,47 ±10,6	18,33±31,3	24,50±37,66	11,58±1,66	14,93±13,79	0,84
TNF_A	5,23±1,03	5,05±0,72	5,41±1,36	4,83±0,98	5,64±1,02	0,55
GM_CSF	5,24±1,03	5,06±0,73	5,67±1,48	5,00±1,3	5,64±1,03	0,49
IL_10	4,50±1,10	4,25±1,30	4,39±2,04	5,00±1,30	4,21±1,63	0,68
IL_8	6,50±1,80	6,58±2,46	5,72±2,29	6,50±1,76	4,50±2,97	0,44

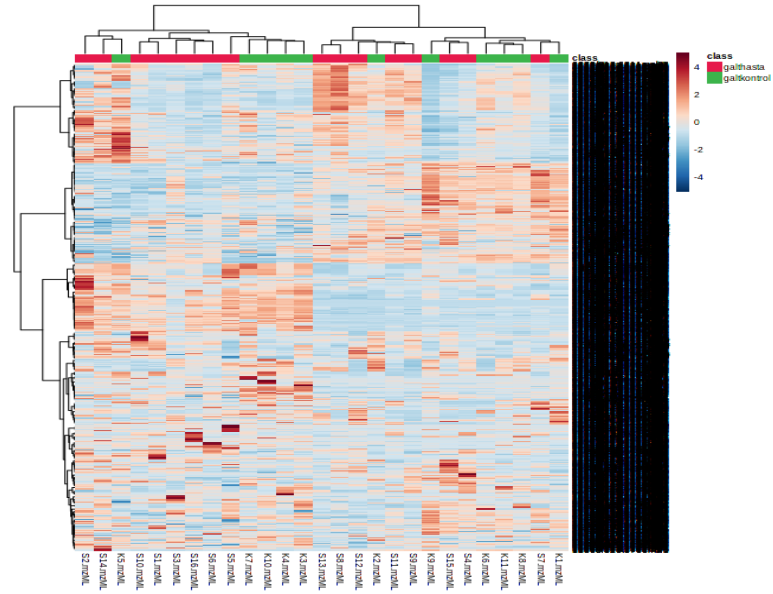
Hasta ve kontrol grupları arasında sitokin düzeyleri ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı.

4.6. Metabolomik Profilleme

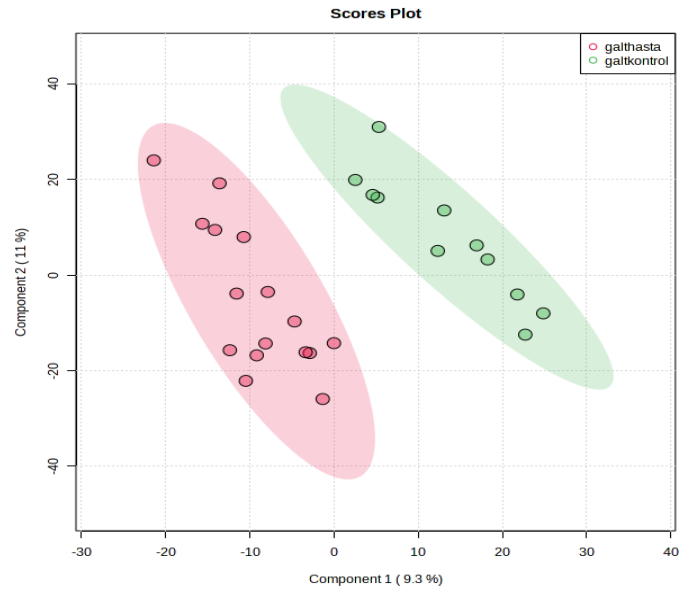
On yedi galaktozemi, 16 MSUD, 9 Tirozinemi ve 6 LPI hastasının hedefsiz metabolomik analiz testleri gerçekleştirildi. Hasta ve kontrol plazmalarında metabolitlerin MS-DIAL programında kütle/yük ve alıkonma zamanlarına göre metabolomik profillemesi yapıldı. İstatistiksel analiz sonucunda hasta ve kontrol grubunda metabolitlerin anlamlı düzeylerde farklılaştığı saptandı. Literatürde bu hasta gruplarında metabolomik analiz çalışması yapılmış çok az çalışma mevcuttur.

4.6.1. Galaktozemi

MS-DIAL programında istatistiksel olarak anlamlı bulunan metabolitler saptandıktan sonra Metaboanalyst 5 programında metabolomik yolak analizleri yapıldı.



Grafik 4.14. Galaktozemi ve kontrol hastalarında olası metabolitlerin hiyerarşik kümelenmesini gösteren ısı haritası.

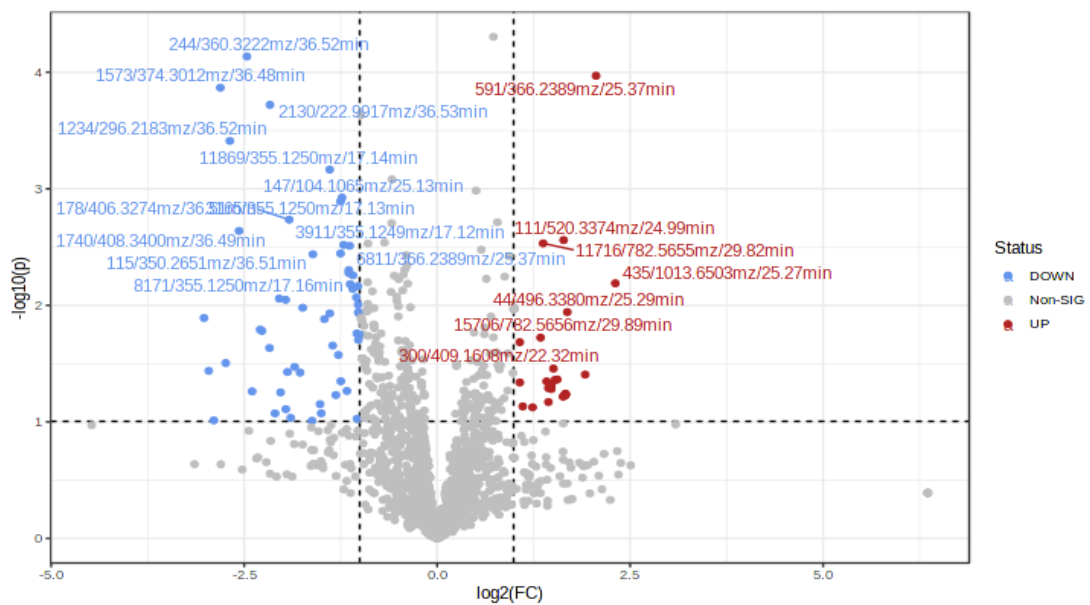


Grafik 4.15. Galaktozemi ve kontrol gruplarının PLS-DA grafiği.

Bu grafikte kırmızı renk galaktozemi hastalarına, yeşil renk ise kontrol vakalarına ait olası metabolitleri göstermektedir. Olası metabolitlerin yoğunlaştığı kısımlar daha yoğun gözükmektedir.

Bu grafik ısı haritalama grafiği olup galaktozemi ve kontrol gruplarında farklılaşan metabolitleri farklı renklerde göstermektedir.

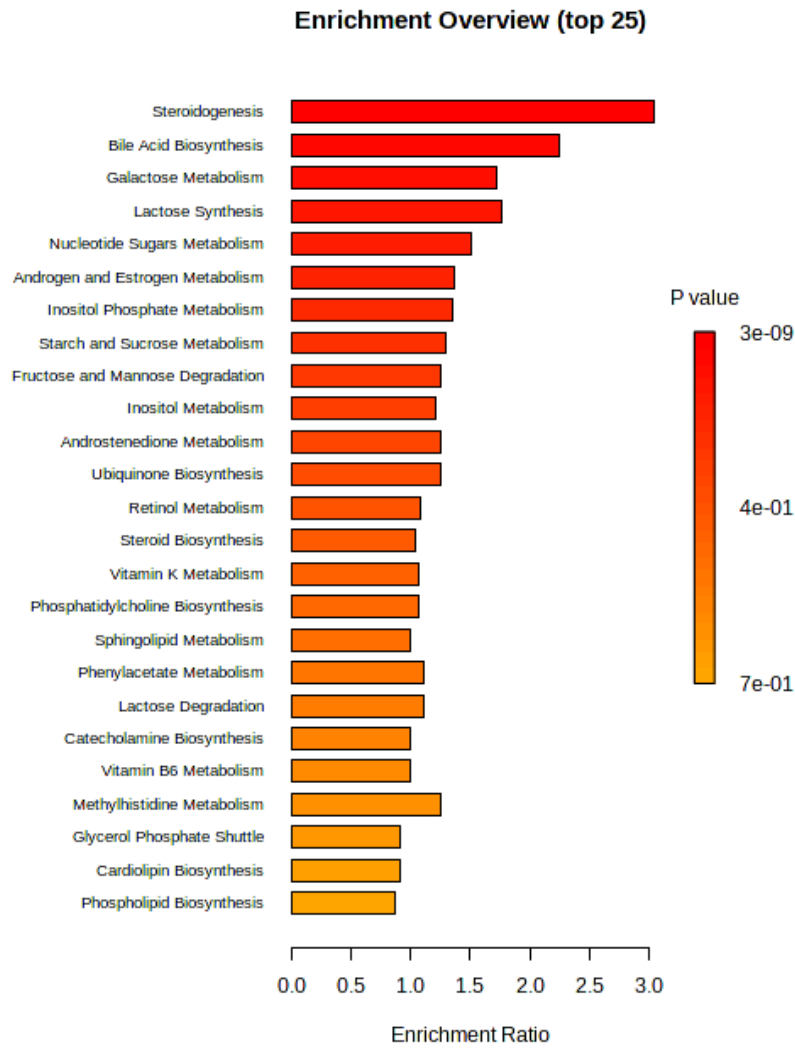
PLS-DA grafiği Galaktozemi ve kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılaşma gösteren olası metabolitleri göstermektedir.



Grafik 4.16. Volkan grafiği: Galaktozemi-kontrol gruplarında metabolomik profillemeye.

FC: fold change (kat değişimi)

Bu grafikte gri renk anlamlı farklılık göstermeyen olası metabolitleri temsil etmektedir. Sıfıra yakın kümelenme anlamlı değişiklik olmadığını göstermektedir. Mavi renk sol tarafta azalan olası metabolitleri, sağ taraf kırmızı renk artanları göstermektedir.

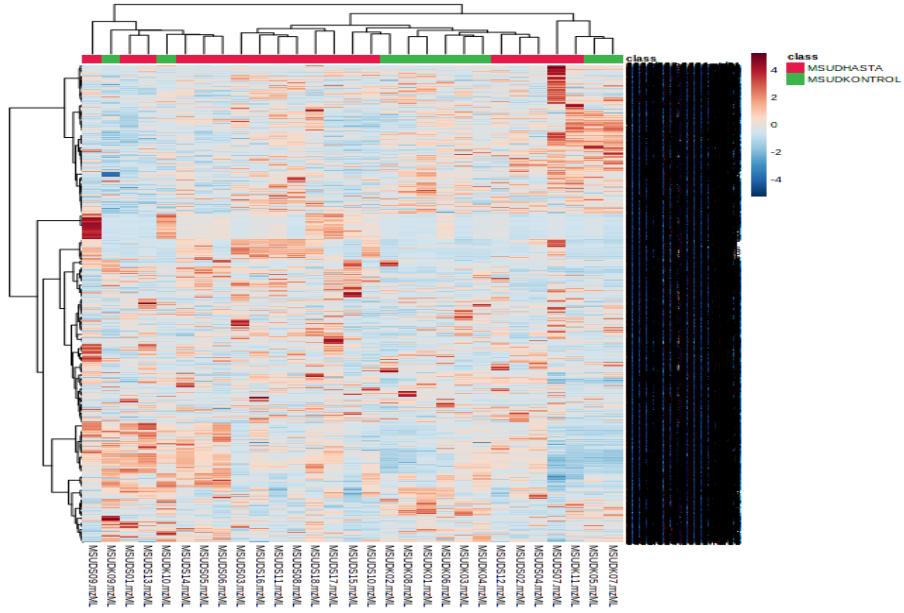


Grafik 4.17. Galaktozemi hastalarında en fazla etkilenen metabolomik yollar.

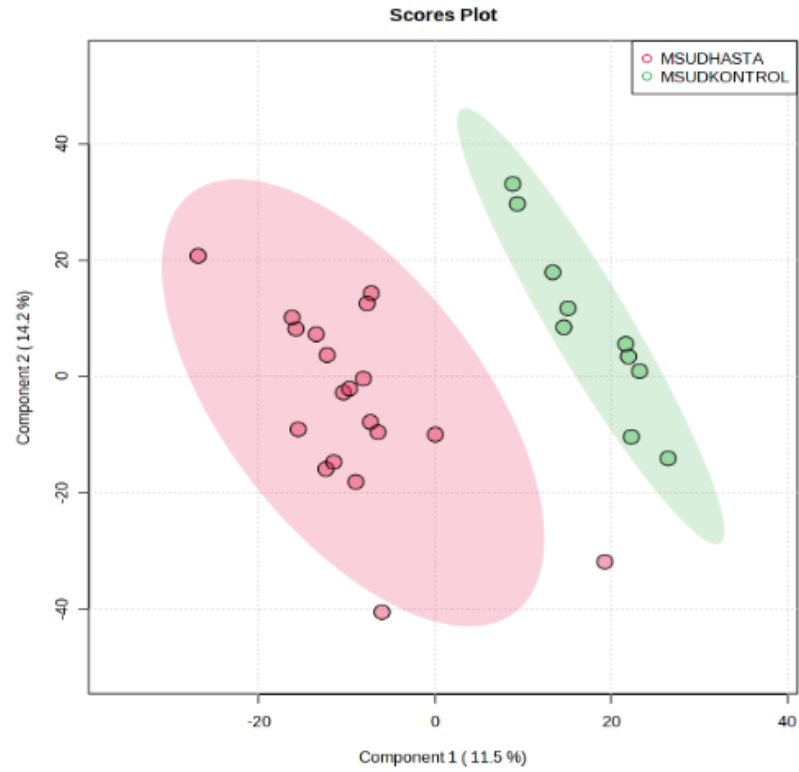
Zenginleştirme analiziyle metabolitlerin yoğun olarak bulunduğu yollar saptanmaktadır. Bu analizlerde rengin koyulaşması p değerinin küçülmesiyle doğru orantılıdır.

Galaktozemi hastalarında; metabolomik yollardan steroid hormon, safra asidi ve laktoz sentez, androjen ve östrojen, inozitol fosfat, lipit, vitamin ve katekolamin metabolizma yolları başlıca etkilenen yollardır. Gliserol fosfat mekiği ve ubikinon sentezi gibi enerji metabolizması yolları açısından hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlemlendi.

