İMMÜN TROMBOSİTOPENİK PURPURA HASTALARININ PLAZMA METABOLOMİK PROFİLLERİNİN Q-TOF LC/MS İLE İNCELENMESİ

Emine KOÇ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Cuma MERTOĞLU
İkinci Tez Danışmanı
Prof. Dr. Mustafa ÇELEBİER

Doktora Tezi – 2026

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İMMÜN TROMBOSİTOPENİK PURPURA HASTALARININ PLAZMA METABOLOMİK PROFİLLERİNİN Q-TOF LC/MS İLE İNCELENMESİ

Emine KOÇ

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Cuma MERTOĞLU

İkinci Tez Danışmanı
Prof. Dr. Mustafa ÇELEBİER

Tez Jüri Üyeleri
Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
Prof. Dr. Cuma MERTOĞLU
Prof. Dr. Elif GÜREL
Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU
Prof. Dr. Z. Tuba TÜYLÜ KÜÇÜKKILINÇ

MALATYA
2026

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

ETİK BEYANI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak "Prof. Dr. Cuma MERTOĞLU" danışmanlığında hazırlayıp sunduğum "İmmün Trombositopenik Purpura Hastalarının Plazma Metabolomik Profillerinin Q-TOF LC/MS ile İncelenmesi " başlıklı Doktora tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

29/01/2026

Emine KOÇ

İÇİNDEKİLER

ÖZET xiii
ABSTRACT xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ xvii
TABLOLAR DİZİNİ xix
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Trombosit Fizyolojisi 4
2.1.1. Trombositlerin Sentezi (Trombopoiez) 6
2.1.2. Trombositlerin Fonksiyonları 7
2.1.3. Trombositlerin Yaşam Döngüsü ve Yıkımı 8
2.1.4. Trombosit Fonksiyonun Bozulduğu Durumlar 9
2.2. İmmün Trombositopenik Purpura 10
2.2.1. İmmün Trombositopenik Purpura'nın Tanısı 12
2.2.2. İmmün Trombositopenik Purpura'nın Epidemiyoloji 14
2.2.3. İmmün Trombositopenik Purpura'nın Patogenezi 15
2.2.4. İmmün Trombositopenik Purpurada Otoimmünitenin Başlatılması 16
2.2.5. İmmün Trombositopenik Purpura'nın Tedavisi 17
2.3. Metabolomik ile İlgili Genel Bilgiler 21
2.3.1. Lipidomik ile İlgili Genel Bilgiler 23
2.3.2. Metabolomik ve İTP: İmmün Trombositopenik Purpuranın Omik Yaklaşımlar Işığında Yeniden Değerlendirilmesi 24
2.3.3. Metabolomik ve Lipidomikte Kullanılan Analitik Yöntemler 28
2.3.4. Sıvı Kromatografisi/Kütle Spektrometresi Temelli Yöntemler 29
3. MATERYAL ve METOT 31
3.1. Materyal 31
3.2. Çalışmanın Tasarımı 32
3.2.1. İTP Tanısında Serolojik ve İmmünolojik Değerlendirme 34
3.3. İTP ve Kontrol Grubunun Tam Kan Sayımı ve Rutin Biyokimya Testlerinin Yapılması 36
3.3.1. İstatistiksel Analiz 37
3.4. Metabolomik Analizler İçin Numune Hazırlama 37

3.4.1. Plazma Numunelerinin Hazırlanması 37
3.4.2. Plazma Numunelerinin Metabolit Ekstraksiyonu 38
3.5. Sıvı Kromatografisi-Kuadrupol Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi Analizleri 39
3.6. Metabolomik Veri Analizi 42
3.6.1. Verilerin işlenmesi 42
3.6.2. Kör ve Kalite Kontrol Filtreleme 43
3.6.3. Normalizasyon 44
3.7. MetaboAnalyst 6.0 ile Temel Bileşenler Analizi, Volkan Grafiği ve Isı Haritası Grafiklerinin Hazırlanması 45
3.7.1. Veri Ön İşleme 45
3.7.2. Temel Bileşenler Analizi 46
3.7.3. Volkan Grafiği Analizi 47
3.7.4. Metabolit Tanımlama Analizi 47
3.7.5. Isı Haritası Analizi 48
3.7.6. Önemli Değişkenler Analizi 49
3.7.7. Metabolit Yolak Analizi 50
3.7.8. Grafiklerin Elde Edilmesi 50
3.8. Lipidomik Analizler 50
3.8.1. Lipidomik Numune Hazırlama 50
3.8.2. Q-TOF LC/MS ile Lipidomik Analizler 51
3.8.3. Lipidomik Veri Analizi 51
4. BULGULAR 53
4.1. İTP ve Kontrol Grubuna Ait Bulgular 53
4.1.1. İTP ve Kontrol Grubuna Ait Demografik Veriler ve Tam Kan Sayımına ait Bulgular 53
4.1.2. İTP ve Kontrol Grubu Metabolomik Analizlerine Ait Bulgular 54
4.1.3. İTP ve Kontrol Grubu Arasındaki Cinsiyet Farklılığının Metabolomik Sonuçlara Etkisi 73
4.1.4. İTP ve Kontrol Grubu Havuzlanmış Numunelerinin Lipidomik Analizlerine Ait Bulgular 75
4.2. İTP Grubunda Tedavi Durumuna Göre Elde Edilen Bulgular 80
4.2.1. İTP Grubunda Tedavi Durumuna göre Demografik, Hematolojik ve Biyokimyasal Bulgular 80

4.2.2. İTP Grubunda Tedavi Durumuna Göre Metabolomik Bulgular 81
4.3. İTP Grubunda Ek Hastalık Varlığına Göre Bulgular 87
4.3.1. İTP Grubunda Ek Hastalık Varlığına Göre Demografik, Hematolojik ve Biyokimyasal Bulgular 87
4.3.2. İTP Grubunda Ek Hastalık Varlığına Göre Metabolomik Bulgular 89
5. TARTIŞMA 92
6. SONUÇ ve ÖNERİLER 110
KAYNAKLAR 111
EKLER 124
EK-1. Özgeçmiş 124
EK 2. Etik Kurul Onay Belgesi 125

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim sürecindeki desteğiyle bana yol gösteren, tez çalışmamın yürütülmesi ve hazırlanması süresince yardımlarını benden esirgemeyen, bilgi birikimi ve önerilerinden yararlandığım çok değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Cuma MERTOĞLU'na,

Doktora eğitimim sürecindeki en büyük şansım olan ve tez çalışmamın yürütülmesi ve hazırlanması süresince yardımlarını benden esirgemeyen, bana her zaman destek olan, bilgilerinden, önerilerinden ve birikimlerinden sürekli yararlandığım, yol göstericiğiyle ufkumu genişleten çok değerli ikinci tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Mustafa ÇELEBİER' e

Metabolomik analizler konusunda bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan ve tez çalışmamda deneylerin yürütülmesinde yardımlarını esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Dr. Ozan KAPLAN'a

TÜBİTAK projesi kapsamında birlikte çalışma olanağı bulduğum, değerli bilimsel katkıları ve destekleri için proje yürtücülerim Sayın Prof. Dr. Feza KORKUSUZ'a ve Doç. Dr. Nadir YALÇIN'a,

Çalışmamın numunelerinin toplanmasında büyük katkı sağlayan Sayın Uzm. Dr. Batuhan ERDOĞDU ve Sayın Uzm. Dr. Selim SAYIN'a,

Lisansüstü eğitimim boyunca her zaman bana yol gösteren ve desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ'e,

Lisansüstü eğitimim boyunca teorik ve pratik derslerde öğrettikleri değerli bilgiler için Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı hocalarıma,

Hacettepe Üniversitesinde de bulunduğum süre içerisinde gösterdikleri yakınlık, ilgi ve samimiyet için Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı akademik ve idari personeline,

Lisans ve Lisansüstü eğitimim boyunca bana kazandırdığı bilimsel bakış açısı, değerli bilgi ve tecrübeleri ile Yüksek Lisans tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Turan ARABACI'ya,

BİÇABA burs programı ve BİDEB proje burslarıyla maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a,

Her zaman manevi destekleriyle yanımda olan çalışma arkadaşlarım; Dr. Öğr. Üyesi Nilüfer BULUT'a, Uzm. Dr. Fatma BUDAK'a, Arş. Gör. Dr. Sevilay KABLAN'a, Ecz. Dr. Esmanur ÇİĞ'e, Bio. Dr. Nurcan GÖKTÜRK'e, Ecz. E. Damla TOPAK'a, Ecz. B. Canan ASLAN'a, Uzm. Biokim. Nursena DEMİRCİGİL'e, Mol. Bio İlayda DEMİRDİŞ'e,

Lisansüstü eğitimim boyunca bana kazandırdığı bilimsel bakış açısı, değerli bilgi ve tecrübeleri ile bilimsel etik anlayışımın şekillenmesinde önemli katkıları bulunan Sayın Prof. Dr. Tayfun GÜLDÜR Hocam'a,

Son olarak, eğitim hayatım boyunca her koşulda yanımda olan, desteklerini esirgemeyen değerli aileme,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

İmmün Trombositopenik Purpura Hastalarının Plazma Metabolomik Profillerinin Q-TOF LC/MS ile İncelenmesi

Amaç: İTP, trombositlere karşı gelişen otoantikorlar sonucu dolaşımdaki trombosit sayısının azalmasıyla karakterize otoimmün bir hastalıktır. Bu çalışma ile İTP tanısı alan hastalar ile sağlıklı kontrollerin metabolomik ve lipidomik profillerini karşılaştırarak İTP'nin fizyopatolojisinin aydınlatılması amaçlanmıştır.

Materyal ve metot: Çalışmaya 22–65 yaş arası 39 İTP hastası ve 41 sağlıklı kontrol dahil edildi. İTP hastaları ve kontrollerden elde edilen plazma örnekleri, metanol ile protein çöktürme yöntemi kullanılarak ekstrakte edildi. Ekstraktlar, Q-TOF-LC/MS cihazı ile metabolomik ve lipidomik analizleri gerçekleştirildi. Gruplar arası farklılıklar PCA, PLS-DA, volkan grafikleri ve VIP skor analizleri ile belirlendi. Metabolit tanımlaması referans standart kütüphane ve tahmini adlandırma yöntemleri ile yapıldı. Ayrıca İTP hastalarının metabolik profili tedavi alan ve almayan hastalar ile ek hastalığı bulunan ve bulunmayan alt gruplar arasında da karşılaştırıldı.

Bulgular: İTP ve kontrol grubu arasında anlamlı değişen toplam 58 metabolit belirlendi. En belirgin değişim gösteren metabolitler; prostaglandin H2 (VIP=3.09), testosteron (VIP=3.04), protoporfirinojen IX (VIP=2.99), 11-dehidrokortikosteron (VIP=2.87), asimetrik dimetilarginin (VIP=2.79) 4-hidroksiretinoik asit (VIP=2.63), prostaglandin A2 (VIP=2.35), progesteron (VIP=2.27), N1,N12-Diasetilspermin, (VIP=2.27), prostaglandin E3 (VIP=2.17), kortizol (VIP=2.17), dolikil b-D-glukozil fosfat (VIP=2.12), N1-Asetilspermin (VIP=2.11), fenilalanin (VIP=2.09), lökotrien A4 (VIP=2.08) kontrollere göre İTP grubunda artarken, dehidroepiandrosteron sülfat (VIP=2.94), 2-Oksovalerik asit (VIP=2.82), oksalosüksinik asit (VIP=2.62), 13-OksoODE (VIP=2.06,) İTP grubunda azaldığı belirlendi. Yolak analizleri sonucunda androstenedion metabolizması, androjen ve östrojen metabolizması, biyotin metabolizması ve steroidogenez yolaklarının değiştiği bulundu.

Sonuç: İTP ve sağlıklı kontrollerin metabolomik profillerinin birbirinden farklı olduğu saptanmıştır. Fenilalanin, glutamin, 2-oksovalerik asit ve dokozahekzaenoik asitin İTP'nin patofizyolojisinde rolü olabilir ve mevcut bulgular gelecekte yapılacak hedefli metabolomik çalışmalar için temel alınabilir.

Anahtar Kelimeler: İmmün trombositopenik purpura (İTP), LC/MS, Lipidomik, Metabolomik, Trombosit

ABSTRACT

Examination of Plasma Metabolomic Profiles of Immune Thrombocytopenic Purpura Patients with Q-TOF LC/MS

Aim: ITP is an autoimmune disease characterized by a decrease in circulating platelet count due to autoantibodies directed against platelets. This study aimed to elucidate the pathophysiology of ITP by comparing the metabolomic and lipidomic profiles of patients diagnosed with ITP and healthy controls.

Materials and Methods: Plasma samples obtained from 39 patients with ITP and 41 age-matched healthy controls (22–65 years) were analyzed using Q-TOF LC/MS–based untargeted metabolomics and lipidomics approaches. Multivariate statistical analyses, including PCA and PLS-DA, were performed to evaluate group separation. Differential metabolites were further assessed using volcano plot analysis and VIP scores. Metabolite identification was achieved through an in-house spectral library and putative database annotations. Subgroup analyses were conducted according to treatment status and the presence of comorbidities.

Results: A total of 58 discriminative metabolites were identified between the ITP and control groups. Prostaglandin H2, testosterone, protoporphyrinogen IX, 11-dehydrocorticosterone, asymmetric dimethylarginine, 4-hydroxyretinoic acid, prostaglandin A2, progesterone, N1,N12-diacetylspermine, prostaglandin E3, cortisol, dolichyl β-D-glucosyl phosphate, N1-acetylspermine, phenylalanine, and leukotriene A4 were significantly increased in the ITP group. In contrast, dehydroepiandrosterone sulfate, 2-oxovaleric acid, oxalosuccinic acid, and 13-oxo-octadecadienoic acid were decreased. Pathway analysis revealed significant alterations in steroid hormone metabolism, steroidogenesis, and biotin metabolism.

Conclusion: The metabolomic profiles of patients with ITP were found to differ significantly from those of healthy controls. Phenylalanine, glutamine, 2-oxovaleric acid, and docosahexaenoic acid may be involved in the pathophysiology of ITP, and these findings may provide a basis for future targeted metabolomic investigations.

Key words: Immune thrombocytopenic purpura (ITP), LC/MS, Lipidomics, Metabolomics, Platelet

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADP	: Adenozin difosfat
BSS	: Yüzde bağıl standart sapma
DK	: Değişim katsayısı
GbIb-IXV	: Glikoprotein Ib-IXV reseptör
GC	: Gaz kromatografisi
GC-MS	: Gaz kromatografisi kütle spektrometrisi
GP	: Glikoprotein
GP-Ib-α	: Glikoprotein Ib-α
GP-IIb-IIIα	: Glikoprotein-IIb-IIIα
GP-VI	: Glikoprotein VI
HMDB	: İnsan metabolom veri tabanı
Ig	: İmmünoglobulin
IL	: İnterlökin
İTP	: İmmün trombositopenik purpura
IVIg	: İntravenöz immünoglobulin
I-WISH	: İTP Dünya etki anketi
KEGG	: Kyoto genler ve genomlar ansiklopedisi
LC	: Sıvı kromatografi
LC/MS	: Sıvı kromatografisi kütle spektrometrisi
m/z	: Kütle/yük oranı
MS	: Kütle spektrometrisi
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
PC	: Temel bileşen
PC1	: Temel bileşen
PC2	: Temel bileşen
PCA	: Temel bileşenler analizi
PLS-DA	: Kısmi en küçük kareler ayırma analizi
Q-TOF-LC/MS	: Sıvı kromatografisi kuadrupol uçuş zamanlı kütle spektrometrisi
Th	: Yardımcı T hücreler

TIC	: Total iyon kromatogramı
TLR	: Toll benzeri reseptör
TPO	: Trombopoietin
TPO-RA	: Trombopoietin reseptör agonistti
tR	: Alıkonma zamanı
VIP	: Önemli değişenler analizi
vWF	: von Willebrand faktör

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. İTP'li bir hastadan periferik kan yayması ve kemik iliği aspirasyonu. 13
Şekil 3.1. Çalışmanın deneysel tasarımı 34
Şekil 3.2. Metabolomik analizlerde kullanılan sıvı kromatografisi-kuadrupol uçuş zamanlı kütle spektrometresi cihazı 39
Şekil 3.3. Pozitif iyonizasyon mod kalite kontrol numunelerine ait temel pik kromatogramı 41
Şekil 3.4. Negatif iyonizasyon mod kalite kontrol numunelerine ait temel pik kromatogramı 42
Şekil 3.5. Q-TOF LC/MS analizleri sonrası MZmine 2.53 yazılım programı ile işlenen verilerin excel çıktısı 43
Şekil 4.1. Kalite kontrol ve havuz numunelerine ait PCA grafiği 54
Şekil 4.2. Pozitif iyonlaşma modu İTP ve kontrol gruplarına ait PCA grafiği 55
Şekil 4. 3. Pozitif iyonlaşma modu İTP ve kontrol gruplarına ait PLS-DA grafiği 56
Şekil 4.4. Negatif iyonlaşma modu İTP ve kontrol gruplarına ait PCA grafiği .. 57
Şekil 4.5. Negatif iyonlaşma modu İTP ve kontrol gruplarına ait PLS-DA grafiği 57
Şekil 4.6. Pozitif iyonlaşma modu İTP ve kontrol grubuna ait volkan grafiği 58
Şekil 4.7. Negatif iyonlaşma modu İTP ve kontrol grubuna ait volkan grafiği .. 59
Şekil 4.8. İTP ve Kontrol grubu arasında anlamlı değişen metabolitlere ait ısı haritası grafiği 70
Şekil 4.9. İstatistiksel olarak anlamlı değişim gösteren metabolitlerin eşleştiği yolaklar 71
Şekil 4.10. Lipidomik analizler sonucu İTP ve kontrol grubuna ait PCA grafiği 76
Şekil 4.11. Lipidomik analizler sonucu İTP ve kontrol grubuna ait PLS-DA grafiği 77
Şekil 4.12. Pozitif iyonlaşma modu tedavi alan ve tedavi almayan İTP gruplarına ait PCA grafiği 82

Şekil 4.13. Negatif iyonlaşma modu tedavi alan ve tedavi almayan İTP gruplarına ait PCA grafiği 83
Şekil 4.14. Tedavi alan ve almayan gruplarda metabolitlerin kontrol grubuna göre bar grafiği. 84
Şekil 4.15. Pozitif iyonlaşma modu ek hastalığı olan ve olmayan İTP gruplarına ait PCA grafiği 89
Şekil 4.16. Negatif iyonlaşma ek hastalığı olan ve olmayan İTP gruplarına ait PCA grafiği 90
Şekil 4.17. Ek hastalığı olan ve olmayan İTP grubu arasında anlamlı değişen metabolitlere ait ısı haritası grafiği 91

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan cihaz, sarf malzeme ve yazılım progamlarının listesi 31
Tablo 3.2. İTP hastalarının klinik verileri 35
Tablo 3.3. Kalite kontrol numunesinde bulunan standartların listesi 40
Tablo 4.1. Kontrol ve İTP grubuna ait demografik veriler ve tam kan sayımı parametreleri 53
Tablo 4.2. Tanımlanan metabolitlerin bileşik sınıflarına göre listesi ve yüzde değerleri 59
Tablo 4.3. İTP ve kontrol grubu arasında anlamlı değişen metabolitlerin listesi 62
Tablo 4.4. İTP ve kontrol grubu arasında değişen metabolitlerin eşleştiği yolaklara ait metabolit sayıları, p değeri ve yanlış keşif oranı değerleri 71
Tablo 4.5. Cinsiyet farklılığından doğrudan etkilenen metabolitler 73
Tablo 4.6. Cinsiyet etkisinden kısmen etkilenebilecek metabolitler 74
Tablo 4.7. Cinsiyet etkisinden bağımsız görünen ve İTP fizyopatolojisi için güçlü aday biyobelirteçler 75
Tablo 4.8. Kontrol ve İTP grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı değişen lipidler 78
Tablo 4.9. Tedavi alan ve tedavi almayan İTP grubuna ait demografik veriler ve tam kan sayımı değerleri 80
Tablo 4.10. Tedavi alan ve tedavi almayan İTP grubu arasında anlamlı değişen metabolitlerin değişim katsayısı değerleri 85
Tablo 4.11. Ek hastalığı olmayan ve ek hastalığı olan (romatoid artrit, diyabet, hipertansiyon vs.) immün trombositopeni purpura grubuna ait demografik veriler ve kan değerleri 87
Tablo 4.12. Ek hastalığı olan ve olmayan İTP grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim gösteren metabolitler 90

1. GİRİŞ

İmmün trombositopenik purpura (İTP), trombositlere karşı gelişen otoantikorların, otoantikorla kaplı trombositlerin retiküloendotelyal sistemde doku makrofajları tarafından yıkımını artırması ve aynı zamanda trombosit üretimini baskılaması sonucunda dolaşımdaki trombosit sayısında azalma ile karakterize otoimmün bir hastalıktır (1). Patolojisi çok karmaşıktır ve hücresel ve humoral immüniteyi içerir. Hastaların yaklaşık %60'ında anti-trombosit antikorları tespit edilir (2). Hastalar deri ve/veya mukoza kanaması ve yaşamı tehdit eden organ kanamaları (beyin, sindirim sistemi vb.) gibi kritik durumlarda hastaneye başvurabilirler. Çoğu hasta için kanama en sık görülen klinik bulgudur (3). Farklı yaş gruplarında tahmini 5 yıllık kanamaya bağlı mortalite %2.2 ile %47.8 arasındadır. Bu nedenle hızlı tanı ve tedavi müdahalesi zorunlu bir hastalıktır. Tedavi seçenekleri arasında kortikosteroid tedavisi ilk tedavi seçeneğini temsil eder ancak her otoimmün hastalıkta olduğu gibi hastalığın tekrarlama riski yüksektir. İkinci basamak tedavi seçenekleri şunları içerir: intravenöz immünoglobulinler, trombopoietin reseptör agonistleri, rituximab veya immünosupresyon, ancak bunların faydası genellikle geçicidir (4). Ayrıca hastalık genellikle tekrarlanan ve uzun süreli tedavi ve hastaneye yatırılma ihtiyacı duyan gençleri etkilemektedir. Günümüzde İTP tanısı, ayrıntılı öykü, fizik muayene ve periferik kan yaymasının değerlendirilmesi sekonder nedenlerin (sistemik lupus eritematozus, romatoid artrit, Evans sendromu, Sjögren sendromu ve antifosfolipid sendromu) dışlanmasıyla ile yapılmaktadır (5). İTP'ye özgü ilaçlara yanıt, tanıyı destekleyebilir ancak bu İTP'yi trombositopenili diğer hastalıkları tamamen dışlamaz ve hastalığın tanısı için uzun vadeli etkili altın standart bir test yoktur. Bu nedenle hastalığın hastalık seyrini ve terapötik yanıtları tahmin etmek için spesifik biyobelirteçlerin tanımlanmasına klinik ihtiyaç vardır. Ancak tedavi etkinliğini, hastalık seyrini ve advers reaksiyonları etkileyen biyolojik süreçler, yaş, cinsiyet, yaşam tarzı faktörleri ve genetik bileşenler gibi çeşitli faktörler nedeniyle bireyler arasında büyük farklılıklar göstermektedir ve bu da bireyselleştirilmiş bir hassas tıp yaklaşımına olan ihtiyacı ortaya koymaktadır. Yıllar içinde yeni, yüksek verimli teknolojiler geliştirilmiş ve bunlar karmaşık biyolojik sistemlere ışık tutmak için giderek daha fazla kullanılmaktadır. Bunlara transkriptomik, (epi)genomik, proteomik ve metabolomik dahildir. Bu verilerden elde edilen bilgiler, hastalığa özgü tanı ve tedavi biyobelirteçlerini belirleme

potansiyeline sahip makine öğrenimi algoritmaları tarafından üretilebilir. Bu teknolojiler henüz İTP'ye kapsamlı bir şekilde uygulanmamıştır (6).

Metabolomik, bir biyolojik numunedeki 1500 Dalton'dan küçük metabolitleri kapsamlı bir şekilde karakterize etmek için gelişmiş istatistiksel yöntemlerle birlikte ileri analitik kimya tekniklerini kullanan, bir yöntemdir (7). Bu omik yaklaşımının, örneklerdeki binlerce metaboliti, aynı anda ölçme kapasitesi, onu kişiselleştirilmiş tıpta araştırma ve klinik uygulamalar için umut verici bir araç haline getirmiştir. Metabolomik analizlerde temel amaç hastalığın tanısı, gelişimi ve tedavinin etkisini gözlemlemektir. Metabolomik verileri birleştirmek, çeşitli alanlarda tanısal, prognostik ve terapötik öneme sahip yeni biyobelirteçlerin keşfedilmesi için büyük bir potansiyele sahiptir. Araştırmacılar, biyolojik sistemlerdeki metabolik profiller hakkındaki bilgileri birleştirerek, fizyolojik ve patolojik süreçlerin altında yatan moleküler mekanizmalar hakkında daha kapsamlı bir anlayış kazanabilirler. Lipidomik ise fosfolipitler, nötral lipitler (trigliserit, kolesteril esterler), sfingolipitler ve yağ asitleri olmak üzere, bir biyolojik sistemdeki tüm lipit türlerinin yapısal ve miktarsal olarak karakterize edilmesini amaçlayan metabolomiğin alt bir disiplinidir (8).

İTP bağlamında metabolomik ve lipidomik kullanan son araştırmalar, birden fazla aday tanısal biyobelirteç belirlemiş ve hastalıkta rol oynayan temel metabolik yolları açıklığa kavuşturmuştur. Önceki çalışmalarda metabolomik ile makine öğrenimi tekniklerini birleştirerek yeni tanı alan İTP ve kronik İTP gruplarının kemik iliği biyopsileri arasında sfingolipid metabolizması, sfingolipid sinyal yolu, ubikinon ve diğer terpenoid-kinon biyosentezi, tiamin metabolizması, triptofan metabolizması ve kofaktör biyosentezi, fosfolipaz D sinyal yolu ve fosfatidilinositol yollarında önemli bozulmalar olduğunu göstermiştir (9). İTP hastaları ile sağlıklı kontroller arasında tanısal potansiyeli olan 17 metabolit tanımlanmıştır. İTP hastalarının metabolik bozukluklarının esas olarak fenilalanin, tirozin ve triptofan biyosentezi, fenilalanin metabolizması ve glioksilat ve dikarboksilat metabolizması ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Ek olarak, kronik İTP hastalarında glukokortikoidlere direnci öngörmede 6 farklı metabolit ve beş önemli yolak belirlenmiştir (10). İTP'li hastaları ve sağlıklı kontrollerden alınan dışkı örneklerinin shotgun metagenomik çalışmada; İTP'de değişikliğe uğrayan çeşitli bağırsak bakteri taksonu ve metabolitleri, trombosit sayılarıyla güçlü korelasyonlar gösteren ve İTP patogenezinde potansiyel bir rol oynayabileceğini düşündüren tanısal biyobelirteçler olarak önerilmiştir (11).

Yine İTP hastalarının dalaktaki metabolomik değişikliklerinin araştırıldığı çalışmada İTP hastalarının dalak dokusu sağlıklı bireyler ile karşılaştırıldığında, asetat, alanin, glutamin, gliserol, izolösin, lizin, valin, fenilalanin, lösin 3-hidroksibütirik asit, askorbat, asparajin, glikojen, düşük yoğunluk lipoproteini, malonat, miyo -inositol, gliserofosfokolin, piroglutamat ve taurin miktarı değişen metabolitlerdi (12). Kemik iliği ve dalak dokusunun metabolik profilleri araştırılmış olsa da İTP hastalarının plazma metabolomik ve lipidomik profilleri daha önce detaylı çalışılmamıştır. Yine bu metabolik profillerin İTP'nin patogenezini nasıl etkilediği bilinmemektedir. Bu çalışma ile İTP'nin erken tanı ve tedavisinde plazmada tanımlanabilecek olası metabolitlerin hastalığın ilerlemesindeki rolü tartışılmıştır. Bu amaçla İTP tanısı konulmuş hastalardan ve sağlıklı kontrollerden plazma numuneleri alınmıştır. Hazırlanan plazma numuneleri ekstraksiyonu yapılarak sıvı kromatografisi-kuadrupol uçuş zamanlı kütle spektrometrisi (Q-TOF LC/MS) yöntemiyle metabolomik ve lipidomik analizleri yapılmıştır. İstatistiksel veri değerlendirmesi yapılarak İTP ve sağlıklı kontroller arasında metabolomik farklılıklar belirlenmiştir. Olası değişikliklerin İTP'nin fizyopatolojisinde, tedavisinde, tedavisinin takibinde kullanılabilecek faydalı biyobelirteçler olup olamayacağı tartışılmıştır. Ayrıca İTP hastalarının metabolik profillerinin tedavi durumu (tedavi alan/tedavi almayan) ve ek hastalık durumuna (ek hastalığı olan/olmayan) bağlı olarak değişip değişmediği de değerlendirilmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda bu tez çalışmasının araştırma soruları şunlardır;

1) Metabolomik veriler, İTP'nin fizyopatolojik mekanizmalarının anlaşılmasında etkili midir?

2) İTP hastalarının metabolik profillerinin sağlıklı kontrollerden farkı biyokimyasal olarak açıklanabilir mi?

3) Metabolik profildeki farkın biyokimyasal yorumuna bakılarak İTP'nin fizyopatolojisi için yeni aday biyobelirteçler önerilebilir mi?

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Trombosit Fizyolojisi

Trombositler, kan dolaşımında yer alan, çekirdek taşımayan, küçük (2-4 µm çaplı) diskoid, pıhtılaşma faktörleri, inflamatuar medyatörler ve bol miktarda granül içeren kan hücreleridir (13). Trombositlerin temel rolü, vasküler endotelyum hasar gördüğünde hemostatik bir tıkaç veya trombüs oluşturarak damar hasarının olduğu bölgede damar bütünlüğünü korumaktır (14). Fizyolojik rollerinin yanı sıra, trombositler inflamasyona, trombotik bozukluklara ve tümör metastazına da katkıda bulunduğu iyi bilinmektedir (15). Normal koşullar altında, kanda dolaşan trombositler µL başına 150.000 ila 350.000 arasındadır ve dolaşımdaki ortalama yaşam süreleri 7 ila 10 gündür. Fizyolojik trombosit konsantrasyonunu korumak için günde 100 milyar trombosit (dakikada 70 milyon) dönüşüm gerektirir. Yaşlanmış ve aktive olmuş trombositler, dalakta makrofajlar veya karaciğer tarafından dolaşımdan alınarak temizlenir.

Trombositlerin sitoplazması, α-granüller, dense granüller, lizozomlar ve peroksizomlar gibi çeşitli granüller içerir (16). Trombosit α-granülleri en bol (trombosit başına 50-80) salgı organelleridir ve zar proteinleri, yapışkan moleküller, vitronektin ve multimerin, hemostaz ve tromboza katkıda bulunan koagülanlar gibi birçok protein içerir (17). Ek olarak, trombosit α-granülleri, patojenlere karşı konak savunmasına aktif olarak katkıda bulunan doğrudan mikrobisidal özelliklere sahip kemokinler ve anjiyogenezi düzenleyen pro- ve anti-anjiyojenik faktörler içerir. α-granülleri ayrıca yüksek konsantrasyonlarda pro-inflamatuar ve immün-modülatör faktörlerin salgılanması yoluyla inflamasyon ve aterosklerozda aktif olarak rol oynar (18).