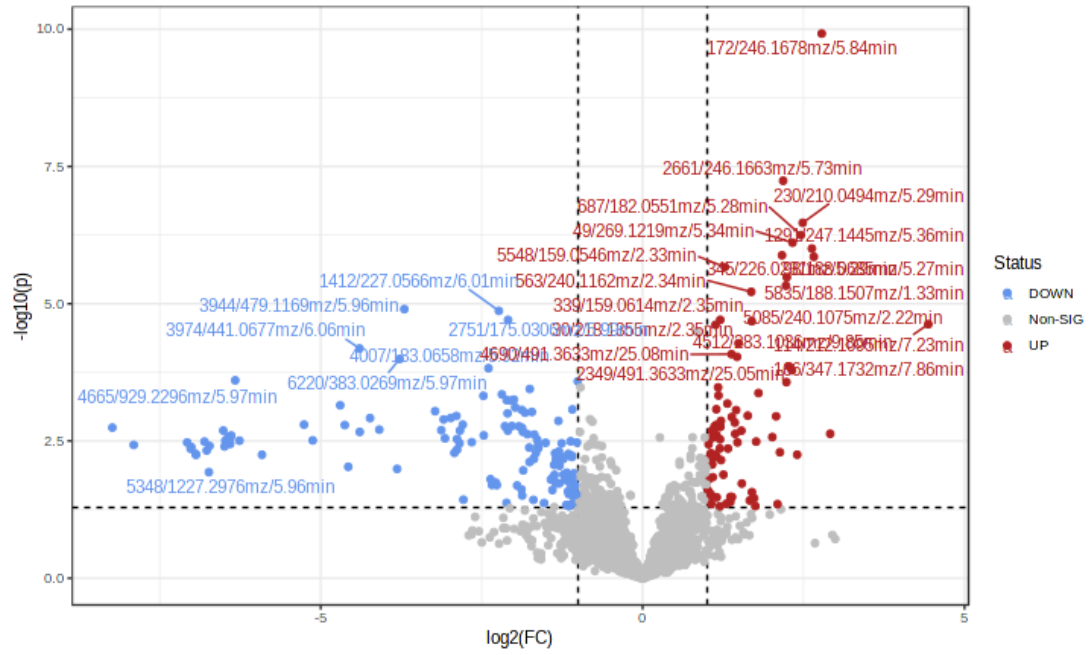
4.6.2. MSUD



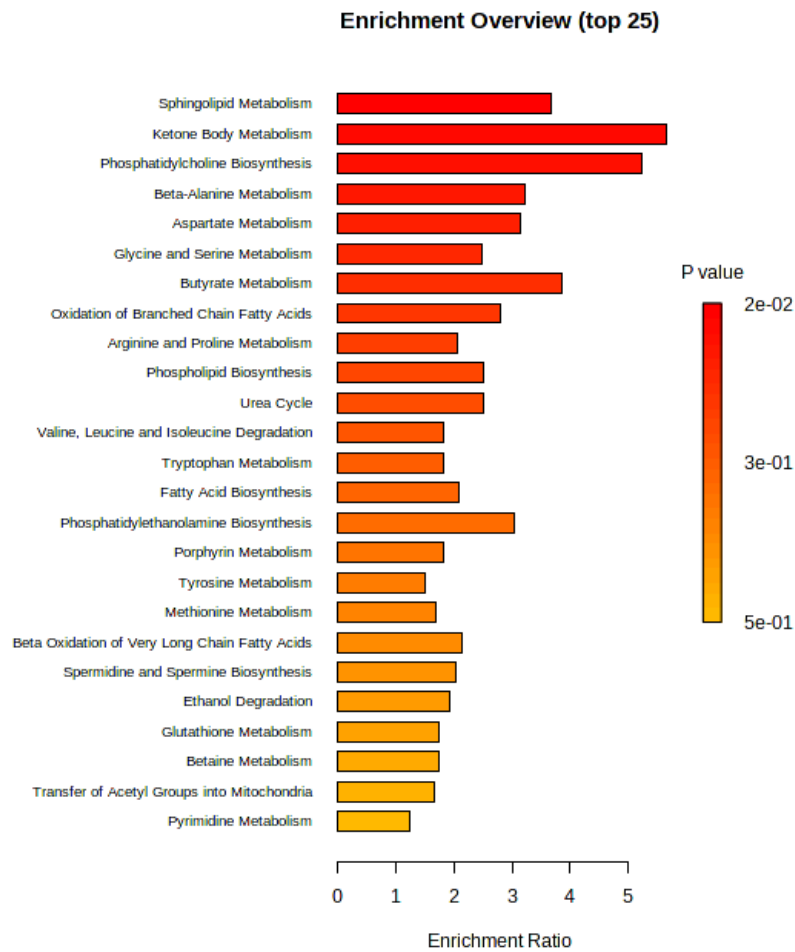
Grafik 4.18. MSUD ve kontrol hastalarında olası metabolitlerin hiyerarşik kümelenmesini gösteren ısı haritası .



Grafik 4.19. MSUD ve kontrol grubunun PLS-DA grafiği.



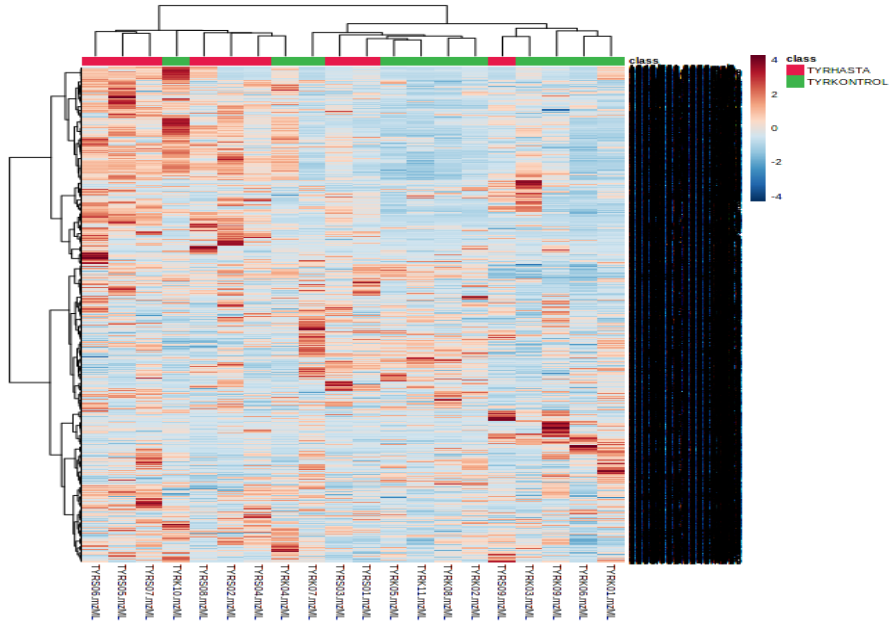
Grafik 4.20. Volcan grafiği: MSUD-Kontrol gruplarında metabolomik profilleme.



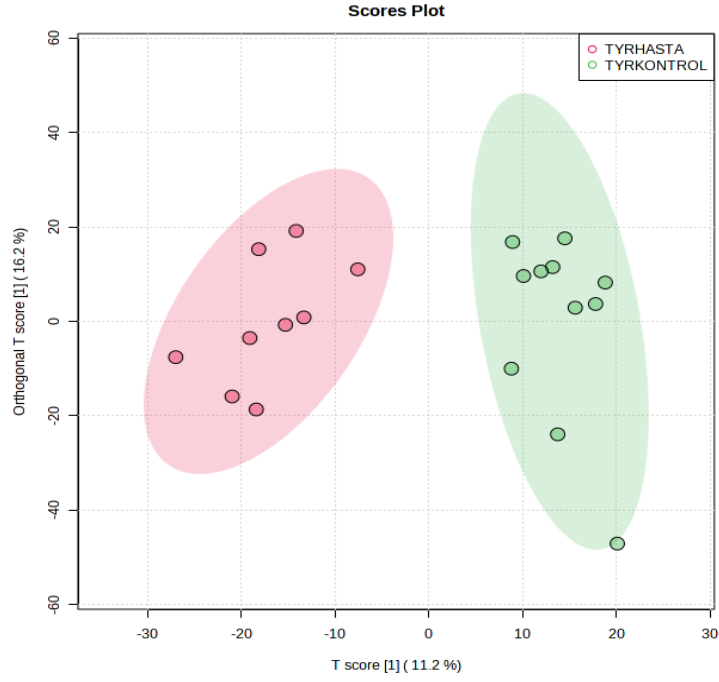
Grafik 4.21. MSUD hastalarında en fazla etkilenen metabolomik yollar.

MSUD hastalarında sfingolipit, fosfatidilkolin, fosfolipit, fosfatidiletanolamin, yağ asidi biyosentezi, lipit ve yağ asit metabolizmasıyla ilgili yollar en fazla etkilenmiştir. Keton cismi, β -alanin, aspartat, glisin-serin, arjinin-prolin, valin, lösin ve izolösin yıkımı, tirozin, triptofan gibi aminoasitleri ilgilendiren yollar, betain, methionin ve glutatyon gibi redoks sinyalizasyonla ilgili yollar, çok uzun zincirli yağ asitleri oksidasyonu gibi peroksizomal disfonksiyonla ilgili yollar, üre siklusu, porfiri metabolizması, poliaminleri (spermin-spermidin) ilgilendiren ve pirimidin metabolizması yollarının etkilendiği gözlenmektedir.

4.6.3. Tirozinemi

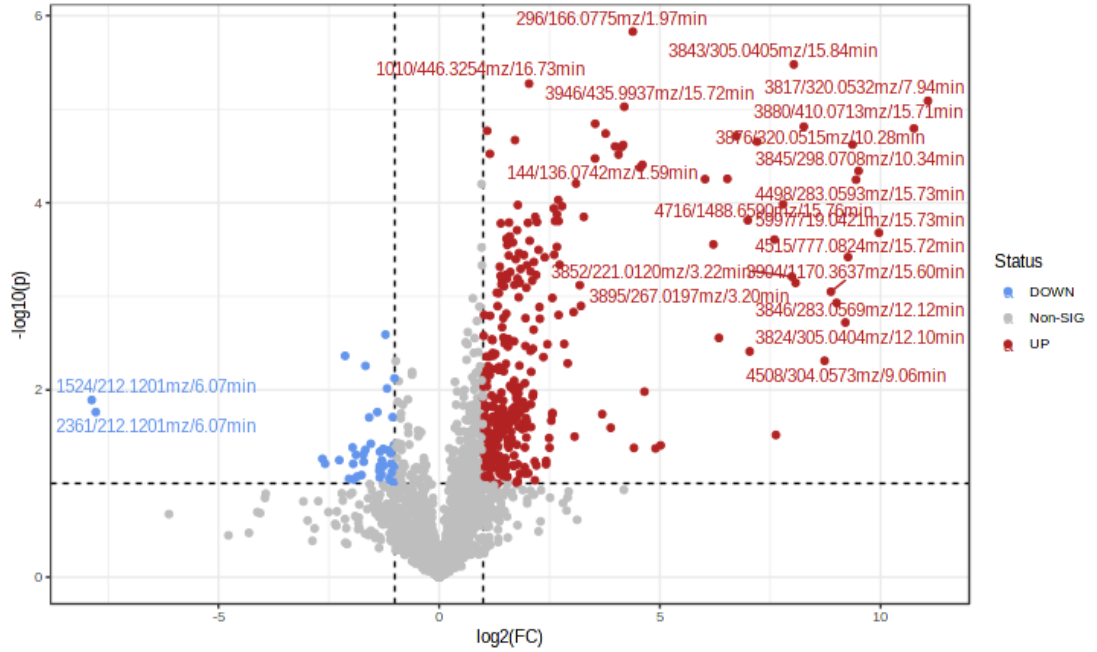


Grafik 4.22. Tirozinemi ve kontrol hastalarında olası metabolitlerin hiyerarşik kümelenmesini gösteren ısı haritası.

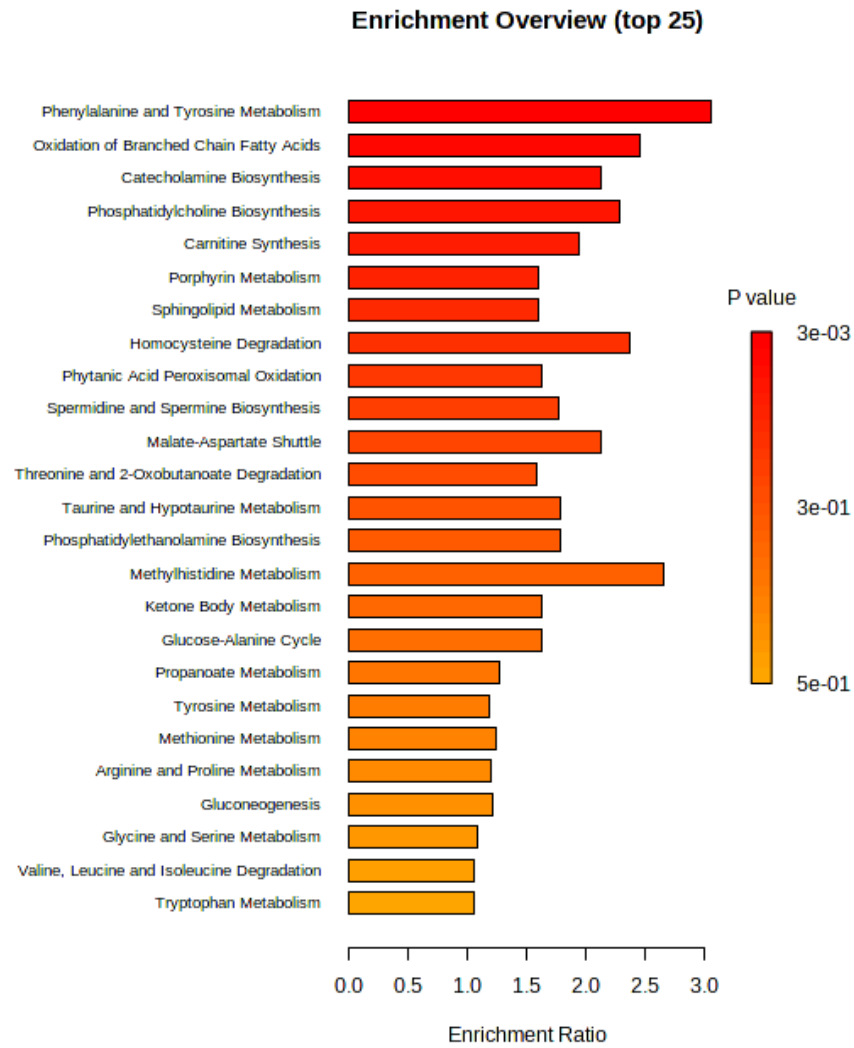


Grafik 4.23. Tirozinemi ve kontrol grubunun PLS-DA grafiği.

Hasta ve kontrol gruplarında olası metabolitler arasındaki farklılaşma net olarak gözlenmektedir.



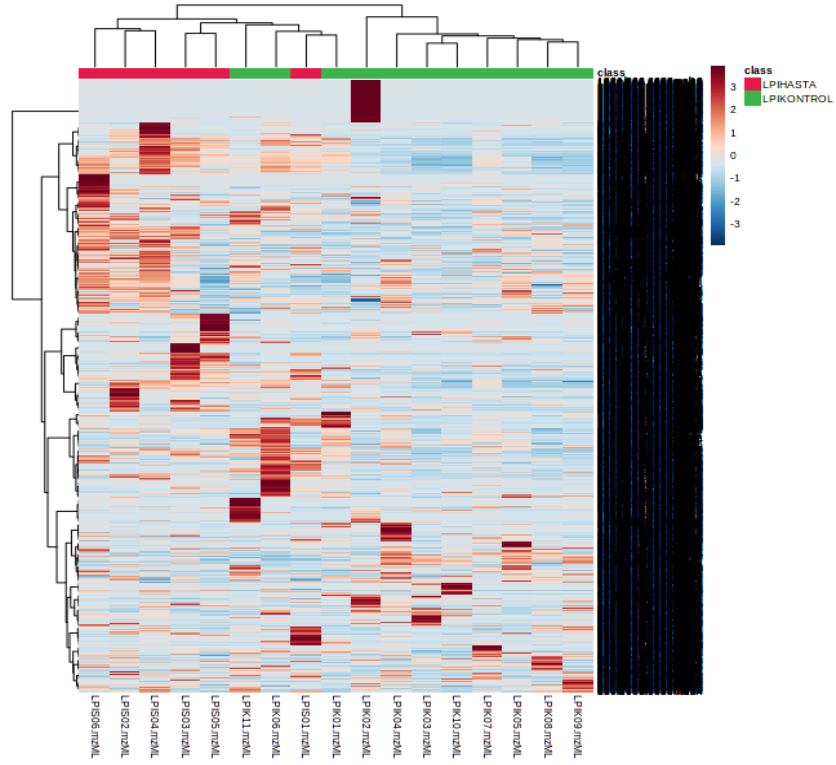
Grafik 4.24. Volcan grafiği: Tirozinemi-Kontrol gruplarında metabolik profillemeye.



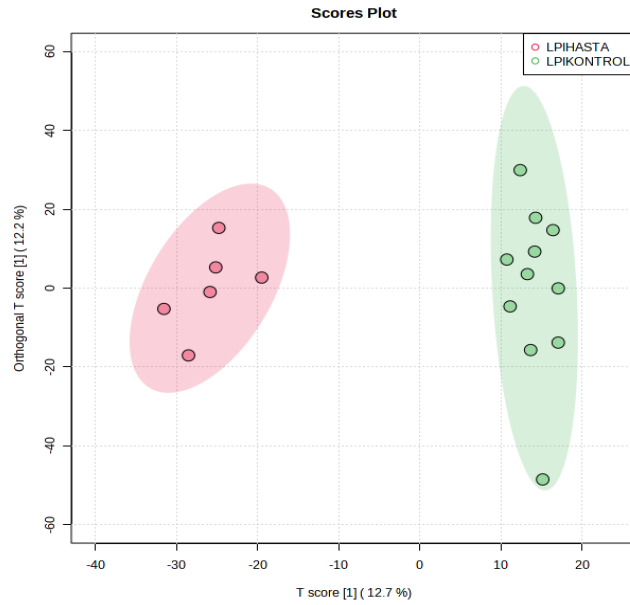
Grafik 4.25. Tirozinemili hastalarında en fazla etkilenen yollar.

Başta fenilalanin ve tirozin metabolizması olmak üzere, arjinin ve prolin metabolizması, malat-aspartat mekiği, metiyonin ve homosistein metabolizması, threonin ve taurin metabolizmaları, poliamin biyosentezi, yağ asitleri ve lipidlerle ilişkili yollar en fazla etkilenen yollar arasındadır.

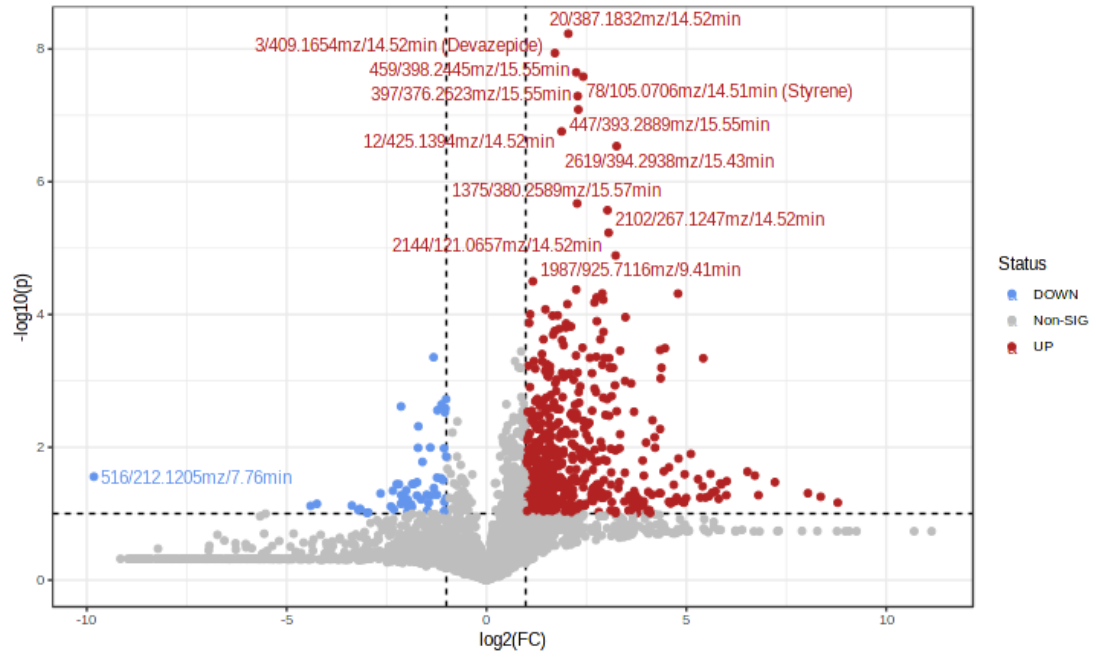
4.6.4. LPI



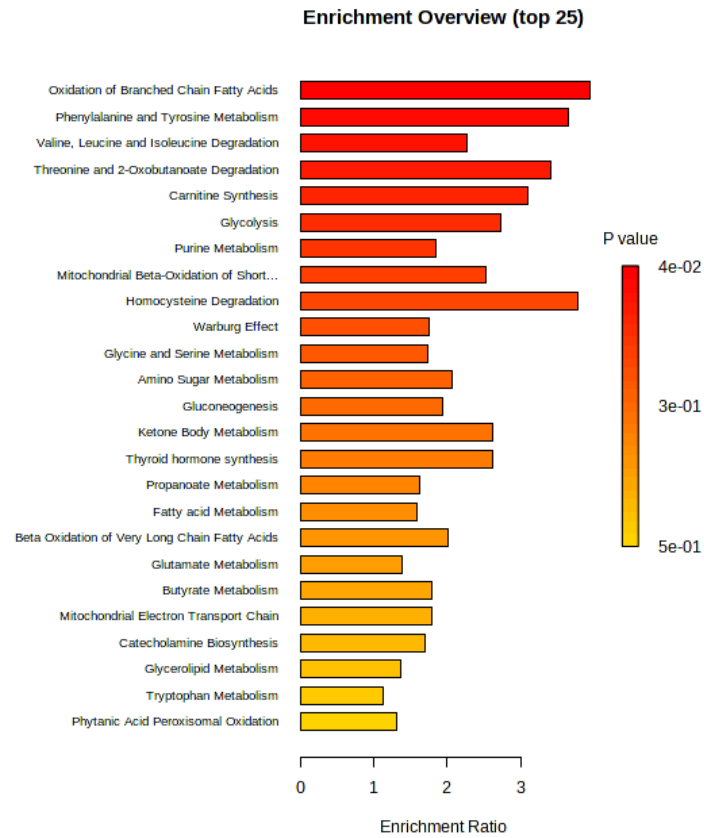
Grafik 4.26. LPI ve kontrol hastalarında olası metabolitlerin hiyerarşik kümelmesini gösteren ısı haritası.



Grafik 4.27. LPI ve kontrol grubunun PLS-DA grafiği.

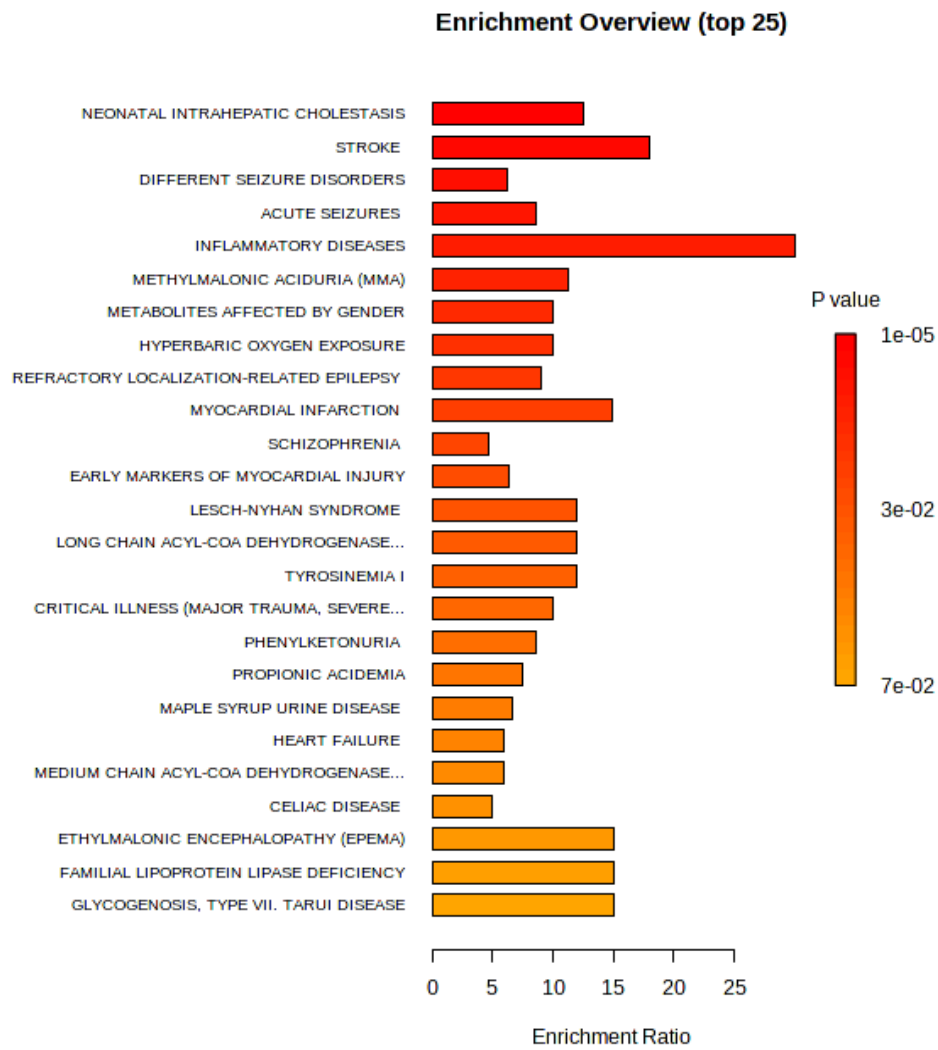


Grafik 4.28. Volkan grafiği: LPI-Kontrol gruplarında metabolomik profillemeye.



Grafik 4.29. LPI grubunda en fazla etkilenen metabolik yollar

LPI grubunda başlıca aminoasid metabolizması yollakları dışında glikoliz, glukoneogenez, elektron transport zinciri, warburg etkisi gibi enerji metabolizmasını ilgilendiren yollaklarda, keton cisim metabolizması, lipid metabolizması, mitokondriyal ve peroksizomal yağ asidi oksidasyonu ile ilgili yollaklar, karnitin sentez, katekolamin ve pürin metabolizması ile ilgili yollakların istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde etkilendiği gözlenmektedir.



Grafik 4.30. LPI'de etkilenen metabolik yollaklarla ilgili hastalık grupları.

LPI hastalarında etkilenen yollaklar kronik inflamatuvar hastalığı olan bireylerde etkilenen yollaklarla en fazla uygunluk göstermektedir. Ayrıca önceki grafikteki metabolit dağılımına uygun olarak LPI hastalarında etkilenmiş olan

metabolomik yolaklar kolestazisi, nörolojik hastalıkları, tirozinemi, fenilketonüri, MSUD , miyokard hasarı, propiyonik asidemisi, Çölyak hastalığı olan bireylerde etkilenmiş metabolik yolaklarla benzerlik göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Kalıtsal metabolik hastalıklar tek gen, tek hastalık modeline uygun olsalar bile hastalığın ileri dönemlerinde farklı klinik tablolar gözlenmektedir. Hastalarda gözlenen farklı klinik fenotipler, farklı genomik, biyokimyasal ve immün fenotipler olabileceğini düşündürmektedir. Tüm kronik hastalıkların patogeneğinde ve patofizyolojisinde etkili olduğu öne sürülen otofajik disfonksiyon, oksidatif stres ve inflamatuvar süreçler kalıtsal metabolik hastalıklarda komplikasyonların gelişmesinde de ortak mekanizmalardır. Çalışmamızda tüm hasta gruplarında hücre içi ROS dahil oksidatif stres belirteçlerinde artış veya total antioksidan kapasitede düşüklük, inflamasyon aktivasyonu belirteci olan NLRP3 ve p62 gen ekspresyonlarında artış, tüm hasta gruplarında LC3B-II'de düşüklük veya yükseklik gibi otofajik akışta bozukluklar, kontrol grubunda otofaji genleri olan p62/Beclin 1/LC3B-II genleri arasında pozitif korelasyon ve sağlıklı otofajik akış bulunmuştur. Bu sonuçlar bu üçlü mekanizmanın kalıtsal metabolik hastalıkların patogeneğinde rolü olabileceğini desteklemektedir. Ayrıca hasta grupları arasında T lenfosit, B lenfosit, CD4 +, NKT, DNT, CD3HLADR, klasik ve klasik olmayan monositler gibi immün hücreler açısından anlamlı farklılıklar olduğu gözlemlendi. Bu sonuçlar farklı hasta gruplarında farklı immün mekanizmaların etkisini göstermesi açısından önemlidir. Metabolik yolak analizleri incelendiğinde de tüm hasta gruplarında sağlıklı kontrol grubundan farklı yolların aktifleştiği gözlemlendi.

Hasta grupları oksidatif stres belirteçleri açısından karşılaştırıldığında en yüksek TOS ve OSİ değerleri MSUD grubunda saptandı. Kötü metabolik kontrollü hastalarda oksidatif stres göstergeleri yüksekti. Hastaların yarısında disülfid ve disülfid/nativ tiyol oranı kontrol grubundan yüksek saptandı. Disülfid ve lösin miktarı arasında anlamlı düzeyde pozitif korelasyon mevcuttu. Disülfid miktarı yüksek hastalarda *NLRP3* ve *p62* gen ekspresyonlarında da artış görüldü. MSUD grubunda tiyol değerlerinin de yüksek olması bu hastalarda adaptif antioksidan mekanizmaların aşırı çalıştığını göstermektedir. Ancak inflamazom gen ekspresyonlarında

galaktozemi ve LPI hastalarında gözlenen 4-5 kat artışlar MSUD grubundaki hastalarda gözlenmedi. Hastaların yarısında 1,7-2 kat artış değişimler gözlendi.

Tüm MSUD hastalarında nörolojik fonksiyon bozukluğu mevcutken *NLRP3* gen ekspresyonu yüksek hastalarda yürüme ve konuşma bozuklukları, epilepsi gibi nörolojik bulguların daha ağır olduğu gözlendi. Hastaların hepsinde de büyüme geriliği mevcuttu. Bu grubun galaktozemi grubuna göre daha ağır nörolojik defisiti mevcuttu. Redoks sinyalizasyon bozukluğunun ve oksidatif stresin majör etkilediği organlardan birinin beyin olması ve nöroinflamasyonun tetiklediği nörodejenerasyon nedeniyle ciddi nörolojik bulgular doğal bir sonuçtur. Klasik diyet tedavisi dışında MSUD karnitin gibi antioksidan tedavilerin uygulanabileceği bir hastalık grubu olarak görülmektedir.