Dense granüller ise adenozindifosfat (ADP), serotonin ve kalsiyum gibi aktivasyonu güçlendiren küçük molekülleri barındırır (19). Lizozomal granüller, proteolitik enzimler içererek hücre içi yıkım mekanizmalarına katkıda bulunur; peroksizomlar ise lipid metabolizmasıyla ilişkili çeşitli enzimler taşır. Aktivasyon sırasında bu granüllerin içerikleri hızla salınarak trombosit fonksiyonlarını güçlendirir ve stabil trombüs oluşumunu destekler. Trombosit lizozomları, asit hidrolazlar (katepsinler, heksosaminidaz, b-galaktosidaz, arilsülfataz, b-glukuronidaz ve asit fosfataz) içerir ve yoğun granüllere benzer şekilde CD63 ve lizozomla ilişkili zar proteini 1 ve 2 eksprese ederler (20).

Trombositler, zarlarında çok sayıda reseptör içerir. Bu reseptörler, trombositlerin yaralanma bölgesine yapışmalarına ve hasarı kapatmak için bir trombüs oluşturmalarına yardımcı olur. En önemli reseptörlerden biri, trombosit alfa granüllerinde depolanan ve nötrofiller, monositler ve eozinofiller üzerindeki P-selektin glikoprotein ligand-1'e bağlanan bir membran proteini olan P-selektindir. Hem nötrofiller hem de monositler, P-selektin aracılığıyla hareketsizleştirilmiş, yapışık trombositler üzerinde yuvarlanarak vasküler lezyonlara çekilir. Daha sonra lökosit makrofaj-1 antijeni veya integrin αMβ2 ile trombosit reseptörü glikoprotein Ib- α (GP-Ib-α), bağlantısal yapışma molekülü 3 ve hücreler arası yapışma molekülü 2'nin etkileşimi ile daha kararlı bir bağlanma sağlanır. Bir diğer önemli reseptör hem zara bağlı hem de çözünür formda salınan trombosit CD40 ligandıdır. Monositlerde, trombosit CD40 ligandına bağlanması, pıhtılaşma kaskadını aktive eden doku faktörünün ekspresyonunu uyarır. Ayrıca, endotel hücrelerinde trombosit CD40L, adezyon reseptörleri E-Selectin, vasküler hücre adezyon molekülü 1 ve vasküler hücre adezyon molekülü -1'in ekspresyonunu ve interlökin-6 (IL-6) ve IL-8 ve monosit kemotaktik protein-1 gibi proinflamatuar sitokinlerin salgılanmasını artırır (21).

Trombosit yüzeyindeki ana reseptör glikoprotein Ib-IX-V reseptör (GbIb-IXV) kompleksidir ve yalnızca trombositler ile megakaryositlerde eksprese edilir. GPIb-IXV kompleksi, damar hasarı sonrası von Willebrand faktörüne (vWF)'ye bağlanarak trombositlerin damar duvarına ilk tutunmasını sağlar (22). Bu etkileşim, trombosit adezyonunun başlatılması ve pıhtı oluşumunun düzenlenmesi açısından kritik öneme sahiptir. Glikoprotein VI reseptörü (GP-VI) ise kollajeni tanıyarak trombosit aktivasyonunun başlatılmasında görev alır. GP-VI reseptörleri aracılığıyla kolajene sıkıca yapışana kadar vWF'ye maruz kaldıklarında yuvarlanmaya başlarlar. Trombosit agregasyonunun temel reseptörü olan glikoprotein IIb-IIIα (GP-IIb-IIIα) veya integrin αIIbβ3 fibrinojeni bağlayarak trombositler arası köprü oluşumunu gerçekleştirir. İntegrin reseptörler α2β1, α5β1, α6β1, αLβ2, αIIbβ3 ve αvβ3 içerir. Bunun yanında trombosit P2Y12 reseptörü ADP aracılı aktivasyonda (23), trombosit proteaz aktifleştirilmiş reseptörler (PAR) 1 ve 4 reseptörleri trombinle indüklenen aktivasyonda önemli rol oynar. Ayrıca C tipi lektin benzeri reseptör 2 ve toll-benzeri reseptörler (TLR) ise hemostazın yanı sıra inflamatuar ve immün yanıt süreçlerinde trombositlerin aktif bir hücresel bileşen olarak görev yapmasını sağlar.

Başlıca trombosit reseptörleri tirozin kinaz reseptörleri (CLEC-2, GP-VI ve FcgR-II) ve G-protein-bağlı reseptörler (PAR P2YX, tromboksan reseptörü) olarak iki sınıfa

ayrılabilir (24). Her iki sinyal yolunun aktivasyonu, trombositlerin endoplazmik retikulumundaki inozintrifosfat reseptörlerinin aktivasyonu ve kalsiyum iyonlarının sitozole salınmasıyla sonuçlanır. Artan kalsiyum konsantrasyonu, trombositlerin ana işlevsel tepkilerini teşvik eder: şekil değişikliği, granül salgılanması, pro-koagülan tepkisi ve integrinlerin aktivasyonu. Tüm bu tepkiler birlikte trombosit agregasyonunu güçlendirir ve kan dolaşımındaki bitişik trombositleri uyarır.

2.1.1. Trombositlerin Sentezi (Trombopoiez)

Trombositler kemik iliğinde megakaryosit adı verilen büyük ve çok çekirdekli hücrelerden trombopoiez adı verilen bir süreçle üretilirler (25). Megakaryositlerin gelişimi, hematopoietik kök hücrelerden başlayarak ardışık bir farklılaşma süreciyle gerçekleşir. Bu süreçte hematopoietik kök hücreler, önce ortak miyeloid progenitöre farklılaşır; ardından megakaryosit–eritroid progenitör hattına yönelir. Bu hücreler daha sonra megakaryoblast aşamasına geçer ve sırasıyla pro-megakaryosit ve matür megakaryosit evrelerine ulaşırlar. Olgun megakaryositler, kemik iliği sinüzoidlerine doğru uzanan proplatelet yapıları oluşturarak sitoplazmalarını küçük fragmanlara ayırır ve bu fragmanlar dolaşıma trombosit olarak salınır (26, 27).

Megakaryosit çoğalmasını ve farklılaşmasını karaciğer parankimal hücrelerinde, böbreklerde ve kemik iliğinde üretilen trombopoietin (TPO) hormonu uyararak trombosit üretimini düzenler (28). TPO, trombosit üretiminin başlıca düzenleyicisidir. TPO, glikoprotein yapıda olup baskın olarak megakaryosit yüzeyinde ifade edilen bir sitokindir. TPO, miyeloproliferatif lösemi proteinine (c-MPL veya CD110) bağlanarak reseptörün homodimerizasyonunu başlatır ve daha sonra hücresel çoğalmayı ve trombositlere farklılaşmayı kontrol eden janus kinaz/transkripsiyon sinyal dönüştürücüleri ve aktivatörleri sinyal yolu ve ras kaskadları gibi hücre içi sinyal yollarının aktivasyonunu indükleyerek trombosit sentezini düzenler (29, 30). Ek olarak, TPO'nun hematopoietik kök hücrelerin mitokondriyal metabolizmasında değişikliklere neden olduğu ve bunları doğrudan megakaryositlere farklılaşmaya hazırladığı tanımlanmıştır (31).

TPO, trombosit ve megakaryosit kitlesi ile hepatik sentez kapasitesinin birlikte belirlediği hassas bir geri bildirim sistemiyle düzenlenmektedir. Trombosit veya megakaryosit sayısının artması TPO'nun daha fazla tüketilmesine ve dolaşımdaki serbest TPO düzeyinin azalmasına yol açarken, trombositopeni durumlarında TPO tüketimi azaldığı için serbest TPO düzeyi yükselir ve bu artış megakaryopoezi uyararak trombosit üretimini artırır (32). Ayrıca inflamatuar sitokinlerden özellikle interlökin-6 (IL-6)

hepatositlerde TPO gen ekspresyonunu doğrudan artırarak trombosit yıkımına neden olur. Karaciğer fonksiyonunun bozulduğu durumlarda ise TPO üretimi azalır ve trombositopeni gelişebilir.

2.1.2. Trombositlerin Fonksiyonları

Trombositler, hemostazda damar hasarına yapışıp tıkaç oluşturarak kanamayı durdurur, koagülasyonnu aktive eder, büyüme faktörleri salgılayarak doku onarımını destekler ve immün yanıta katkı sağlar.

Trombositlerin hemostazdaki rolü: Trombositlerin temel rolü, damar hasarının olduğu bölgede damar bütünlüğünü korumaktır. Normal koşullarda trombositler, damar iç yüzeyini kaplayan endotel hücrelerinin salgıladığı nitrik oksit, prostasiklin ve endotelyal CD39 gibi inhibitör sinyaller sayesinde inaktif, disk şeklindedirler (33). Vasküler hasar meydana geldiğinde, endotel hücrelerinin aktivasyonuna veya ölümüne ve subendotelyal matris proteinlerinin, özellikle kolajenin açığa çıkmasına yol açar. Aktifleştirilmiş veya hasar görmüş endotel hücreleri, vWF içeren Weibel-Palade cisimcikleri salgılar. Dolaşımdaki trombositler yüzeylerinde bulunan adezyon reseptörleri (GPIb) aracılığıyla ve vWF'nin yardımıyla damar duvarına bağlanır. Bu bağlanma, trombositlerin aktivasyonunu tetikler ve ardından trombosit agregasyonu olarak adlandırılan, diğer trombositlerin de bu bölgeye toplanarak birbirine bağlanması süreci başlar (34). Aktivasyon aşamasında, trombositler diskten küresel hâle geçip psödopodlar oluşturur, hücre içi Ca^{2+} seviyesi artar, αIIbβ3 integrini aktifleşir ve granüllerinden ADP, serotonin ve tromboksan A_2 salgılanır. Ayrıca, prokoagülan yüzey oluşumu ile fosfatidilserin dışa flip yapar (21). Aktivasyonun ardından trombositler, fibrinojen aracılığıyla birbirine bağlanarak agregasyon sağlar ve trombus oluşur; bu süreç αIIbβ3 integrini ile gerçekleşir. Son olarak, koagülasyonun güçlendirilmesi aşamasında, fosfatidilserin yüzeye çıkar ve trombin üretimi artar. Bu olaylar zinciri sonucunda büyüyen bir trombüs oluşur ve damar bütünlüğü yeniden sağlanır.

Doku onarımı/yeniden şekillenmesi: Trombositler, vasküler lezyonların ve organ hasarlarının olduğu bölgelere ulaşan ilk hücrelerdir ve burada lökositler, endotel hücreleri ve doku yeniden organizasyonuna katkıda bulunan yerleşik veya dolaşımdaki hücrelerle etkileşime girerler. Aktive olmuş trombositler inflamasyon, anjiyogenez ve doku apoptozu gibi merkezi süreçleri etkileyebilirler (35). Trombosit aktivasyonu, yara iyileşme sürecinin diğer kısımlarını da etkiler. Örneğin, doku hasarı, inflamasyon hücrelerinin toplanmasını ve aktivasyonunu tetikleyen sinyal moleküllerinin salınmasına

yol açar. Bunu izleyen bağışıklık tepkisi, organizmayı istilacı patojenlerden korur, hücre parçalarının ve hasarlı dokuların uzaklaştırılmasını düzenler ve doku yeniden yapılanmasını sağlar. Trombositler ayrıca, trombosit aktivasyonu sırasında salınan çok çeşitli membran reseptörleri ve çözünür medyatörler aracılığıyla bu inflamasyon sürecini etkiler. Yaralanma sırasında doku bariyerlerinin yıkılması da mikroorganizmaların istilasını mümkün kılar ve doku enfeksiyonlarını tetikleyebilir. Bu nedenle, istilacı patojenlere karşı bağışıklık tepkisinin başlatılması ve düzenlenmesi, doku iyileşmesinde önemli bir adımı temsil eder. Trombositlerin bu sürece katkıda bulunduğu gösterilmiştir (14, 24).

İmmün fonksiyon: Trombositlerin immün fonksiyonu büyük ölçüde granüllerde depolanan veya aktivasyon üzerine sentezlenen çok sayıda inflamatuar ve biyoaktif molekülü salma yeteneklerinden kaynaklanmaktadır. Bu aracılar, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin efektör hücrelerini çeker ve düzenler. Ayrıca, trombositler doğrudan efektör işlevi gösterir ve bu nedenle doğuştan gelen bağışıklıkta efektör hücreler olarak kabul edilirler. Trombositler, enfeksiyon bölgelerinde üretilen dört kemokin sınıfının (C, CC, CXC ve CX3C) tamamı için sinyalleri algılayan CCR1, CCR3, CCR4 ve CXCR4 gibi CC ve CXC kemokin reseptörlerini ifade eder ve bu da trombositlerin enfeksiyon bölgesinde hızla artmalarına neden olur. Trombositler ayrıca, patojenle ilişkili moleküler örüntüleri algılayan TLR'ler gibi örüntü tanıma reseptörlerini de ifade eder. Trombosit TLR'lerinin, çeşitli bakteriyel lipopolisakkarit izoformlarını tanıyıp ayırt edebildiği ve farklı sitokin profilleri ve efektör peptitler salgılayarak farklı patojenle ilişkili moleküler farklı şekilde yanıt verdiği gösterilmiştir (17).

2.1.3. Trombositlerin Yaşam Döngüsü ve Yıkımı

Trombositlerin yaşam döngüsü, kemik iliğinde olgunlaşan megakaryositlerin sitoplazmalarından trombosit üretip dolaşıma salmasıyla başlar ve sağlıklı bireylerde ortalama 7–10 gün dolaşımda kalırlar. Yıkımı ağırlıklı olarak dalak makrofajları aracılığıyla gerçekleştirilirken, daha küçük bir kısmı karaciğerin Kupffer hücrelerinde gerçekleşir (22). Dolaşımdaki trombositler yaşlandıkça yüzey glikoproteinlerinde ve fonksiyonel özelliklerinde belirgin değişiklikler meydana gelir. Bu süreç, trombosit yüzey reseptörlerinin siyalik asit ile glikozilasyonu ile başlar ve trombosit yüzeyinde karaciğer ve dalaktaki makrofajlar tarafından tanınabilen galaktoz ve benzeri şeker kalıntılarının açığa çıkmasına neden olur. Siyalik asit kaybeden trombositler asialoglikoprotein reseptörü 1 ve 2 alt birimlerinden oluşan bir transmembran heteroligomerik glikoprotein

kompleksi olan hepatositlerde yer alan Ashwell–Morell reseptörü yoluyla temizlenir (36). Bunun dışında bağışıklık hücrelerinde bulunan farklılaşma molekülü kümesi 11B, makrofaj galaktoz tipi lektin desiyalile trombositlerin tanınması ve uzaklaştırılmasında kritik işlev görür (37). Ek olarak GP-Ib düzeyinde azalma, fosfatidilserinin dış yüzeye geçmesi, mitokondriyal disfonksiyon ve apoptotik sinyallerin artması, yaşlanan trombositlerin immün sistem tarafından tanınmasını kolaylaştırır (38). Bu değişiklikler, yaşlanan trombositlerin retiküloendotelyal sistem hücreleri tarafından tanınmasını kolaylaştırır. Son dönem çalışmalar, trombosit aktivasyonu ve granül salınımının desiyalilasyonu hızlandırdığını ve enfeksiyonlar ile immün bozukluklarda görülen trombositopeninin önemli bir mekanizması olduğunu göstermektedir. Bu düzenli yıkım süreci sayesinde dolaşımdaki trombosit havuzu sürekli yenilenir ve hemostatik denge korunmuş olur.

2.1.4. Trombosit Fonksiyonun Bozulduğu Durumlar

Trombositler için fizyolojik aralık yaşamın ilk haftasında 80.000- 450.000/mm3 ve sonrasında 150.000-400.000/mm3 'tür. Trombosit sayısının fizyolojik aralığın alt sınır değerinin altında olması trombositopeniyi oluşturur. Trombositopeni, trombosit üretiminin bozulması nedeniyle azalan trombosit sayısı, dalakta trombositlerin sekestrasyonunun artması, trombositlerin seyrelmesi ve bu mekanizmaların sonucu trombosit sayısının azalmasıdır ve çocuklarda önemli kanamalara yol açabilen kusurlu primer hemostazın en yaygın nedenidir (39). Trombositemi veya trombositoz, trombositlerin aşırı üretimi nedeniyle artan trombosit sayısıyla ilişkilidir. Trombosit fonksiyon bozukluğu, içsel trombosit kusurundan veya normal trombosit fonksiyonunu değiştiren dışsal bir faktörden kaynaklanabilir ve kalıtsal veya edinilmiş olabilir. Bu bozukluklar çeşitli klinik tablolara yol açabilir:

İmmün trombositopenik purpura (İTP): trombositler otoantikorlar tarafından işaretlenerek özellikle dalak makrofajları tarafından hızla yok edilmesidir. Artmış yıkım nedeniyle trombosit sayısı düşer ve hastalarda ciltte morarma, peteşi ve kanamalar görülebilir.

Trombotik mikroanjiyopatiler: mikrovasküler pıhtılarla karakterize nadir bir hastalıktır ve mikroanjiyopatik hemolitik anemiye, trombositopeniye ve uç organ hasarına yol açar. Bu mikrotrombüsler trombositlerin yoğun şekilde tüketilmesine yol açar. Trombosit sayısındaki düşüş, organlarda iskemi ve hemoliz gibi ek sorunlarla birlikte seyreder (40).

Diyabette trombosit hiperaktivitesi: Kronik inflamasyon ve metabolik stres nedeniyle trombositler aşırı uyarılabilir hale gelir. Bu durum doğrudan sayıyı azaltmasa da artan tüketim ve mikrotrombüs oluşumu nedeniyle bazı hastalarda trombosit sayısında dalgalanmalar görülebilir ve tromboz riskini artırır (41).

İlaçlara bağlı trombosit sayısı bozuklukları: Aspirin, klopidogrel veya GP-IIb-IIa inhibitörleri doğrudan trombosit fonksiyonunu baskılar; bazı ilaçlar ise immün mekanizmalarla gerçek trombositopeniye yol açabilir. Özellikle GP-IIb-IIIa inhibitörleri ve bazı kemoterapi ilaçları, trombosit sayısında belirgin düşüşe neden olabilir (42, 43).

Kalıtsal trombosit fonksiyon bozuklukları: Bernard–Soulier sendromu gibi GP-Ib kompleks eksikliklerinde trombositler büyük ve fonksiyonel olarak yetersizdir; bunun yanında sayıları da normalden düşük olabilir (44). Glanzmann trombastenisinde trombosit sayısı genellikle normaldir ancak fonksiyon ciddi şekilde bozulmuştur. ADP granül bozukluklarında ise üretim normal olsa da granül kusurları nedeniyle trombosit fonksiyonu zayıftır; bazı hastalarda hafif trombositopeni eşlik edebilir (39).

Genel olarak bu durumlar, trombositlerin üretim azalması, aşırı yıkım, tüketim artışı veya fonksiyonel yetersizlik nedeniyle dolaşımdaki trombosit sayısının etkilenmesiyle karakterizedir ve hemostaz üzerinde önemli klinik sonuçlar doğurur.

2.2. İmmün Trombositopenik Purpura

İTP, trombositlere karşı gelişen otoantikorlar sonucu, retiküloendotelyal sistemde artmış trombosit yıkımı ve bozulmuş trombosit üretiminin neden olduğu azalmış trombosit sayısı ile sonuçlanan edinsel otoimmün bir hastalıktır (45). Bu etkileşim, trombosit sayısında azalmaya ve ardından deride, mukozada kanamalar ve hatta kafa içi kanama olayları ile klinik olarak anlamlı hale gelebilen bir kanama bozukluğuna yol açar. Kanamanın şiddeti genellikle trombositopeninin şiddeti ile ilişkilidir. Klinik olarak, İTP'li bireylerde epistaksis ve diş eti kanaması gibi diğer hemorajik belirtilerin yanı sıra ciltte peteşiler görülür. Ayrıca, purpura ve ekimoz, cildin veya mukozanın herhangi bir bölgesinde ortaya çıkabilir ve ağırlıklı olarak alt ve distal üst ekstremiteleri etkiler. Tahmini görülme sıklığı yılda bir milyon kişide 100 vakadır; bu vakaların yaklaşık yarısı daha önce sağlıklı olan çocuklarda görülür ve en sık görülen kan bozukluğudur (46).

Hastalığın Seyri: İTP, Amerika hematoloji derneğinin son yayımlanana 2019 yılı tanı kılavuzuna göre; semptomların süresi ve kalıcılığına bağlı olarak yeni tanı konmuş, kalıcı, kronik olmak üzere üç şekilde sınıflandırılır (5). Bu sınıflandırmaya göre tanıdan itibaren 3 aya kadar geçen süre yeni teşhis konulmuş İTP, hastalık 3-12 ay devam ediyorsa

kalıcı İTP, 12 aydan uzun süren kronik İTP olarak sınıflandırılmaktadır (5). Yetişkinlerde, yeni teşhis edilen İTP vakaların yaklaşık %70'inde kronik İTP'ye doğru ilerler. Kronik İTP'nin kendiliğinden iyileşme olasılığı çok düşüktür. İTP teşhisi konan yaşlı hastaların kronik hastalık riskinin artıp artmadığı ise bilinmemektedir. Çocuklarda genellikle akut İTP görülme olasılığı daha yüksekken, kronik İTP ise yetişkinlerde daha sık ortaya çıkar.

Kronik İTP gelişme riskini artıran faktörler arasında, tanı anında ileri yaş, tanı sırasında daha hafif trombositopeni, semptomların kademeli olarak başlaması, İTP tanısından önce geçirilmiş enfeksiyon veya aşılama öyküsünün olmaması ve başvuru anında mukozal kanama bulunmaması yer alır. Yetişkin hastaların çoğu, bir veya birden fazla tedaviyle stabil trombosit düzeyine ulaşır. Spontan remisyon, yetişkinlerin yaklaşık %10'unda, genellikle ilk altı ay içinde ortaya çıkar. Spontan remisyona girmeyen olguların yaklaşık üçte biri ila ikisi, birinci basamak tedavilerle stabil trombosit sayısına ulaşır. Geriye kalan hastalarda ise ek ikinci basamak tedavilere veya splenektomiye ihtiyaç duyulan refrakter hastalık söz konusudur. Bazı bildirilen vakalarda, İTP'nin başlangıçta otoimmün bir mekanizma ile tetiklendiği ve yetişkinlerde daha sonra sistemik lupus eritematozus veya kronik lenfositik lösemi gelişimine yol açabildiği belirtilmiştir. Ancak, İTP sonrasında sistemik lupus eritematozus veya kronik lenfositik lösemi gelişme riski halen belirsizliğini korumaktadır. Yetişkinlerde İTP'ye bağlı ölüm oranı, yaşa göre eşleştirilmiş normal popülasyona kıyasla yalnızca biraz daha yüksektir ve genellikle, kanama komplikasyonlarından kaynaklanır.

Bazı araştırmalar yaşla kanama riski arasında ilişki bulmazken, bazıları benzer trombosit sayılarında yaşlı hastalarda daha fazla kanama olduğunu göstermiştir. Trombosit sayısı ve kanama bulguları yaşla doğrudan ilişkili değildir. Ancak ileri yaş, özellikle çok yaşlılarda (≥80), eşlik eden hastalıklar (kalp-damar, böbrek/karaciğer yetmezliği, gastrointestinal hastalıklar) ve ilaç kullanımı (özellikle antikoagülanlar) durumunda ciddi kanama riskini artırır (47). 65 yaş üstü ama ek hastalığı olmayan ve antikoagülan kullanmayan hastaların tedavisi gençlerle benzer şekilde planlanabilir. Çok yaşlı ve komorbiditesi olanlarda ise daha agresif yaklaşım ve daha yüksek trombosit eşiği ile tedavi kararı düşünülmelidir.

İTP, primer veya sekonder formda görülebilir. Primer İTP: kemik iliğinde değişiklik olmaksızın ve diğer nedenlerin yokluğunda izole bir trombositopeni olarak tanımlanır. Bu patolojinin ana özelliği, trombositlerin periferik yıkımının artmasıdır; hastaların çoğunda antiplatelet membran glikoprotein antikorları görülür. En çok ciddi komplikasyon kanamadır; en yüksek riski intrakraniyal olan oluşturur. Kanama nedeniyle

ölüm oranı çocuklarda %1, yetişkinlerde ise %5'tir (3). Primer İTP, genellikle idiyopatik olup altta yatan belirgin bir neden bulunmaz; bazen de otoimmün mekanizmalarla ilişkilidir. Sekonder İTP: primer trombositopeni dışındaki tüm immün aracılı trombositopeni formlarıdır. Enfeksiyonlar, ilaç kullanımı veya malignite gibi tetikleyici faktörler sonucunda gelişir Genel immün trombositopeni vakaları açısından, sekonder immün trombositopeni sıklığının %8.7 ile %20 arasında değiştiği tahmin edilmektedir. İTP ile karşılaştırıldığında, başlangıç yaşı daha yüksektir ve kadınlarda baskınlık yoktur. Tanı anındaki kanama oranları benzerdir. Etiyolojik kriterlere dayanarak, dört ana sekonder İTP grubu belirlenebilir: Otoimmün hastalıklara sekonder İTP (tüm ITP vakalarının %7-10'u), virüslere bağlı İTP (Hepatit C:+/− %2 ve HIV: +/− %1), lenfoproliferatif hastalıklara bağlı İTP (%2-5). 4) ve immün yetmezlikler. Yetişkinlerde, kronik lenfositik lösemi ve B hücreli lenfomalar, sistemik lupus veya primer immün yetmezlikler (İTP'lerin %1'inden fazlası), çoğunlukla yaygın değişken immün yetmezlikle temsil edilir ve sekonder İTP'nin en sık görülen nedenleridir (48).

2.2.1. İmmün Trombositopenik Purpura'nın Tanısı

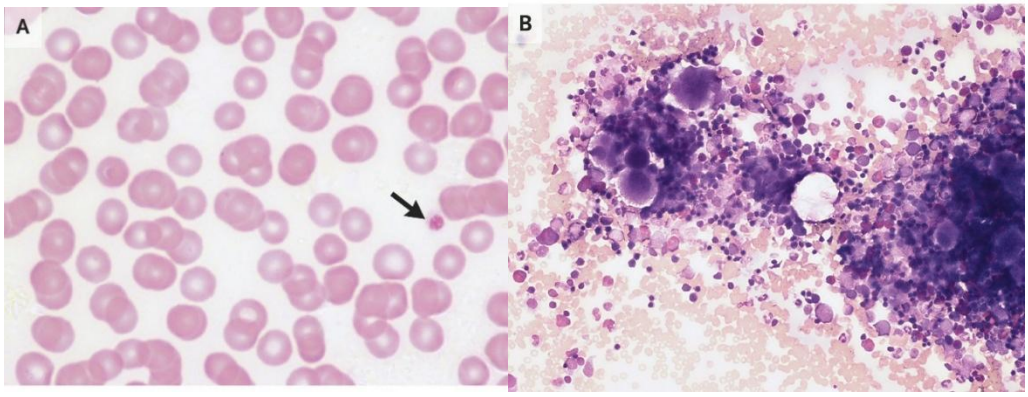
İTP tanısı için "altın standart" bir tanı testi bulunmamaktadır. Kesin tanı için yalnızca trombosit sayısının $100x10^9$/L (100 000/μL)'nin altına düşmesi ve trombositopeniye yol açan diğer otoimmün hastalıklar veya trombositopeninin eşlik ettiği enfeksiyonlar dışlanmalıdır (49). Bu nedenle gerekli gördüğü durumlarda bazı biyokimyasal testler, viral enfeksiyon taraması, kemik iliği incelemesi ve batın ultrasonografisi yapılabilir. Ek olarak yanlış tanı oranını en aza indirmek ve sekonder nedenleri dışlamak için 2019 yılında yayımlanan uluslararası İTP tanı kılavuzuna göre retikülosit sayıları, kantitatif Ig düzeyleri, kan grupları ve HCV/HBV/HIV için serolojik tarama gibi birkaç ek test, önerilmektedir (5). Ayrıca kemik iliği muayenesini ve antinükleer antikorlar, anti-fosfolipid antikorları, anti-tiroid antikorları, tiroid fonksiyonu ve pıhtılaşma parametreleri (protrombin zamanı, aktive parsiyel tromboplastin zamanı, fibrinojen seviyesi ve D-Dimer) için testleri temel değerlendirme olarak önermektedir (50).

Fiziki muayene: İTP'nin trombositopeninin şiddetini ve dağılımını değerlendirmek ile İTP'yi diğer nedenlerden ayırmak amacıyla sistematik olarak yapılır. Muayenede öncelikle hastanın genel durumu, vital bulguları ve anemi ile ilişkili semptomları gözden geçirilir; Deri ve mukozaların ayrıntılı incelenmesi kritik olup alt ekstremitelerde basmakla solmayan peteşiler, purpura, ekimozlar ve ağız içi ile burunda

mukozal kanamalar olup olmadığı değerlendirilir. Göz, ağız, gastrointestinal ve genitoüriner sistemlerde kanama odakları araştırılır; özellikle mukozal kanama, trombosit sayısının çok düşük olduğuna işaret eder. Eklem içi kanama İTP için tipik değildir ve koagülasyon bozukluklarını akla getirir. Ayrıca baş ağrısı, bilinç değişikliği veya nörolojik defisitler ağır trombositopeniye bağlı intrakraniyal kanama açısından acil uyarı bulgularıdır. Genel olarak İTP'de fizik muayene çoğunlukla normaldir; belirgin kanama paternleri dışında organ büyümesi, sistemik enfeksiyon bulguları veya yaygın lenfadenopati olmaması tanıyı destekler (5).

Kan sayımı: İTP, periferik kanda $100x10^9$/L'nin (100 000/μL) altında trombosit sayısı, kemik iliği muayenesinde normal veya artmış megakaryopoez ve klinik olarak belirgin ilişkili durumların veya trombositopeni nedenlerinin olmaması ile tanımlanır. Orta dereceli trombositopeni, gözlemin ilk 3 ayında $30x10^9$/L'nin (30 000/μL) ve $100x10^9$/L(100 000/μL) arasında bir başlangıç trombosit sayısı ve $30x10^9$/L'nin altına düşmemesi olarak tanımlanır. Şiddetli trombositopeni, başlangıç trombosit sayısının $30x10^9$/L'nin altında olması veya başlangıçta $30x10^9$/L ile $100x10^9$/L arasında olup sonraki üç ay içerisinde $30x10^9$/L'nin altına düşmesi olarak tanımlanır (51).

Periferik yayma: İTP'li bir hastada periferik kan yaymasının incelenmesi, başka anormallik olmaksızın (örn. şistositler ve displastik değişiklikler) azalmış trombosit sayısı gösterir; bazı hastalarda büyük trombositler bulunsa da bu patognomonik bir özellik değildir (Şekil 2.1) (52).



A'da trombositopeni (alanda yalnızca bir trombosit [ok] görülmektedir) ve periferik kan yaymasında normal eritrositler görülmektedir. B'de İTP'li bir hastada iyi hücresellik, eritroid ve miyeloid hücrelerin normal gelişimi ve megakaryosit sayısında artış olan kemik iliği görülmektedir (52)

Şekil 2.1. İTP'li bir hastadan periferik kan yayması ve kemik iliği aspirasyonu.

Anti-glikoprotein (GP) otoantikorların tespiti, İTP tanısı için oldukça spesifiktir, ancak duyarlılık nispeten düşüktür. Anti-GP otoantikorlarının varlığı, primer İTP'yi

sekonder İTP'den ayırt edemese de immün trombositopeni tanısını doğrulamada yardımcıdır. Serum TPO seviyeleri İTP hastalarında normal veya hafif artmıştır bu nedenle İTP'nin ayırıcı tanısı için potansiyel olarak değerlidir. Üre nefes testi veya dışkı antijen testi kullanılarak *Helicobacter pylori* enfeksiyonunun tespiti, özellikle enfeksiyonunun yüksek yaygınlık gösterdiği bölgelerde, dispeptik semptomları olan hastalarda yapılabilir (1). Doğrudan antiglobulin testi, hemoliz için klinik veya laboratuvar kanıtı olan İTP hastaları için uygundur. Yeni nesil dizilemenin maliyetindeki önemli düşüş nedeniyle, tüm ekzom dizilemesi, tüm genom dizilemesi veya hedefli gen dizilemesi gibi genomik analizler, multirefrakter hastalar, kemik iliği yetmezliği sendromu ve kalıtsal hastalıkları dışlamak için splenektomi geçirecek vakalar için değerli bilgiler sağlayabilir.

Kemik iliği muayenesi kemik iliği muayenesi yanlış tanı oranını azaltmaya ve tanı süresini kısaltmaya yardımcı olabilir. İTP tanısı için rutin olarak yapılması gerekmez; ancak, hedefli testler, özel semptomlar, belirtiler ve laboratuvar bulguları olan belirli vakalarda yararlı olabilir.

2.2.2. İmmün Trombositopenik Purpura'nın Epidemiyoloji

Pediatrik İTP'nin yıllık insidansının 100.000 kişide çocuklarda 1.1-5.81 yetişkinlerde 100.000 kişide 1.6-3.9 vaka arasında olduğu tahmin edilmektedir (53). Araştırmacılar bu rakamın daha yüksek olması gerektiğini, çünkü toplam İTP vakalarına değil, bildirilen semptomatik hastaneye yatırılmış vakalara dayandığını ileri sürmektedir. Pediatrik İTP her yaşta ortaya çıkabilir, ancak en yüksek insidanslar 2 ila 5 yaşlarında ve ergenlikte görülür. Durum, bebeklikten çocukluğa kadar erkek çocuklarında kız çocuklarına göre daha yaygındır. Ergenler ve genç yetişkinlerde (yani 18 ila 45 yaş) ise tam tersi geçerlidir. Bu yaş gruplarındaki kadınlardaki baskınlık, otoimmüniteyi teşvik edebilen östrojenin etkilerine atfedilmektedir.

İTP'li çocuklarda mevsimsel dalgalanmalar gözlemlenmiştir ve hastalığın görülme sıklığı, viral enfeksiyonların yaygın olduğu ilkbahar ve yaz başlarında artmaktadır. İTP'nin yetişkinlerdeki yıllık görülme sıklığının 100.000 kişide 1 ila 6 vaka olduğu tahmin edilmektedir. Ancak, durum yetişkinlerde daha çok kronik bir hastalıktır, bu nedenle yaygınlık yaklaşık 100.000 vakada 12'dir. Yetişkinlerde en yüksek görülme sıklığı 60 yaş civarında meydana gelir. Ancak görülme sıklığı yaşla birlikte artar (54). İTP'nin 60 yaş sonrası görülme sıklığı erkek ve kadın yetişkinler arasında neredeyse benzerdir.

Ülkemizde İTP'nin ortalama yıllık insidansı 100.000 kişide 2.92 ve genel prevalans 100.000'de 35.1 olarak bulunmuştur (55).

2.2.3. İmmün Trombositopenik Purpura'nın Patogenezi

İTP'nin patogenezi açıkça açıklanmamış olsa da retiküloendotelyal sistemdeki fagositik makrofajlar tarafından yıkıma yol açan kişinin kendi trombositlerine karşı otoantikor üretiminin önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Mevcut kanıtlar ayrıca hastalığın T düzenleyici hücrelerdeki eksiklikler, mezenkimal kök hücrelerin işlev bozukluğu ve B hücresi aktive edici faktörün ve çoğalmayı indükleyen bir ligandın yükselmesi gibi birkaç altta yatan kusurdan kaynaklanabileceğini düşündürmektedir (56).

Otoantikor Oluşumu: İTP, patogenezinde öncelikle IgG tipi otoantikorların gelişmesi yer alır; bu antikorlar çoğunlukla trombosit yüzey glikoproteinleri olan GP-IIb-IIIa ve GP-Ib-IX komplekslerine bağlanarak trombositleri opsonize eder (57, 58). Opsonize trombositler, özellikle dalakta bulunan Fcγ reseptörleri ile makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir.

GP-Ib-IX kompleksi, trombosit membranında 1:2:1 oranında düzenlenmiş üç alt birimden (GP-Ib-α, GP-Ib-β ve GP-IX) oluşur. Her alt birim, kısa bir sitoplazmik kuyruk, bir transmembran ve hücre dışı glikozile bir alan içeren lösin açısından zengin tekrar protein ailesine aittir. Her iki GP-Ib-β alt birimi de GP-Ib-α ile disülfür bağları oluşturur ve GP-IX'e kovalent olmayan bir şekilde bağlıdır. Lösin açısından zengin 15 tekrar, bir transmembran alan ve kısa bir sitoplazmik kuyruk içeren GPV, GP-Ib-α ile transmembran alan etkileşimleri yoluyla GP-Ib-IX kompleksiyle zayıf bir şekilde ilişkilidir. Bu etkileşimin bozulması, GP-V yüzey ekspresyonunu önemli ölçüde değiştirir. GP-Ib-α, 135 kDa kütleye sahip GP-Ib-IX kompleksinin en büyük alt birimidir ve bilinen hemen hemen tüm ligandlara bağlanmayı sağlar. GP-Ib-α'nın hücre dışı N-terminal alanı, uzunlamasına bir şekil oluşturan ve trombosit yüzeyinin oldukça üzerinde açığa çıkan sekiz lösin açısından zengin tekrardan oluşur ve ligand bağlanma alanını oluşturur. Lösin açısından zengin bölgeye yakın, üç sülfatlanmış tirozin kalıntısı içeren negatif yüklü bir kısım, öncelikle trombin bağlanması için önemlidir. Bu alan, GP-Ib-α'nın ağırlıkça %40'ını oluşturan siyalile edilmiş O ve N-glikozidik olarak bağlı karbonhidrat zincirleri içeren polimorfik bir musin benzeri makroglikopeptide bağlıdır. Ligand bağlama bölgesine açık bir pozisyon sağlar ve ligand bağlanma olaylarını kolaylaştırır. Mekanosensitif bir alan, trombosit membranına yakın makroglikopeptid bölgesinin bitişiğindedir. Mekanosensitif alan, metalloproteinaz ADAM17 tarafından parçalanabilir

ve bu da plazmaya çözünür G-Ib-α parçalarının (glikokalisin olarak da bilinir) salınmasına yol açar (38).

Kemik iliğinde megakaryositlerin baskılanması: GP-Ib'e karşı gelişen antikorlar komplement yolunu aktive ederek trombosit yıkımını hızlandırabilir ve hastalığın daha dirençli seyretmesine yol açabilir. Ancak İTP yalnızca trombosit yıkımı artışıyla açıklanamaz: otoantikorların megakaryositlere bağlanması ve $CD8^+$ sitotoksik T hücrelerinin kemik iliğindeki megakaryositleri hedef alması, trombosit üretimini belirgin şekilde baskılar. Buna ek olarak, Th1 yanıtının baskın hâle geldiği, IFN-γ ve IL-2 gibi proinflamatuar sitokinlerin arttığı, buna karşılık düzenleyici T hücrelerinin (Treg) azaldığı gösterilmiştir (59); bu durum tolerans kaybını ve otoimmünitenin sürekliliğini destekler. Trombositopeniye rağmen karaciğerde TPO üretiminin beklenenden az artması da üretim yetersizliğini derinleştirir; bunun kemik iliğindeki megakaryosit kitlesinin mutlak olarak azalmamasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir (46).

Hücresel immünitenin rolü (T Hücreleri): İTP'nin immünopatolojisi çok faktörlü olsa ve hem doğuştan hem de adaptif bağışıklık tepkilerini içerse de hastalığı düzenlemede immünosüpresif mekanizmaların rolünün giderek daha fazla tanınması söz konusudur. Çünkü otoantikor üretimi anormal T hücresi tepkileriyle, özellikle de interferon-γ (IFN-γ) ve IL-17 gibi proinflamatuar sitokinleri serbest bırakabilen ve otoimmüniteyi teşvik eden ve trombosit yıkımına katkıda bulunan CD4+ yardımcı T hücreler (T-helper; Th; 1 ve Th17) hücreleriyle yakından bağlantılıdır. Dahası, CD8+ CTL'ler antijen sunan hücrelerin yüzeyinde sunulan trombosit antijenlerini de tanır. Aktifleştirilmiş CTL, trombositlere karşı otoimmün reaksiyonu potansiyel olarak şiddetlendiren inflamasyonu teşvik eden proinflamatuar sitokinler üretebilir. CTL'ler ayrıca doğrudan trombositlere ve megakaryositlere bağlanabilir ve yıkıma neden olabilir (60).

Tüm bu mekanizmalar birlikte değerlendirildiğinde, İTP'nin temelinde otoantikor aracılı ve T hücresi aracılı immün disregülasyonun hem trombosit yıkımını artırarak hem de üretimi azaltarak trombositopeniye yol açtığı söylenebilir.

2.2.4. İmmün Trombositopenik Purpurada Otoimmünitenin Başlatılması

Trombositler normalde senesans sırasında makrofajlar tarafından uzaklaştırılır ve dalak içindeki lizozomlarda parçalanır. Bir inflamatuar hasar (örneğin bakteriyal enfeksiyon) antijen sunan hücrelerin (makrofajlar ve dentrik hücreler) aktive edebilir ve bunların işleme ve sunum yollarını değiştirebilir. Th0'da (naif T hücreleri) inflamatuar

sitokinlerin (örneğin IL-2) ekspresyonunu indükleyen proinflamatuar sitokinlerin (örneğin IL-1β, TNF-α ve IL-6) aşırı üretimine yol açar. Ayrıca, dendritik hücreler, inflamatuar uyarılar aldıklarında, sabit bir durumdan aktive edilmiş ve immünojenik bir alt tipe (miyeloid dendritik hücreler ve plazmasitoid dendritik hücreler) geçerler; bu, proinflamatuar sitokinlerin (örn. IL-4, IL-12 ve IL-17) salgılanması yoluyla Th0 hücrelerini etkilemenin yanı sıra, doğal öldürücü hücrelerinin aktivitesini ve işlevini de düzenler. Th0-dentrik hücreler-makrofaj etkileşimleri, İTP'de otoimmünitenin başlatıcıları olarak işlev görür (60). Antijen sunan hücreler tarafından bakteriyel antijenlerin tanınması ve T hücrelerine sunulması, T hücrelerinin aktivasyonuna ve daha sonra B hücrelerinden antikor üretiminin indüklenmesine yol açar. Bakteriyel ve trombosit antijenleri arasındaki benzerlik nedeniyle çapraz reaksiyon meydana gelir ve antikorlar trombositlere bağlanır. Dalaktaki makrofajlar daha sonra bu trombositleri yok eder (59, 61).

2.2.5. İmmün Trombositopenik Purpura'nın Tedavisi

İTP'de tedavi seçimi esas olarak kanama semptomları ve trombosit sayısına dayanır; ancak hastalık süresi, kullandığı diğer ilaçlar, eşlik eden hastalıklar, beklenen tolerans, bakıma erişilebilirlik, yaşam kalitesi ve hasta beklentilerinin de dikkate alınması gerekir. Yaş tedavi seçimini etkiler; ancak her durumda tedavi her zaman hastaya özel olarak planlanmalıdır ve güncel İTP kılavuzları, tedavinin kişiselleştirilmesi gerektiğini vurgulamaktadır (62). Ayrıca, hastaların endişeleri, korkuları ve hastalık yükü genellikle hekim tarafından yanlış değerlendirilir. Bu nedenle, diğer hematolojik hastalıklarda da görüldüğü gibi, tedavi kararı her zaman hasta ile paylaşılmalıdır.

Birinci Basamak Tedaviler

Kortikosteroidler: İTP birinci basamak tedavisi kısa süreli kortikosteroid kullanımına dayanır (47). Kortikosteroidlerin etki mekanizması net değildir. Otoantikor üreten lenfositlerin inhibisyonuna ve trombosit fagositozundan sorumlu olan makrofaj aktivitesinin aşağı regülasyonuna ile trombosit sayısını artırdığı düşünülmektedir. Tedavide oral 0,5-2,0 mg/kg/gün prednizon veya 4 gün boyunca 40 mg/gün deksametazon kullanılmaktadır (63). Kullanım sonrası trombosit sayısındaki iyileşme genellikle ilk 2 haftada görülür. Tedavinin 2-4. haftasında iyileşme olmazsa, steroid sonraki 1-2 hafta içinde azaltılmalıdır. Çünkü düşük doz remisyonu sürdürmede yetersizdir ve yan etkilere neden olurlar. Bir dizi kontrollü çalışma, deksametazonun prednizolona kıyasla daha hızlı

ve daha yüksek bir trombosit yanıtı sağladığını öne sürmüştür, ancak uzun kullanımda (6 aydan fazla) yanıt oranı her iki grupta da benzer bulunmuştur (64).

İntravenöz immünoglobulin (IVIg): Yüksek kanaması olan hastalar için tercih edilen bir tedavi yöntemidir. Ancak maliyeti, ulaşılabilirliği, geçici yanıtı (1 aydan az) ve olası yan etkileri genel kullanımını kısıtlamaktadır. Önerilen doz 1 g/kg/gün olup, yaşamı tehdit eden şiddetli kanama durumunda 2. günde veya daha az şiddetli kanama durumunda ve ilk infüzyondan sonra yanıt alınamaması durumunda 3. günde tekrarlanabilir. Yan etkiler arasında anafilaksi, hemolitik reaksiyonlar ve baş ağrısı, mide bulantısı veya ateş gibi hafif semptomlar bulunur. Böbrek yetmezliği, sıvı yüklenmesi ve tromboz gibi diğer advers olaylar yaşlı hastalarda daha sık görülmektedir ve hidrasyon ve böbrek fonksiyonlarının dikkatli bir şekilde izlenmesiyle daha düşük günlük dozaj (1-4. günler 0,5 g/kg veya 1-5. günler 0,4 g/kg) önerilmektedir (63). Ayrıca IVIg ve kortikosteroidlerin kombine kullanımı yanıt süresi, trombosit sayısı ve yanıt süresi açısından tek başına kortikosteroidlerden daha etkili olduğu bulunmuştur (65).

Anti-Rho(D) ilaçlar: Bu ilaçlar splenektomi geçirmemiş Rho(D) pozitif hastaları tedavi etmek için önerilmiştir ve nadir görülen ancak yaşamı tehdit eden yan etkiler pahasına yüksek yanıt oranlarına sahiptir. Rho(D) intravenöz uygulamasından sonra, özellikle bu tedaviden kaçınılması gereken yaşlı hastalarda, akut hemoglobinemi veya hemoglobinüri ile ilişkili ölümcül yaygın intravasküler koagülasyon bildirilmiştir.

İkinci Basamak Tedaviler

İTP'de hastalar birinci basamak tedaviye dirençli olduğunda veya birinci basamak tedaviden sonra hastalık nüks ettiğinde, ikinci basamak tedavi uygulanır. İTP için giderek artan sayıda ikinci basamak tedavi seçeneği mevcuttur. Her birinin beklenen bir yanıt modeli vardır, ancak bugüne kadar İTP tedavisini seçmeye yardımcı olacak doğru bir öngörücü bulunmamaktadır. Tedavi seçimi ayrıca, her moleküle özgü uyarılara da dayanmaktadır. Eşlik eden hastalıklar ve hasta tercihleri de tedavi kararlarında önemlidir. Bu bağlamda, tedavi, kısa ve uzun vadeli toksik etkileri sınırlandırırken güvenli bir trombosit sayısını koruyarak kanamayı önlemeyi hedeflemelidir. İkinci basamak tedaviler immünsüpresif ilaçları ve splenektomiyi içerir.

Trombopoietin reseptör agonistleri (TPO-RA): TPO sentezini uyararak trombosit üretimini artırır. Eltrombopag ve romiplostim, İTP'de ikinci basamak tedavi olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. TPO-RA'lar janus kinaz/transkripsiyon sinyal dönüştürücüleri ve aktivatörleri yolunu aktive ederek megakaryosit progenitör proliferasyonunu ve trombosit üretimini artırırlar. Eltrombopaga benzer bir peptit

olmayan TPO-RA olan avatrombopag, aynı transmembran alanına bağlanır, ancak herhangi bir diyet kısıtlaması olmadığı ve yiyeceklerle birlikte alınabildiği için daha fazla kullanım kolaylığı sağlar (66, 67). TPO-RA'lar düşük bir başlangıç dozuyla başlatılır ve gerektiğinde doz artırılır. Romiplostim dozları genellikle 1 ila 10 mg/kg arasında değişir ancak genellikle 2 ila 3 mcg/kg ile başlanır. Romiplostim tedavisine ilk yanıt genellikle 7 ila 14 gün içinde görülür. Eltrombopag başlangıçta günde 50 mg olarak uygulanır ve Doğu Asya kökenli veya orta ila şiddetli karaciğer yetmezliği olan bireylerde günde bir kez 25 mg'a düşürülür. Eltrombopag tedavisine ilk yanıt genellikle 7 ila 14 gün içinde görülür. Eltrombopag emilimi, kalsiyum açısından zengin gıdaların eş zamanlı alımıyla azalabilir (67).

Rituksimab: CD20 pozitif B hücrelerini hedefleyen bir monoklonal antikor olarak İTP tedavisinde ikinci basamak seçeneklerden biridir ve özellikle kortikosteroidlere yanıtsız veya sık nüks eden hastalarda tercih edilir. İlacın temel etkisi, otoantikor üreten B hücrelerini ortadan kaldırarak trombosit yıkımını azaltmak ve immün toleransı yeniden kurmaktır. Standart uygulama protokolü haftada bir kez 375 mg/m² toplam dört hafta şeklindedir; alternatif olarak bazı merkezlerde haftada bir kez 100 mg düz doz düşük doz rejimi de kullanılmaktadır (68). Yanıt genellikle tedaviden 4–8 hafta sonra ortaya çıkar, hastaların yaklaşık yarısında klinik yanıt alınır ve bu yanıtın bir kısmı 1–2 yıl devam edebilir. Rituksimab genel olarak iyi tolere edilse de infizyon reaksiyonları, enfeksiyon riskinde artış ve nadiren hipogammaglobulinemi gibi istenmeyen etkiler görülebilir. Ayrıca kronik İTP'de splenektomiye alternatif veya splenektomi öncesi bir köprü tedavi seçeneği olarak değerlendirilebilmektedir.

Splenektomi: Dalağın cerrahi olarak çıkarılması işlemidir. İTP'de splenektomi özellikle steroid ve IVIg'e yant vermeyen, 12 aydan uzun süredir devam eden ya da sık relaps gösteren hastalarda ikinci basamak tedavi olarak tercih edilir (69). Yüksek yanıt oranıyla (yaklaşık %60–70 kalıcı remisyon) kullanılır. Ameliyat sonrası trombosit sayıları genellikle hızlı şekilde yükselir ve stabil seyreder.

Dalak, insan vücudunun temel bir bağışıklık organıdır ve doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık sisteminin yakın etkileşimini sağlar. Dalak, dalak makrofajları kan yoluyla taşınan yaşlı hücreleri ve mikroorganizmaları temizlerken, fagositik bir kan filtresi görevi görür. Ayrıca, dalak aynı zamanda uzun ömürlü bellek B hücreleri, plazmablastlar ve plazma hücreleri tarafından antikor üretiminin de gerçekleştiği bir organdır (70, 71). Lenfoid beyaz pulpada, T ve B hücreleri, dendritik hücreler veya marjinal zon B hücreleri gibi antijen sunan hücrelerle etkileşime girer. Bu işlevler

doğrultusunda, cerrahi splenektomi çeşitli olumsuz sonuçlarla ilişkilidir. Dalağın işlevinin azalması veya yokluğu, enfeksiyöz komplikasyonlara, bozulmuş eritrosit ve demir geri dönüşümüne ve tromboembolik hastalığa yol açabilir. İmmünolojik olarak, immünoglobulin M bellek B hücreleri ve değiştirilmiş bellek B hücreleri, splenektomiden sonra belirgin şekilde azalır. Splenektomi sonrası serum IgM seviyesi düşerken, IgG ve IgA seviyeleri kontrol değerlerine benzerdir. Genel olarak, splenektomi uygulanan bireyler, özellikle pnömokok polisakkaritleri gibi T hücresi bağımsız antijenlere karşı belirli antijene özgü antikorların seviyelerindeki düşüşe karşı özellikle hassas görünmektedir. Bunun nedeni muhtemelen dalağın hem T hücresi bağımsız antijenlere hem de kandaki antijenlere karşı antikor yanıtlarının oluşumunda değil, aynı zamanda bu yanıtların sürdürülmesinde de önemli olmasıdır.

Son (2019 yılı) Amerikan Hematoloji Derneği tedavi kılavuzu ve uluslararası uzlaşı raporu, splenektomiyi üçüncü basamak seçenek olarak adlandırmıştır (5). Fransa'da ve diğer birçok ülkede, İTP için splenektomi oranı son on yılda önemli ölçüde azalmıştır ve çoğu hasta ve doktor, özellikle uzun vadeli yanıt için güçlü bir öngörücünün yokluğunda, sırasıyla bu cerrahi prosedürü geçirmeye veya önermeye isteksizdir.

İTP'nin tedavi yönetimi: İTP'nin klinik durumuna ve trombosit sayısına göre tedavi kararını iki şekilde karar verilir. Eğer hastanın trombosit sayısı 20–30 × 10^9/L'nin üzerindeyse ve kanama yoksa tedavi başlanmaz, yalnızca üç ayda bir tam kan sayımı kontrolü yapılır. Buna karşılık trombosit sayısı 20–30 × 10^9/L'nin altındaysa veya hasta kanama gösteriyorsa ilk basamak tedavi olarak prednizolon ya da deksametazon gibi kortikosteroidler, alternatif olarak IVIg veya Anti-D uygulanır (72). Tedaviye yanıt alınması durumunda yönetim hastalığın süresine göre değişir: İTP süresi 12 aydan kısa olan hastalarda splenektomi, trombopoetin reseptör agonistleri (eltrombopag, romiplostim) veya rituksimab seçenekleri değerlendirilirken; 12 aydan uzun süre hastalığı olanlarda yine aynı tedaviler tercih edilir. İlk basamak tedaviye yanıt yoksa veya hastalık nüks ederse ikinci basamak tedavilere geçilir. Splenektomi özellikle 65 yaş altındaki genç hastalarda, yüksek kür oranı isteyen ve cerrahiye uygun olan kişilerde veya TPO-RA ya da rituksimaba yanıt alınamayan durumlarda önerilir. Cerrahiye uygun olmayan, yaşı ileri olan, splenektomi istemeyen veya splenektomi sonrası başarısızlık yaşayan hastalarda ise idame tedavisi istemeyen ve yine tromboz riski olmayan hastalar için rituksimab tercih edilir (73). Bu yaklaşım, hastanın klinik özelliklerine göre İTP'ye en uygun bireyselleştirilmiş tedaviyi belirlemeyi amaçlar.

İTP Dünya Etki Anketi (I-WISh), İTP'nin ve tedavilerinin hastaların yaşamları üzerindeki çok yönlü etkisini ortaya koymak üzere tasarlanmış keşifsel, kesitsel bir ankettir. 2021 yılında yapılan I-WISh'e göre, 13 ülkeden 1507 hasta ve 472 hekimin İTP tanı yolu, belirti ve semptomların sıklığı ve şiddeti ve tedavi kullanımı konusundaki algılarına odaklanmıştır. Hastaların %22'si gecikmiş tanı (birkaç faktörden kaynaklanan) yaşadı ve bunların %73'ü bunun sonucunda kaygı hissetti. Hastalar, tanı anında İTP ile ilişkili en sık görülen ve en şiddetli semptom olarak yorgunluğu derecelendirdiler (%58 en sık; %73 en şiddetli), ancak hekimler buna daha düşük bir öncelik verdi (%30). Yorgunluk, anket tamamlandığında devam eden birkaç semptomdan biriydi (%50 ve %65) ve hastaların çözülmesini istediği en önemli semptomdu (%46) (62). I-WISh, hastaların ve hekimlerin genel İTP semptom yükü konusunda büyük ölçüde aynı fikirde olduğunu, ancak yorgunluk gibi bazı farklılıklar olduğunu gösterdi. İTP'nin hasta üzerindeki duygusal ve klinik yükünü anlamak, ortak karar yönetimini, tedavi hedeflerinin belirlenmesini ve oluşturulmasını ve hastalığın evresine uygun tedavi seçimini kolaylaştıracaktır. Yine hastaların sağlıkla ilişkili yaşam kalitesinin araştırıldığı ankette, Hekimlerin %80'i İTP semptomlarının hastaların İTP'nin hastaların sağlıkla ilişkili yaşam kalitesini önemli ölçüde azalttığını bulmuştur ve İTP'nin hastaların enerji seviyelerini (%85'i), egzersiz kapasitelerini (%77) düşürdüğünü ve günlük görevleri yerine getirme yeteneklerini sınırladığını (%75) bildirdi. Hastalar İTP'nin duygusal iyilik hali üzerinde önemli bir etkisi olduğuna inanıyordu ve hastaların %63'ü durumlarının kötüleşeceğinden endişe ediyordu (74).

2.3. Metabolomik ile İlgili Genel Bilgiler

Metabolomik, organizmanın biyolojik durumunu yansıtan küçük moleküllerin (molekül ağırlığı ≤ 1.5 kDa) kapsamlı analizini sağlayan bir omik teknolojidir (7). Metabolomik çalışmalar, birçok hastalığın tedavi ile ilişkili moleküler hedeflerin önerilmesi, immün yanıt ve ilaç etki mekanizmalarının aydınlatılması, tedavi öncesi ve sonrası prognostik biyobelirteçlerin belirlenmesi ve tedavi yanıtının tahmin edilmesi açısından giderek önem kazanmaktadır (75). Metabolomik çalışmalar genellikle kan örnekleri (serum, plazma, eritrositler, trombositler, periferik kan mononükleer hücreleri ve tam kan), diğer vücut sıvıları (tükürük, ter, idrar, dışkı, safra, beyin omurilik sıvısı ve mukus), insan, fare veya sıçan dokuları (kahverengi ve beyaz yağ dokusu, kalp, karaciğer, böbrek, beyin, plasenta ve arteriyel plak), kültür hücreleri (birincil deri fibroblastları, insan embriyonik böbrek hücreleri, bronşiyal epitel hücreleri, kümülüs hücreleri, oositler

ve organoidler), ayrıca model organizmalar (maya, meyve sineği, zebra balığı ve *C. elegans*) ile kültür ortamı gibi çok çeşitli biyolojik numune türleri kullanılmaktadır (76).

Metabolitler beslenme yoluyla vücuda girer veya vücutta çeşitli biyokimyasal reaksiyonlarla sentezlenirler. Metabolitler, biyolojik süreçlerin alt çıktısı olup, genomik, epigenomik ve çevresel etkilerin izlerini taşırlar. Genellikle genotip ve fenotip arasındaki bağlantı olarak anılırlar ve metabolizmanın o an ki mevcut görüntüsünü sunarlar (77). Metabolitler, vücudun farklı bölgelerinde çeşitli etkilere sahiptir ve enerji üretimi (örneğin glikoliz, pentoz fosfat yolu ve trikarboksilik asit döngüsü), hücresel yapı taşlarının oluşumu (örneğin purin ve pirimidin metabolizması) ve homeostatik işlevler (örneğin redoks metabolizması ve anti-oksidasyon) gibi önemli süreçlere katılarak konağın sağlık veya hastalık durumunu belirler. Bu yolların çoğu türler arasında oldukça korunmuş olsa da değişen hücresel koşullara dinamik olarak yanıt verirler ve miktarları çevresel koşullara yanıt olarak da hızla değişebilir (78). Bu nedenle metabolomik aracılığıyla insanların metabolit profilinin ölçülmesi ve elde edilmesi, insan gen ifadesindeki değişiklikler, mikrobiyotanın etkileşimleri ve özellikle otoimmün hastalıklar olmak üzere çeşitli hastalıkların oluşumu hakkında önemli bilgiler sağlayabilir. Bu bilgiler hastalıkların patofizyolojisinin anlaşılmasında, tanı için potansiyel biyobelirteçlerin belirlenmesinde ve daha etkili tedavi için yeni ilaçların ve tedavi yaklaşımlarının tasarlanmasında yeni bir bakış açısı sağlayabilir (61).

Metabolom, bir hücredeki tüm metabolitleri ifade eder. Metabolom hem hücre içi olarak incelenebilir ve hücresel düzeyde fonksiyonel anormallikleri ortaya çıkarabilir. Hem de periferik olarak, örneğin organ metabolik aktivitesini yansıtan ve patofizyolojik bilgiler sağlayan çok sayıda metabolit içeren biyosıvılarda (özellikle kan plazmasında) incelenebilir (79). Metabolomdaki değişkenlik kısmen kalıtsaldır ve beslenme düzenleri, bağırsak mikrobiyotası ve yaşam tarzı alışkanlıkları (örneğin sigara içme veya fiziksel aktivite) gibi kontrol edilmesi zor birçok faktör sonuçları etkileyebilir (80). Beslenme ve mikrobiyom, bireysel metabolik değişkenliğe ana katkıda bulunan faktörleri oluşturur ve her kişinin metabotipini benzersiz kılar (81). Ancak, önemli sağlık değişiklikleri olmadığında, bireyin metabotipi zaman içinde nispeten sabit kalır.