Galaktozemi grubunda da oksidatif stres belirteçlerinden TOS değerleri oldukça yüksek bulundu. Özellikle katarakt ve hipogonadotropik hipogonadizm gibi komplikasyon geliştiren üç hastada hem disülfid düzeyleri hem TOS değerleri çok yüksek bulundu. Bu durum oksidatif stres ve klinik fenotip korelasyonu açısından değerlidir. Ayrıca bu hastalarda *NLRP3*, *ASC* ve *kaspaz 1* gen ekspresyonlarında da belirgin yükseklik mevcuttu. *NLRP3* ilişkili periodik ateş sendromlarında keratit, uveit, band keratopati, sklerit, kuru göz gibi göz bulgularının geliştiği bilinmektedir. Akut glokom patogenezinde de *NLRP3* ve *kaspaz 1* gen ekspresyonlarında yükseklik saptanması gözle ilgili komplikasyonların gelişmesinde inflamazom genlerinin patogenezdaki rolünü desteklemektedir.

Katarakt gelişen galaktozemi hastalarında farklı genotipler dikkat çekmektedir. Hastaların birinde kırılma (IVS3+2T>C), diğerinde birleşik heterozigot mutasyon (c.442C>T,c.460T>C), diğerinde yanlış anlamlı mutasyon (c.1018G>T) mevcuttu. Genotip-fenotip korelasyonu kurulamasa da inflamazom gen ekspresyonuyla (transkriptom), disülfid ve tiyol/disülfid dengesiyle korelasyon bulunması ilginçtir.

LPI grubunda disülfid ve disülfid/tiyol oranı en yüksek olup, TAS düzeyi ise anlamlı düzeyde kontrol grubundan düşük saptandı. Akciğer tutulumu olan LPI hastalarında otofaji yolağında rol alan NLRP3/p62 ekspresyonları çok yüksek saptandı, nötropeni ve kemik iliğinde hemofagositoz saptanan hastaların oksidatif stres göstergesi olarak nativ tiyol düşük, disülfid ve disülfid/nativ tiyol oranı yüksek bulundu. Klinik fenotiplerin farklı biyokimyasal fenotiplerle korele olması ve farklı yolların aktivasyonunu göstermesi açısından önemlidir.

Akciğer ve böbrek tutulumu olan hastalarda inflamazom geni NLRP3'ün ifadesinde artış olduğu gözlemlendi. Beclin 1 ekspresyonu da çok düşük saptanmıştır. Bu durum genetik delesyona veya arjinin eksikliğine bağlı olabilir. TAS düzeyinde düşüklük ise sekonder karnitin eksikliği veya uygulanan diyet tedavilerine sekonder olabileceği düşünülmektedir.

11 yaşındaki kız hastada LPS-ATP uyarısı sonrasında *NLRP3/p62* ekspresyonunda 3 kat artış protein düzeyinde anlamlı düşüklük saptandı. Boy kısalığı, bisitopeni, osteopeni, kemik iliğinde hemofagositoz, tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonu mevcut. LPS+ATP uyarısıyla inflamazom gen ekspresyonlarında artış gözlenen hastanın *Beclin 1* ve *LC3B-II* otofaji protein ekspresyonlarında belirgin düşüklük saptandı. *LPS* indüksiyonu sonucunda beklenen hücresel cevap koruyucu mekanizma olarak otofajinin aktive olmasını gösterir fakat bu hastada bu yanıt gözlenmedi. Otofajik fonksiyon bozukluğu inflamazomun ortadan kaldırılamamasına ve inflamasyonun daha da artarak komplikasyonların gelişmesine neden olabilir. 31 yaşındaki LPI tanılı erkek hastamızda bazal *NLRP3*, *p62*, *NFKB* ekspresyonları çok yüksek olmasına rağmen LPS uyarısına yanıt oluşmadığı görüldü. Bu durum hücrelerde belli bir doyumluğa ulaşıldığında uyarıcı faktörlerin etkisiz olduğunu düşündürmektedir. LPI hastalarında bağırsak mikrobiyotasındaki düzensizlik ve disbiyozis düşünüldüğünde, kronik endotoksin uyarısı altında olduğu düşünülebilecek LPI hastalarda tek doz LPS uyarısına cevap alınmaması şaşırtıcı değildir.

En yüksek *NLRP3* inflamazom gen ekspresyonu ölçülen hastamız 20 yaşında, kadın hasta akciğer tutulumu, meduller nefrokalsinozis, kreatin yüksekliği (0,9-1,1 arasında), lenfopeni, kemik iliğinde hemofagositoz ve boy kısalığı nedeniyle izlenmekteydi. Antioksidan kapasitesi düşük olan hastada tiyol/disülfid dengesi normaldi. Bu sonuç yaşla birlikte inflamasyonun ve komplikasyonların ilerlediği sonucunu düşündürmektedir. Metabolomik analizler sonucunda da bu grupta artan metabolitler en fazla inflamatuvar hastalıklarla uyumluydu.

Yaşla birlikte ilerleme gösteren, nedeni de tam anlaşılamayan böbrek tutulumu LPI olan hastaların ayrılmaz bir parçasıdır. Glomerüler veya tübüler disfonksiyon, kreatin yüksekliği, medüller nefrokalsinozis ve kronik böbrek yetmezliği hasta grubumuzda gözlenen renal bozukluklardır. Tüm hastalarda TAS düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı düşüklük ciddi boyutta oksidatif stres varlığını desteklemektedir. LPI grubunda monosit/lenfosit oranında yükseklik, klasik monosit düzeylerinde ve NK hücrelerinde belirgin yükseklik olup, kemik iliğinde de hemofagositoz izlendi. Bu sonuçlar sürekli immun aktivasyonu ve sublinik makrofaj aktivasyon sendromunu göstermektedir. Dolaşımdaki monositler dokulara geçerek makrofajlara dönüşmekte ve kronik inflamasyona neden olmaktadır. T ve B lenfosit düzeyleri diğer grup hastalardan 3 hastada ölçülmüş olmasına rağmen anlamlı düzeyde düşük saptanmıştır. Hastaların nerdeyse tamamında nötropeni, lenfopeni, B hücre düzeylerinde saptanan düşüklük immun yetmezliği göstermektedir. Ancak blastik transformasyon testleri normaldir. Daha fazla hastayla daha detaylı immun fonksiyonların araştırıldığı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Yeni yapılan bir çalışmada otofaji yolağında rol alan *NLRP3* aktivasyonu için birincil sinyal basamağının gerekli olmadığı saptandı. Bizim çalışmamızda da literatürdeki çalışmalardan farklı olarak LPS/ATP indüksiyonu olmadan bazal gen ekspresyonları çalışıldı ve tüm hasta gruplarında *NLRP3* gen ekspresyonunda yükseklik saptandı. Bu durum ikinci sinyal molekülü olan ROS düzeylerinin yüksek olmasının inflamatuvar yolağı aktifleştirdiği şeklinde yorumlanabilir.

Aktif enfeksiyonları veya metabolik kriz tabloları olmadığı dönemde yapılan bu çalışmanın sonuçları hastalıkların fizyopatolojisinde kronik inflamasyon ve doğal immün sistemin etkisini göstermesi açısından önemlidir. Literatürde bu hasta gruplarında inflamazom gen ekspresyonlarının ve proteinlerinin çalışıldığı araştırma mevcut değildir.

Tüm hastalarda hücre içi otofaji ve inflamazom protein düzeyleri flow sitometri yöntemiyle ölçüldü. Bazal protein düzeyleri ve uyarı sonrasındaki değişiklikler 7 protein için ölçüldü. Gen ekspresyon analizlerinde olduğu gibi *NLRP3* ve *p62* proteinlerinin birlikte hareket ettiği gözlemlendi. *Beclin 1* ve *LC3B-II* düzeylerinde de genel olarak düşüşler mevcuttu. Galaktozemi grubunda gen ekspresyonuyla uyumlu yüksek değerler saptandı. Literatürde LPS uyarısı sonrasında otofaji indüksiyonunu destekleyen çalışmalar mevcuttur. Hastalarımızda ise otofajik akışta bozukluk gözlemlendi.

Aflaki ve ark. çalışmasında Gaucher hastalarının makrofajlarında (GM) lizozomal disfonksiyona bağlı otofajinin bozulduğu ve inflamazom aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (83). LPS-ATP uyarımına bağlı otofaji inhibe olurken ve LC3B'de düşüklük gözlenirken, inflamazomun sürekli aktivasyonu vardır. GM'de otofajik adaptör p62'nin düzeyi artarak inflamazomun otofagozomun içine alınması engellenmiştir. Bizim çalışmamızda tüm hasta gruplarında *NLRP3* geni ve *p62* arasında yüksek pozitif korelasyon mevcuttur. Sağlıklı kontrol grubunda *Beclin 1* ve *p62* gen ekspresyonları çok kuvvetli pozitif korelasyon gösterirken LC3B-II gen ekspresyonuyla da pozitif korelasyon mevcuttur. Hasta gruplarında ise LPS uyarısına karşı otofaji genlerinde düşüklük veya cevapsızlık gözlenmektedir. Gen ekspresyon ve protein analizleri hasta gruplarında otofajik disfonksiyonun varlığını göstermektedir. Otofaji normal şartlarda aşırı ROS üretiminde hasarlı mitokondrileri uzaklaştırarak veya glutatyon sentezini artırarak hücreyi korumaktadır. Ancak aşırı p62 ekspresyonu nedeniyle kalıtsal metabolik hastalıklarda bu süreç bozulmaktadır. Çalışmamız *p62* yüksekliğinin *Nrf2* üzerinden antioksidan mekanizmaları tetiklediğini göstermektedir. TOS düzeyleriyle TAS düzeyleri arasında pozitif korelasyon oksidatif stres artışıyla

birlikte antioksidan sistemlerin cevap verdiğini göstermektedir. Ancak belli eşik değeri üzerine çıkıldığında adaptif antioksidan mekanizmalar yetersiz kalmaktadır. Bu durumda NLRP3 geni aktifleşerek inflamasyon ve hücre ölüm yolaklarını harekete geçirdiği düşünülebilir.

Çalışmamızda tüm hasta gruplarında hücre içi ROS düzeylerinde artış saptandı. Belli bir eşik değeri ve sürenin sonucunda oksidatif stres artık tolere edilebilen 'eustres' durumundan 'distres' tarafına geçerek organ disfonksiyonuyla sonuçlanmaktadır. Antioksidan tedaviler ise redüktif strese neden olabileceğinden dikkatli başlanmalı ve takip edilmelidir. Ancak sağlıklı kontrollerde bile hiçbir zaman fizyolojik sürecin olmadığı, organizmada kompensatuvar mekanizmaların yoğun çalışmasıyla hastalıkların önlendiği görülmektedir. Hangi ROS düzeyinde patolojik sürecin başladığı ve uygulanacak tedavi dozları ve süresiyle ilgili daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kalıtsal metabolik hastalıklar, immundisregülasyon, enfeksiyonlara yatkınlıkları, otoimmünite, otoinflamatuar hastalık ve kanser geliştirme potansiyelleriyle immün yetmezlik profiline uygun hastalıklardır. Çoğu metabolik hastalıkta doğal ve adaptif immün sistemde kalitatif ve kantitatif değışiklikler gözlenmektedir. Çalışmamızda immün fenotip ve klinik bulgular arasında korelasyon göze çarpmaktadır. Aslında metabolik hastalıklı çocuklar nörodejeneratif hastalıklar gibi yaşlılık benzeri klinik bulgular geliştirmektedir, yani erken bir "inflammaging" durumu gözlenmektedir. Farklı klinik tabloların farklı dokulardaki NLRP3 gibi doğal immün sisteme ait gen ekspresyonlarındaki farklılıklara bağlı olabileceği düşünülebilir. LPİ hastalarında alveolar makrofajların etkilenmesi pulmoner alveoler proteinozis tablosuna neden olurken, MSUD hastalarında mikrogliya hücrelerindeki gen ekspresyonları nöroinflamasyonu tetiklemektedir. Galaktozemi hastalarında göz ve over tutulumu NLRP3 inflamazom gen ekspresyonu ile ilgili olabilir. Bu durum her hasta grubunda farklı organlarda eksprese edilen doğal immüniteyle ilgili gen ekspresyonlarının klinik fenotipleri etkilediğini düşündürmektedir. Örnek olarak LPİ metabolik ve immün fenotiplerin birlikte gözlendiği bir hastalıktır. Tringham M ve ark

Finlandiya’da yaptıkları çalışmada 926 gen ekspresyonunda farklılık tespit etmişlerdir (23). Transkriptomik analiz sonucunda inflamatuvar cevap, immun sistem süreçleri ve apoptozis gibi biyolojik süreçlerde anlamlı farklılıklar bulunmuştur. SLC7A7 geni dışındaki farklı gen ekspresyonlarının farklı semptomlardan sorumlu olabileceği belirtilmiştir.

CD3+CD4-CD8- T cells (double-negative T cells- DNT) kronik inflamatuvar hastalıklarda ve otoimmün hastalıklarda patolojik veya regülatör fonksiyonları vardır. Dokularda birikerek sitokin sentezledikleri ve inflamasyonu tetikledikleri gösterilmiştir. İnflamatuvar hastalıkların aktivasyonunda, organ inflamasyonunda ve hastalığın progresinde önemli bir belirteç olabileceği düşünülmektedir (106). İskemik atak geçiren hastalarda beyinde ve periferik kanda DNT hücrelerinde yükselme saptanmıştır ve nöroinflamasyonla ilişkili olduğu belirtilmiştir (106). Çalışmamızda tüm hasta gruplarında DNT yüksekliği saptanmıştır. DNT yüksekliğinin en fazla olduğu grup ise tirozinemi hastalarıdır. Özellikle mikronodüler siroz ve karaciğerde ileri düzey heterojenite saptanan iki hastada yaş gruplarına göre çok yüksek değerler görülmektedir. Hastalığın progresyonunun izlenmesinde biyobelirteç adayı olabilir. DNT tedavi amaçlı çok dikkat çekici bir hücre grubu olup bu konuda ileri düzeyde çalışmalar devam etmektedir.

Çalışmamızda öne çıkan diğer hücre grubu aktive T lenfosit olan CD3HLADR’dır. MSUD grubunda yaşlarına göre düşük, yüksek ve normal değerler bulunmuştur. Galaktozemi ve tirozinemi hastalarında biri hariç hepsinde düşük, LPI hastalarında ise yaşlarına göre normal bulunmuştur. Bu hastalarda enfeksiyonlara yatkınlık nedenlerinden biri bu aktive T lenfosit düzeylerinde düşüklük olabilir. ROS düzeyleriyle T lenfosit aktivasyonu arasında önemli ilişki mevcuttur. Özellikle MSUD hastalarında T lenfosit aktivasyonu diyabet gibi otoimmün hastalıkların tetiklenmesiyle ilişkili olabilir. Galaktozemi ve MSUD hastalarında T lenfosit aktivasyon düşüklüğü hastaların yarısında gözlenmiştir. T lenfositlerinde lenfosit aktivasyon cevabının düşük olmasının ROS düzeylerinde yüksekliğe bağlı olabileceği düşünüldü.