Metabolitlerin incelenmesi iki genel yaklaşıma dayanmaktadır: belirli bir metabolit kümesini belirlemeye odaklanan hedefli metabolomik ve örnekler arasında mümkün olduğunca çok metaboliti belirlemek ve karşılaştırmak için tarafsız bir yaklaşım kullanan hedefsiz metabolomik. Hedefli metabolomikte, analiz edilecek kimyasallar önceden seçilir. Hedefli metabolomik, kimyasal olarak karakterize edilmiş ve

biyokimyasal olarak bilinen metabolitlerin tanımlanmış gruplarının ölçümüdür. Bu, geniş bir ölçüm aralığına sahip oldukça hassas bir test sağlar; ancak bu testte yalnızca seçilen moleküller tespit edileceğinden, yeni metabolitler keşfetmek mümkün değildir. İç standartların kullanımıyla analiz, nicel veya yarı nicel bir şekilde gerçekleştirilebilir. Bu yaklaşım, çok çeşitli metabolik enzimlerin, kinetiklerinin, son ürünlerinin ve bilinen biyokimyasal yollaklarının kapsamlı bir şekilde anlaşılmasında kullanılır. Hedefli metabolomik kullanıldığında, numune hazırlama optimize edilebilir ve analizlerde yüksek miktarda bulunan moleküllerin baskınlığı azaltılabilir (82).

Hedeflenmemiş metabolomik ise, bir örnekte aynı anda çok sayıda biyokimyasal metabolit tanımlanabilir. Ancak hedeflenmemiş metabolomik analizi ve yorumlanmasıyla ilgili bazı zorluklar getirir. Bu zorluklar arasında, analiz kütüphanesinde yer almayan analitlerin tanımlanması ve çeşitli metabolik yollardan yüzlerce biyokimyasalın sonuçlarının bir yorum ve tanı sağlamak üzere entegre edilmesi yer almaktadır. Ayrıca hedeflenmemiş metabolomikte çözücülerin seçimi, ayırma stratejileri ve enstrümantasyon platformları, hangi metabolitlerin tespit edilebileceğini büyük ölçüde etkiler (83).

2.3.1. Lipidomik ile İlgili Genel Bilgiler

Lipidomik fosfolipitler, nötral lipitler (trigliserit, kolesteril esterler), sfingolipitler ve yağ asitleri olmak üzere, bir biyolojik sistemdeki tüm lipit türlerinin yapısal ve miktarsal olarak karakterize edilmesini amaçlayan metabolomiğin alt bir disiplinidir (8). Temel hedefi, hücre membran yapısı, enerji depolama, sinyal iletimi ve immün yanıt gibi süreçlerde lipitlerin biyolojik rollerini sistem düzeyinde aydınlatmaktır. Lipitler; inflamasyon, fagositoz, hücre aktivasyonu, oksidatif stres ve apoptosis gibi süreçlerde kritik sinyal aracı olarak görev alır (84). Bu nedenle lipidomik, özellikle kanser ve immün ilişkili hastalıklarda; tedavi yanıtı, ilaç hedeflerinin keşfi ve immün aracılı yan etkilerin değerlendirilmesinde önemli translasyonel çıktılar üretmiştir.

Lipidomikteki en büyük zorluklardan biri, çoğu biyolojik örnekte beklenen moleküler lipit türlerinin yüksek çeşitliliğidir; bu da büyük ölçüde lipitlerin çeşitli yapı taşlarının birleşiminden kaynaklanan kombinasyonel olasılıkların bir sonucudur. Bu durum, lipit moleküler iyonları ve moleküler adükt iyonlarının birçok potansiyel kütle spektral örtüşmesine yol açar. İzomerik türler tam olarak aynı element bileşimine sahip olup parçalanmadan kütle spektrometrisi ile ayrılamazken, izobarik lipitler aynı element

bileşimine sahip değildir ve bu nedenle yeterince yüksek kütle çözünürlüğüyle ayrılabilirler.

Çok sayıda çalışma, lipid metabolizması ve homeostazındaki bozulmanın birçok hastalıkla ilişkili olduğunu göstermiştir. Diyabet ve obezite, ateroskleroz ve felç, kanser, psikiyatrik bozukluklar, nörodejeneratif hastalıklar ve nörolojik bozukluklar ve otoimmün bozukluklar) bu da lipidlerin insan sağlığı ve hastalıklarında birçok hayati rol oynadığını açıkça göstermektedir (84). Ayrıca lipidomikin diğer omiklerle entegrasyonu, kapsamlı metabolik yolak analizlerine imkan sağlayabilir.

2.3.2. Metabolomik ve İTP: İmmün Trombositopenik Purpuranın Omik Yaklaşımlar Işığında Yeniden Değerlendirilmesi

Metabolomik ve onun alt disiplini olan lipidomik omik veriler içerisinde benzersiz bir konuma sahiptir ve bütünleyici analizde giderek daha fazla ilgi görmektedir. Günümüzde, bu yöntemler, diyabet, hipertansiyonun, koroner kalp hastalığı ve çeşitli hematolojik malignitelerin incelenmesinde uygulanmaktadır. Örneğin, insan genetik ve metabolomik verilerinin birleştirildiği geniş ölçekli bir çalışmada dallı zincirli aminoasitlerin metabolizmasının tip 2 diyabetin etiyolojisinde nedensel bir rolü olduğunu göstermektedir (77). Yine Alzheimer hastalığında bazı amino asit seviyelerindeki değişikliklerin, Alzheimer hastalarında dil yeteneğinde, görsel-uzaysal yetenekte, bilişsel performansta azalma ve beyin atrofisindeki değişikliklerle ilişkili olduğu bulunmuştur (85). Meme kanseri alanında metabolomik tamamen uygulanmıştır (86). Glutamin, izolösin, treonin ve linolenik asidin dört metaboliti, meme kanseri için Neoadjuvan kemoterapiye yanıtı tahmin etmek için potansiyel belirteçler olarak kullanılabilir (87)

İTP'de hastalık seyrini ve terapötik yanıtları tahmin etmek için spesifik biyobelirteçlerin tanımlanmasına klinik ihtiyaç vardır. Ancak tedavi etkinliğini, hastalık seyrini ve advers reaksiyonları etkileyen biyolojik süreçler, yaş, cinsiyet, yaşam tarzı faktörleri ve genetik bileşenler gibi çeşitli faktörler nedeniyle bireyler arasında büyük farklılıklar göstermektedir ve bu da bireyselleştirilmiş bir hassas tıp yaklaşımına olan ihtiyacı ortaya koymaktadır. Yıllar içinde yeni, yüksek verimli teknolojiler geliştirilmiş ve bunlar karmaşık biyolojik sistemlere ışık tutmak için giderek daha fazla kullanılmaktadır. Bunlara transkriptomik, (epi)genomik, proteomik ve metabolomik dahildir. Bu verilerden elde edilen bilgiler, hastalığa özgü tanı ve tedavi biyobelirteçlerini belirleme potansiyeline sahip makine öğrenimi algoritmaları tarafından üretilebilir. Bu teknolojiler henüz İTP'ye kapsamlı bir şekilde uygulanmamıştır (6). Bağırsak

mikrobiyomu ve metabolomu arasındaki ilişkiyi ele alan çalışmalar, İTP'de belirli bağırsak bakterileri ve metabolitlerin trombosit sayısıyla güçlü korelasyonları olduğunu ve tanısal biyobelirteç niteliği taşıyabileceğini ortaya koymuştur (10).

Sun ve ark. (88), primer İTP hastalarından splenektomi öncesi alınan kemik iliği biyopsi örneklerinde proteomik analiz gerçekleştirmiştir. Çalışmaya retrospektif olarak 34, prospektif doğrulama kohortu olarak ise 26 hasta dahil edilmiştir. Çalışmada ağırlıklı gen eşifade ağ analizi kullanılarak proteinler arasındaki korelasyon desenleri incelenmiş ve 7959 protein ile 12 modül belirlenmiştir. Klinik özellikler ile modüller arasındaki ilişkiler analiz edildiğinde, 1253 proteinden oluşan bir modülün splenektomiye yanıtla anlamlı şekilde ilişkili olduğu, bu modülün ribozomal ve spliceozom yollarıyla bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Makine öğrenmesi ile splenektomiye yanıt veren ve yanıt vermeyen gruplar karşılaştırılmış; yanıt vermeyenlerde 32 farklı eksprese protein saptanmış (2'si artmış). Altı proteinden oluşan optimal bir kombinasyon belirlenmiş, bunlar arasında aktin düzenleyici protein cofilin-1 de yer almış ve prospektif kohortta bağımsız olarak doğrulanmıştır. Sonuç olarak, bu çalışma proteomik analizlerin kemik iliği biyopsilerinde splenektomi yanıtını öngörmede kullanılabileceğini göstermektedir (88).

Tedavi yanıtının metabolik zeminini araştıran bir diğer prospektif çalışmada Li ve ark. (9), tedaviye yanıtı öngörebilecek potansiyel biyobelirteçleri belirlemek amacıyla prospektif olarak toplanan 91 İTP hastasına ait kemik iliği biyopsi örneklerinde metabolomik profilleme yapmıştır. Yeni tanı almış İTP (n = 40) ve kronik İTP (n = 51) hastaları ile karşılaştırılmıştır. Toplam 4494 metabolit tespit edilmiş, bunlardan 876 metabolitin 181 metabolik yolakla ilişkili olduğu ve iki grup arasında anlamlı farklılık gösterdiği bulunmuştur. Hastalar daha sonra beş farklı tedaviye verdikleri yanıta göre sınıflandırılmış, kemik iliği metabolitleri olası biyobelirteçler açısından makine öğrenmesi algoritmaları ile analiz edilmiştir. Özellikle lipid ile ilişkili metabolitlerin, tedavi yanıtlarının ayırt edilmesinde yararlı olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, çalışma metabolomik analizlerin yeni tanı ve kronik İTP hastaları arasındaki farklılıkları ortaya koymada ve tedavi yanıtını öngörmede değerli olabileceğini göstermiştir. Ancak örneklem büyüklüğünün sınırlı olması, ayrıca metabolitlerin mutlak kantifikasyonu ve validasyonunun yapılmamış olması başlıca kısıtlılıklar olarak belirtilmiştir.

İTP'li hastaların dışkı metabolomlarının sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığı çalışmada Zhang ve ark. (89) bu iki grup arasındaki dışkı metabolomik profillerinde önemli farklılıklar bulunmuştur. Bu farklılıklar, birçoğu bağışıklık sistemi üzerinde etkilere sahip olan lipitler, sekonder safra asitleri, amino asitler ve glikanlar gibi

metabolitlerin üretim ve yıkım seviyelerinde gözlenmektedir. İTP'li hastaların serumunda artan bir lipit metaboliti olarak tanımlanan Resolvin D2, monositlerde TLR4 ekspresyonunu azaltır ve soğukta saklandıktan sonra trombosit agregasyonunu ve aktivasyonunu azaltarak trombosit işlevini korur. Yine sekonder safra asitleri biyosentezi İTP'li hastalarda azalmıştır. Sekonder safra asitleri, bağırsak epitel hücrelerinin bütünlüğünü etkiler ve savunma bariyerini güçlendirir ayrıca, dentrik hücrelerin yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak bu hücrelerin aktivitesini düzenler ve proinflamatuar sitokinlerin üretimini azaltır (11).

Dalak, antijenleri yok eden ve adaptif bağışıklık yanıtlarını düzenleyen çeşitli önemli bir organdır (71). Özellikle zarflı virüsler ve alloantijenlere karşı gelişen bağışıklık tepkilerinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Aşılamalar sırasında IgG antikorlarının Fc bölgesindeki N-bağlı glikanlarda fükoz azalması (afukozilasyon) bağışıklık efektör fonksiyonlarının düzenlenmesinde kritik bir özelliktir. Dalak dokusunun IgG-Fc glikozilasyonu üzerindeki rolünün incelendiği çalışmada travma, İTP ve sferositoz nedeniyle splenektomi yapılan geniş bir hasta kohortunda LC/MS tabanlı analizler gerçekleştirilmiştir. Splenektomi sonrası IgG1 ve IgG2/3-Fc fukozilasyon düzeyleri belirgin şekilde artarken, galaktozilasyon ve sialilasyonda değişiklik gözlenmemiştir. Çalışmada İTP hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla toplam IgG-Fc fukozilasyonunun azalmış olduğu bulunmuştur. Genel olarak, sonuçlar dalağın afukozile IgG yanıtlarının indüksiyonu ve sürdürülmesinde daha önce tanınmamış bir role sahip olabileceğini ortaya koymaktadır (90). Otoimmün hastalıklarda IgG glikozilasyonundaki değişiklikler olasıdır. Örneğin otoimmün tiroid hastalıklarında toplam IgG afukozilasyonunun yükseldiği bulunmuştur ancak İTP hastalarının plazmasından saflaştırılan toplam IgG1 ve IgG2/3, sağlıklı bireylere kıyasla azalmış fukozilasyon gösterirken, galaktozilasyon, siyalilasyon ve biseksiyon değişmediği bulunmuştur (90). Bu değişikliklerin altında yatan mekanizmanın, hastalığın etiyolojisine, hedef dokuya veya antijene özgü IgG glikozilasyon düzeyine bağlı olarak değişebileceğini düşündürebilir.

İTP'nin dalakta neden olduğu metabolomik değişiklik araştırıldığı çalışmada (12); 18 İTP ve 20 normal dalak örneğinin metabolomik profili nükleer manyetik rezonans spektroskopisi kullanılarak tespit edilmiştir. Normal dalakla karşılaştırıldığında, İTP dalak dokusunda gliserol, asetat, alanin, glutamin, izolösin, lizin, valin, fenilalanin, lösin ve metanol konsantrasyonları yükselmiş ve 3-hidroksibutirik asit, askorbat, asparagin, etanol, glikojen, düşük yoğunluklu lipoprotein, malonat, miyo-inositol, gliserofosfokolin,

piroglutamat ve taurin azaldığı bulunmuştur. Taurin seviyesindeki azalma, en belirgin metabolik imzaydı ve İTP'li dalakları normalden ayırt etmek için yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahipti. Çalışmada taurinin İTP tedavisi için potansiyel bir öngörücü tanı biyobelirteçi olabileceği bulunmuştur.

Gıda intoleransının İTP'deki rolünün araştırıldığı çalışmada, normal diyetin elemental diyetle değiştirilmesiyle incelenmiştir, ancak bu trombosit sayısını artırmamıştır. Bununla birlikte, İTP'li hastaların idrar numunelerinin uçucu organik bileşikler ile sağlıklı gönüllülerde bulunanlar arasında belirgin farklılıklar görülmüştür ve bu durum, bağırsak mikrobiyomunun anormal metabolik aktivitesinin İTP'ye neden olan bir faktör olabileceği bulunmuştur. Normal diyet uygulayan hastalar ile elemental diyet uygulayan hastaların uçucu organik bileşikler arasında da farklılıklar vardı ve bu durumda, söz konusu uçucu organik bileşiklerin üretimi diyet değişikliğinden etkilendiği için bakteriyel kökenli olma olasılığı çok yüksektir (91).

İTP ile ilgili potansiyel biyobelirteçleri belirlemek için transkriptomik ve metabolomik verilerin entegre edildiği başka bir çalışmada (92), İTP'li fare serum numuneleri transkriptomik ve metabolomik profilleri incelenmiştir. Transkriptomik analiz sonucu, farklı şekilde ifade edilen 472 (116'sı yukarı regüle edilmiş ve 358'i aşağı regüle edilmiş) gen tanımlamıştır. Metabolik analizlerde 133 metabolit tespit edilmiştir. Özellikle, ksantosin, 2'-deoksiadenozin, litokolik asit 3-O-sülfat ve 20-HETE gibi metabolitler, PNP, XDH, CA2 ve SLC2A1 gibi önemli genlerle güçlü korelasyonlar göstermiştir. Bu ifade edilen genler ağırlıklı olarak nükleotit metabolizması ve safra salgılama yollarıyla ilişkili olduğunu ortaya koymuştur.

Plazma örneklerinin metabolomik analizi, 98 İTP hastası ve 30 sağlıklı kontrol üzerinde GC-MS kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yaş ve cinsiyete göre uyumlu gruplar arasında toplam 85 metabolit tespit edilmiştir bu metabolitlerden İTP hastaları ile sağlıklı kontroller arasında tanısal potansiyeli olan 17 metabolit tanımlanmıştır. İTP hastalarının metabolik bozukluklarının esas olarak fenilalanin, tirozin ve triptofan biyosentezi, fenilalanin metabolizması ve glioksilat ve dikarboksilat metabolizması ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Ek olarak, kronik İTP hastalarında glukokortikoidlere direnci öngörmede 6 farklı metabolit ve beş önemli yolak belirlenmiştir (10).

İTP ve sağlıklı kontrol gruplarında kemik iliği örneklerini proteomik analizlerinin araştırıldığı diğer bir çalışmada 20 aktif İTP hastası ve 20 sağlıklı kontrolden kemik iliği örneklerinin hedefli proteomik analizleri yapılmıştır. Bu çalışmada toplam 829 protein tanımlanmış bu proteinlerde istatistiksel olarak anlamlı olan (DK>1.5 ve p<0.05) toplam

26 protein yukarı regüle edilen, 69 protein aşağı regüle edilen toplam 95 protein tanımlanmıştır. Tanımlanan proteinler apoptozis ile ilişkili olduğunu ve bu proteinlerin fosfoinozitid-3-kinaz-protein kinaz B/Akt sinyal yolu ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu veriler apoptozun İTP patogenezi üzerindeki önemli etkisini doğrulamıştır (93).

İTP tedavisinde birinci basamak tedavi olan IVIg'nin cinsiyetler arasında plazma protein içeriği ve ekspresyon düzeylerindeki biyolojik farklılıklar, hastalık prevalansındaki değişkenlik ile IVIg bileşiminin de farklılaşabileceğini düşündürmüştür. Bu soruyu ele alan deneysel çalışmada, İTP'li bir fare modeli ve in-vitro monosit–makrofaj inflamasyon modeli kullanılarak üç IVIg fraksiyonu karşılaştırılmıştır: dişi plazma IVIg, erkek plazma IVIg ve karışık plazma IVIg. Elde edilen sonuçlarda erkek plazmasının dişi plazma IVIg ve karışık plazma IVIg'ye göre en avantajlı profil sergilemiştir ve diğer fraksiyonlara göre immün trombositopenide daha güçlü bir terapötik immün düzenleme potansiyeli sunabileceği bulunmuştur (94).

2.3.3. Metabolomik ve Lipidomikte Kullanılan Analitik Yöntemler

Metabolomik ve lipidomik biyolojik sistemlerin kimyasal fenotipini çözümlemek için en yaygın kullanılan platformlar, sıvı kromatografi ve gaz kromatografisi ile eşleştirilmiş kütle spektrometrisi ve nükleer manyetik rezonans (NMR) yöntemleridir (95). Özellikle sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi (LC/MS) ve gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) klinik metabolomikte altın standart olup yüksek hassasiyet ve doğruluk sağlar (96). NMR ise özellikle non-destrüktif analizlerde tercih edilir ve farmako-metabolomik çalışmalarda önemli rol oynar (97). LC–MS, lipitler, amino asitler, organik asitler ve nükleotidler dahil geniş bir metabolit profilini yüksek hassasiyet ve dinamik aralıkta profilleyebildiği için hem hedefli hem de hedefsiz metabolomik çalışmalarının omurgasını oluşturmaktadır. LC–MS, yüksek hassasiyeti ve kimyasal türevlendirme olmadan birçok bileşiği tespit etme yeteneği nedeniyle hedeflenmemiş metabolomik için en yaygın kullanılan analitik yöntemdir (98). Buna karşılık, uçucu veya kimyasal türevlenebilir metabolitlerde üstün ayırma kapasitesi sunan gaz GC–MS, özellikle enerji metabolizması ara ürünleri, şeker türevleri ve yağ asitlerinin karakterizasyonunda yüksek çözünürlüklü spektral parmak izi sağlar (99). Kütle spektrometrisine alternatif olarak ^{1}H NMR spektroskopisi, minimal örnek hazırlığı ile tahribatsız kantifikasyon imkânı sunarak tekrarlanabilir ve mutlak konsantrasyon çıktıları üretir; örneğin katı veya yarı-katı dokularda kimyasal kayma anizotropisini azaltmak için

^{1}H MAS NMR dokunun doğal fazında metabolit profillerinin daha keskin piklerle çözülmesine olanak tanır (100). Polar ve iyonik metabolitlerde etkili bir başka ayrıştırıcı platform olan kapiller elektroforez–kütle spektrometrisi ise özellikle yüksek tuzluluk içeren sıvılarda düşük hacimli örneklerle iyon akışına dayalı hassas ölçümler sağlar (101).

Metabolomik ve lipidomik verilerinde m/z ve alıkonma zamanına göre pikleri tespit edip hizalayan, adükt/izomerleri ayrıştıran ve metabolit/lipit annotasyonu yaparak veriyi istatistik ve yolak analizine hazır hale getirmek için MzMine MS-Dial ve XCMS gibi yazılım programları kullanılmaktadır. Sonuçların biyolojik bağlama taşınması ise yolak-temelli eşleştirme ve annotasyon için metabolitlerin İnsan Metabolomu Veri Tabanı (HMDB), biyokimyasal ağ çözümlemesi için KEGG ve çok değişkenli veri indirgeme ve biyobelirteç modellemeleri için MetaboAnalyst 6.0 gibi araçlarla gerçekleştirilmektedir.

2.3.4. Sıvı Kromatografisi/Kütle Spektrometresi Temelli Yöntemler

Sıvı kromatografisi (LC), sabit bir faz içeren kromatografik kolon üzerine enjekte edilen numune bileşenlerinin, hareketli faz olarak kullanılan organik çözücüler yardımıyla birbirinden ayrılmasına dayanmaktadır. Ayırım, hareketli fazın yüksek basınç altında kolondan geçirilmesi sırasında, numune bileşenlerinin sabit faz ile olan etkileşim farklılıklarına bağlı olarak gerçekleşmektedir. LC-MS analizlerinde sabit faz, genellikle silika temelli ve yüzeyi kimyasal olarak modifiye edilmiş partiküllerden oluşan bir kolon dolgusudur. Hareketli faz ise ayrılacak bileşiklerin kimyasal özelliklerine göre seçilen bir veya birden fazla çözücünün belirli oranlarda karışımından oluşmaktadır. Bu sistemde, karışım içerisindeki apolar bileşikler sabit fazla daha güçlü etkileşime girdiğinden kolonda daha uzun süre tutulmakta, buna karşılık polar bileşikler hareketli fazla daha uyumlu olduğundan kolondan daha kısa sürede elüe olmaktadır. Bu farklı tutulma süreleri, bileşenlerin etkin bir şekilde ayrılmasını sağlamakta ve kütle spektrometresi ile tanımlanmalarına olanak tanımaktadır. Ters faz kromatografisi apolar bir sabit faz ve polar hareketli fazdan oluşur ve metabolomik çalışmalarda en sıklıkla kullanılan kromatografik yöntemdir (102).

Kütle spektrometresi (MS) temel olarak iyon kaynağı, kütle analizörü ve dedektör olmak üzere üç ana bileşenden oluşmaktadır. Bu bileşenler, analitin iyonlaştırılmasından başlayarak kütle/yük (*m/z*) oranına göre ayrılması ve algılanmasına kadar olan süreci ardışık olarak yürütmektedir. İyon kaynağı, analit moleküllerinin yüklü partiküllere dönüştürüldüğü ve oluşan iyonların cihazın diğer bölümlerine aktarıldığı bölümdür. Kütle spektrometrisi uygulamalarında biyolojik bileşiklerin analizinde matris destekli lazer

desorpsiyon iyonizasyonu ve elektrosprey iyonizasyon teknikleri kullanılmaktadır. Kütle analizörü, iyon kaynağında oluşturulan iyonların kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayrılmasını sağlayan bölümdür. Bu ayrım çoğunlukla elektrik alanı yardımıyla gerçekleştirilirken, bazı sistemlerde manyetik alan da kullanılabilmektedir. İyon ayırımında görev alabilecek birçok analizör tipi bulunmakla birlikte, en yaygın kullanılan sistemler kuadrupol, kuadrupol iyon tuzağı, uçuş zamanlı kütle spektrometrisi (ToF) ve Fourier transform iyon siklotron rezonans (FT-ICR) analizörleridir. Dedektör, kütle analizöründen iletilen iyonların oluşturduğu elektrik akımını veya iyonların uçuş zamanını ölçen bileşendir. Analizör tarafından belirlenen *m/z* değerlerine bağlı olarak dedektör, bu iyonları algılayarak sinyal üretir ve böylece spektrum elde edilir. ToF dedektörlerde, yöntemde iyonize edilen moleküller, dedektöre ulaşmadan önce yaklaşık 1–2 metre uzunluğundaki bir tüp içerisinde serbest uçuşa bırakılmaktadır. ToF analizinin en önemli avantajı, iyon kaynağında oluşturulan tüm iyonların ölçüm süreci boyunca dedektöre ulaşabilmesidir. Bu durum, geniş kütle aralıklarında hızlı ve yüksek çözünürlüklü analizlerin gerçekleştirilmesine olanak sağlamaktadır. Kromatografik kütle spektrometrisi analizlerinde ölçümler pozitif veya negatif iyon modunda gerçekleştirilebilmektedir. Pozitif modda, analiz edilen moleküllerin sabit faza olan affinitesinin daha yüksek olduğu ve bu faza bağlanma eğilimi gösterdiği bildirilmektedir. Bu sırada istenmeyen bileşikler hareketli faz ile daha hızlı bir şekilde sistemden uzaklaştırılmaktadır.

Çok yönlü olması ve yüksek derecede seçicilik ve hassasiyete sahip olması nedeniyle LC/MS metabolomik için en yaygın uygulanan tekniktir (103). Yeni biyobelirteçlerin keşfedilmesi ve hastalıklara özgü moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına olanak sağlaması nedeniyle de LC/MS tabanlı metabolomik yaklaşımların kullanım alanı hızla artmaktadır. Bu kapsamda, LC/MS ile gerçekleştirilen hedeflenmemiş ve hedeflenmiş metabolomik çalışmalarda metabolit kapsamını genişletmeye yönelik çok sayıda strateji geliştirilmiştir. Uygun örnek hazırlama protokolleri, matris etkilerinin azaltılmasına, LC/MS sisteminin analitik stabilitesinin korunmasına ve tespit edilebilen metabolit sayısının artırılmasına katkı sağlamaktadır. Son yıllarda ise metabolit tanımlamasını ve veri işleme süreçlerini hızlandırmak, ayrıca hastalık sınıflandırması ve klinik sonuçların öngörülme doğruluğunu artırmak amacıyla makine öğrenimi yaklaşımları LC/MS metabolomik iş akışlarına entegre edilmeye başlanmıştır (104).

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

Çalışmanın deneysel aşamalarında kullanılan cihaz, sarf malzeme ve yazılım progamlarının listesi Tablo 3.1'de sunuldu. Kullanılan tüm reaktifler analitik saflıkta olup, uygun saklama ve kullanım koşulları üretici talimatlarına göre sağlandı. Analizler, kalibrasyonları yapılmış ve düzenli bakımları gerçekleştirilen cihazlarda gerçekleştirildi.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan cihaz, sarf malzeme ve yazılım progamlarının listesi

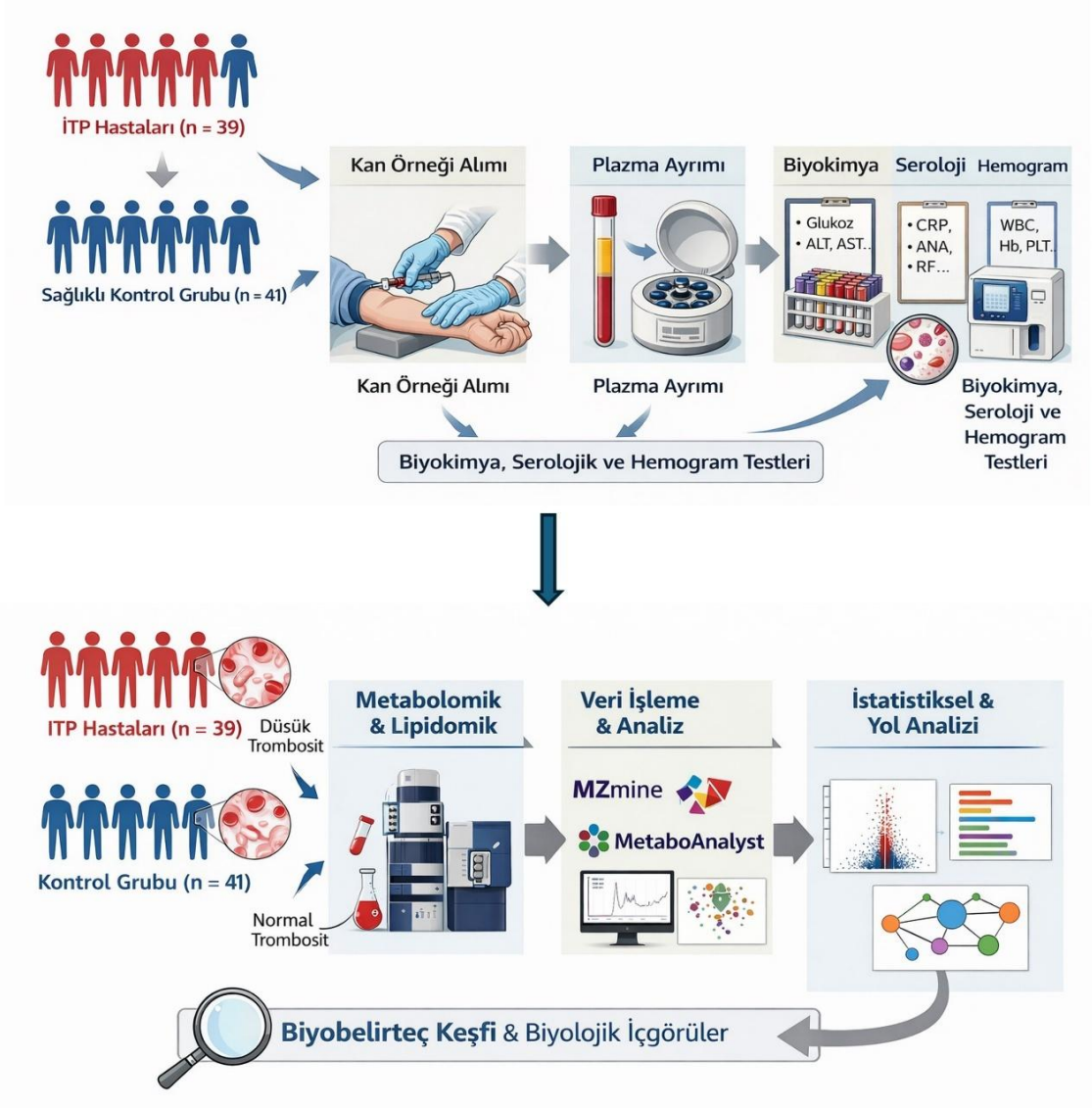
Adı	**Marka, Model, Ülke**	**Kullanım amacı**	**Türü**
Sıvı kromatografisi - kuadrupol uçuş zamanlı kütle spektrometresi	Agilent 6530, Santa Clara, ABD	Kromatografik analiz	Makine teçhizat
Soğutmalı santrifüj	Hettich Universal 320 R, Almanya	Numune hazırlama	Makine teçhizat
Vakum santrifüj	Labconco CentiVap, 7310030, ADB	Numune hazırlama	Makine teçhizat
Vorteks	IKA, VG3, Almanya	Numune hazırlama	Makine teçhizat
Elektronik hassas terazi	Mettler Toledo AG285 SPE, ABD	Numune hazırlama	Makine teçhizat
C18 kromatografi kolonu (2,1 x 100mm, 2,5 μm)	Xbridge Waters, ABD	Kromatografik analiz	Sarf malzeme
Otomatik pipetler	Isolab, Almanya	Numune hazırlama	Sarf malzeme
Metanol (LC/MS saflıkta)	Isolab, Almanya	Numune hazırlama	Sarf malzeme
Asetonitril (LC/MS saflıkta)	Isolab, Almanya	Hareketli faz	Sarf malzeme

İzopropilalkol (LC/MS saflıkta)	Isolab, Almanya	Hareketli faz	Sarf malzeme
Formik asit (LC/MS saflıkta)	Sigma-Aldrich, ABD	Hareketli faz	Sarf malzeme
Amonyum asetat	Sigma-Aldrich, ABD	Hareketli faz	Sarf malzeme
Asetik asit	Sigma-Aldrich, ABD	Hareketli faz	Sarf malzeme
Cam vial, insert	Isolab, Almanya	Numune hazırlama	Sarf malzeme
Pipet ucu	Isolab, Almanya	Numune hazırlama	Sarf malzeme
Mikrosantrifüj tüpü (1.5/2 mL)	Isolab, Almanya	Numune hazırlama	Sarf malzeme
Mass Hunter Q-TOF LC/MS kontrol yazılımı	Agilent, Santa Clara, ABD	Kromatografik analiz	Yazılım programı
MzMine 2.53	Charles Üniversitesi, Prag, Çekya	Veri analizi	Yazılım programı
MetaboAnalyst 6.0	McGill Üniversitesi, Montréal, Kanada	Veri görselleştirme	Yazılım programı
Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 23.0	IBM Corp. Armonk, NY, ABD	İstatistiksel analiz	Yazılım programı
Microsoft Excel 365	Microsoft Corporation, ABD	Ham verilerin düzenlenmesi, ön işlenmesi ve grafiksel sunumları	Yazılım programı
İnsan metabolomu veritabanı (HMDB)	Alberta Üniversitesi, Kanada.	Veri analizi	Web sitesi
Lipid Metabolites and Pathways Strategy (LIPID MAPS)	California Üniversitesi, San Diego, ABD	Lipidomik analizler	Web sitesi

3.2. Çalışmanın Tasarımı

Çalışma İTP tanısı almış hastalar ile sağlıklı bireyler arasında metabolomik ve lipidomik profillerin karşılaştırılmasını amaçlayan girişimsel olmayan prospektif kesitsel bir laboratuvar çalışması olarak planlandı. Çalışmaya Sağlık Bilimleri Üniversitesi,

Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Hematoloji polikliniğine başvuran 18-65 yaş arası 39 İTP hastası ve 18-65 yaş arası kan bankasına gönüllü kan bağışçısı olarak başvuran 41 sağlıklı gönüllü kadın ve erkek dahil edildi. Çalışmada 18 yaş altı, aktif kanser hastalığı olan ve sekonder nedenlere (sistemik lupus eritematozus, romatoid artrit, Evans sendromu, Sjögren sendromu ve antifosfolipid sendromu) bağlı İTP hastaları hariç bırakıldı. 18 yaş üstü, aktif kanser olmayan, sekonder nedenler dışlanarak İTP tanısı almış bireyler dahil edildi (5). Çalışmanın etik kurul izni Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Araştırma Etik Kurulundan 22.10.2024 tarihinde SBA 24/927 kayıt numarası ile alındı. Etik kurul onayının ardından uzman hekim tarafından yapılan muayene sonucu İTP tanısı alan hastalardan gönüllü onam formları imzalatıldıktan sonra her bir katılımcıdan iki tüp venöz kan alındı. Kontrol grubu için sağlıklı kan bağışçısı olan gönüllü katılımcılardan onamları alındıktan sonra iki tüp venöz kan alındı. Katılımcılardan alınan kanlar plazmalarına ayrıldı. Tüm bireyler için hemogram testleri, İTP hastaları için ilave biyokimyasal ve serolojik testler gerçekleştirildi. Ayrılan plazma numuneleri metabolomik ve lipidomik analizler için analiz süresine kadar -80 C'de saklandı. Çalışmanın deneysel tasarımı Şekil 3.1'de sunuldu. Çalışmaya katılan tüm gönüllülerin yaşları, cinsiyetleri aldığı tedaviler ve varsa ek hastalıkları not edildi.



Yapay zeka araçlarından yararlanılarak bu çalışma kapsamında oluşturulmuştur.

Şekil 3.1. Çalışmanın deneysel tasarımı

3.2.1. İTP Tanısında Serolojik ve İmmünolojik Değerlendirme

İTP tanısı konulan hastalarda, sekonder nedenlerin dışlanması ve olası enfeksiyöz veya otoimmün etiyolojilerin değerlendirilmesi amacıyla standart laboratuvar testleri uygulandı. Bu kapsamda tüm hastalarda viral hepatit ve insan bağışıklık yetmezliği virüsü (ya da HIV) enfeksiyonlarının dışlanması amacıyla Hepatit B yüzey antijeni, Hepatit C virüsüne karşı antikor ve insan immün yetmezlik virüsüne karşı antikor testleri uygulandı. Akut viral veya paraziter enfeksiyonların saptanması için Sitomegalovirüs immünoglobulin M Toksoplazma immünoglobulin M, Epstein-Barr virüsü, viral kapsid antijeni, immünoglobulin M ve Herpes simpleks virüsü tip 1 ve tip 2 immünoglobulin M düzeyleri değerlendirildi. Brusellozun ekarte edilmesi amacıyla Rose Bengal testi yapıldı.

Ayrıca, sekonder trombositopeniye yol açabilecek antifosfolipid antikor sendromu olasılığını değerlendirmek için Anti β2-glikoprotein I immünoglobulin G ve M, Anti-kardiyolipin immünoglobulin G ve M ve antifosfolipid immünoglobulin G ve M düzeyleri ölçüldü. Testler tüm hastalarda standart şekilde uygulandı ve tüm testleri negatif olan hastalar İTP hastası olarak değerlendirildi. Ayrıca İTP grubunda bulunan her bir bireyin hastalık süresi, geçmiş kanama öyküsü, numune alındığı zamanda varsa aldığı tedavi ve eşlik eden hastalıklarına göre bilgileri de kaydedildi (Tablo 3.2). İTP grubunda bulunan katılımcılar tedavi durumlarına (tedavi alan/almayan) ve ek hastalık durumuna (ek hastalığı olan/olmayan) göre de alt gruplara ayrıldı.

Tablo 3.2. İTP hastalarının klinik verileri

Klinik bulgular		**n**
Hastalık süresi	0-1 yıl	11
	1 yıl üzeri (ortalama± standart sapma 5.46±4.16)	28
Geçmiş Kanama Öyküsü	Kanama yok	10
	Cilt ve Mukoza	26
	Gastrointestinal Sistem	-
	Pulmoner Sistem	-
	Santral Sinir Sistemi	-
	Hipermenore	2
	Girişim sonrası kanama	1
Tromboz	Var	1
	Yok	38
Örnek Alınma Zamanı	Tedavi başlanmamış	6
	Tedavisiz izlem	10
	Tedavi kesildikten sonrası sonuçları hedef aralıkta	2
	Tedavi altında	17
	Tedavi sonrası trombosit hedef aralıkta değil	4
Örnek Alındığında Aldığı Tedavi	Tedavi yok	22
	Steroid/ İntravenöz imünoglobilin (IVIG)	8

	Eltrombopag	7
	Rituximab	7
	Splenektomi	3
	Siklosporin	2
	Mikofenolat Mofetil	2
Eşlik Eden Hastalık	Yok	26
	Hipertansiyon	2
	Diyabet	3
	Hiperlipidemi	2
	Hipotiroidi	1
	Romatoid Artrit	5
	Konjenital Adrenal Hiperplazi	1
	Malignite	1
	Nefrotik Sendrom	1

3.3. İTP ve Kontrol Grubunun Tam Kan Sayımı ve Rutin Biyokimya Testlerinin Yapılması

Çalışmaya dahil edilen bireylerin genel sağlık durumlarının değerlendirilmesi, metabolik ve hematolojik açıdan karşılaştırılabilirliğin sağlanması ve metabolomik analiz sonuçlarının yorumlanmasında klinik parametrelerle ilişkilendirilebilmesi amacıyla tam kan sayımı (hemogram) ve rutin biyokimya testleri yapıldı. Bu testler sayesinde, olası sistemik hastalıkların veya akut metabolik bozuklukların araştırma sonuçlarını etkilemesinin önüne geçilmesi hedeflendi. Ayrıca, elde edilen hematolojik ve biyokimyasal veriler, hasta ve kontrol grupları arasındaki temel fizyolojik farklılıkların belirlenmesi ve metabolit değişimlerinin biyokimyasal yansımalarının desteklenmesi amacıyla değerlendirildi. Bu amaçla çalışmaya dahil edilen tüm katılımcılardan sabah saatlerinde, 8–12 saatlik açlık sonrası venöz kan örnekleri alındı. Kan örnekleri, tam kan sayımı için K_2EDTA içeren tüplere, biyokimyasal analizler için ise jel içeren biyokimya tüplerine alındı. Tam kan sayımı analizleri, örnek alımından sonraki ilk iki saat içinde, otomatik hematoloji analizörü (Sysmex XN-1000) kullanılarak gerçekleştirildi. Analizde eritrosit, lökosit, trombosit, nötrofil, monosit, lenfosit sayıları, hemoglobin, hematokrit düzeyleri ile ortalama eritrosit hacmi ve ortalama trombosit hacmi gibi indeksler

değerlendirildi. Rutin biyokimya testleri için kan örnekleri, 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Elde edilen serumlar, otomatik biyokimya analizörü (Abbott Architect c8000) ile ölçüldü. Analizde alkalen fosfataz, gama glutamil transferaz, alanin aminotransferaz, aspartat aminotransferaz, laktat dehidrogenaz, tiroid uyarıcı hormon, üre, kreatinin, glomerüler filtrasyon hızı, folat, vitamin B12 ve glukoz düzeyleri ölçüldü. Tüm testler, laboratuvarın iç kalite kontrol prosedürleri ve üretici firma talimatlarına uygun şekilde yürütülmüştür. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.3.1. İstatistiksel Analiz

Tam kan sayımı ve rutin biyokimya testlerinden elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesi, SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 23.0 yazılımı (IBM Corp., Armonk, NY, ABD) kullanılarak yapıldı. Verilerin normal dağılımı Shapiro–Wilk testi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren sürekli değişkenler ortalama ± standart sapma, normal dağılım göstermeyen değişkenler ise medyan (minimum–maksimum) şeklinde ifade edildi. Gruplar arasındaki farkların karşılaştırılmasında: Normal dağılım gösteren parametreler için bağımsız örneklem *t*-testi (Independent Samples *t*-test), Normal dağılmayan parametreler için Mann–Whitney U testi kullanıldı. Kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında Ki-kare (χ^2) testi uygulandı. Tüm testlerde istatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

3.4. Metabolomik Analizler İçin Numune Hazırlama

Metabolomik numune hazırlamada amaç, hücresel ve plazmada bulunan metabolitlerin enzimatik aktivitelerden kaynaklanan parçalanmalarını önlemek, protein ve lipid gibi makromoleküllerden arındırılmış bir numune elde etmek ve analitik cihaz ile uyumlu bir numune matriksi sağlamaktır. Numune hazırlama işlemi, metabolitlerin ekstraksiyonu sırasında organik çözücü ile protein çöktürme, santrifüjleme ve metabolitleri yeniden çözündürme adımlarını içermektedir. Bu işlemler sonucunda, numunelerdeki küçük moleküllü metabolitlerin saflaştırılması ve ölçümde tekrarlanabilirlik ile duyarlılığın artırılması hedeflendi. Bu amaçla katılımcılardan alınan kanlar plazmalarına ayrıldı elde edilen plazmalar metanol ile çöktürülerek metabolit ekstraksiyonu gerçekleştirildi.

3.4.1. Plazma Numunelerinin Hazırlanması

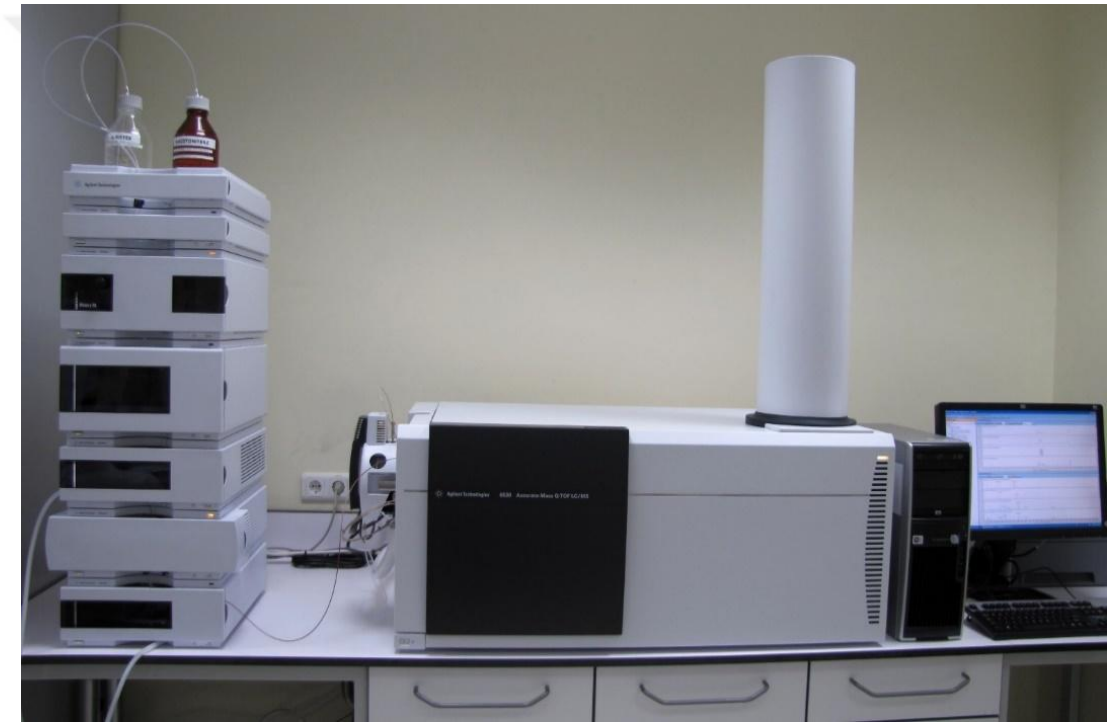
Çalışmaya katılan her bir katılımcıdan K_2EDTA içeren hemogram tüplerine kan numunesi alındı. Alınan kan 3,000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst plazma fazından her bir alikot 0.5 mL olacak şekilde yeni bir tüplere alınarak analiz süresine kadar -80 °C'de saklandı. Hazırlanan plazma numuneleri metabolomik ve lipidomik analizler için iki alikot şeklinde saklandı.

3.4.2. Plazma Numunelerinin Metabolit Ekstraksiyonu

Plazma numunelerinden metabolit ekstraksiyonu, metanol ile protein çöktürme yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Her bir plazma numunesinden 0.1 mL alınarak ve üzerine 1:2 oranında soğuk metanol:su (9:1, h/h) eklendi. Karışım, proteinlerin tam olarak denatüre edilmesi ve metabolitlerin metanol fazına geçmesini sağlamak için 1 dakika vortekslendikten sonra oda ısısında 10 dakika bekletildi. Sürenin sonunda numuneler 4 °C'de, 12.000 rpm'de 25 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonucunda, proteinler pellet şeklinde tüpün dibine çökmüştür metabolitleri içeren kısım üstte kalan süpernatant fazda kaldı. Süpernatant fazından 0.1 mL yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alınmış ve vakum santrifüjde içerisindeki çözücü tamamen uzaklaşana kadar buharlaştırıldı. Kalan ekstrakt 0.1 mL asetonitril:su (1:1, h/h) içerisinde yeniden çözüldü. Bir dakika vortekslenen numuneler 12.000 rpm'de +4 °C'de 25 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst fazdan 0.08 mL cam viallere alınarak analiz edildi. Ayrıca bireysel numunelerle (İTP ve Kontrol grubu) beraber havuz numuneleri, kalite kontrol numuneleri (quality control, QC) ve kör numuneleri hazırlandı. Bireysel numuneler için her bir kişiye ait plazma numuneleri 0.1 mL alınarak ayrı ayrı miksrosantrifüj tüpüne alındı Havuz numuneleri için her bir gruba ait plazma numuneleri 0.01 mL aynı tüpte birleştirildi (her grup için ayrı ayrı olacak şekilde). Kalite kontrol numuneleri için tüm iki gruba ait plazma numunelerinden 0.01 mL alınarak aynı tüpte birleştirildi. Kör numunesi için 0.1 mL distile su kullanıldı. Bireysel numuneler tek alikot, havuz numuneleri, kalite kontrol ve kör numuneleri 4 alikot olacak şekilde hazırlandı. Tüm numuneler hazırlandıktan sonra rastgele numaralandırma yöntemiyle her bir numuneye bir sayı atandı. Bu sayılar tüplerin üzerine yazılarak numune hazırlama sırasında gruplar arasında oluşabilecek olası varyasyonları en aza indirildi. Her bir numune serisi 24 numune olacak şekilde ve her set içerisinde 1 kör numunesi, 1 kalite kontrol numunesi, 1 İTP havuz, 1 kontrol havuz ve 20 bireysel numune (İTP ve kontrol) olacak şekilde çalışıldı Tüm numuneler aynı gün hazırlandı ve aynı koşullar altında analiz edildi.

3.5. Sıvı Kromatografisi-Kuadrupol Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi Analizleri

LC/MS yöntemi kompleks biyolojik numunelerde yer alan metabolitlerin ayrıştırılması, tanımlanması ve miktarlarının belirlenmesi için yüksek duyarlılık ve özgüllük sunan bir yöntemdir. Bu yöntem ile, numunelerdeki metabolitlerin alıkonma zamanı (tR, dakika) ve kütle/yük oranı (*m/z*) verileri elde edilerek, metabolit profillerinin detaylı şekilde çıkarılması amaçlanır. Bu amaçla ekstraksiyonu yapılan numuneler Q-TOF LC/MS (Agilent Tech Agilent Technologies, 6530, ABD) cihazı (Şekil 3.2) ile analiz edildi elde edilen veriler işlenerek İTP ve kontrol grubu arasında değişen metabolitler belirlendi.



Sıvı kromatografisi-kuadrupol uçuş zamanlı kütle spektrometresi cihazı (liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry; Q-TOF LC/MS, Agilent Technologies,6530, Santa Clara, ABD).

Şekil 3.2. Metabolomik analizlerde kullanılan sıvı kromatografisi-kuadrupol uçuş zamanlı kütle spektrometresi cihazı

Kromatografik koşullar: C18 (2.1 x 100 mm, 2.5 µm, Xbridge Waters, Milford, ABD) ters faz kromatografi kolonu kullanıldı. Hareketli faz olarak A: distile su (%0.1 LC/MS saflıkta formik asit içeren) ve B: LC/MS saflıkta asetonitril (%0.1 LC/MS saflıkta formik asit içeren) kullanıldı. Akış hızı 0.4 mL^{-1}, enjeksiyon hacmi 5 µL, kolon sıcaklığı 35 °C olarak ayarlandı. Her bir numune için toplam analiz süre 20 dakika olarak

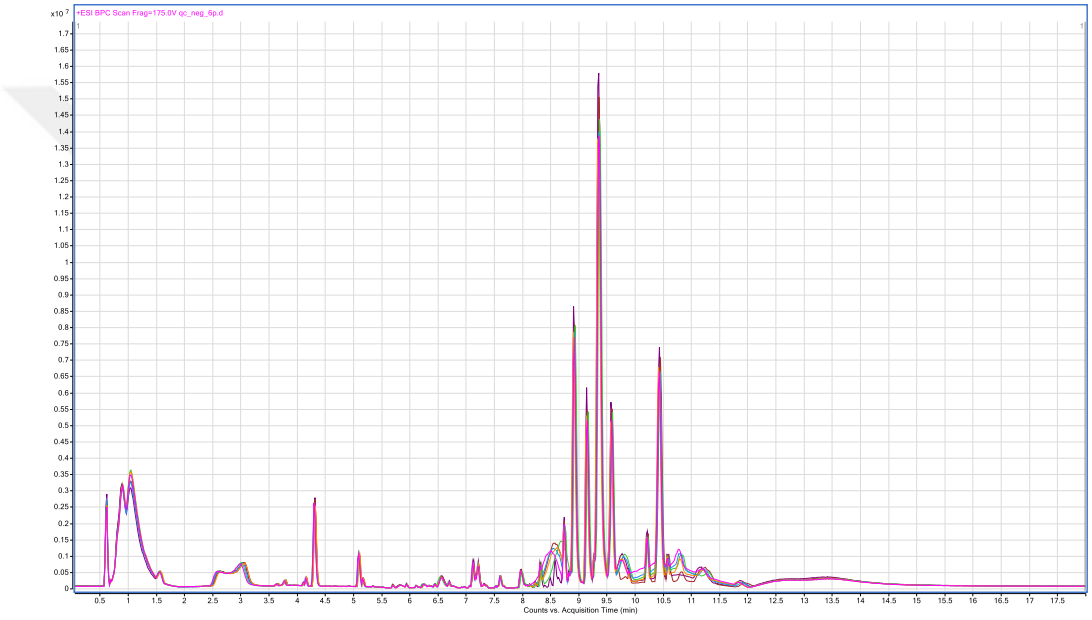
belirlendi. Kütle spektrometresi (MS) negatif ve pozitif tarama modunda çalıştırıldı. Analizlerde kuadrupol uçuş zamanlı dedektör (Q-TOF) kütle dedektörü kullanıldı. TOF kısmı yüksek çözünürlükte ve tarama modunda, kuadrapol (Q) kısmı 75-1200 *m/z* aralığında çalıştırıldı. Kütle spektrometresi kaynak parametreleri: kapiler voltaj [3.5 kV], gaz sıcaklığı [325 °C], kurutma gazı akış hızı [10 L/dk], nebülizatör basıncı [35 psi], fragmentör voltajı [175 V] ve skimmer voltajı [65 V]. Sürekli kütle ekseni kalibrasyonu, referans kütle çözeltisinin infüzyonu ile sağlandı ve m/z [112.9856] ile [1033.9881] değerlerinde kilit kütleler kullanıldı. Veriler, 2 spektrum/saniye toplama hızı ile centroid modunda kaydedildi. Numuneler karışık sırada ve her 6 enjeksiyonda bir kör çözelti ve kalite kontrol numunesi enjeksiyonu eklenerek yapıldı. Her analiz öncesi cihazın analiz süresince kararlılığını, tekrarlanabilirliğini ve ölçüm doğruluğunu değerlendirmek amacıyla standart kalite kontrol numunesi enjeksiyonu yapıldı. Standart kalite kontrol numunesinde bulunan standartların listesi Tablo 3.3'te sunuldu. Standartlar son konsantrasyon 10 mg/L olacak şekilde metanol ve/veya distile suda çözündü. Hazırlanan standartların her birinden 0.1 mL cam viallere alınarak analiz öncesi enjekte edildi.

Tablo 3.3. Kalite kontrol numunesinde bulunan standartların listesi

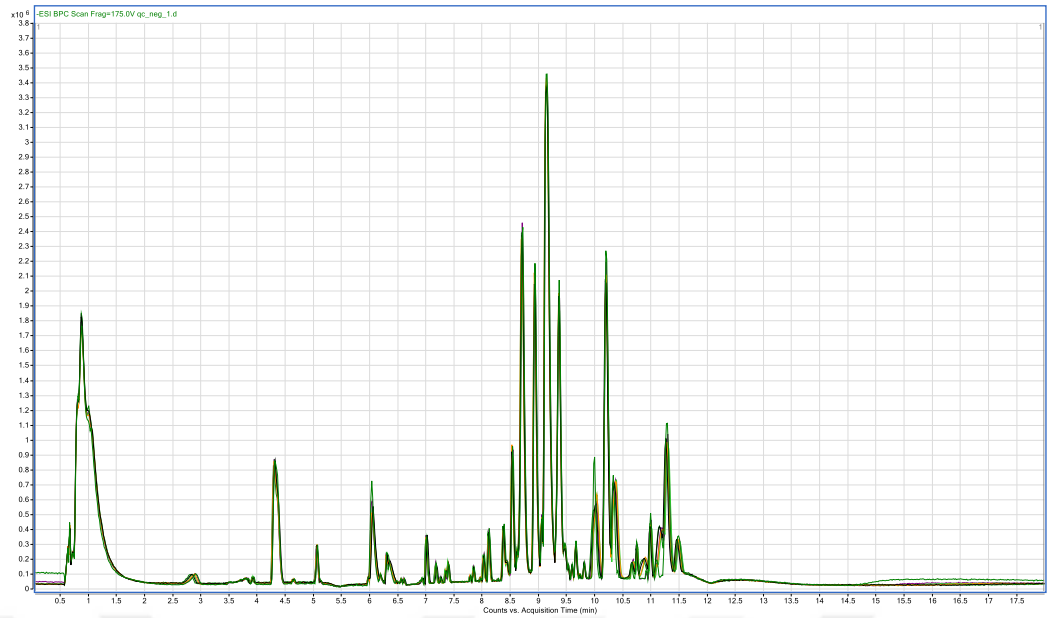
Standart adı	**Marka**	**CAS Numarası**	**Moleküler ağırlığı (g/mol)**
Üridin	Sigma Aldrich	58-96-8	244.2
Adenozin	Sigma Aldrich	58-61-7	267.24
Guanosin	Sigma Aldrich	110-00-3	283.24
4-hidroksibenzoik asit	Sigma Aldrich	99-96-7	138.12
Vanillik asit	Sigma Aldrich	121-34-6	168.15
Kolik asit	Sigma Aldrich	81-25-4	408.57
Hiyodeoksikolik asit	Sigma Aldrich	83-49-8	392.57
Nikotinik asit	Sigma Aldrich	59-67-6	123.11

Q-TOF LC/MS cihazında, öncelikle karışımdaki bileşikler polarite, hidrofobiklik ve molekül ağırlığına göre LC kısmında ayrılır. Ardından QTOF detektörü, bu bileşikleri *m/z* değerlerine göre yüksek çözünürlükte analiz eder. Sonuç olarak, her numune için total iyon kromatogramları (total ion chromatogram, TIC) elde edilir. Bu kromatogramlar, metabolitlerin hem ayrışma profili hem de yoğunluk dağılımını göstermesi bakımından verinin temel görsel çıktısını oluşturur. Elde edilen kromatogramlar, her bir metabolitin

tR ve *m/z* göre iyon yoğunluğunun tespit edildiği grafiksel sinyallerdir. Yatay eksen: metabolitin kromatografik kolondan çıkış süresini (dakika cinsinden), dikey eksen: iyon sinyal yoğunluğunu, yani metabolitin dedektör tarafından algılanma miktarını gösterir. Her bir tepe noktası (pik), belirli bir metabolit veya bileşik grubuna karşılık gelir. Çalışmamızda İTP ve kontrol grubu numunelerinin yapılan kromatografik analiz sonucu elde edilen TIC kromatogramlar çıkarıldı. Kalite kontrol numunelerinden hazırlanan numunelere ait kromatogramlar pozitif iyonizasyon modu (Şekil 3.3) ve negatif iyonizasyon modu (Şekil 3.4) için ayrı ayrı sunuldu. Kromatografik analizlerin tamamlanmasıyla bu ham kromatogramlar işlenerek veri analizi gerçekleştirildi.



Şekil 3.3. Pozitif iyonizasyon mod kalite kontrol numunelerine ait temel pik kromatogramı



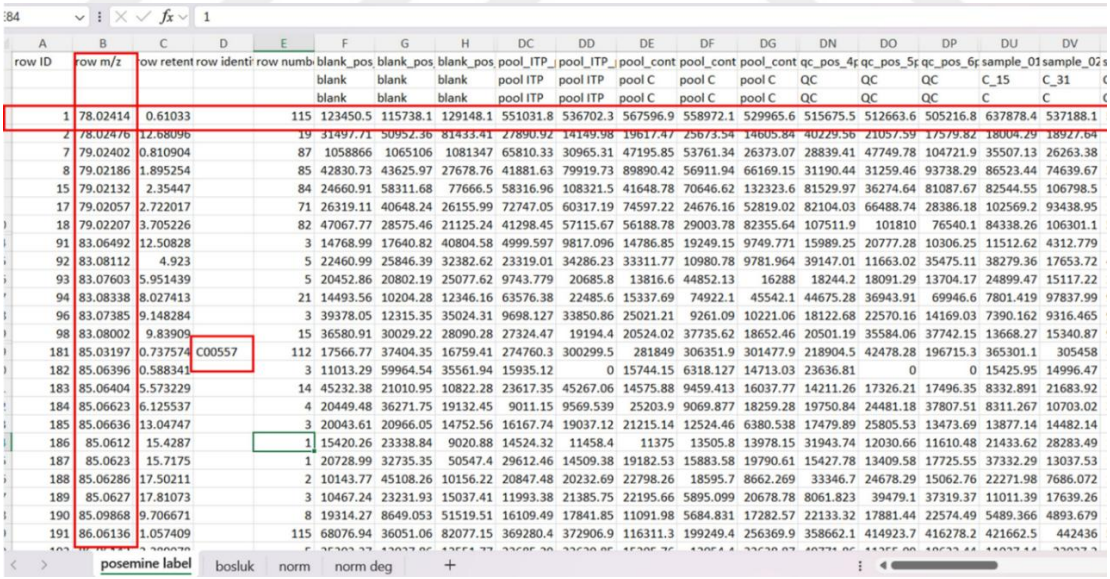
Şekil 3.4. Negatif iyonizasyon mod kalite kontrol numunelerine ait temel pik kromatogramı

3.6. Metabolomik Veri Analizi

3.6.1. Verilerin işlenmesi

Q-TOF LC/MS analizlerinden elde edilen ham verilerin işlenmesi ve metabolit tanımlamasının yapılabilmesi amacıyla MZmine 2.53 yazılımı kullanıldı. MZmine 2.53, açık kaynaklı bir metabolomik veri işleme platformu olup, pik tespiti, hizalama, dekonvolüsyon, eksik değer atama, normalizasyon ve metabolit tanımlama gibi temel işlemleri otomatik olarak gerçekleştirmektedir. Bu yazılım, her örnekteki metabolit sinyallerinin doğru şekilde belirlenmesini, örnekler arasında karşılaştırılabilir hale getirilmesini ve istatistiksel analizlerde kullanılabilecek bir veri matrisi oluşturulmasını sağlar. Ayrıca, MZmine 2.53 yazılım programı üzerinden elde edilen *m/z* ve tR verileri, metabolit tanımlama aşamasında Kyoto genler ve genomlar ansiklopedisi (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG), insan metabolom veri tabanı (Human Metabolme Database, HMDB) ve MetaboAnalyst 6.0 veri tabanlarıyla ilişkilendirilerek değerlendirildi. Bu amaçla Q-TOF LC/MS cihazından alınan .d formatındaki ham veriler .mzml uzantılı dosya formatına dönüştürüldü. Pik belirleme, pik eşleştirme, pik şiddetlerinin belirlenmesi gibi işlemler gerçekleştirildi. Yazılım programı, yüklenen veri dosyalarındaki sinyalleri çıkarılmış iyon kromatogramları (EIC) halinde ayrıştırmakta ve belirlenen gürültü eşiğinin altındaki pikleri elemektedir. Ardından, tespit edilen pikler örnek setleri boyunca m/z ve tR temelinde taranarak birbiriyle eşleştirilmektedir. Pik

eşleştirme sırasında m/z ve tR için hata aralıkları kullanıcı tarafından belirlenmektedir. MzMine 2.53 programında gürültü eşiği 10000, *m/z* eşleşme aralığı 0.008 *m/z,* minimum tR 0,2 dk, maksimum asimetri oranı 1.2, maksimum 3 ppm ve 0,1 dk aralık olarak belirlendi. Fitreleme sonucu elde edilen verilerin *m/z* değeri, tR, pik alan şiddetleri ve referans kütüphane ile eşleşme kodları Excel dosyasına aktarıldı. Excel tablosunda her bir satırda bir piki temsil ederken, sütunlarda bu pike ait tanımlayıcı bilgiler ve farklı örneklerdeki sinyal yoğunlukları yer almaktadır. A sütunu (row ID): her bir metabolit için MZmine 2.53 tarafından otomatik olarak verilen sıra numarasıdır. B sütunu (row m/z): pikin kütle/yük oranını ifade eder. Bu değer, bileşiğin kütlesel özelliklerini temsil eder ve kimyasal tanımlamada temel parametredir. C sütunu (row retention time): pikin kromatografik kolon üzerindeki dakika cinsinden tR değeridir. D sütunu (row ID): referans standart kütüphaneyle eşleşen piklere ait KEGG veya HMDB kodunu gösterir. E sütunu: metabolit kaç tane numune tespit edildiğini gösterir. Sonraki sütunlar (örneğin F–DV arası): farklı örnek gruplarına ait pik yoğunluklarını göstermektedir (Şekil 3.5). Excel dosyasında aktarılan verilerden tR>10 olan pikler elendikten sonra kalan piklerden kör çözelti filtrelemesi, bağıl standart sapma filtresi uygulandı. Kalan pikler normalize edilerek veri analizine devam edildi.