Galaktozemili hastalar erken yaşta tanı almalarına ve galaktozemiden fakir diyet tedavisine başlanılmasına rağmen bilişsel, konuşma ve davranış bozuklukları veya genç yaşlarda overyen yetmezlik gibi komplikasyonlar yüksek oranda görülmektedir. Bu uzun dönem komplikasyonların nedeni tam anlaşılamamıştır. 2019 yılında yayınlanan bir makalede 183 hasta ve 31 kontrol vakada hedefsiz metabolomik analizi yapılarak redoks, aminoasit ve mitokondri sinyal yollarını kapsayan toplam 14 yolakta farklılıklar tespit edilmiştir (107). Bizim çalışmamızda da aynı yollarda değişiklikler saptanmıştır. Bu durum galaktozemideki komplikasyonların zemininde oksidatif stresin sorumlu olabileceği fikrini desteklemektedir. Ayrıca steroid hormon senteziyle ilgili yollarda önemli farklar vardır. Sekonder hipoglikozilasyon nedeniyle hormon düzeylerinde düşüklük, hipergonadotropik hipogonadizm, overyen yetmezlik ve kriptorşidizm gibi endokrin bozukluklar hastalarda gözlenmektedir (8).

MSUD tanılı hastalarımızda tespit edilen analitlerin çoğunluğu lipidler, aminoasitler, nükleotidler ve enerji metabolizmasıyla ilgiliydi. Orta ve uzun zincirli yağ asitleri, multipl açil karnitinler, açil kolin yağ asitleri, fosfolipit metabolitleri, monoaçil ve diaçil gliseroller, sfingolipidler açısından önemli farklılıklar saptandı. Lipit oksidasyonundaki değişiklikler (dallı zincirli yağ asidinin alfa oksidasyonu, uzun zincirli ve çok uzun zincirli yağ asitlerinin beta oksidasyonu, safra asidi sentezi ve eter lipit sentezindeki değişiklikler) MSUD hastalarında peroksizomal disfonksiyon varlığını desteklemektedir. Lipitler beyinde beyaz cevher oluşumu, hücre membranlarının yapısı, vitamin transportu, sindirim, hormon regülasyonu, kardiyovasküler hastalık riski gibi çok sayıda fizyolojik olaylarda önemli rolü olan moleküllerdir (108). MSUD hastalardaki dikarboksilik asit düzeylerindeki artış yüksek dallı zincirli aminoasit düzeylerinin mitokondriyal fonksiyonlardaki etkisini göstermektedir.

Peroksizomal alfa ve beta oksidasyon ürünlerinin mitokondriye transportundaki defektler mitokondriyal beta oksidasyon ve enerji metabolizmasında aksaklıklara neden olmaktadır. Enerji yolağındaki akış bozuklukları trikarboksilik asit döngüsünde süksinil-koA ve asetil-koA düzeylerindeki azalma mitokondriyal oksidatif

fonksiyonlarında bozulmaya neden olur. Eter fosfolipit düzeylerindeki azalma endoplazmik retikulum aktivitesinde de sorunlar olduğunu göstermektedir. Günümüzde alkolik olmayan steatohepatit tedavisinde kullanılan ve yağ asidlerinin metabolik disregülasyonunu düzelteren glitazon, fibrat ve diğer peroksizom proliferatör-aktive edici reseptör (PPAR) agonistlerinin de MSUD tedavisinde kullanılabileceği literatürde önerilmektedir (109).

Tirozinemi hastalarının metabolomik analizlerinde dallı zincirli amino asit, treonin ve spermidin düzeylerinde azalmalar gözlenmektedir. Spermidin ve spermin poliaminler hücre büyümesi, farklılaşması, DNA, RNA ve protein sentezinden sorumlu önemli moleküllerdir. Treonin böbrek hasarıyla ilişkili metabolittir. Bu grupta ayrıca dopamin eksikliği saptanmıştır. Bazı tirozinemi hastalarında görülen dikkat eksikliği hiperaktivite sendromunun dopamin eksikliğiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir.

LPI hastalarının metabolomik profillemesi sonucunda kolin ve kynurenin düzeylerinde yükseklik saptandı. Karnitin, tirozin, fenilalanin düzeylerinde düşüklük mevcuttu. Metil donörü olarak görev yapan, homosistein metilasyonunu sağlayan betain düzeyi düşük saptandı. Kynurenin nörolojik sistemle ilişkili hastalıkların tedavisinde hedef moleküldür. Triptofan metabolizmasının önemli metaboliti olan ve nörotoksik etkili kynurenin düzeylerinde artış gözlemlendi. L-kynurenin nörotoksik metabolitler antranilat ve kuinolinik asidin öncü molekülüdür. T hücrelerinde de fonksiyon bozukluğuna ve ölüme neden olmaktadır. Karnitin ise oksidatif stresden koruyucu olup, mitokondriyal ve peroksizomal fonksiyonlarda önemlidir. Kurko ve ark. çalışmalarında kronik böbrek hastalığıyla bazı metabolitlerin istatistiksel olarak anlamlı ilişkisini saptamışlardır (22).

Lizinürik protein intolerans hastalarında Warburg etkisiyle ilgili metabolitlerin etkilendiği gözlenmektedir. Warburg etkisi, bir molekül glukozdan elde edilen ATP'nin az olmasına rağmen glukozu laktata dönüştürmesidir. Glikoliz ve pentoz fosfat yolları aktive olarak nükleotid ve NADPH sentezi gerçekleşir. Mitokondriyal hasar nedeniyle tümör hücrelerinde yetersiz oksijene karşı uyum sağlayabilmek amacıyla

Warburg etkisinin kanser hücreleri tarafından tercih edilmektedir. Kalıtsal metabolik hastalıklarda da özellikle T lenfositlerinde oksidatif fosforilasyon yerine diğer enerji yolları tercih edilmektedir. Bu tercih organel, hücre, doku ve organ düzeyinde fonksiyon bozukluklarına neden olmaktadır. Tüm hasta gruplarında enerji yollarında kontrol grubuna göre farklılıklar gözlenmektedir.

Literatürde KMH'da tiyol/disülfid homeostazisinin araştırıldığı yayınlar mevcuttur. Aktuğlu ve ark. çalışmalarında NTBC tedavisi altında tirozinemi tip 1 hastalarında TDH'nin bozulmadığını saptamışlardır (16). Bizim çalışmamızda da tirozinemi hastalarında disülfid düzeyi kontrol grubundan daha düşük bulundu. Tirozinemi grubunda uygulanan nitizinon tedavisinin oksidatif stresi azaltıcı etkisi görülmekle birlikte karaciğer düzeyinde inflamasyon, fibrozis ve hepatoselüler kanser gelişme riski devam etmektedir. Çok kısa süreli ara verişlerin bile önemli sonuçları olduğu hayvan deneylerinde gösterilmiştir (15). Başka bir çalışmada MSUD hastalarında serum disülfid/nativ tiyol, disülfid/total tiyol ve nativ tiyol/total tiyol oranlarının kontrol grubundan farklılık göstermediği saptanmıştır. İyi metabolik kontrolün oksidatif stresi önlediği ve antioksidan tedavilerin gerekli olmadığı belirtilmiştir (51). Cam ve ark. çalışmasında ortalama disülfid düzeyi [19.8 (11.6-25) vs 14(10.1-18.8), p=0.004], disulfid / nativ tiyol oranı (4.5±2.0 vs 3.2±1.6, p<0.001) ve ortalama disulfid / total tiyol oranlarını (4.0±1.7 vs 2.9±1.4, p=0.001) intoksikasyon tipi KMH'da (fenilketonüri, galaktozemi, üre siklus defektleri) sağlıklı birey grubundan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (52).

İnflamazom aktivasyonu karaciğer hastalıklarında önemi son yıllarda anlaşılmıştır. İnflamazom ilişkili karaciğer hasarını araştırdıkları fare modelinde karaciğerde *NLRP3* inflamazom aktivasyonuna bağlı şiddetli karaciğer inflamasyonu, hepatik "stellate" hücre aktivasyonuna bağlı kollajen birikimi ve fibrozisin gelişerek, piropitotik hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir (110). Tirozinemi hastalarımızda karaciğerde inflamasyon ve fibrozis nedeniyle izlenen hastalarda *NLRP3* bazal ekspresyonlarında artış saptandı. Ayrıca LPS-ATP indüksiyonu sonrasında karaciğer heterojenitesi fazla olan hastada kaspaz 1 protein düzeylerinde yükseklik

mevcuttu. Bu hastalarda DNT, serum NLRP3 ve kaspaz 1 protein düzeyi ölçümlerinin klinik prognozun izlenmesinde faydalı olabileceğini düşünmekteyiz. Bu konuda da daha geniş kapsamlı çalışmalar yapılmalıdır.

Galaktozemi, MSUD ve tirozinemi tip 1 hasta grupları arasında T lenfosit, B lenfosit, NKT, aktive T lenfositler düzeyleri incelendiğinde istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar gözlemlendi. Hastaların immun fenotiplendirmeleri açısından önemlidir. T lenfositleri düzeylerinin yaşlarıyla uyumlu olduğu saptanmıştır. CD4 lenfosit düzeyleri tüm gruplarda hastaların yaklaşık % 80' inde yükselmiştir. B lenfositleri LPİ grubunda belirgin düşük bulunurken, diğer gruplarda yaşlarıyla uyumludur. Gruplar arasında belirgin farklılıklar gözlenmektedir. Ayrıca LPİ grubu dışındaki tüm hasta gruplarında (Galaktozemi, MSUD, Tirozinemi) T lenfosit aktivasyonunun sağlıklı gruptan belirgin düşük olduğu gözlemlendi.

Doğal immun sistemin metabolik hastalıkların patofizyolojisinde önemli rolü vardır. Düşük dereceli kronik inflamasyon ve doğal immünite yolları KMH'nin patogenezinde önemlidir. Metabolik inflamasyonun ne zaman başladığı ve hangi düzeylerde patolojik sonuçlar doğurduğu bilinmemektedir. Lipit metabolitlerinin düzeyleriyle nöroinflamasyon veya karaciğer inflamasyonu gibi klinik fenotipler arasında ilişki kurulması ileride yeni tedavilere ışık tutacaktır.

Her bireyin kendine özgü klinik, genomik, immünolojik ve metabolomik özellikleri mevcuttur. Bu farklılıklar da kişiye özel tıp uygulamalarının artık kalıtsal metabolik hastalıklar için de uygulanması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Bu çalışma kalıtsal metabolik hastalıkların fizyolojisinde otofajik disregülasyon, oksidatif stres ve inflamasyon rolünü göstermektedir. Doğal immun sistem hücreleri olan monositler, NKT ve DNT hücreleri açısından da hasta gruplarında farklılıklar saptandı. Metabolomik profillemeye analizi de hasta ve sağlıklı gruplar arasında önemli farklılıklar göstermektedir. Bu sonuçlar metabolik hastalıklar ve immun sistem ilişkisine işaret etmekte ve fizyopatolojide immun regülasyon bozukluklarının da etkisini ortaya koymaktadır. Çalışmamızın sonuçları konvansiyonel

tedaviler dışında (diyet, vitaminler vb) yeni tedavi yöntemlerinin de uygulanması gerekliliğini göstermiştir. Bu konuda elde ettiğimiz bulgular ışığında ileri düzeyde çalışmalar yapılmasına ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma kalıtsal metabolik hastalıkların fizyopatolojisinde otofajik disfonksiyon, oksidatif stres ve inflamasyonun rolünü destekleyen bir çalışmadır. Katarakt, siroz, böbrek ve akciğer tutulumu gibi komplikasyonların altında moleküler mekanizmaları olabileceğini destekleyen veriler elde edilmiştir. Ancak bu çalışmaların daha geniş kapsamlı hasta gruplarında yapılması gerekmektedir.

Aynı hasta grubu içerisinde farklı gen ekspresyonları ve biyokimyasal belirteçlerde farklılık saptanması her bireyin klinik izlem ve tedavi planı açısından ayrı değerlendirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Kişiselleştirilmiş tıp uygulamaları bu hasta gruplarında da önem kazanmaktadır.

Hastalıkların mekanizmaları bilinenlerden çok daha kompleksdir. Tek metabolik defekte yönelik diyet, enzim replasmanı, vitamin ve kofaktör destekleri komplikasyonların önlenmesi için yeterli olmamaktadır. Metabolomik analizlerle etkilenen yollar aydınlatılmalı ve tedavi protokolleri genişletilmelidir. İmmun modülatörler, otofaji regülatörleri veya gen tedavileriyle ilgili klinik çalışmaların artırılması gereklidir.

TAS ve TOS değerleri hastaların genel durumlarını göstermek açısından faydalı olmakla birlikte tek başına oksidatif stres durumunu değerlendirmek için yeterli değildir. Dinamik tiyol/Disülfid homeostazis açısından da hastalar değerlendirilmelidir.

LPI hastalarında glutatyon eksikliği ve sekonder karnitin eksikliği de gözlenmektedir. Bu nedenle tedavilerine C vitamini ve karnitin eklenmesinin uygun olacağını düşünebiliriz.

LPI hastalarının renal fonksiyonlarını yakın takip etmek için idrar metabolomik analizinin de yapılması önerilir. Bu hastalar için sorun olan kronik böbrek yetmezliğine gidişi engellemek için biyobelirteçler keşfedilmeli ve riskli hastalara yeni tedaviler uygulanmalıdır. Akciğer ve böbrek tutulumlu hastalarda antiinflamatuvar tedaviler

düşünülebilir. Humoral immün yetmezlikleri ve subklinik makrofaj aktivasyonu nedeniyle immünolojik açıdan yakın takip edilmelidirler.

Tirozinemi hastalarının klinik izleminde NLRP3, Kaspaz 1 ve DNT önemli biyobelirteç adayları olsalar bile bu konuda da yeni çalışmalara ihtiyaç vardır. Fibrozis ve hepatoselüler kanser gelişiminde oksidatif stres belirteçlerinin yeterli olmadığı ve inflamasyon ilişkili yeni biyobelirteçlerin gerekliliği literatürde bildirilmektedir. Metabolomik analizler ayrıca onkometabolitleri saptamaları açısından önem kazanmaktadır.

Plazma sitokin düzeylerini ölçmek çok pahalı olması ve klinik seyirle ilgili bilgi vermemesi nedeniyle önerilmese de doku düzeyinde ve supernatanlarda ölçümlerin çok daha informatif ve mantıklı olacağı söylenebilir. Bu hastalıklarda kronik, düşük grade'li inflamasyon mevcut olup, perifere yansıyacak akut inflamasyon tablosu bulunmamaktadır. Metabolik krizlerde farklı sonuçlar alınabilir. LPI grubunda subklinik makrofaj aktivasyon tablosu mevcut olmasına rağmen sitokin düzeylerinde yükseklik saptanmamıştır.

NLRP3, p62, NF-KB ve Beclin 1 gen ekspresyonları birlikte hareket ettikleri ve aralarında kuvvetli pozitif korelasyon olduğu görülmektedir. Ancak LC3B-II ekspresyon ve protein düzeylerindeki düşüklük otofajik akışta bozukluğu göstermektedir.

Hasta ve kontrol grupları arasında metabolitler açısından önemli farklılıklar bulunmuştur. Özellikle lipid metabolitlerinde önemli değişiklikler gözlenmiştir. Bu hastalara lipidomik analizlerin de yapılması planlanmıştır.

Özellikle MSUD hastalarında oksidatif stres belirteçleri çok yüksektir. 'Redoks hastalığı' olarak bile tanımlanabilir. Bu hastaların klinik izleminde bu belirteçlerin düzenli ölçülmesi ve karnitin gibi antioksidan tedavilerin eklenmesinin önemli olduğunu düşünmekteyiz.