	A	B	C	D	E	F	G	H	DC	DD	DE	DF	DG	DN	DO	DP	DU	DV
	row ID	row m/z	row retent	row identi	row numb	blank_pos	blank_pos	blank_pos	pool_ITP_	pool_ITP_	pool_cont	pool_cont	pool_cont	qc_pos_4	qc_pos_5	qc_pos_6	sample_01	sample_02
						blank	blank	blank	pool ITP	pool ITP	pool C	pool C	pool C	QC	QC	QC	C_15	C_31
						blank	blank	blank	pool ITP	pool ITP	pool C	pool C	pool C	QC	QC	QC	C	C
	1	78.02414	0.61033		115	123450.5	115738.1	129148.1	551031.8	536702.3	567596.9	558972.1	529965.6	515675.5	512663.6	505216.8	637878.4	537188.1
	2	78.02476	12.68096		19	31497.71	50952.36	81433.41	27890.92	14149.98	19617.47	25673.54	14605.84	40229.56	21057.59	17579.82	18004.29	18927.64
	7	79.02402	0.810904		87	1058866	1065106	1081347	65810.33	30965.31	47195.85	53761.34	26373.07	28839.41	47749.78	104721.9	35507.13	26263.38
	8	79.02186	1.895254		85	42830.73	43625.97	27678.76	41881.63	79919.73	89890.42	56911.94	66169.15	31190.44	31259.46	93738.29	86523.44	74639.67
	15	79.02132	2.35447		84	24660.91	58311.68	77666.5	58316.96	108321.5	41648.78	70646.62	132323.6	81529.97	36274.64	81087.67	82544.55	106798.5
	17	79.02057	2.722017		71	26319.11	40648.24	26155.99	72747.05	60317.19	74597.22	24676.16	52819.02	82104.03	66488.74	28386.18	102569.2	93438.95
	18	79.02207	3.705226		82	47067.77	28575.46	21125.24	41298.45	57115.67	56188.78	29003.78	82355.64	107511.9	101810	76540.1	84338.26	106301.1
	91	83.06492	12.50828		3	14768.99	17640.82	40804.58	4999.597	9817.096	14786.85	19249.15	9749.771	15989.25	20777.28	10306.25	11512.62	4312.779
	92	83.08112	4.923		5	22460.99	25846.39	32382.62	23319.01	34286.23	33311.77	10980.78	9781.964	39147.01	11663.02	35475.11	38279.36	17653.72
	93	83.07603	5.951439		5	20452.86	20802.19	25077.62	9743.779	20685.8	13816.6	44852.13	16288	18244.2	18091.29	13704.17	24899.47	15117.22
	94	83.08338	8.027413		21	14493.56	10204.28	12346.16	63576.38	22485.6	15337.69	74922.1	45542.1	44675.28	36943.91	69946.6	7801.419	97837.99
	96	83.07385	9.148284		3	39378.05	12315.35	35024.31	9698.127	33850.86	25021.21	9261.09	10221.06	18122.68	22570.16	14169.03	7390.162	9316.465
	98	83.08002	9.83909		15	36580.91	30029.22	28090.28	27324.47	19194.4	20524.02	37735.62	18652.46	20501.19	35584.06	37742.15	13668.27	15340.87
	181	85.03197	0.737574	C00557	112	17566.77	37404.35	16759.41	274760.3	300299.5	281849	306351.9	301477.9	218904.5	42478.28	196715.3	365301.1	305458
	182	85.06396	0.588341		3	11013.29	59964.54	35561.94	15935.12	0	15744.15	6318.127	14713.03	23636.81	0	0	15425.95	14996.47
	183	85.06404	5.573229		14	45232.38	21010.95	10822.28	23617.35	45267.06	14575.88	9459.413	16037.77	14211.26	17326.21	17496.35	8332.891	21683.92
	184	85.06623	6.125537		4	20449.48	36271.75	19132.45	9011.15	9569.539	25203.9	9069.877	18259.28	19750.84	24481.18	37807.51	8311.267	10703.02
	185	85.06636	13.04747		3	20043.61	20966.05	14752.56	16167.74	19037.12	21215.14	12524.46	6380.538	17479.89	25805.53	13473.69	13877.14	14482.14
	186	85.0612	15.4287		1	15420.26	23338.84	9020.88	14524.32	11458.4	11375	13505.8	13978.15	31943.74	12030.66	11610.48	21433.62	28283.49
	187	85.0623	15.7175		1	20728.99	32735.35	50547.4	29612.46	14509.38	19182.53	15883.58	19790.61	15427.78	13409.58	17725.55	37332.29	13037.53
	188	85.06286	17.50211		2	10143.77	45108.26	10156.22	20847.48	20232.69	22798.26	18595.7	8662.269	33346.7	24678.29	15062.76	22271.98	7686.072
	189	85.0627	17.81073		3	10467.24	23231.93	15037.41	11993.38	21385.75	22195.66	5895.099	20678.78	8061.823	39479.1	37319.37	11011.39	17639.26
	190	85.09868	9.706671		8	19314.27	8649.053	51519.51	16109.49	17841.85	11091.98	5684.831	17282.57	22133.32	17881.44	22574.49	5489.366	4893.679
	191	86.06136	1.057409		115	68076.94	36051.06	82077.15	369280.4	372906.9	116311.3	199249.4	256369.9	358662.1	414923.7	416278.2	421662.5	442436

posemine label | bosluk | norm | norm deg

Şekil 3.5. Q-TOF LC/MS analizleri sonrası MZmine 2.53 yazılım programı ile işlenen verilerin excel çıktısı

3.6.2. Kör ve Kalite Kontrol Filtreleme

Kör çözelti filtreleme: bu yöntemde amaç veri işleme basamağında cihazdan veya analizden kaynaklanabilecek zemin gürültüsünün azaltılması ve sadece gerçek metabolit

sinyallerinin tespit edilmesidir. Kör çözelti filtreleme yönteminde, sadece çözücüden (distile su ve/veya metanol) oluşan bir çözelti, örnek hazırlama basamağında bireysel numuneler ile aynı adımlarla muamele edilir. Her ölçüm serisinde bu kör çözelti ile cihaz ve kontaminasyon kaynaklı piklerin tespiti amaçlanır, ayrıca sinyal yoğunluğu ve zemin gürültüsü de kontrol edilir. Kör enjeksiyonların ortalama pik alan değerleri (sinyal/gürültü oranları dahil) metot validasyonu sırasında referans alınarak, numune pik alanlarından cihaz kaynaklı art alanlar ayrıldı. Çalışmamızda kör çözelti distile su ile hazırlandı bireysel plazma numuneleri ile aynı şekilde ekstraksiyonu yapıldı ve enjeksiyonlar sırasında her 6 enjeksiyonda bir enjekte edildi. Veri işleme basamağında bu kör numunelerine ait pik şiddetlerinin ortalaması (sinyal/gürültü oranları dahil) numunelerin toplam pik şiddetlerinin ortalamasına bölünerek 3'ten büyük olanlar filtrelendi. Filtreleme sonucu kalan piklerden veri analizine devam edildi.

Yüzde bağıl standart sapma filtrelemesi (%BSS): Amaç analitik süreç boyunca cihaz hassasiyetini ve kararlılığını takip etmektir. Kalite kontrol numuneleri numune hazırlama basamağında tüm numunelerin eşit hacimde karıştırmasıyla hazırlanır ve bireysel numunelerle aynı basamaklardan geçirilir ve aynı koşullarda enjekte edilir. Kalite kontrol numunelerinin tüm pikleri içerdiği kabul edildi ve analitik süreç boyunca cihaz hassasiyetini ve kararlılığını takip etmek için kullanıldı. Kromatografik analiz sonucu kalite kontrol numunelerinin pik alanlarının standart sapması kalite kontrol numunelerinin pik alanlarının pik ortalamasına bölündü. Elde edilen değer 100 ile çarpıldı. Bu değerlerden %30'un (metabolomik analizler için %30 ve/veya 50) altında kalan pikler filtrelenerek kalan piklerden veri analizine devam edildi. Bu sayede, cihaz hassasiyetinde meydana gelebilecek dalgalanmalardan veya ana bileşenlerdeki küçük değişimlerden kaynaklanan veri hatalarının önüne geçilmesi hedeflendi.

3.6.3. Normalizasyon

Metabolomik analizlerde verilerin standart sapmaları homojen olmadığından örneklerin metabolomik verilerin analiz edinilmesinden önce veya sonra normalize edilmesi gerekir. Normalizasyon işleminde amaç bir numunedeki metabolitlerin miktarları veya konsantrasyonlarındaki farklılıklardan, numune hazırlama sırasındaki farklılıklardan ve analitik koşullardan kaynaklanabilecek numuneden numuneye değişkenliği azaltmaktır. Literatürde iç standart, pik ortalaması, pik ortanca değeri, ya da ölçeklendirmeye bağlı normalizasyon yöntemleri mevcuttur. Çalışmamızda normalizasyon işlemi pik ortalaması yöntemi kullanılarak yapıldı. Normalizasyon

işleminde her bir numuneye ait pik şiddeti, ait olduğu tüm numunelerinin pik şiddetlerinin ortalamasına bölünerek hesaplandı. Normalizasyon sırasında cihaz performansındaki olası varyasyonları kontrol etmek amacıyla, analiz serilerine düzenli aralıklarla kalite kontrol numuneleri dahil edildi.

Normalize edilen pik değerlerinden kontrol ve İTP grubu arasındaki varsa istatistiksel değişimleri gözlemlemek için normalize edilen tüm pik değerlerinden temel bileşenler analizi (principal components analysis, PCA) gerçekleştirildi. Değişimin gruplar arasında kaç kat değiştiği ve değişimin hangi yönde (artıp, azaldığı) olduğunu belirlemek için *t*-test ve değişim katsayısı (DK; Fold change, FC) değerleri hesaplandı. DK İTP numunelerinin pik şiddetlerinin ortalamasının kontrol numunelerinin pik şiddetlerinin ortalamasına bölünmesi ile hesaplandı. *t*-test değerleri excelde otomatik *t*-test formülü kullanılarak hesaplandı. DK anlamlılık düzeyi ≥1.5 ve/veya 2'dir. Hesaplama sonucu gruplar arasında t-test <0.05 ve DK ≥1.5 filtreleri uygulandı. Her bir filtreleme sonucu kalan pik listeleri MetaboAnalyst 6.0 (www.MetaboAnalyst 6.0.ca) yazılım programına yüklenerek gruplar arasında değişen metabolitler belirlendi. Ayrıca filtrelemeleri sonucunda kalan piklerle her bir örnek grubu için PCA grafikleri, PLS-DA grafikleri, volkan grafikleri, ısı haritaları ve önemli değişenler analizi (Variable in Importance Protection, VIP skor) grafikleri ve gruplar arasında anlamlı değişen metabolit listeleri çıkarıldı. Ayrıca aynı işlemler İTP grubunun tedavi durumu ve ek hastalık durumu için ayrı ayrı ve aynı şekilde gerçekleştirildi.

3.7. MetaboAnalyst 6.0 ile Temel Bileşenler Analizi, Volkan Grafiği ve Isı Haritası Grafiklerinin Hazırlanması

Plazma metabolit profillerinin istatistiksel değerlendirmesi MetaboAnalyst 6.0 çevrimiçi platformu kullanılarak gerçekleştirildi. İTP ve kontrol gruplarına ait normalize pik değerleri öncelikle platformun istatistiksel analiz (Statistical Analysis-one-factor) modülüne yüklendi. Her bir modül için uygun değerler girilerek grafikler hazırlandı. Aynı işlemler İTP grubunun tedavi durumu ve ek hastalık durumunu değerlendirmek için ayrı ayrı ve aynı şekilde gerçekleştirildi.

3.7.1. Veri Ön İşleme

Metabolomik analiz sonucu elde edilen ham veriler MetaboAnalyst 6.0 platformuna yüklenerek analiz öncesi veri ön işleme işlemi uygulandı. Bu aşama, ölçüm hatalarının etkisini azaltmak, eksik değerleri gidermek ve metabolitlerin gruplar arası

karşılaştırmalarda eşit ağırlıkta değerlendirilmesini sağlamak amacıyla gerçekleştirildi. Analiz her biri bir özelliği temsil eden *m/z* değeri ve her bir numuneye ait pik yoğunluk değerlerini içeren tablo biçiminde istatistiksel analiz modülüne yüklenerek yapıldı. Sistem de ilk aşama olarak eksik değerler, veri setindeki en küçük pozitif değerin 1/5'i ile değiştirildi. Veriler, otomatik ölçekleme yöntemiyle (ortalama=0, standart sapma=1) standardize edildi. Bu işlem, gruplar arası karşılaştırmalarda değişkenlerin farklı ölçüm aralıklarından kaynaklanan varyans farklarını ortadan kaldırarak eşit ağırlıkta değerlendirilmesini sağlandı. Veri işleme sonrası örneklerin genel dağılımı PCA ön izleme grafiği ile kontrol edilerek olası uç değerlerin tespiti yapıldı. Veri setinin kalitesi onaylandıktan sonra çok değişkenli istatistiksel analizlere geçildi. Aynı işlemler İTP grubunun tedavi durumu ve ek hastalık durumu için ayrı ayrı ve aynı şekilde gerçekleştirildi.

3.7.2. Temel Bileşenler Analizi

İTP ve kontrol gruplarının genel metabolit profillerinin incelenmesi ve numuneler arasındaki benzerlik veya farklılıkların görselleştirilmesi amacıyla temel bileşen analizi (Temel Bileşenler Analizi, Principal Component Analysis, PCA) yapıldı. Analiz, normalize edilmiş pik listesinin MetaboAnalyst 6.0 platformunda, veri ön işleme adımlarının (eksik değer düzeltme, log10 dönüşümü yapılmadan ve otomatik ölçekleme) ardından gerçekleştirildi. PCA, çok değişkenli istatistiksel bir yöntem olup yüksek boyutlu metabolomik veriyi, varyansın en yüksek olduğu doğrusal bileşenler (principal components, PC) aracılığıyla iki veya üç boyutlu düzleme indirger. Grafiğin eksenlerinde ilk temel bileşen (PC1) ve ikinci temel bileşen (PC2) bileşenleri yer alır. PC1, veri noktalarının uzayda en yüksek veya en fazla varyansa sahip olduğu yöndür. PC1'de yakalanan değişkenlik ne kadar büyükse, orijinal veri kümesinden elde edilen bilgi de o kadar büyük olur. PC2, veri kümesinde PC1'den sonraki en yüksek varyansa sahip bileşendir ve PC1'e diktir. Metabolomik analizlerde PC1 ve PC2 toplam varyansın verilerin %50-70'ni açıklaması beklenir. Böylece verilerin birbirinden ne kadar ayrıldığı tespit edilir. Grup varyansları yüksek ve gruplar birbirinden ayrılmışsa gruplar arasında metabolit profilinin o kadar ayrıştığı söylenebilir. Analiz sonucunda elde edilen PCA skor grafiğinde, her bir nokta bir örneği temsil eder. Benzer metabolit profiline sahip örnekler grafikte birbirine yakın konumlanırken, farklı profillere sahip olanlar uzak konumda yer alır. Hasta ve kontrol grupları farklı renklerle ifade edilir. Grupların ayrışması, hastalık durumunda ortaya çıkan metabolit değişimlerinin genel örüntüsünü yansıtır. İTP ve

kontrol gruplarının oluşturulan PCA grafiği incelenerek gruplar arası ayrışmaya en fazla katkı sağlayan pikler belirlendi. Bu pik listeleri daha sonra anlamlılık analizi (volcano plot) ve yolak zenginleştirme analizinde değerlendirildi. PCA grafikleri pozitif ve negatif iyonlaşma modunda normalize edilmiş pik listeleri kullanılarak ayrı ayrı hazırlandı. Aynı işlemler İTP grubunun tedavi durumu ve ek hastalık durumu için ayrı ayrı ve aynı şekilde gerçekleştirildi.

3.7.3. Volkan Grafiği Analizi

İTP ve kontrol grupları arasında metabolit düzeylerinde meydana gelen anlamlı metabolitleri belirlemek amacıyla volkan grafiği (volcano plot) analizi gerçekleştirildi. Analiz, MetaboAnalyst 6.0 platformunda istatistiksel analiz modülünden yapılmış olup, normalize edilmiş pik listesi yüklenerek veri ön işleme adımında otomatik ölçeklendirme seçilerek yapıldı. Volcano grafiği, kat değişimi (fold change) ve istatistiksel anlamlılık (*p*-değeri) ölçütlerini birleştirerek metabolit düzeylerinde farklılık gösteren bileşenlerin görsel olarak değerlendirilmesini sağlar. Grafikte: X ekseni logaritmik DK [log2(değişim katsayı)] değerini, Y ekseni ise logaritmik *p* [log10(*p*)] değerini göstermektedir. Bu iki ölçüt birlikte değerlendirildiğinde, anlamlı düzeyde farklılık gösteren pikler grafiğin üst kısımlarında ve uç bölgelerinde yer alır. Pozitif log2(değişim katsayı) değeri hasta grubunda artış gösteren (yükselmiş) pikleri, negatif log2(değişim katsayı) değeri ise hasta grubunda azalmış pikleri temsil eder. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0.05$, DK sınırı ise $|\text{DK}| \geq 1.5$ olarak belirlendi. Bu kriterleri karşılayan metabolitler kırmızı (yükselmiş) veya mavi (azalmış) renklerle işaretlendi. Analiz sonucunda elde edilen volkan grafiği hangi piklerin hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı düzeyde değiştiğini görsel olarak ortaya koymuştur. Filtrelemeler sonucu anlamlı kabul edilen pik listesi indirilerek csv. dosya formatında kaydedilerek daha sonra sonra MetaboAnalyst 6.0 platformunda fonksiyonel analiz (functional analysis/LC/MS) modülüne yüklenerek anlamlı değişim gösteren piklerin hangi metabolitlerle eşleştiği tespit edildi. Volkan grafikleri pozitif ve negatif iyonlaşma modunda normalize edilmiş pik listeleri kullanılarak ayrı ayrı hazırlandı. Aynı işlemler İTP grubunun tedavi durumu ve ek hastalık durumu için ayrı ayrı ve aynı şekilde gerçekleştirildi.

3.7.4. Metabolit Tanımlama Analizi

Q-TOF LC–MS analizinden elde edilen m/z ve tR değerlerinin doğruluğunu artırmak İTP ve kontrol grupları arasında biyolojik olarak anlamlandırılması ve bilinen

metabolitlerle eşleştirilmesi amacıyla gerçekleştirildi. Metabolitlerin tanımlanması iki aşamalı olarak gerçekleştirildi:

Standart referans kütüphane ile kesin tanımlama (seviye 1): bu tanımlama ticari bir metabolomik standart kütüphane kiti (Mass Spectrometry Metabolite Library of Standards; IROA Technologies, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Standart referans kütüphane kiti üretici firmasının önerdiği şekilde hazırlandı ve her bir standart karışımı LC/MS sistemine aynı kromatografik koşullar altında enjekte edildi. Her metabolit için cihazdan referans tR ve *m/z* değerleri elde edildi. Bu standartlara ait veriler, numune analizlerinden elde edilen piklerle karşılaştırılarak metabolit tanımlama yapıldı. Analizde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı değişen piklerden tR ve *m/z* değerleri referans standart kütüphaneyle (in house) eşleşen pikler seviye 1 metabolit olarak sınıflandırıldı. Referans kütüphaneyle eşleşmeyen pikler *m/z* değerleri kullanılarak veri tabanı (KEGG ve HMDB) eşleşmesine dayalı tahmini adlandırma ile tanımlandı ve seviye 2 metabolit olarak sınıflandırıldı.

Veri tabanı eşleşmesine dayalı tahmini (putatif) tanımlama (seviye 2/3): analiz, her biri bir özelliği temsil eden *m/z* değeri ve her bir numuneye ait DK ve *p* değerlerini içeren tablo MetaboAnalyst 6.0 fonksiyonel analiz (Functional Analysis-LC/MS) modülüne yüklenerek yapıldı. Veri yükleme aşamasında "Functional Analysis →A peak list profile" modülü seçildi. Kütle tolerans aralığı ±5 ppm olarak seçildi. İyon türü pozitif iyonlaşma modu için [M+H]+, negatif iyonlaşma modu için [M+H]- seçildi. Analizde insan metabolom veri tabanı HMDB referans veri tabanı kullanıldı. Bu parametreler doğrultusunda MetaboAnalyst 6.0, girilen *m/z* değerlerini HMDB veri tabanındaki bilinen metabolitlerle karşılaştırmış ve her *m/z* değeri için olası metabolit adaylarını listelendi. Eşleşmelerin doğruluğu, sistem tarafından hesaplanan eşleşme puanı (match score) ile değerlendirildi. Eşleştirilen metabolit listesi indirilerek birden fazla eşleşmeler, yanlış eşleşmeler çıkarılarak kalan metabolitler listelendi. Tanımlanan her bir metabolite ait tR, *m/z* değeri, DK değeri ve *p* değeri belirlenerek metabolitler listelendi. Tanımlanan metabolit listeleri pozitif ve negatif iyonlaşma modu için ayrı ayrı hazırlandı olup listeler birleştirilerek sunuldu. Bu metabolitlerin İTP ve kontrol grubunda nasıl değiştiklerini belirlemek için ısı haritası grafiği, VIP skor grafiği ve yolak analizi aşamalarında detaylı olarak değerlendirildi. Aynı işlemler İTP grubunun tedavi durumu ve ek hastalık durumu için ayrı ayrı ve aynı şekilde gerçekleştirildi.

3.7.5. Isı Haritası Analizi

İTP ve kontrol grupları arasında hangi metabolitlerin hangi grupta değiştiğini tespit etmek amacıyla ısı haritası (heatmap) analizi uygulandı. Bu yöntem, benzer metabolit profiline sahip numuneleri ve birbirine yakın değişim gösteren metabolitleri gruplandırır. Sonuç olarak elde edilen dendrogram, örneklerin ve metabolitlerin kümelenme ilişkilerini görsel olarak ortaya koyar. Analizde satırlar metabolitleri, sütunlar ise bireysel örnekleri (İTP ve kontrol gruplarını) temsil etmektedir. Renk skalasında kırmızı tonlar yüksek yoğunluğu (artmış metabolit düzeyleri), mavi tonlar ise düşük yoğunluğu (azalmış metabolit düzeyleri) göstermektedir. Analiz MetaboAnalyst 6.0 platformunda, istatistiksel analiz modülünden (log10 dönüşümü yapılmadan ve otomatik ölçeklendirme uygulanmış) pozitif ve negatif iyonlaşma modu için ayrı ayrı tanımlanan metabolitlere ait normalize edilmiş pik şiddetlerinin birleştirmesiyle oluşturulan tablo yüklenerek gerçekleştirildi. MetaboAnalyst 6.0 yazılımında yer alan hiyerarşik kümeleme (hierarchical clustering) algoritması, Euclidean mesafesi ve Ward bağlantı metodu kullanılarak uygulandı. Hem pozitif hem negatif iyonlaşma modunda tanımlanmış metabolitler için normalize pik değerlerinden her bir numune için maksimum değer seçilerek gerçekleştirildi. Elde edilen ısı haritası, metabolitlerin İTP ve kontrol grubunda nasıl kümelendiğini ve bu kümelenmelerin biyokimyasal ilişkilerinin değerlendirilmesinde kullanıldı. Aynı işlemler İTP grubunun tedavi durumu ve ek hastalık durumunun değerlendirilmesi için ayrı ayrı ve aynı şekilde gerçekleştirildi.

3.7.6. Önemli Değişkenler Analizi

İTP ve kontrol grupları arasındaki tanımlanan metabolitler metabolit profillerinin sınıflandırılması ve gruplar arası ayrışmanın değerlendirilmesi amacıyla kısmi en küçük kareler ayırma analizi (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA) uygulandı. Analiz, pozitif ve negatif iyonlaşma modu için ayrı ayrı tanımlanan metabolitlere ait normalize edilmiş pik listesi yüklenerek gerçekleştirildi. PLS-DA modeli sonucunda her bir metabolitin modeldeki önem düzeyi önemli değişkenler analizi (Variable Importance in Projection, VIP) skoruyla belirlendi. VIP skoru, PLS-DA modelinde her bir metabolitin gruplar arasındaki ayrımı açıklamadaki önem derecesini gösteren istatistiksel bir ölçüttür. Bu skor, modelde yer alan metabolitlerin sınıflandırma performansına katkı düzeyini belirler ve hangi metabolitlerin biyolojik olarak anlamlı değişim gösterdiğini ortaya koyar. VIP skorları genellikle çubuk grafik (VIP score plot) olarak sunulur. Grafikte metabolitler azalan VIP skoruna göre sıralanır; en yüksek skorlar, gruplar arası ayrımda en etkili metabolitleri temsil eder. Çalışmada VIP skoru 1.0'dan büyük olan (VIP> 1)

metabolitler modelin ayrım gücüne anlamlı düzeyde katkı sağlayan değişkenler olarak kabul edildi. Aynı işlemler İTP grubunun tedavi durumu ve ek hastalık durumu için ayrı ayrı ve aynı şekilde gerçekleştirildi.

3.7.7. Metabolit Yolak Analizi

İTP ve kontrol grupları arasında anlamlı düzeyde farklılık gösteren metabolitlerin biyokimyasal yollarla ilişkisini belirlemek amacıyla metabolit zenginleştirme analizi (Metabolite Set Enrichment Analysis, MSEA) yapıldı. Analiz, MetaboAnalyst 6.0 platformunda bulunan HMDB ve KEGG veri tabanları kullanılarak gerçekleştirildi. Yolak analizi, seçilen metabolitlerin önceden tanımlı metabolit setlerinde (örneğin steroidogenez, amino asit metabolizması, lipid metabolizması vb.) anlamlı şekilde birikip birikmediğini test eder. İstatistiksel anlamlılık, hipergeometrik test yöntemiyle hesaplanır ve sonuçlar *p* değeri ile ifade edilir. Anlamlılık eşiği $p < 0.05$ olarak belirlendi. Sonuçlar, balon grafiği biçiminde görselleştirildi. Bu grafikte: yatay eksen: -log10(*p*) değerini (anlamlılık düzeyi) temsil eder. Balon büyüklüğü: zenginleşme oranını gösterir. Renk skalası: anlamlılık derecesini ifade eder (kırmızı tonlar yüksek anlamlılığı belirtir). Bu analiz, hastalık durumunda etkilenen biyokimyasal yolakların sistem düzeyinde belirlenmesini ve metabolit farklılıklarının biyolojik bağlamda yorumlanmasını sağladı.

3.7.8. Grafiklerin Elde Edilmesi

Elde edilen PCA, PLS-DA volkan grafiği, ısı haritası, VIP skor grafiği, yolak analizi ve ROC analizi görselleri, MetaboAnalyst 6.0 platformundaki indir→yüksek çözünürlüklü fotoğraf (PNG) seçeneği kullanılarak yüksek çözünürlükte (300 DPI) indirilmiş ve istatistiksel analiz sonuçlarının görsel sunumu olarak tezde kullanıldı.

3.8. Lipidomik Analizler

3.8.1. Lipidomik Numune Hazırlama

Lipidomik numune hazırlamada amaç, biyolojik örneklerdeki lipidlerin özgün yapısını koruyarak analize uygun şekilde izole edilmesini sağlamak ve güvenilir, doğru, biyolojik olarak anlamlı lipid profilleri elde etmektir. Bu amaçla genellikle kloroform ve metanol gibi bifazik solvent karışımları kullanılır. Bu amaçla hazırlanan plazma numunelerinden 0.1 mL plazma bir mikrosantrifüj tüpüne alındı üzerine 0.3 mL soğuk metanol:kloroform (1:2, h/h) eklendi. Bir dakika vorteklendi. Üzerine 0.1 mL distile su

eklendi. Bir dakika vortekslendikten sonra oda ısısında 30 dakika bekletildi. Bekletilen numuneler 7.000 rpm'de +4°C'de 25 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alt fazda bulunan kloroform fazından 0.1 mL yeni bir tüpe alındı vakum santrifüjde içerisindeki çözücü tamamen uzaklaşana kadar buharlaştırıldı. Kalan ekstrakt 0.1 mL izopropilalkol içerisinde yeniden çözüldü. Bir dakika vortekslendikten sonra 12.000 rpm'de +4 °C'de 25 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst fazdan 0.08 mL alınarak Q-TOF LC/MS analiz edildi.

3.8.2. Q-TOF LC/MS ile Lipidomik Analizler

Q-TOF LC/MS analizlerinde C18 ters faz kromatografi kolonu (2.1 x 100 mm, 2.5 µm, Xbridge Waters, Milford, USA) kullanıldı. Hareketli faz A; 1 M amonyum asetat ve %0.01 asetik asit içeren su, hareketli faz B; 1 M amonyum asetat ve %0.01 asetik asit içeren asetonitril:izopropilalkol (70:30, h/h) kullanıldı. Enjeksiyon hacmi 10 µL akış hızı 0.4 mL/dak idi. Kütle spektrometresi pozitif iyonlaşma modunda çalıştırıldı. Kromatografik koşullar metabolomik analizlerle aynı şekilde yürütüldü. Kromatografik analiz sonucu elde edilen numunelere ait ham kromatogramlar işlenerek veri analizi gerçekleştirildi. Kalite kontrol numuneleri, kör numuneleri ve havuz numuneleri metabolomik analiz kısmıyla aynı stratejiye göre hazırlandı. Tüm numuneler aynı gün hazırlandı ve aynı koşullar altında analiz edildi.

3.8.3. Lipidomik Veri Analizi

Lipidomik veri analizi, metabolomik analizlerde kullanılan veri işleme ve istatistiksel analiz iş akışı temel alınarak gerçekleştirildi. Q-TOF LC/MS analizi sonucu elde edilen ham veriler, metabolomik analizlerde olduğu gibi öncelikle MzMine 2.53 yazılım programı kullanılarak işlendi; pik tespiti, alıkonma zamanı hizalaması ve özellik çıkarımı adımları uygulandı. Elde edilen veri matrisi, analiz öncesinde kalite kontrol örnekleri esas alınarak değerlendirildi ve tekrarlanabilirliği düşük sinyaller analiz dışı bırakıldı. Analizler havuz numunelerinden (İTP havuz ve kontrol havuz) gerçekleştirildi. Metabolomik analizlerden farklı olarak, lipidomik analizde veri filtreleme ve anotasyon aşamalarında lipidlere özgü kriterler dikkate alındı. Bu kapsamda, lipid sinyalleri kütle doğruluğu, tR ve iyonlaşma modu uyumu açısından değerlendirildi; lipid sınıflarına özgü addukt yapıları göz önünde bulundurularak tahmini olarak tanımlama yapıldı. Çalışmada raporlanan lipidlerin biyolojik olarak daha anlamlı ve yorumlanabilir bir veri seti elde edilebilmesi ve olası yanlış pozitif eşleşmelerin önlenmesi amacıyla, veri setine bir dizi

filtreleme kriteri uygulandı. Bu kapsamda, tek karbonlu (odd-chain) yağ asitleri, ilaç ve ilaç metabolitleri, vitaminler ve lipid metabolizması ile doğrudan ilişkili olmadığı düşünülen bileşikler analiz dışı bırakıldı Özellikle hücre ve plazma lipidomunda biyolojik olarak nadir bulunan veya deneysel koşullarla ilişkili olabilecek bileşikler analiz dışı bırakıldı. İyonizasyon kaynaklı varyasyonları ve adduct çeşitliliğine bağlı yanlış anotasyon riskini azaltmak amacıyla, $[M+H]^+$ ve $[M+Na]^+$ adduktları öncelikli olarak değerlendirildi. Diğer addukt formları yalnızca bu iyonların tespit edilemediği durumlarda ikincil olarak dikkate alındı. Tanımlamalar, LIPID MAPS sınıflandırma sistemi temel alınarak gerçekleştirildi (105) ve eşleşmeler uygun kütüphaneler (HMDB ve KEGG) aracılığıyla doğrulandı.

4. BULGULAR

4.1. İTP ve Kontrol Grubuna Ait Bulgular

4.1.1. İTP ve Kontrol Grubuna Ait Demografik Veriler ve Tam Kan Sayımına ait Bulgular

Çalışmaya 41'i kontrol, 39'u İTP olmak üzere toplam 80 birey dahil edildi; İTP ve kontrol grubunun demografik verileri incelendiğinde; cinsiyet dağılımı açısından iki grup arasında anlamlı fark vardı, İTP grubunda kadın oranı belirgin şekilde daha yüksekti (p<0.001). Gruplar arasında yaş açısından ise çalışmaya katılanların yaş ortalamaları benzer bulundu (p=0.637). Çalışmada İTP tanılı bireyler ile kontrol grubunun hematolojik parametreleri karşılaştırıldığında; trombosit, eritrosit, hemoglobin ve hematokrit değerleri İTP grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde düşüktü (tüm p<0.001). Monosit değeri İTP grubunda anlamlı olarak yüksek bulundu (p=0.002). Buna karşın, lökosit, nötrofil, lenfosit ve ortalama eritrosit hacmi değerleri açısından iki grup arasında anlamlı fark yoktu (p>0.05) (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Kontrol ve İTP grubuna ait demografik veriler ve tam kan sayımı parametreleri

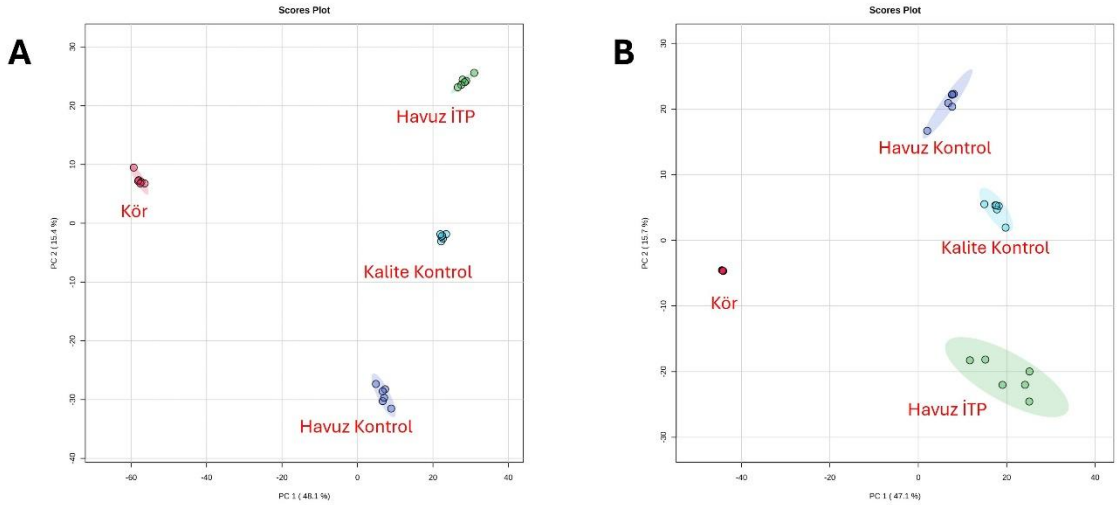
Değişkenler	**Kontrol Grubu (n=41)**	**İTP Grubu (n=39)**	***p*-Değeri**
	Yüzde % (n)	**Yüzde % (n)**	
Cinsiyet			
Kadın	12.2 (5)	69.2 (27)	<0.001*
Erkek	87.8 (36)	30.8 (12)	
	Ortalama ±SS	**Ortalama ±SS**	
Yaş (yıl)	42.60 ±8.56	43.82±14.20	0.637**
Trombosit (10^3/µL)	215.88±34.91	90.70±68.23	0.000**
Eritrosit (10^6/µL)	5.19±0.38	4.90±0.48	0.003**
Hemoglobin (g/dL)	15.80±1.23	13.51±1.55	<0.001**
Hematokrit (%)	45.28±3.05	41.92±4.01	0<.001**
	Median (min-maks)	**Median (min-maks)**	
Trombosit (10^3/µL)	212.00(149.00-295.00)	87.00(3.00-338.00)	<0.001***
Lökosit (10^3/µL)	7.70 (4.50-10.80)	8.63 (3.67-24.60)	0.099***

Monosit (10^3/µL)	0.50 (0.30-0.80)	0.65 (0.90-1.97)	0.002***
Nötrofil (10^3/µL)	5.00 (2.70-8.50)	5.22 (1.56-21.12)	0.331***
Lenfosit (10^3/µL)	2.40 (1.10-4.60)	2.37 (1.04-6.46)	0.969***
Ortalama Eritrosit Hacmi (fL)	86.06 (52.50-95.40)	85.70 (71.70-94.90)	0.277***

İTP: İmmün trombositopeni purpura, SS: Standart Sapma, * Ki-kare **Bağımsız gruplarda t-testi, ***Mann Whitney U Testi, p<.0.05.

4.1.2. İTP ve Kontrol Grubu Metabolomik Analizlerine Ait Bulgular

Yapılan veri değerlendirmesi sonuçlarına göre İTP ve kontrol grubu numunelerinden hazırlanan kör, havuz ve kalite kontrol numunelerine ait PCA grafiği incelendiğinde; pozitif iyonlaşma modunda verilerdeki toplam varyansın %63,50'ini ilk iki bileşen (PC1: %48.10; PC2: %15.40) tarafından açıklandığı görüldü. Negatif iyonlaşma modunda verilerdeki toplam varyansın %62.80'ini ilk iki bileşen (PC1: %47.10; PC2: %15.70) tarafından açıklandığı görüldü. Kör numunelerinin havuz ve kalite kontrol numunelerinden kalite kontrol ve havuz numunelerinin ise birbirinden belirgin şekilde ayrıldığı görüldü (Şekil 4.1).

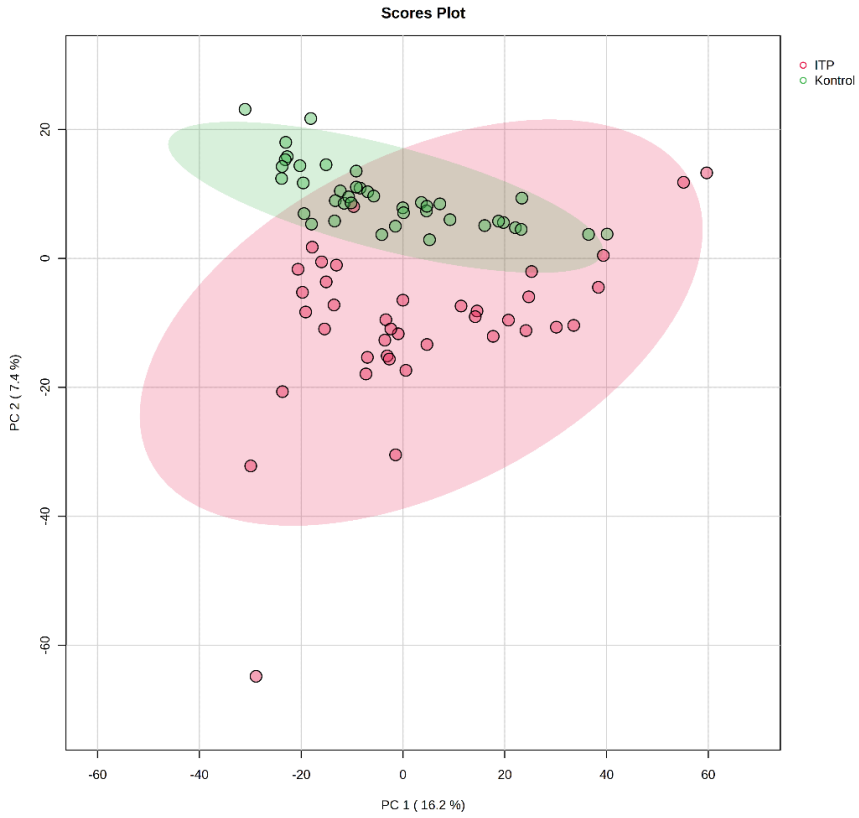


A: pozitif iyonlaşma modu, B: negatif iyonlaşma modu

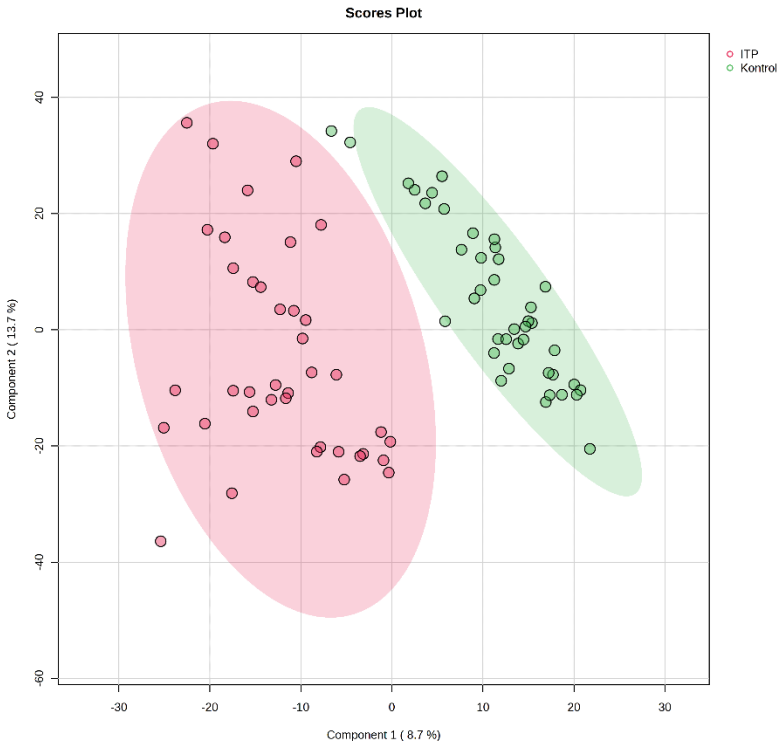
Şekil 4.1. Kalite kontrol ve havuz numunelerine ait PCA grafiği

İTP ve kontrol grubuna ait PCA grafiği incelendiğinde; pozitif iyonlaşma modunda iki temel bileşen olan PC1 ve PC2'nin sırasıyla %16.20 ve %7.40 olduğu ve verilerdeki toplam varyansın %23.60'ını oluşturduğu görüldü (Şekil 4.2). PLS-DA grafiği incelendiğinde iki grubun komponent 1 (%8.7 0) ve komponent 2 (13.70) eksenleri boyunca büyük ölçüde ayrıldığı ve yalnızca sınırlı bir örtüşme alanı bulunduğu gözlendi

(Şekil 4.3). Skor grafiğindeki bu ayrışma, İTP hastalarında metabolik profilin sağlıklı bireylerden sistematik olarak farklılaştığını ortaya koymaktadır.



Şekil 4.2. Pozitif iyonlaşma modu İTP ve kontrol gruplarına ait PCA grafiği

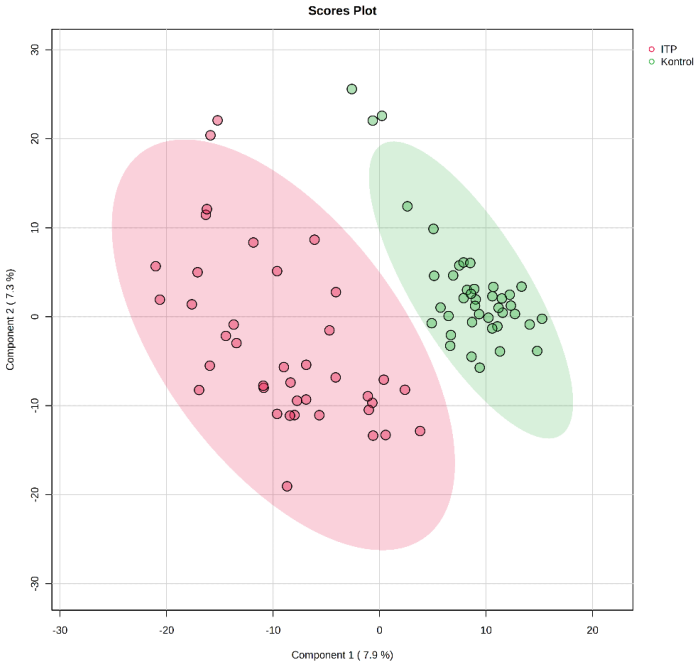


Şekil 4. 3. Pozitif iyonlaşma modu İTP ve kontrol gruplarına ait PLS-DA grafiği

Negatif iyonlaşma modunda PCA grafiği incelendiğinde iki temel bileşen olan PC1 ve PC2'nin toplam varyansın %16.60'ını oluşturduğu görüldü (Şekil 4.4). İTP ve kontrol grupları belirli ölçüde ayrıldığı ve her iki grup arasında kısmi bir kümelenme farkı gözlendi. İTP grubunun daha geniş bir varyasyon aralığına sahip olduğu kontrol grubunun ise daha sıkı bir dağılım gösterdiği, belirlendi. PLS-DA grafiği incelendiğinde iki grubun komponent 1 (%9.90) ve komponent 2 (7.30) eksenleri boyunca büyük ölçüde ayrıldığı ve yalnızca sınırlı bir örtüşme alanı bulunduğu gözlendi (Şekil 4.5).

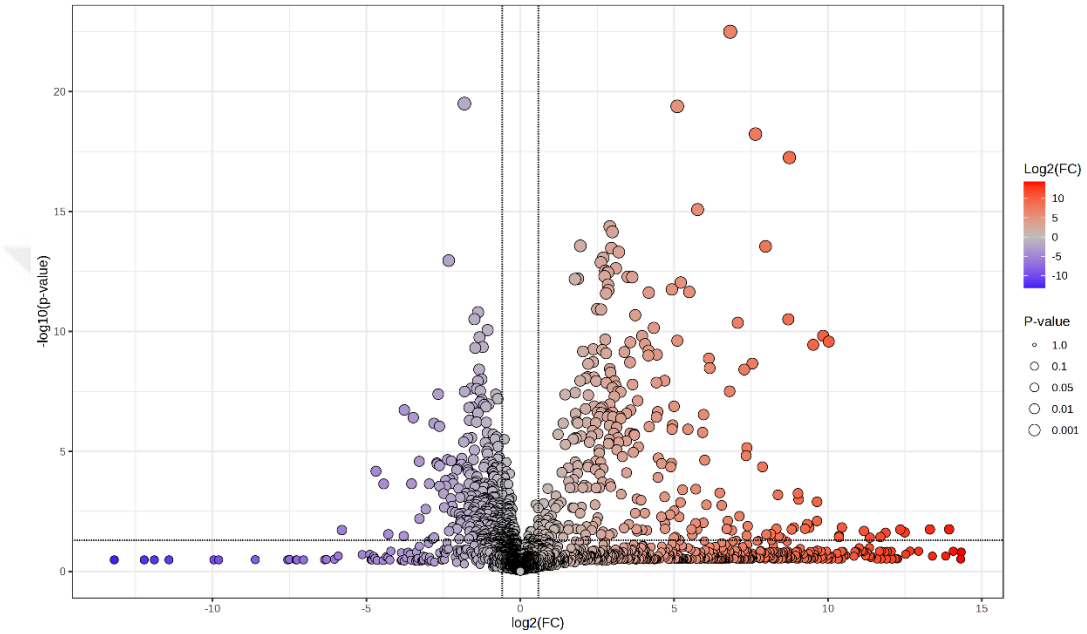


Şekil 4.4. Negatif iyonlaşma modu İTP ve kontrol gruplarına ait PCA grafiği



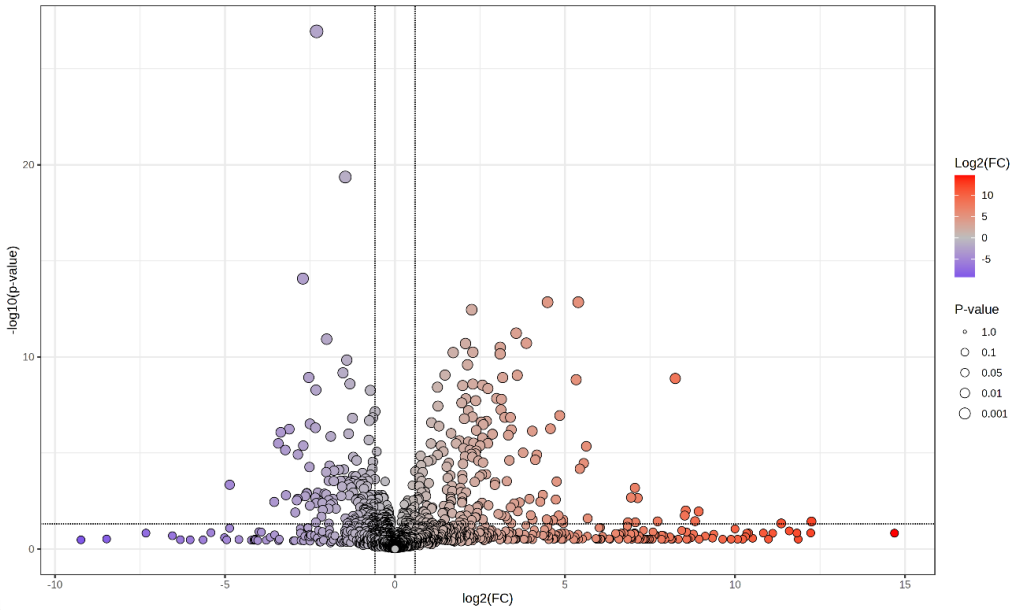
Şekil 4.5. Negatif iyonlaşma modu İTP ve kontrol gruplarına ait PLS-DA grafiği

İTP ve kontrol grubu arasında yapılan volkan grafiği analizine sonuçlarına göre; pozitif iyonlaşma modunda istatiksel olarak anlamlı değişim gösteren toplam 581 pik tespit edildi. Bu piklerden 291'nin artış gösterdiği, 290'nın azaldığı bulundu (Şekil 4.6). Negatif iyonlaşma modunda ise gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı değişim gösteren toplam 337 pik tespit edildi. Bu piklerden 193'nün artış gösterdiği, 144'ünün azaldığı bulundu (p <0.05 DK ≥1.5) (Şekil 4.7).



Gruplar arasında istatistiksek olarak anlamlı değişen pikleri gösterir. Sol taraf mavi noktalar azalan pikleri, sağ taraf kırmızı noktalar artan pikleri gösterir. Azalan pik sayısı (sol taraf) 290, artan pik sayısı (sağ taraf) 291, Toplam istatistiksel olarak anlamlı değişen pik sayısı 581 (p <0.05 DK ≥1.5).

Şekil 4.6. Pozitif iyonlaşma modu İTP ve kontrol grubuna ait volkan grafiği



Azalan pik sayısı (sol taraf) 144, artan pik sayısı (sağ taraf) 193, Toplam istatistiksel olarak anlamlı değişen pik sayısı 337 (p <0.05 DK ≥1.5).

Şekil 4.7. Negatif iyonlaşma modu İTP ve kontrol grubuna ait volkan grafiği

İTP ve kontrol grubu arasında yapılan metabolit tanımlama analizine göre; pozitif ve negatif iyonlaşma modunda istatistiksel olarak anlamlı değişim gösteren toplam 58 metabolit tespit edildi. Tespit edilen metabolitlerden 4 tanesi referans standart kütüphaneyle eşleşen seviye 1 metabolit, 54 tanesi tahmini eşleşme seviye 2 metabolit olarak tanımlandı. Tanımlanan metabolitler metabolit sınıflarına göre en fazla lipid ve türevleri (%49.09), organik asit ve türevleri (%20.00) ve organo heterosiklik bileşikler (%16.36) olduğu bulundu (Tablo 4.2).

Tablo 4. 2. Tanımlanan metabolitlerin bileşik sınıflarına göre listesi ve yüzde değerleri

Metabolit sınıfı	**Eşleşen Metabolitler**	**Yüzde Oranı (metabolit sayısı)**
Lipidler ve lipit benzeri moleküller	Androsteron, Androstenedion, Kortizol, Testosteron, Stearik asit, Dehidroepiandrosteron sülfat, Dolikil b-D-glukozil fosfat, Lökotrien A4, Prostaglandin H2, Progesteron, Dokosaheksaenoik asit, Prostaglandin E3, Prostaglandin A2, Kortizon, Androsteron glukuronid, Vitamin	49.09 (27)

	K1 2,3-epoksit, Prostaglandin B1, Testosteron glukuronid, 3a,7a,12a-Trihidroksi-5b-kolestan-26-al, Kalsidiol, 13-L-Hidroperoksilinoleik asit, 11-Dehidrokortikosteron, 13-OksoODE, 4-Hidroksiretinoik asit, Stearidonik asit, Chenodeoksiglikolik asit, Psikozin sülfat,	
Organik asitler ve türevleri	Fenilalanin, Tiroksin, Süksinik asit, L-Arginin, N1-Asetilspermin, Asimetrik dimetilarginin, 2-Oksovalerik asit*, N1, N12-Diasetilspermin, Biyositin, D-Glutamin, Oksalosüksinik asit	20.00 (11)
Organoheterosiklik bileşikler	Biyotin, L-Triptofan, Biliverdin, Adenozil kobirinik asit a,c diamid, Protoporfirinojen IX, 5-Metoksiindolasetat, N-Metilserotonin, D-Glukuron-6,3-lakton*, 6-Metilmerkaptopürin	16.36 (9)
Benzenoidler	3,4-Dihidroksimandelik asit, Salisilik asit*, 4-Hidroksifenilasetaldehit, Fenilasetaldehit, 2-Aminobenzensülfonik asit*	9.09 (5)
Nükleositler, nükleotidler ve analogları	Guanosin, S-Adenozilmetioninamin	3.64 (2)
Organik oksijen bileşikleri	Kitobiyoz	1.82 (1)

*seviye 1 metabolit

Tanımlanan metabolitlere ait *m/z* değerleri, alıkonma zamanları, *p* değerleri, yüzde bağıl standart sapma değerleri, VIP skorları, DK değerleri ve hangi iyonlaşma modunda tespit edildikleri Tablo 4.3'te sunuldu. Tanımlanan metabolitler arasında en yüksek VIP skoruna ait metabolitler; prostaglandin H2 (VIP=3.09), testosteron (VIP=3.04), protoporfirinojen IX (VIP=2.99), 11-dehidrokortikosteron (VIP=2.87, DK=4.89), asimetrik dimetilarginin (VIP=2.79) 4-hidroksiretinoik asit (VIP=2.63), prostaglandin A2 (VIP=2.35), progesteron (VIP=2.27), N1,N12-Diasetilspermin (VIP=2.27),

prostaglandin E3 (VIP=2.17), Kortizol (VIP=2.17), dolikil b-D-glukozil fosfat (VIP=2.12), N1-Asetilspermin (VIP=2.11), fenilalanin (VIP=2.09), lökotrien A4 (VIP=2.08) kontrol grubuna göre İTP grubunda artarken, dehidroepiandrosteron sülfat (VIP=2.94), 2-Oksovalerik asit (VIP=2.82), oksalosüksinik asit (VIP=2.62), 13-OksoODE (VIP=2.06,) kontrol grubuna göre İTP grubunda azaldı (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. İTP ve kontrol grubu arasında anlamlı değişen metabolitlerin listesi

Sıra	*m/z*	Eşleştiği Form	Metabolit Adı	HMDB Kodu	tR (dak)	%BSS	VIP skor	*p* Değeri	DK	Değişim	İyonlaşma
1	389.1984	M+HCOO [-]	11-Dehidrokortikosteron	HMDB0004029	8.19	26.50	2.87	<0.001	4.89	↑	-
2	335.2190	M+Na [1+]	13-L-Hidroperoksilinoleik asit	HMDB0003871	6.81	13.87	1.29	0.006	5.73	↑	+
3	329.1887	M+Cl [-]	13-Oksozit	HMDB0004668	6.86	29.43	2.06	<0.001	7.25	↓	-
4	174.0195	-	2-Aminobenzensülfonik asit*	HMDB0304940	0.82	17.05	1.51	0.049	1.51	↑	+
5	115.0411	-	2-Oksovalerik asit*	HMDB0001865	1.23	15.28	2.82	<0.001	2.67	↓	-
6	183.0300	M-H [-]	3,4-Dihidroksimandelik asit	HMDB0001866	1.09	17.97	1.40	0.004	4.39	↓	-

7	218.1772	M+2H [2+]	3a,7a,12a-Trihidroksi-5b-kolestan-26-al	HMDB0003533	3.93	12.39	1.45	0.002	2.35	↑	+
8	83.0141	M-H [-]	3-Bütinoat	METPA0766	5.86	4.31	1.41	0.004	4.71	↓	-
9	183.0642	M+K [1+]	4-Guanidinobütanamid	METPA0359	0.75	11.29	1.23	0.008	3.85	↓	+
10	137.0603	M+H [1+]	4-Hidroksifenilasetaldehit	HMDB0003767	0.79	19.47	1.41	0.002	1.50	↑	+
11	315.1960	M-H [-]	4-Hidroksiretinoik asit	HMDB0006254	9.51	19.40	2.63	<0.001	6.64	↑	-
12	204.0665	M-H [-]	5-Metoksiindolasetat	HMDB0004096	6.36	2.48	1.76	<0.001	1.51	↓	-
13	167.0384	M+H [1+]	6-Metilmerkaptopürin	HMDB0060412	3.60	12.48	1.25	0.007	3.49	↓	+
14	605.2286	M+H+Na [2+]	Adenozil kobirinik asit a,c diamid	HMDB0001083	5.53	16.56	1.35	0.004	13.33	↑	+
15	144.1043	M+2H [2+]	Androstenedion	HMDB0000053	0.79	3.55	1.25	0.007	3.37	↓	+

16	325.1927	M+Cl [-]	Androsteron	HMDB0000031	8.64	29.19	1.71	<0.001	1.99	↑	-
17	481.2424	M-H+O [-]	Androsteron glukuronid	HMDB0002829	7.22	9.62	1.73	<0.001	1.96	↓	-
18	237.1117	M+Cl [-]	Asimetrik dimetilarginin	HMDB0001539	6.32	14.12	2.79	<0.001	4.38	↑	-
19	565.2441	M-H2O+H [1+]	Biliverdin	HMDB0001008	6.71	6.47	1.65	<0.001	2.78	↓	+
	581.2399	M-H [-]	Biliverdin	HMDB0001008	8.58	5.88	1.33	0.006	1.55	↓	-
20	387.1717	M-H+O [-]	Biyositin	HMDB0003134	6.76	29.47	1.32	0.007	2.03	↓	-
21	217.1007	M-CO+H [1+]	Biyotin	HMDB0000030	0.83	20.70	1.69	<0.001	1.50	↓	+
22	212.1651	M+H+Na [2+]	Kalsidiol	HMDB0003550	4.46	11.28	1.48	0.001	1.95	↓	+
23	486.2798	M+Cl37 [-]	Kenodeoksiglikolik asit	HMDB0006898	8.81	15.48	1.17	0.017	2.13	↓	-
24	459.1397	M+Cl [-]	Kitobiyoz	HMDB0003556	8.64	26.19	1.93	<0.001	3.80	↓	-