PBMC hücreleri non- invazif yöntemlerle, kolay elde edilen hücrelerdir. Donmuş hücrelerde çalışmak zorlayıcı bir sürece neden olmuştur. Literatürde önerilen yöntemlerle hücrelerin hızla öldükleri gözlenmiştir. Farklı yöntemlerle deneyler optimize edilmiştir. Farklı komplikasyonların araştırıldığı moleküler çalışmalar için uygun bir hücre grubu olduğu düşünülebilir. Özellikle moleküler ve immünolojik mekanizmaların birlikte çalışılması açısından uygun hücrelerdir. Karaciğer ve böbrek gibi doku çalışmaları tabii ki her zaman daha değerli olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Olsen RJK, Cornelius N, Gregersen N. Redox signalling and mitochondrial stress responses; lessons from inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis* 2015;38: 703-719.
2. Richard E, Gallego-Villar L, Rivera-Barahona A, Oyarzabal A, Perez B, Rodriguez-Pombo P ve ark. Altered redox homeostasis in branched-chain amino acid disorders, organic acidurias, and homocystinuria. *Oxid Med Cell Longev* 2018:1-17.
3. Guo H, Callaway JB, Ting JP. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med.* 2015 Jul;21(7):677-87.
4. Ezgu F. Inborn errors of metabolism:Advances In Clinical Chemistry, Makowski GS (eds) Amsterdam: Elsevier, 2016:195-250.
5. Saudubray JM. Clinical Approach to Inborn Errors of Metabolism in Pediatrics. In: Saudubray JM, Baumgartner MR, Walter JH (eds). *Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment* (6th ed). Berlin- Heidelberg: Springer-Verlag, 2016.
6. Yurdakök M, Çoşkun T. *Yenidoğanda Kalıtsal Metabolik Hastalıklar*. Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara,2014.
7. Ferreira CR, Rahman S, Keller M, Zschocke J; ICIMD Advisory Group. An international classification of inherited metabolic disorders (ICIMD). *J Inherit Metab Dis.* 2021;44(1):164-177.
8. Succio M, Sacchetti R, Rossi A, Parenti G, Ruoppolo M. Galactosemia: Biochemistry, Molecular Genetics, Newborn Screening, and Treatment. *Biomolecules* 2022;11;12(7):968.
9. Berry GT. Classic Galactosemia and clinical variant Galactosemia' In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH (eds). 2014; Gene Reviews, Seattle.
10. Coelho AI, Rubio-Gozalbo ME, Vicente JB, Rivera I. Sweet and sour: an update on classic galactosemia. *J Inherit Metab Dis* 2017;40: 325– 342
11. Sitta A, Ribas GS, Mescka CP, Barschak AG, Wajner M, Vargas CR. Neurological damage in MSUD: the role of oxidative stress. *Cell Mol Neurobiol* 2014 Mar;34(2):157-65.
12. Barschak AG, Sitta A, Deon M, Barden AT, Dutra-Filho CS, Wajner M, Vargas CR. Oxidative stress in plasma from maple syrup urine disease patients during treatment. *Metab Brain Dis* 2008 Mar;23(1):71-80.

13. Scaini G, Tonon T, Moura de Souza CF, Schuck PF, Ferreira GC, Quevedo J et al. Evaluation of plasma biomarkers of inflammation in patients with maple syrup urine disease. *J Inherit Metab Dis*; 2018 May 8.
14. Mescka CP, Guerreiro G, Donida B, Marchetti D, Wayhs CA, Ribas GS, et al. Investigation of inflammatory profile in MSUD patients: benefit of L-carnitine supplementation. *Metabolic brain disease* 2015;30(5):1167-74.
15. De Laet C, Dionisi-Vici C, Leonard JV, McKiernan P, Mitchell G, Monti L ve ark. Recommendations for the management of tyrosinaemia type 1. *Orphanet J Rare Dis* 2013, 8, 8.
16. Mitchell G.A, Yang H. Remaining challenges in the treatment of tyrosinemia from the clinician's viewpoint. *Adv Exp Med Biol* 2017; 959: 205–213.
17. Colemonts-Vroninks H, Neuckermans J, Marcelis L, Claes P, Branson S, Casimir G ve ark. Oxidative Stress, Glutathione Metabolism, and Liver Regeneration Pathways Are Activated in Hereditary Tyrosinemia Type 1 Mice upon Short-Term Nitisinone Discontinuation. *Genes (Basel)* 2020; 22;12(1):3.
18. Aktuglu Zeybek AC, Kiykim E, Neselioglu S, Iscan HZ, Zubarioglu T, Cansever MS, Erel O. Evaluation of dynamic thiol/disulfide homeostasis in hereditary tyrosinemia type 1 patients. *Pediatr Res* 2022;92(2):474-479.
19. Mauhin W, Habarou F, Gobin S, Servais A, Brassier A, Grisel C ve ark. Update on Lysinuric Protein Intolerance, a Multi-faceted Disease Retrospective cohort analysis from birth to adulthood. *Orphanet J Rare Dis* 2017; 12:3
20. Baulny HO. Lysinuric protein intolerance (LPI): A multi organ disease by far more complex than a classic urea cycle disorder. *Mol Genet Metab* 2012 May;106(1):12-7
21. Barilli A, Rotoli BM, Visigalli R, Bussolati O, Gazzola GC, Gatti R ve ark. *Mol Genet Metab* 2012 Apr;105(4):585-9.
22. Kurko J, Tringham M, Tanner L, Näntö-Salonen K, Vähä-Mäkilä M, Nygren H. Imbalance of plasma amino acids, metabolites and lipids in patients with lysinuric protein intolerance (LPI). *Metabolism* 2016 Sep;65(9):1361-75
23. Tringham M. Exploring the transcriptomic variation caused by the Finnish founder mutation of lysinuric protein intolerance (LPI). *Mol Genet Metab* 2012 Mar;105(3):408-15.
24. Winterbourn CC. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol* 2008;4(5):278–86.

25. Miller AF. Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. *FEBS Lett* 2012; 586(5): 585–95
26. Winterbourn CC. The biological chemistry of hydrogen peroxide. *Methods Enzymol* 2013; 528:3–25.
27. Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 2009;47(4):333–43. 5.
28. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev* 2014;94(3):909–50
29. Brown GC, Borutaite V. There is no evidence that mitochondria are the main source of reactive oxygen species in mammalian cells. *Mitochondrion* 2012;12(1):1–4
30. Hanschmann EM, Godoy JR, Berndt C, Hudemann C, Lillig CH. Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins—molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling. *Antioxid Redox Signal* 2013;19(13):1539–605.
31. Nathan C, Cunningham-Bussel A. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nat Rev Immunol* 2013;13(5):349–61.
32. Bindoli and M. P. Rigobello. Principles in redox signaling: from chemistry to functional significance. *Antioxid Redox Signal* 2013; 18(13): 1557–1593.
33. Jones DP, Sies H. The redox code. *Antioxid Redox Signal* 2015;23:734–746.
34. Finkel T. Signal transduction by mitochondrial oxidants. *J Biol Chem* 2012;287(7): 4434– 4440
35. Yin F, Sancheti H, Liu Z, Cadenas E. Mitochondrial function in ageing: coordination with signalling and transcriptional pathways. *J Physiol* 2016;594(8): 2025–2042
36. Jacobsen D.W, Hannibal L. Redox signaling in inherited diseases of metabolism. *Curr Opin Physiol* 2019;9:48–55.
37. Kölker S, Burgard P, Sauer SW, Okun JG. Current concepts in organic acidurias: understanding intra- and extracerebral disease manifestation. *J Inherit Metab Dis* 2013; 36:635-644.
38. Rivera-Barahona A, Alonso-Barroso E, Perez B, Murphy MP, Richard E, Desviat LR. Treatment with antioxidants ameliorates oxidative damage in a mouse model of propionic acidemia. *Mol Genet Metab* 2017; 122:43-50

39. Guerreiro G, Faverzani J, Jacques CED, Marchetti DP, Sitta A, de Moura Coelho D, ve ark. Oxidative damage in glutaric aciduria type I patients and the protective effects of l-carnitine treatment. *J Cell Biochem* 2018; 119:10021-10032.
40. Seminotti B, Amaral AU, Ribeiro RT, Rodrigues MDN, Colin- Gonzalez AL, Leipnitz G ve ark. Oxidative stress, disrupted energy metabolism, and altered signaling pathways in glutaryl-coa dehydrogenase knockout mice: potential implications of quinolinic acid toxicity in the neuropathology of glutaric acidemia type I. *Mol Neurobiol* 2016; 53:6459-6475.
41. Salmi H, Leonard JV, Lapatto R. Patients with organic acidaemias have an altered thiol status. *Acta Paediatr Int J Paediatr* 2012; 101.
42. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol* 2017; 11:613-619.
43. Olsen RK J, Cornelius N, Gregersen N. Genetic and cellular modifiers of oxidative stress: what can we learn from fatty acid oxidation defects? *Mol Genet Metab* 2013;110:31–39.
44. Richard E, Rodriguez-Pombo P, Desviat LR. Mitochondrial organic acidurias. Part II: mitochondrial dysfunction. In: *Mitochondrial Pathophysiology*, F. Palau and S. Cadenas, Eds., pp. 173–191, Research Signpost, Kerala, India, 2011
45. Streck EL, Czapski GA, Goncalves da Silva C. Neurodegeneration, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev* 2013; 2013: 826046.
46. Espinosa-Diez C, Miguel V, Mennerich D, Kietzmann T, Sanchez-Perez P. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol* 2015;6:183–197.
47. Mc Guire PJ, Parikh A, Diaz GA. Profiling of oxidative stress in patients with inborn errors of metabolism. *Mol Genet Metab* 2009; 98(1-2): 173–180.
48. Özcan O , Erdal H , Çakırca G, Yönden Z. Oxidative stress and its impacts on intracellular lipids, proteins and DNA. *J Clin Experimental Investigations* 2015; 6 (3): 331-336
49. A. Pastore, D. Martinelli, F. Piemonte. Glutathione metabolism in cobalamin deficiency type C (cblC). *J Inherit Metab Dis* 2014; 37(1): 125–129.
50. Turell L, Radi R, Alvarez B. The thiol pool in human plasma: The central contribution of albumin to redox processes. *Free Radic Biol Med* 2013; 65:244–253.

51. Erel O, Neselioglu S. A novel and automated assay for thiol/disulphide homeostasis. *Clin Biochem* 2014; 47(18):326–332
52. Zubarioglu T, Kiykim E, Cansever MS, Neselioglu S, Aktuglu-Zeybek C, Erel O. Evaluation of dynamic thiol/disulphide homeostasis as a novel indicator of oxidative stress in maple syrup urine disease patients under treatment. *Metab Brain Dis* 2017;32(1):179-184.
53. Cam V, Olgac A, Kilic M, Erel O, Neselioglu S, Kasapkara CS. Oxidative Stress in Intoxication Type Inborn Errors of Metabolism using Thiol-Disulfide Ratio. *J Coll Physicians Surg Pak* 2021;30(6):663-667.
54. Deretic V. Autophagy in immunity and cell-autonomous defense against intracellular microbes. *Immunol Rev* 2011; 240: 92–104.
55. Yin Z, Pascual C, Klionsky DJ. Autophagy: machinery and regulation. *Microb Cell* 2016; 3: 588–596.
56. Stolz A., Ernst A., Dikic I. Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nat Cell Biol* 2014; 16:495–501.
57. Carlsson SR, Simonsen A. Membrane dynamics in autophagosome biogenesis. *J Cell Sci* 2015; 128:193–205
58. Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: Morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal* 2014; 20:460–473.
59. Oku M, Sakai Y. Three Distinct Types of Micro-autophagy Based on Membrane Dynamics and Molecular Machineries. *Bioessays* 2018;40:e1800008.
60. Kaushik S, Cuervo A.M. Chaperone-mediated autophagy: A unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol* 2012; 22: 407–417.
61. Rok Yun H. Roles of Autophagy in Oxidative Stress. *Int J Mol Sci* 2020;21:3289.
62. Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* 2004, 306: 990–995.
63. Wei Y, Liu M, Li X, Liu J, Li H. Origin of the autophagosome membrane in mammals. *Biomed Res Int* 2018, 2018: 1012789.
64. Galluzzi L, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P, Bravo-San Pedro JM, Cecconi F, Choi AM, et al. Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J* 2017; 36: 1811–1836.

65. Haack TB. Absence of the Autophagy Adaptor SQSTM1/p62 Causes Childhood-Onset Neurodegeneration with Ataxia, Dystonia, and Gaze Palsy. *Am J Hum Genet* 2016 Sep 1;99(3):735-743.
66. Anding AL, Baehrecke EH. Cleaning house: selective autophagy of organelles. *Dev Cell* 2017; 41: 10–22.
67. Ebrahimi-Fakhari D, Saffari A, Wahlster L, Lu J, Byrne S, Hoffmann GF, H ve ark. Congenital disorders of autophagy: an emerging novel class of inborn errors of neuro-metabolism. *Brain* 2016; 139: 317-337.
68. Valente G, Morani F, Nicotra G, Fusco N, Peracchio C, Titone R ve ark. Expression and clinical significance of the autophagy proteins BECLIN 1 and LC3 in ovarian cancer. *Biomed Res Int* 2014 : 462658.
69. Nakamura S, Yoshimori T. New insights into autophagosome-lysosome fusion. *J Cell Sci* 2017; 130: 1209–1216.
70. Fang C, Gu L, Smerin D, Mao S, Xiong X. The interrelation between reactive oxygen species and autophagy in neurological disorders. *Oxid Med Cell Longev* 2017
71. Lau A, Wang X.J, Zhao F, Villeneuve N.F, Wu T, Jiang T ve ark. A noncanonical mechanism of Nrf2 activation by autophagy deficiency: Direct interaction between Keap1 and p62. *Mol Cell Biol* 2010;30:3275–3285.
72. Komatsu M., Kurokawa H., Waguri S., Taguchi K., Kobayashi A., Ichimura Y. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol* 2010;12:213–223.
73. Jain A, Lamark T, Sjøttem E, Larsen K.B, Awuh J.A, Overvatn A ve ark. p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor Nrf2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *J Biol Chem* 2010;285:22576–22591.
74. Henning P. The Crosstalk between Nrf2 and Inflammasomes. *Int J Mol Sci* 2018; 19(2):562.
75. Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol* 2013; 13:397.
76. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory Kaspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* 2002;10(2):417-26.

77. De TC, Mesa DCP, Pelegrín P. The NLRP3 and pyrin inflammasomes: implications in the pathophysiology of autoinflammatory diseases. *Front Immunol* 2017; 8: 43.
78. Lu A, Magupalli VG, Ruan J, Yin Q, Atianand MK, Vos MR, Schröder GF ve ark. Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes. *Cell* 2014; 156: 1193–1206.
79. Shao BZ, Xu ZQ, Han B, Su D, Liu C. NLRP3 inflammasome and its inhibitors:a review. *Front Pharmacol* 2015;6:262.
80. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 2011; 469:221–5.
81. Liang S, Sanchez-Lopez E, He F, Shalapour S, Lin X ve ark. New mitochondrial DNA synthesis enables NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 2018;560:198–203.
82. Cao Z, Wang Y, Long Z, He G. Interaction between autophagy and the NLRP3 inflammasome. *Acta Biochim Biophys Sin* 2019; 51(11): 1087–1095
83. Aflaki E. Lysosomal storage and impaired autophagy lead to inflammasome activation in Gaucher macrophages. *Aging Cell* 2016;15(1):77-8.
84. Sen P. Perspectives on system modeling of human peripheral blood mononuclear cells. *Fron Mol Bio* 2017; 4:96
85. Li H. Double- negative T cells in autoimmun diseases. *Curr Opin Rheumatol* 2021 March 01; 33(2): 163–172
86. Cui Y. NKT Cells in Neurological Diseases. *Front Cell Neurosci* 2019 May 29;13:245.
87. Wong KL, Tai JJ, Wong WC, Han H, Sem X, Yeap WH ve ark. Gene expression profiling reveals the de ning features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* 2011; 118(5):e16–31
88. Chimen M, Yates CM, McGettrick HM, Ward LS, Harrison MJ, Apta B ve ark. Monocyte subsets coregulate in ammatory responses by integrated signaling through TNF and IL-6 at the endothelial cell interface. *J Immunol* 2017; 198(7):2834–43
89. Aleksey V, Belikov. T cells and reactive oxygen species. *Journal of Biomedical Science* 2015; 22:85

90. Mougiakakos D, Johansson CC, Kiessling R. Naturally occurring regulatory T cells show reduced sensitivity toward oxidative stress-induced cell death. *Blood* 2009;113(15):3542–5
91. Dettmer K, Aronov P.A, Hammock B.D. Mass Spectrometry-Based Metabolomics. *Mass Spectrom Rev* 2007; 26:51–78.
92. Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G. Metabolomics: The Apogee of the Omics Trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13: 263–269.
93. Jang C, Chen L, Rabinowitz JD. Metabolomics and Isotope Tracing. *Cell* 2018; 173: 822–837.
94. Wishart DS. NMR Metabolomics: A Look Ahead. *J Magn Reson* 2019; 306: 155–161.
95. Cui L, Lu H, Lee YH. Challenges and Emergent Solutions for LC-MS/MS Based Untargeted Metabolomics in Diseases. *Mass Spectrom Rev* 2018; 37: 772–792.
96. Liang L, Sun, F, Wang H, Hu Z. Metabolomics, Metabolic Flux Analysis and Cancer Pharmacology *Pharmacol Ther* 2021; 224: 107827.
97. Johnson CH, Ivanisevic J, Siuzdak, G. Metabolomics: Beyond Biomarkers and towards Mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2016; 17: 451–459.
98. Zamboni N, Saghatelian A, Patti GJ. Defining the Metabolome: Size, Flux, and Regulation. *Mol Cell* 2015, 58, 699–706.
99. Roberts LD, Souza AL, Gerszten RE, Clish CB. Targeted Metabolomics. *Curr Protoc Mol Biol* 2012, 98, 30.2.1–30.2.24.
100. Wishart DS. Metabolomics for Investigating Physiological and Pathophysiological Processes. *Physiol Rev* 2019 Oct 1;99(4):1819-1875.
101. Vernon, H.J. Inborn Errors of Metabolism: Advances in Diagnosis and Therapy. *JAMA Pediatr.* 2015, 169, 778–782.
102. Guijas C, Montenegro-Burke JR, Warth B, Spilker ME, Siuzdak G. Metabolomics activity screening for identifying metabolites that modulate phenotype. *Nat Biotechnol* 2018;36(4):316-20.
103. Yang J, Chen Y, Jing Y, Green MR, Han L. Advancing CAR T cell therapy through the use of multidimensional omics data. *Nat Rev Clin Oncol* 2023;2084):211-228.
104. Method of the year 2016: Epitranscriptome analysis. *Nat Methods* 2017;14 (1):32

105. Driesen K, Witters P. Understanding Inborn Errors of Metabolism through Metabolomics. *Metabolites* 2022; 27;12(5):398.
106. Meng H. Double-negative T cells remarkably promote neuroinflammation after ischemic stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Mar 19;116(12):5558-5563.
107. Fischer ST. Metabolic perturbations in classic galactosemia beyond the Leloir pathway: insights from an untargeted metabolomic study. *J Inherit Metab Dis* 2019;1-10
108. Douglas TD, Newby LK, Eckstrand J, Wixted D, Singh RH. Lipid changes in the metabolome of a single case study with maple syrup urine disease (MSUD) after five days of improved diet adherence of controlled branched-chain amino acids (BCAA). *Mol Genet Metab Rep* 2020 Oct 14;25:100651.
109. Kakazu E, Kondo Y, Ninomiya M, Kimura O, Nagasaki F, Ueno Y, Shimosegawa T. The influence of pioglitazone on the plasma amino acid profile in patients with nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Hepatol Int* 2013 Jun;7(2):577-85.
110. Gaul S, Leszczynska A, Alegre F, Kaufmann B, Johnson CD, Adams LA, Veerakumar R. Hepatocyte pyroptosis and release of inflammasome particles induce stellate cell activation and liver fibrosis. *J Hepatol* 2021 Jan;74(1):156-167.

8. EKLER

EK-1. Galaktozemi ve Kontrol Gruplarında Anlamlı Düzeyde Farklılaşan Metabolitler

Uridine diphosphate glucose	N-Acetylornithine	Mevalonic acid-5P	Presqualene diphosphate	3a,7a-Dihydroxy-5b-cholestan-26-al	Paraoxon
Pyrophosphate	Sedoheptulose 1,7-bisphosphate	Oxidized dithiothreitol	20-Hydroxy-leukotriene E4	7a-Hydroxy-5b-cholestan-3-one	Benzo[a]pyrene
dTDP-D-galactose	Farnesyl pyrophosphate	Sphinganine 1-phosphate	7a-Hydroxycholesterol	3a,7a-Dihydroxy-5b-cholestane	Behenic acid
S-Adenosylhomocysteine	Saccharopine	18-Hydroxycorticosterone	LysoSM(d18:1)	7a,12a-Dihydroxy-5b-cholestan-3-one	Tetrahydrofolyl-[Glu](2)
Guanosine diphosphate	Nicotinamide ribotide	4-Hydroxy-2-oxoglutaric acid	5a-Pregnane-3,20-dione	5-b-Cholestane-3a,7a,12a-triol	(R)-Salsolinol
Oxalacetic acid	Chitin	17-Hydroxyprogesterone	Etiocolanediol	7a-Hydroxy-cholestene-3-one	2-Methoxy-estradiol-17b 3-glucuronide
Flavin Mononucleotide	Bilirubin	Lathosterol	D-Tagatose 1,6-bisphosphate	7a,12a-Dihydroxy-cholestene-3-one	SN38 glucuronide
Uridine triphosphate	Itaconic acid	Dehydroepiandrosterone	5a-Cholest-8-en-3b-ol	7a,12a-Dihydroxy-5a-cholestan-3-one	Coenzyme Q10
L-Phenylalanine	Allantoic acid	Alpha-D-Glucose 1,6-bisphosphate	Dihydrotestosterone	Chenodeoxyglycocholic acid	4,4-Dimethylcholesta-8,14,24-trienol
L-Tyrosine	Biliverdin	Beta-Cortol	Lithocholic acid	Taurodeoxycholic acid	Delta 8,14 -Sterol
Sucrose	Cysteic acid	Dolichyl b-D-glucosyl phosphate	20a-Dihydroprogesterone	Tetrahydrocortisol	1D-Myo-inositol 1,4,5,6-tetrakisphosphate
Tetrahydrofolic acid	L-Ribulose	dioxobutanoic acid	1D-Myo-inositol 3,4-bisphosphate	Chenodeoxycholic acid glycine conjugate	Floxuridine
IDP	Androsterone	Inositol 1,3,4,5-tetraphosphate	Alpha-N-Phenylacetyl-L-glutamine	17a,21-Dihydroxy-5b-pregnane-3,11,20-trione	Dihydroceramide
Uridine 5'-	Deoxyuridine	3'-UMP	5,6-Dihydroxyindole-2-	Dihydrocortisol	Phytosphingosine

monophosphate			carboxylic acid		
Uracil	L-Arabitol	Cysteinylglycine	5-Methylthioribose 1-phosphate	Tetrahydrocortisol	5'-Deoxy-5-fluorouridine
Dihydroxyacetone phosphate	Testosterone	L-Iditol	LysoPC(18:1(9Z))	11b,21-Dihydroxy-3,20-oxo-5b-pregnan-18-al	24-Hydroxycholesterol
D-Glyceraldehyde 3-phosphate	Norepinephrine	Stearic acid	5-Androstenediol	3a,11b,21-Trihydroxy-20-oxo-5b-pregnan-18-al	2-Arachidonylglycerol
D-Ribose	Deoxyadenosine	Calcidiol	LysoPC(O-18:0)	11b,21-Dihydroxy-5b-pregnane-3,20-dione	Alpha-Tocotrienol
Inosinic acid	Phosphorylcholine	Linoleic acid	Etiocolanolone	21-Hydroxy-5b-pregnane-3,11,20-trione	6beta-Hydroxytestosterone
PC(16:0/16:0)	3-Dehydro-L-gulonate	Melatonin	1D-Myo-inositol 1,3,4,6-tetrakisphosphate	21-Hydroxypregnenolone	9-Hydroxybenzo[a]pyrene
DG(16:0/16:0/0:0)	Dolichyl diphosphate	Calcitriol	Deoxycholic acid	17alpha,21-Dihydroxypregnenolone	15H-11,12-EETA
Thymine	Gentisic acid	L-Dopachrome	17-alpha,20-alpha-Dihydroxypregn-4-en-3-one	11b,17a,21-Trihydroxypreg-nenolone	Benzo[a]pyrene-7,8-oxide
3,5-Dihydroxybenzoic acid	4-Hydroxybenzaldehyde	Galactitol	D-Myo-inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate	11-Dehydrocorticosterone	S-(2,2-Dichloro-1-hydroxy)ethyl glutathione
D-Xylose	Chondroitin 4-sulfate	Elaidic acid	N,N'-Diacetylchitobiosyldiphosphodolichol	11b-Hydroxyprogesterone	S-(1,2-Dichlorovinyl)glutathione
glucopyranose	Pyridoxamine 5'-phosphate	Mesaconic acid	5-Methylthioribulose 1-phosphate	17alpha,20alpha-Dihydroxycholesterol	All-trans-13,14-dihydroretinol
Cholesterol	D-Glyceraldehyde 3-phosphate	Nebularine	AICAR	20alpha-Hydroxycholesterol	9-cis-Retinoic acid
D-Glucuronic acid	D-Fructose 2,6-bisphosphate	Biotin amide	Prostaglandin A1	20a,22b-Dihydroxycholesterol	Hyodeoxycholic acid
dADP	gamma-Glutamylcysteine	Glycocholic acid	Prostaglandin C1	22b-Hydroxycholesterol	7alpha,24S-Dihydroxycholesterol
D-Maltose	Glycerophosphocholine	Pregnenolone	2-(3-Carboxy-3-(methylammonio)propyl)-L-histidine	Deoxyinosine	25-Hydroxycholesterol

Acetylphosphate	Androstanedione	L-Erythrulose	3a,7a,12a-Trihydroxy-5b-cholestanoic acid	3-Sulfopyruvic acid	7-a,25-Dihydroxycholesterol
Alpha-Lactose	Oleic acid	Vitamin K1	Ganglioside GM3 (d18:1/12:0)	5,6-Dihydroxyindole	Cholest-5-ene-3beta,26-diol
Palmitic acid	Amylose	Retinyl ester	carboxylate	Homovanillic acid	PA(P-16:0e/18:2(9Z,12Z))
Pyridoxal	Cortisol	11-cis-Retinaldehyde	trienoic Acid	3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycolaldehyde	5-Dehydroepisterol
L-Arabinose	All-trans-retinoic acid	Leukotriene B4	Ganglioside GM1 (18:1/12:0)	Normetanephrine	5-Dehydroavenasterol
Androstenedione	Epinephrine	D-Xylono-1,5-lactone	17a-Hydroxypregnenolone	5-Hydroxyindoleacetaldehyde	4a-Carboxy-4b-methyl-5a-cholesta-8,24-dien-3b-ol
D-Sedoheptulose 7-phosphate	Sorbitol	Sinapyl alcohol	16a-Hydroxydehydroisoandrosterone	5-Hydroxyindoleacetic acid	3-Keto-4-methylzymosterol
Inosine	Sphinganine	Alpha-Tocopherol	5'-Deoxyadenosine	Acetyl-N-formyl-5-methoxykynurenamine	trans-2-Enoyl-OPC8-CoA
Uridine	Pantothenic acid	Chenodeoxycholic acid	3-Hexaprenyl-4,5-Dihydroxybenzoic acid	Bilirubin diglucuronide	(6Z,9Z,12Z,15Z,18Z,21Z)-3-oxotetracosahexaenoyl-CoA
D-Ribulose	Deoxycytidine	2-Hydroxyglutarate	Hexanoyl-CoA	Galactan	2-Phenyl-1,3-propanediol monocarbamate
D-Xylulose	Maltose	Dodecanoic acid	5b-Dihydrotestosterone	2-Hexaprenyl-3-methyl-5-hydroxy-6-methoxy-1,4-benzoquinone	3-Carbamoyl-2-phenylpropionaldehyde
L-Threo-2-pentulose	Leukotriene A4	PS(16:0/16:0)	19-Hydroxytestosterone	Vitamin K1	4-Hydroxy-5-phenyltetrahydro-1,3-oxazin-2-one
Pyridoxine	Estradiol	Imidazoleacetic acid	3-Hexaprenyl-4-hydroxy-5-methoxybenzoic acid	D-4-Hydroxy-2-oxoglutarate	5-Phenyl-1,3-oxazinane-2,4-dione
Oxoadipic acid	Indoleacetic acid	L-Octanoylcarnitine	Phenylethylamine	Leukotriene D4	2-Hydroxynevirapine
Glucosamine	Aminoadipic acid	N,N-Dimethylaniline	5(S)-Hydroperoxyeicosatetraenoic acid	12(S)-HPETE	6-Methylthiopurine 5'-monophosphate ribonucleotide

Geranylgeranyl-PP	Prostaglandin B1	Fucose 1-phosphate	Fructose 1,6-bisphosphate	2-Oxo-3-hydroxy-4-phosphobutanoic acid	5-Fluorouridine
Fructose 1,6-bisphosphate	N-Acetylserotonin	L-Palmitoylcarnitine	Oxalosuccinic acid	Sphingosine 1-phosphate	Irinotecan
dUMP	Riboflavin reduced	N-Acetylmuramoyl-Ala	D-Glucuronic acid 1-phosphate	Sedoheptulose 1-phosphate	9-cis-Retinal
Retinal	L-Fucose	5-Acetamidovalerate	Isomaltose	27-Hydroxycholesterol	7 alpha,24-Dihydroxy-4-cholesten-3-one
D-Xylitol	Hydroxymethylbilane	5beta-Cholestanone	Galactosylglycerol	7-a,27-Dihydroxycholesterol	3 beta-Hydroxy-5-cholestenoate
Xanthine	Protoporphyrinogen IX	L-2-Hydroxyglutaric acid	Melibiose	Myristic acid	7alpha-Hydroxy-3-oxo-4-cholestenoate
QH2	Trehalose	Deoxycorticosterone	3'-Ketolactose	Eicosapentaenoic acid	7alpha-Hydroxypregnenolone
Progesterone	D-2-Hydroxyglutaric acid	Mono(glucosyluronic acid)bilirubin	3 alpha,7 alpha,26-Trihydroxy-5beta-cholestane	Iduronic acid	7a-Hydroxydehydroepiandrosterone
Galactose 1-phosphate	Rhamnose	Uridine diphosphategalactose			11-Hydroxytestosterone

EK-2. Tirozinemi ve Kontrol Gruplarında Anlamlı Düzeyde Farklılaşan Metabolitler

L-Tyrosine	3-Hexaprenyl-4,5-dihydroxybenzoate	Cystathionine	L-Adrenaline	Phenazocine
N-Methyltyrosine	3-Nonaprenyl-4-hydroxybenzoate	Deferoxamine	L-Arginine	Phendimetrazine
(-)-Jasmonic acid	4-(beta-D-Glucosyloxy)benzoate	Delphinidin	L-Carnitine	Phenindamine
(-)-Menthyl O-beta-D-glucoside	4-Aminobutanoate	Deoxyadenosine	L-Citrulline	Phenylacetaldehyde
(5-L-Glutamyl)-L-glutamine	4-Hydroxycinnamyl alcohol 4-D-glucoside	Deoxyguanidinoproclavaminic acid	Lecanoric acid	Phenylpyruvate
(9Z)-Octadecenoic acid	4-Methylene-L-glutamine	Desacetoxyvindoline	Leu-Gly-Pro	Phosphocreatine
(Ac)2-L-Lys-D-Ala-D-Ala	5-Acetamidopentanoate	D-Glucose	L-Histidine	Phosphoenolpyruvate
(R)-Mevalonate	5-Methylcytosine	D-Glucuronate	Linoleate	Pregnan-21-al
(S)-2,3,4,5-Tetrahydropyridine-2-carboxylate	5'-Methylthioadenosine	Dicumarol	LL-2,6-Diaminoheptanedioate	Pregnanolone
(S)-2,3-Epoxysqualene	6-Keto-prostaglandin F1alpha	Dihydrobiopterin	L-Leucine	Propiverine
(S)-Dihydroorotate	7,8-Diaminononanoate	Dihydromyricetin	L-Octanoylcarnitine	Prostaglandin B1
1-(2-Carboxyphenylamino)-1-deoxy-D-ribose 5-phosphate	7-Hydroxy-6-methyl-8-ribityllumazine	Dihydropteroate	Lophocerine	Protoporphyrin
11-Aminoundecanoic acid	8,11,14-Eicosatrienylethanolamide	Diphenidol	L-Palmitoylcarnitine	Protoporphyrinogen IX
16-Methoxy-2,3-dihydro-3-hydroxytabersonine	8,8a-Deoxyoleandolide	Dipivefrin	L-Phenylalanine	Psychosine sulfate
1-Aminocyclopropane-1-carboxylate	Adenine	Disopyramide	L-Pipecolate	Pyocyanine
1-Chloro-2,2-bis(4'-chlorophenyl)ethane	all-trans-Dehydroretinal	Disopyramide phosphate	L-Proline	Pyridoxine
Phosphocholine	all-trans-Nonaprenyl diphosphate	DMG-MINO	L-Threonine	Pyrvinium

1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylserine	all-trans-Pentaprenyl diphosphate	Docebenone	L-Tryptophan	Quercetin
1-O-Palmityl-sn-glycero-3-phosphocholine	alpha-Santonin	D-Ribose	L-Tryptophanamide	Quinapril
1-Linoleoylglycerophosphocholine	Androstenedione	dUMP	L-Valine	Riboflavin
Phosphoethanolamine	Angiotensin (5-7)	D-Urobilinogen	Macarpine	Secologanin
Phosphoethanolamine	Anisotropine methylbromide	Echitovenine	Mahanimbine	sn-Glycero-3-phosphocholine
1-Oleoylglycerophosphocholine	Ankorine	EDTA	Mandelonitrile	Solanidine
1-O-Sinapoyl-beta-D-glucose	Anthranilate	epsilon-Caprolactam	Mescaline	Solasodine
2-(Acetamidomethylene)succinate	Ascorbic acid	Ergocornine	Mesoridazine	Spermidine
2,2'-Diketospirilloxanthin	Avermectin A1a aglycone	Erucic acid	Methylarsonate	Spermine
2,3-Dimethylmaleate	Barbiturate	Estrone	Mucronine A	Sphinganine
2,4,5-Trichloro-2,5-cyclohexadiene-1-ol	Barringtogenol C	Ethanolamine phosphate	Mycinamicin VII	Sphingosine
2,5-Dichloro-4-oxohex-2-enedioate	beta-Alanyl-L-arginine	Fumitremorgin A	Mycolactone D	Sphingosine 1-phosphate
20,21-Diprenylterpendole I	Betamethasone	Geranyl diphosphate	aminohexanoate	Succimer
20,21-Diprenylterpendole J	Bilirubin	Gibberellin A1	N,N-Dimethylsphing-4-ene	Succinate
2,6-Diaminopurinosine	Biliverdin	Ginsenoside Rb1	deoxyadenosine	Taurolithocholate sulfate
Benzoquinone	Biochanin A	Gluconapin	N-Acetylmuramate	Taxifolin
2-Hydroxymuconate semialdehyde	Bixin	Glutathione	N-Acetylserotonin	Terpendole I
2'''-N-Acetyl-6'''-deamino-6'''-hydroxyparomomycin II	Butorphanol	Glycochenodeoxycholate 7-sulfate	N-Benzoyl-D-arginine	Testolactone
2-Naphthylamine	Canthaxanthin	Glycodeoxycholate	N-Benzoyloxycarbonylglycine	Testololactone
2-Octaprenyl-3-methyl-6-methoxy-1,4-benzoquinone	Capsaicin	Glycolithocholate	N-D-Glucosylarylamine	Tetrahydrocortisone

2-Oxobutanoate	Carnitine	Guanine	N-Hydroxy-4-aminobiphenyl	Thiamin diphosphate
2-Oxoglutaramate	Chenodeoxycholate	Heteropyrithiamine	Nicotinamide	Thymine
2-Oxoglutarate	Chikusetsusaponin Ia	Histamine	N-Octanoyl-L-homoserine lactone	trans,trans-Farnesyl diphosphate
2S-Amino-tridecanoic acid	Chitobiose	Homoarginine	Nopaline	trans-Cinnamate
2-Undecanone	Choline	Homocarnosine	Norethindrone	Tridemorph
3,4,6-Trichloro-cis-1,2-dihydroxycyclohexa-3,5-diene	Choline phosphate	Hydroxypyruvate	O-Butanoylcarnitine	Trihexyphenidyl
3',4'-Dihydrorhodovibrin	Chorismate	Hypotaurine	Octadecanamide	Trimethobenzamide
3',5'-Cyclic AMP	Ciliatocholate	Imipramine	Octanal	Tropine
3alpha,7alpha-Dihydroxy-12-oxo-5beta-cholanate	Cortisol	Indinavir	O-Decanoyl-L-carnitine	Tropinone
3beta,5alpha,6beta-Cholestanetriol	Cortisone	Indole-3-acetaldehyde	O-Propanoylcarnitine	Ubiquinone-8
3'-Demethylstaurosporine	Creatinine	Inosine	Pantetheine	Urate
3-Demethylubiquinone-9	Cucurbitacin I	Isoflurophate	para-(Dimethylamino)azobenzene	Veatchine
3-Geranylgeranylindole	Cyclohexylamine	Kyotorphin	Paramethadione	Xylobiose
4-Maleylacetoacetic acid	Homogentisic acid	Malic acid	Acetoacetic acid	succinylacetone
4-Fumarylacetoacetic acid				

EK-3. MSUD ve Kontrol grubunda Anlamlı Düzeyde Farklılaşan Metabolitler

1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate	Phenacylamine Hydrochloride
Acetoacetate	Actrarit
Choline	Methylbenzylamine Hydrochloride
Diaminopropionic Acid	N-(N-Octyl)-2-Pyrrolidinone
Catechol	Gulonolactone
Cytosine	Indolebutyrate
Aminolevulinate	3,3`-Dimethylbenzidine
Proline	Propionylcarnitine
Norvaline	Hydroxypyrene
Isoguvacine	Xanthurenic Acid
L-Pyroglutamic Acid	Propyl Gallate
L-Isoleucine	Methylumbelliferyl Acetate
Tyramine	Diphenylcarbohydrazide
Hydroxybenzoic Acid	Octopine
Hydroxymethylcytosine	Methylcytidine
Cis,Cis-Muconic Acid	Isoleucylglutamate
4-Methyl-5-Thiazoleethanol	N-Acetylcarnosine
Spermidine	Cyanidin
4-Hydroxy-6-Methylpyran-2-One	Sphinganine
3,4 Dihydroxymandelate	Acetylvalerenolic Acid
Pipecolate	Sphingosine
Xanthine	Hexadecanedioic Acid
Ureidopropionate	Decanoyl-L-Carnitine
Adenine	Kaurenic Acid
Aminomethylcyclohexanecarboxylic Acid	Orotidine 5'-Monophosphate
Quinolinic Acid	Stearoyl Ethanolamide
Guanidinobutanoate	Methylergonovine
N-(2-Furoyl)Glycine	Cyanidin Chloride
Arginine	7-Alpha-Hydroxy-4-Cholesten-3-One
N-Acetyl-L-Aspartic Acid	Glycolithocholic Acid
L-Citrulline	Chicoric Acid
Putrescine Dihydrochloride	LysoPC(0:0/18:0)
Phosphocholine	Haematoidin
Amino-Beta-Pinene	Lactosylceramide
Methoxytryptophol	Acetyl Coenzyme A

EK-4. LPI ve Kontrol Grubunda Anlamli Düzeyde Farklılaşan Metabolitler

11-Aminoundecanoic acid	Erucic acid
16-Methoxy-2,3-dihydro-3-hydroxytabersonine	Fumitremorgin A
Phosphocholine	Geranyl diphosphate
Phosphoethanolamine	Hypoxanthine
2,4,5-Trichloro-2,5-cyclohexadiene-1-ol	Indinavir
20,21-Diprenylterpendole J	Indole-3-acetaldehyde
2-Hydroxyuconate semialdehyde	Inosine
2''-N-Acetyl-6''-deamino-6''-hydroxyparamomycin II	L-Carnitine
2-Naphthylamine	L-Leucine
2-Oxobutanoate	L-Octanoylcarnitine
2-Oxoglutaramate	L-Palmitoylcarnitine
3,4,6-Trichloro-cis-1,2-dihydroxycyclohexa-3,5-diene	L-Phenylalanine
3'-Demethylstaurosporine	L-Threonine
3-Ketosphingosine	L-Tryptophan
3-Phospho-D-glycerate	L-Tryptophanamide
4-Aminobutanoate	L-Tyrosine
4-Ketomyxol	L-Valine
4-Methyl-2-oxopentanoate	Mycinamicin VII
4-Methylene-L-glutamine	Nicotinamide
5-Acetamidopentanoate	O-Decanoyl-L-carnitine
5-Methylcytosine	O-Propanoylcarnitine
8,11,14-Eicosatrienoylethanolamide	Phenylpyruvate
Adenine	Phosphoenolpyruvate
D-glucosamine	Pikromycin
Americine	Psychosine sulfate
Angiotensin (5-7)	Quinate
Bendroflumethiazide	Succinate
Bilirubin	Taurocholate
Biochanin A	Terpendole C
Chitobiose	Testolactone
Cucurbitacin H	Tetrahydrocorticosterone
Deoxyguanidinoproclavaminic acid	Thymine
Dicumarol	Tos-Phe-CH ₂ Cl
Dihydropteroate	trans-Cinnamate
Disopyramide phosphate	Tropinone
DMG-MINO	Tubocurarine
Ecdysone palmitate	Urate
	Veatchine

EK-5. Dijital Makbuz**Dijital Makbuz**

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Eda Ozaydın
Ödev başlığı: Moleküler metab
Gönderi Başlığı: Doktora Tezi
Dosya adı: Doktora_Tezi-Eda_zayd_n_1.docx
Dosya boyutu: 4.15M
Sayfa sayısı: 119
Kelime sayısı: 19,191
Karakter sayısı: 143,431
Gönderim Tarihi: 28-Ağu-2023 10:06ÖÖ (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 2152615503

Y.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KALITSAL METABOLİK HASTALILARDA OTOFAJİ, OKSİDATİF STRES VE
İNFLAMASYON İlişkisi

EDA OZAYDIN

MOLEKÜLER METABOLİZMA
DOKTORA TEZİ

ANKARA
2023

EK-6. Turnitin Raporu

Doktora Tezi

ORJİNALLİK RAPORU

%8

BENZERLİK ENDEKSİ

%8

İNTERNET KAYNAKLARI

%3

YAYINLAR

%1

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%2
2	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
3	rest.kegg.jp İnternet Kaynağı	%1
4	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	diagen.com.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	www.bezelyedergi.net İnternet Kaynağı	<%1
7	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	<%1
8	acikerisim.sakarya.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
9	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	<%1

EK-7. Etik Kurul Kararı



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 -1800

Konu :

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Prof. Dr. A. Nurten AKARSU
Hacettepe Üniversitesi
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar
Etik Kurulu Başkanı

Toplantı Tarihi : 05 ARALIK 2017 SALI

Toplantı No : 2017/26

Proje No : GO 17/924 (Değerlendirme Tarihi: 05.12.2017)

Karar No : GO 17/924- 09

ASLI GİRİDİR

Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Onkoloji Eğitim Araştırma Hastanesi öğretim üyelerinden Doç. Dr. Eda ÖZAYDIN' ın sorumlu araştırmacı olduğu, Prof. Dr. Ali DURSUN, Prof. Dr. Rıza Köksal ÖZGÜL, Doç. Dr. Basri GÜLBAKAN, Yrd. Doç. Dr. Didem Yücel YILMAZ ve Arş. Gör. Can KOŞUKCU ile birlikte çalışacakları, Doç. Dr. Eda ÖZAYDIN' ın doktora tezi olan, GO 17/924 kayıt numaralı, "*Doğuştan Metabolik Hastalıklarda Otofaji, Oksidatif Stres ve İnflamasyon İlişkisi*" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

- | | | | |
|------------------------------------|----------|---------------------------------------|-------|
| 1. Prof. Dr. Nurten AKARSU | (Başkan) | 10 Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU | (Üye) |
| 2. Prof. Dr. Sevda F. MÜFTÜOĞLU | (Üye) | 11 Yrd. Doç. Dr. Özay GÖKÖZ | (Üye) |
| İZİNLİ | | İZİNLİ | |
| 3. Prof. Dr. Yıldırım SARA | (Üye) | 12. Doç. Dr. Gözde GİRGEN | (Üye) |
| 4. Prof. Dr. Nedalet SAĞLAM | (Üye) | 13. Doç. Dr. Fatma Visal OKUR | (Üye) |
| 5. Prof. Dr. Hatice Doğan BOZDOĞRU | (Üye) | 14. Doç. Dr. Can Ebru KURT | (Üye) |
| KATILMADI | | | |
| 6. Prof. Dr. R. Köksal ÖZGÜL | (Üye) | 15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüseyin TURNAGÖL | (Üye) |
| 7. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN | (Üye) | 16. Öğr. Gör. Dr. Müge DEMİR | (Üye) |
| 8. Prof. Dr. Elmas Ebru YALÇIN | (Üye) | 17. Öğr. Gör. Dr. Meltem ŞENGELEN | (Üye) |
| 9. Prof. Dr. Mintaze Kerem GÜNEL | (Üye) | 18. Av. Meltem ONURLU | (Üye) |

ÖZGEÇMİŞ

Doç. Dr.Eda Özaydın