25	421.2230	M+CH3COO [-]	Kortizol	HMDB0000063	9.06	23.67	2.17	<0.001	3.48	↑	-
26	405.1913	M+HCOO [-]	Kortizon	HMDB0002802	7.30	22.80	1.49	0.002	1.60	↑	-
	379.2115	M+H2O+H [1+]	Kortizon	HMDB0002802	3.95	15.82	1.13	0.016	2.38	↑	+
27	367.1595	M-H [-]	Dehidroepiandrosteron sülfat	HMDB0001032	8.96	3.43	2.94	<0.001	4.03	↓	-
	333.1513	M-H4O2+H [1+]	Dehidroepiandrosteron sülfat	HMDB0001032	5.32	2.35	1.37	0.003	2.05	↓	+
28	175.0271	-	D-Glukurono-6,3-lakton*	HMDB0006355	1.11	10.13	1.84	<0.001	1.94	↓	-
29	145.0625	M-H [-]	D-Glutamin	HMDB0003423	5.42	3.06	1.35	0.006	1.92	↑	-
30	328.2386	M [1+]	Dokosaheksaenoik asit	HMDB0002183	7.54	22.27	1.29	0.006	1.71	↓	+
31	431.2194	M-H4O2+H [1+]	Dolikil b-D-glukozil fosfat	HMDB0001054	7.79	8.06	2.12	<0.001	13.02	↑	+
32	302.1105	M+H2O+H [1+]	Guanosin	HMDB0000133	4.97	24.47	1.69	<0.001	2.22	↓	+

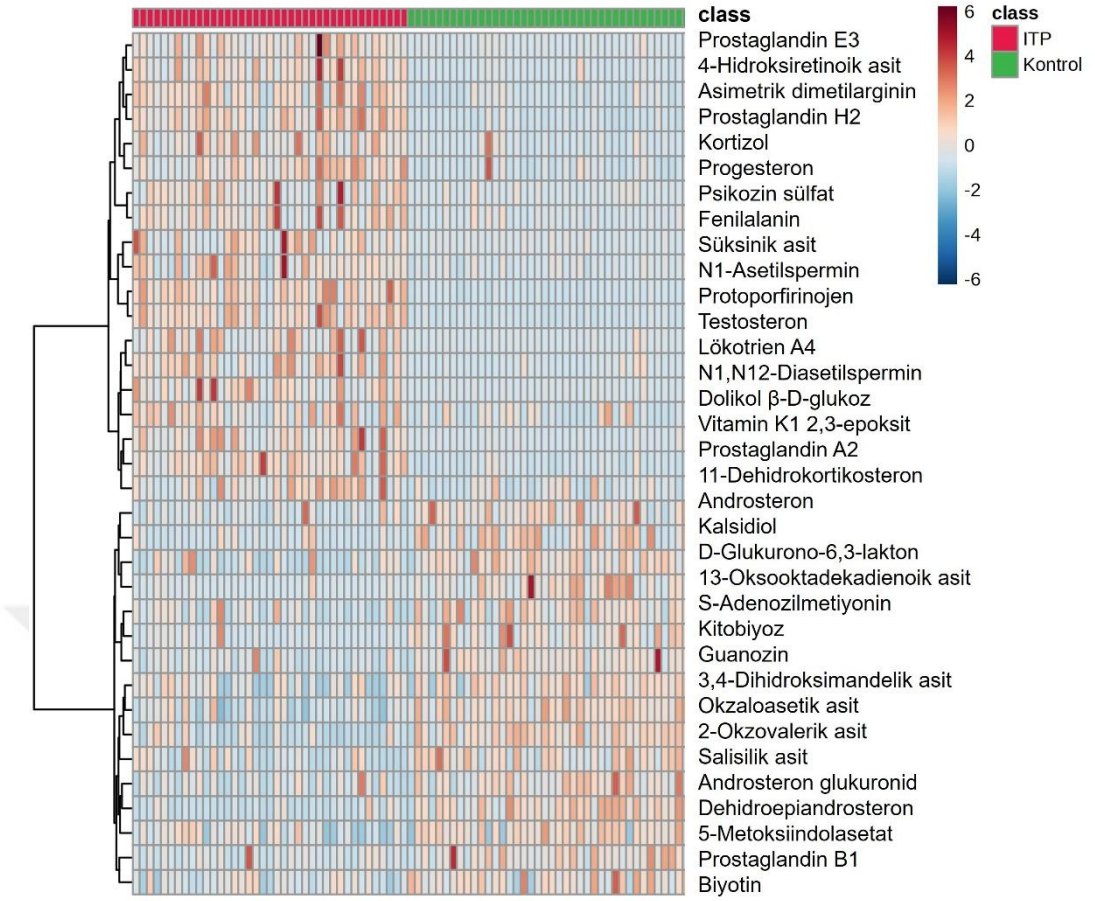
33	197.1017	M+Na [1+]	L-Arginin	HMDB0000517	3.78	18.49	1.06	0.025	1.91	↓	+
34	317.2110	M-H [-]	Lökotrien A4	HMDB0001337	9.04	29.64	2.08	<0.001	13.61	↑	-
35	203.0828	M-H [-]	L-Triptofan	HMDB0000929	4.56	5.73	1.30	0.008	1.72	↓	-
36	305.2541	M+H2O+H [1+]	N1, N12-Diasetilspermin	HMDB0002172	9.21	9.51	2.27	<0.001	6.20	↑	+
37	263.2439	M+H2O+H [1+]	N1-Asetilspermin	HMDB0001186	5.22	22.98	2.11	<0.001	2.34	↑	+
38	310.1147	M+H [1+]	N-Asetilnöraminat	-	5.05	7.56	1.92	<0.001	3.72	↓	+
39	225.0802	M+Cl [-]	N-Metilserotonin	HMDB0004369	7.66	14.74	1.10	0.025	2.75	↓	-
40	224.9801	M+Cl [-]	Oksalosüksinik asit	HMDB0003974	1.10	7.56	2.62	<0.001	1.65	↓	-
41	119.0497	M-H [-]	Fenilasetaldehit	HMDB0006236	7.35	19.68	1.54	0.001	4.06	↓	-
42	120.0808	M-HCOOH+H [1+]	Fenilalanin	HMDB0000159	4.17	26.56	2.09	<0.001	3.46	↑	+

43	359.2238	M+HCOO [-]	Progesteron	HMDB0001830	9.99	24.69	2.27	<0.001	3.14	↑	-
44	333.2055	M-H [-]	Prostaglandin A2	HMDB0002752	8.76	18.37	2.35	<0.001	6.04	↑	-
45	337.2386	M+H [1+]	Prostaglandin B1	HMDB0002982	7.48	14.68	1.79	<0.001	10.95	↑	+
46	365.1972	M-H+O [-]	Prostaglandin E3	HMDB0002664	8.45	15.01	2.17	<0.001	6.63	↑	-
47	351.2183	M-H [-]	Prostaglandin H2	HMDB0001381	9.38	23.71	3.09	<0.001	4.77	↑	-
48	551.3014	M-H2O+H [1+]	Protoporfirinojen IX	HMDB0001097	4.15	8.45	2.99	<0.001	6.14	↑	+
49	506.2791	M-H4O2+H [1+]	Psikozin sülfat	HMDB0013046	4.15	11.24	1.83	<0.001	5.79	↑	+
50	375.1210	M+Na-2H [-]	S-Adenozilmetioninamin	HMDB0000988	6.89	10.19	1.63	0.001	1.88	↓	-
51	181.0422	-	Salisilik asit*	HMDB0001895	1.14	6.70	1.68	<0.001	2.01	↓	-
52	141.1282	M-2H [2-]	Stearik asit	HMDB0000827	9.02	5.19	1.17	0.017	1.57	↓	-

53	137.0966	M-2H [2-]	Stearidonik asit	HMDB0006547	7.50	29.30	1.01	0.041	3.73	↑	-
54	99.0090	M-H2O-H [-]	Süksinik asit	HMDB0000254	9.43	28.03	1.97	<0.001	6.01	↑	-
55	288.2075	M [1+]	Testosteron	HMDB0000234	4.15	9.41	3.04	<0.001	7.79	↑	+
56	509.2374	M+HCOO [-]	Testosteron glukuronid	HMDB0003193	7.42	16.34	1.03	0.037	1.73	↓	-
57	775.6776	M-H [-]	Tiroksin	HMDB0000248	7.83	11.80	1.13	0.022	1.53	↓	-
58	466.3469	M [1+]	Vitamin K1 2,3-epoksit	HMDB0002972	9.77	17.47	1.56	0.001	2.23	↑	+

m/z: Kütle yük oranı, HMDB: İnsan metabolomu veri bankası, tR: Alıkonma zamanı, %BSS: Yüzde bağıl standart sapma, DK: Değişim katsayısı↑: Kontrol grubuna göre İTP grubunda artan, ↓: Kontrol grubuna göre İTP grubunda azalan, +: Pozitif iyonlaşma modu, -:Negatif iyonlaşma modu, *seviye 1 metabolit. $p<0.05$, DK>1.5, VIP>1.0, %BSS<30

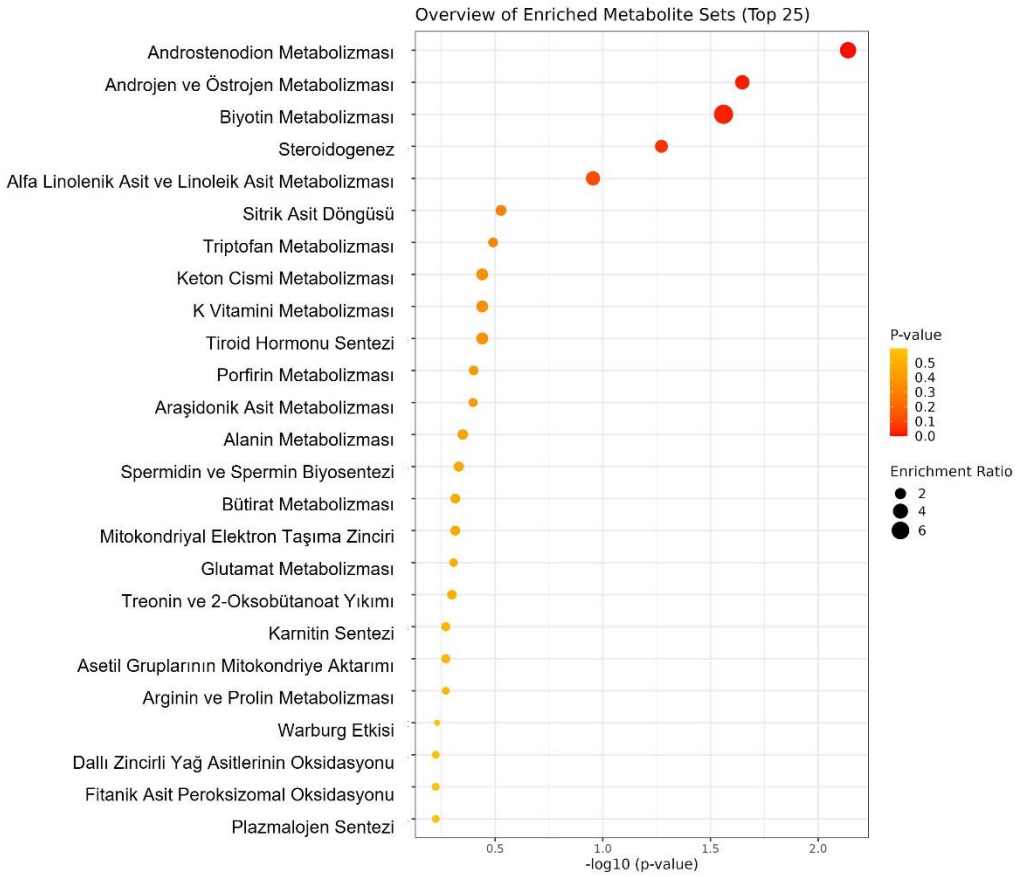
İTP ve kontrol grupları arasındaki metabolitlere ait ısı haritası grafiği incelendiğinde; metabolit düzeylerinin gruplar arasında farklı olduğu bulundu (Şekil 4.8). İTP grubunda Testosteron, protoporfirinojen IX, 11-Dehidrokortikosteron, asimetrik dimetilarginin, 4-Hidroksiretinoik asit, prostaglandin A2, progesteron metabolitlerin daha yüksek düzeylerde (kırmızı tonlar) yoğunlaştığı, buna karşılık kontrol grubunda aynı metabolitlerin daha düşük düzeylerde (mavi tonlar) bulunduğu gözlendi. İTP grubunda metabolitlerin dağılımı daha genişti; bazı örneklerde belirgin artış veya azalışlar gözlendi. Kontrol grubunda renk dağılımı daha dengeli ve metabolit seviyelerinde daha az varyasyon gözlendi (Şekil 4.8).



Pembe sütunlar (sol taraf); İTP grubunu, yeşil sütunlar (sağ taraf); kontrol grubunu temsil etmektedir. Her bir sütun bir numuneyi göstermektedir. Dikey eksende metabolit isimleri göstermektedir. Renk skalası: kırmızı tonları, metabolit düzeylerinin yüksek olduğunu, mavi tonları, metabolit düzeylerinin düşük olduğunu, beyaz tonlar, nötr veya ortalama değerlere yakın olduğunu göstermektedir ($p < 0.05$ DK ≥ 1.5, VIP>1.0) (pozitif ve negatif iyonlaşma modu).

Şekil 4.8. İTP ve Kontrol grubu arasında anlamlı değişen metabolitlere ait ısı haritası grafiği

İTP ve kontrol grubu arasında anlamlı değişen metabolitlerin en fazla eşleştiği yolaklar incelendiğinde en fazla metabolit androstenodion metabolizması, androjen ve östrojen metabolizması, biyotin metabolizması ve steroidogenez yolakları ile eşleştiği bulundu (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. İstatistiksel olarak anlamlı değişim gösteren metabolitlerin eşleştiği yolaklar

Yolak analizinde metabolit setlerinin eşleştiği yolaklara ait *p* değeri, yanlış keşif oranı ve hangi yolakta kaç metabolitin eşleştiği Tablo 4.4'te sunuldu.

Tablo 4.4. İTP ve kontrol grubu arasında değişen metabolitlerin eşleştiği yolaklara ait metabolit sayıları, *p* değeri ve yanlış keşif oranı değerleri

Yolak adı	**Eşleşen Metabolitler**	***p* değeri**	**Yanlış keşif oranı**
Androstenedion metabolizması	Androsteron, Androstenedion, Testosteron, Androsteron glukuronid	0.007	0.712
Androjen ve östrojen metabolizması	Androstenedion, Testosteron, Dehidroepiandroste ron sülfat,	0.023	0.900

	Testosteron glukuronid		
Biyotin metabolizması	Biotin, Biyositin	0.028	0.900
Steroidogenez	Kortizol; Progesteron, Kortizon, 11-Dehidrokortikosteron	0.053	1.0
Alfa linolenik asit ve linoleik asit metabolizması	Dokosaheksaenoik asit, Stearidonik asit	0.111	1.0
Sitrik asit döngüsü	Biotin, Süksinik asit	0.297	1.0
Triptofan metabolizması	L-Triptofan, 5-Metoksiindolasetat, N-Metilserotonin	0.323	1.0
Porfirin metabolizması	Biliverdin, Protoporfirinojen IX	0.398	1.0
Araşidonik asit metabolizması	Lökotrien A4; Prostaglandin H2, Prostaglandin A2	0.400	1.0
Glutamat metabolizması	Biotin, Süksinik asit	0.493	1.0
Arginin ve prolin metabolizması	Süksinik asit, L-Arginin	0.536	1.0
Warburg etkisi	Biotin, Süksinik asit	0.588	1.0
Valin, lösin ve izolösin yıkımı	Biotin, Süksinik asit	0.607	1.0
Tirozin metabolizması	Tiroksin, 3,4-Dihidroksimandelik asit	0.702	1.0

4.1.3. İTP ve Kontrol Grubu Arasındaki Cinsiyet Farklılığının Metabolomik Sonuçlara Etkisi

Tablo 4.3'te sunulan 58 anlamlı metabolitin cinsiyet bağımlılığı açısından değerlendirilmesi sonucunda, toplam 11 metabolitin doğrudan cinsiyete bağlı olduğu ve bu metabolitlerin İTP ve kontrol karşılaştırmasındaki anlamlılığının büyük ölçüde gruplar arası cinsiyet farklılığından kaynaklanıyor olabileceği belirlenmiştir. Bu metabolitler ve cinsiyet bağımlılık gerekçeleri Tablo 4.5'te sunuldu.

Tablo 4.5. Cinsiyet farklılığından doğrudan etkilenen metabolitler

Metabolit	**HMDB**	**İTP VIP**	**DK**	**Yön**	**Cins. VIP**	**Cinsiyet Bağımlılık Gerekçesi**
Testosteron	HMDB0000234	3.04	7.79	↑	1.35	Androjen; erkeklerde 10-20 kat yüksek
Progesteron	HMDB0001830	2.27	3.14	↑	1.05	Seks hormonu; menstrüel döngüye bağlı
DHEA sülfat	HMDB0001032	2.94	4.03	↓	-*	Androjen prekürsörü; erkeklerde yüksek
Kortizol	HMDB0000063	2.17	3.48	↑	1.06	HPA ekseni; steroid tedavi etkisi
Kortizon	HMDB0002802	1.49	1.60	↑	1.43	Kortizol metaboliti; yüksek cinsiyet VIP
11-Dehidrokortikosteron	HMDB0004029	2.87	4.89	↑	-	Glukokortikoid metaboliti
Androsteron	HMDB0000031	1.71	1.99	↑	-	Androjen metaboliti
Androsteron glukuronid	HMDB0002829	1.73	1.96	↓	-	Androjen konjugatı
Androstenedion	HMDB0000053	1.25	3.37	↓	-	Androjen; cinsiyet dimorfik

Testosteron glukuronid	HMDB0003193	1.03	1.73	↓	1.23	Androjen konjugatı
Kalsidiol	HMDB0003550	1.48	1.95	↓	-	Vitamin D; cinsiyet dimorfik

İTP VIP: İTP vs kontrol PLS-DA modelinden elde edilen VIP skoru; DK: Değişim katsayısı (İTP/kontrol); Yön (↑artış, ↓azalış): Kontrol grubuna göre İTP grubundaki değişim yönü; Cins. VIP: Kadın vs erkek İTP hastaları PLS-DA modelinden elde edilen VIP skoru. *DHEA sülfatın bilinen cinsiyet dimorfizmine rağmen cinsiyet modelinde anlamsız çıkması, modelin sınırlılığını veya veri girişi hatasını düşündürmektedir.

PLS-DA modelinde anlamlı VIP skorlarına sahip olup birincil olarak cinsiyet hormonu sınıfında yer almayan metabolitlerin VIP skorları, cinsiyete göre VIP skorları ve açıklamaları Tablo 4.6'da sunuldu.

Tablo 4.6. Cinsiyet etkisinden kısmen etkilenebilecek metabolitler

Metabolit	**İTP VIP**	**Yön**	**Cins. VIP**	**Risk**	**Açıklama**
Protoporfirinojen IX	2.99	↑	1.60	Yüksek	Testosterone ile aynı tR (4.15); co-elution riski
13-OxoODE	2.06	↓	1.28	Orta	Lipid peroksidasyon ürünü
Prostaglandin A2	2.35	↑	1.25	Orta	Araşidonik asit metaboliti
Dolikil b-D-glukozil fosfat	2.12	↑	1.14	Düşük-Orta	Glikolipid metabolizması
Stearik asit	1.17	↓	1.74	Yüksek	Cinsiyet VIP > İTP VIP
Stearidonik asit	1.01	↑	1.39	Yüksek	Cinsiyet VIP > İTP VIP
Süksinik asit	1.97	↑	1.11	Düşük-Orta	TCA döngüsü; kısmi cinsiyet etkisi
Lökotrien A4	2.08	↑	1.01	Düşük	İnflamatuar medyatör

Yön (↑artış, ↓azalış): Kontrol grubuna göre İTP grubundaki değişim yönü. Risk: Cinsiyet VIP skoru ve biyolojik bağlam göz önüne alınarak değerlendirilen karıştırıcı etki riski.

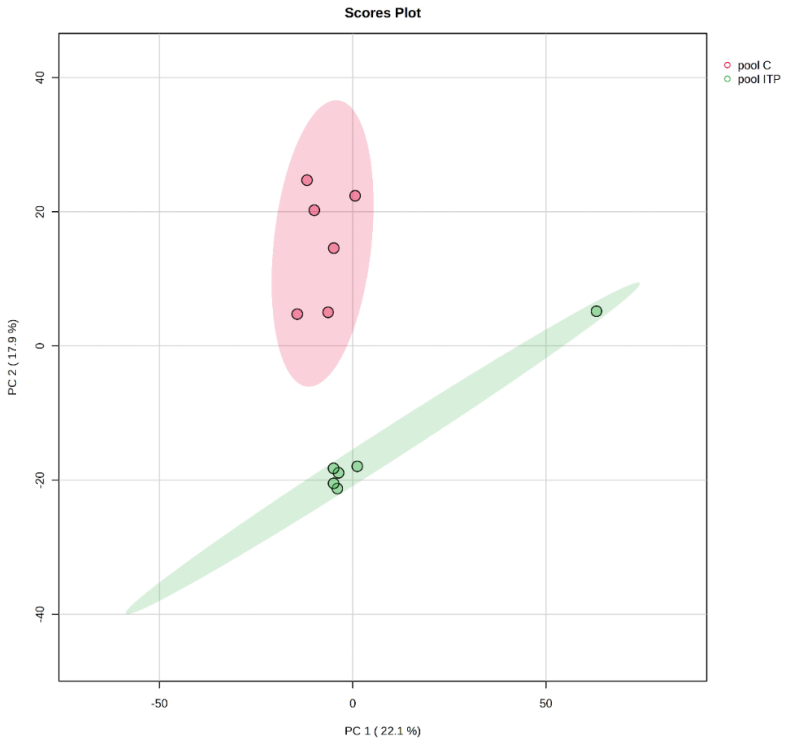
PLS-DA modelinde VIP skoru <1.0 olan ve biyolojik olarak doğrudan cinsiyete bağımlı olmayan metabolitler Tablo 4.7'de sunuldu.

Tablo 4.7. Cinsiyet etkisinden bağımsız görünen ve İTP fizyopatolojisi için güçlü aday biyobelirteçler

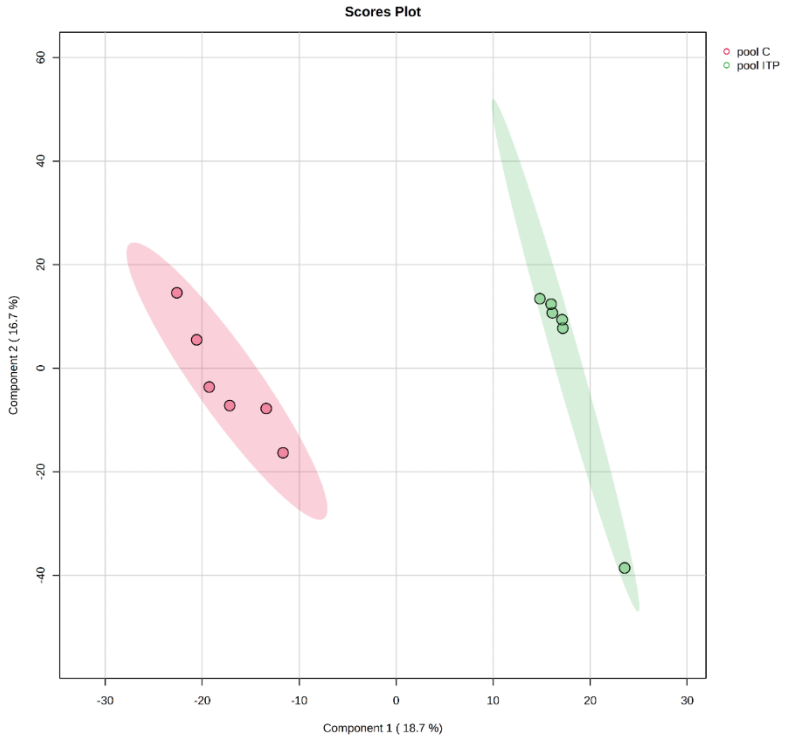
Metabolit	İTP VIP	Yön	Cins. VIP	Patofizyolojik İlişki
Prostaglandin H2	3.09	↑	-	COX yolağı / trombosit aktivasyonu
Asimetrik dimetilarginin	2.79	↑	-	NO sentaz inhibitörü / endotel disfonksiyonu
4-Hidroksiretinoik asit	2.63	↑	-	Retinoid metabolizması / immün modülasyon
2-Oksovalerik asit	2.82	↓	-	Aminoasit katabolizması
Oksalosüksinik asit	2.62	↓	-	TCA döngüsü / enerji metabolizması
N1,N12-Diasetilspermin	2.27	↑	-	Poliamin metabolizması / hücre proliferasyonu
Prostaglandin E3	2.17	↑	-	Anti-inflamatuar eikozanoid
N1-Asetilspermin	2.11	↑	-	Poliamin metabolizması
Fenilalanin	2.09	↑	-	Aminoasit metabolizması / BH4 yolağı

4.1.4. İTP ve Kontrol Grubu Havuzlanmış Numunelerinin Lipidomik Analizlerine Ait Bulgular

Lipidomik analiz sonucu İTP ve kontrol grubuna ait PCA grafiği incelendiğinde iki temel bileşen olan PC1 ve PC2'nin sırasıyla %22.10 ve %17.90 olduğu ve verilerdeki toplam varyansın %40.00'ını oluşturduğu görüldü (Şekil 4.10). PLS-DA grafiği incelendiğinde iki grubun komponent. 1 (%18.70) ve komponent 2 (16.70) eksenleri boyunca büyük ölçüde ayrıldığı ve yalnızca sınırlı bir örtüşme alanı bulunduğu gözlendi (Şekil 4.11).



Şekil 4.10. Lipidomik analizler sonucu İTP ve kontrol grubuna ait PCA grafiği



Şekil 4.11. Lipidomik analizler sonucu İTP ve kontrol grubuna ait PLS-DA grafiği

Lipidomik analizler sonucunda, İTP ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık gösteren lipid türleri; yağ asitleri, monaçilgliseroller (MG) diaçilgliseroller (DG), triaçilgliseroller (TG), gliserofosfolipitler [fosfatidilkolin (PC), fosfatidiletanolamin (PE), fosfatidik asit (PA), fosfatidilgliserol (PG), fosfatidilinozitol (PI)], lizofosfolipitler (LPC, LPIP) ve sfingolipidler [(seramidler (Cer), galaktoserebrozitler (GalCer)] türleri tespit edildi (Tablo 4.5). Tanımlanan lipid türlerinden İTP grubunda kontrollere kıyasla en yüksek VIP skorlarına sahip lipid türleri; MG (16:1) (VIP=2.34, DK=19.88↑), Cer (d14:0/10:d) (VIP=2.24, DK=5.53↑), LPIP (26:2) (VIP=2.16, DK=4.20↑) ve PG (12:0_26:1) (VIP=1.91, DK=3.78↑) kontrole göre artarken PE (O-22:0/22:O, (VIP=2.05, DK=2.43↓), PE-Cer (d14:2/26:d) (VIP=1.96, DK=4.28↓), PC (18:3/2:1) (VIP=1.92, DK=1.60↓) ve MGDG (18:1_26:1) (VIP=1.86, DK=1.93↓) türlerinin ise kontrole göre azaldığı bulundu. Tanımlanan tüm lipid türleri için *m/z*, tR, DK, %BSS, VIP skorları ve *p* değerleri ve iyonlaşma modu, Tablo 4.5'te ayrıntılı olarak sunuldu.

Tablo 4.8. Kontrol ve İTP grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı değişen lipidler

Sınıfı	Lipid Adı	m/z	Eşleştiği form	tR (dak)	%BSS	*p* değeri	VIP Skor	DK	Değişim	Mod
Yağ Asitleri ve Oksitlenmiş Türevleri	3-Keto-C20 sfinganin	327.3124	M [1+]	7.96	11.51	0.016	1.60	2.00	↓	+
	9-Hidroksi-5Z-nonenoik asit	195.0984	M+Na [1+]	2.23	19.68	0.025	1.52	4.04	↓	+
	Pentakosatrienoik asit	376.3365	M [1+]	9.05	26.00	0.012	1.65	2.28	↓	+
Monoasilgliseroller (MG)	MG (16:1)	329.2655	M+H [1+]	8.49	9.28	<0.001	2.34	19.88	↑	+
Diaçilgliseroller (DG)	DG (14:1_28:0)	868.6984	M [1+]	10.59	18.63	0.017	1.59	4.82	↓	+
	DG (18:1_26:2)	892.6985	M [1+]	10.47	12.74	0.003	1.86	1.93	↓	+
Triaçilgliseroller (TG)	TG (8:0_18:2_20:4)	766.6093	M [1+]	9.99	8.38	0.030	1.49	1.54	↓	+
Fosfatidik Asitler (PA)	PA (10:0_26:0)	353.2782	M+2H [2+]	5.87	11.02	0.044	1.40	4.80	↑	+
	PA (22:6_36:0)	501.3960	M+2H [2+]	8.87	20.80	0.014	1.62	1.82	↑	+
	PA(P-22:1/24:1) /PA(O-22:2/24:1)	824.6624	M [1+]	10.06	15.71	0.017	1.59	1.96	↓	+
Fosfatidilkolinler (PC)	PC (10:0_26:0)	790.6372	M+H [1+]	8.90	3.92	0.005	1.79	2.74	↓	+
	PC (18:3/2:0)	560.3380	M+H [1+]	7.49	20.29	0.001	1.92	1.60	↓	+

	PC(O-14:0/20:4)	740.5560	M+H [1+]	9.71	5.11	0.026	1.51	1.59	↓	+
	PC(O-18:0/22:6)	820.6208	M+H [1+]	9.33	2.47	0.003	1.84	1.79	↓	+
	PC(O-22:0/4:0)	636.5017	M+H [1+]	9.61	20.69	0.028	1.50	1.71	↑	+
Fosfatidiletanolaminler (PE)	PE(20:1/4:1)	575.3573	M [1+]	5.86	11.50	0.007	1.75	2.12	↑	+
	PE(O-22:0/22:5)	836.6571	M+H [1+]	11.11	11.01	<0.001	2.05	2.43	↓	+
Lizofosfolipitler	LPC (24:3)	602.4172	M+H [1+]	6.66	1.71	0.003	1.86	1.53	↓	+
	LPIP (26:1)	790.4108	M [1+]	4.00	17.11	<0.001	2.16	4.20	↑	+
Fosfatidilgliseroller (PG)	PG (12:0_26:1)	804.5944	M [1+]	11.64	19.47	0.002	1.91	3.78	↑	+
Sfingolipid; Seramidler (Cer)	Cer(d14:0/10:0)	422.3625	M+Na [1+]	4.88	22.63	<0.001	2.24	5.53	↑	+
Sfingolipid; Galaktosilseramidler (GalCer)	GalCer(d14:0/20:1(OH))	716.5630	M+H[1+]	10.11	21.14	0.039	1.43	1.56	↓	+
Sfingolipid; PE-bağlı Seramidler	GalCer(d14:0/26:1)	783.6648	M[1+]	10.81	8.93	0.025	1.53	1.63	↓	+
	PE-Cer(d14:2/26:2)	738.5654	M[1+]	11.13	19.76	0.001	1.96	4.28	↓	+

m/z: Kütle yük oranı, tR: Alıkonma zamanı, DK: Değişim katsayısı ↑: Kontrol grubuna göre İTP grubunda artan, ↓: Kontrol grubuna göre İTP grubunda azalan, +: Pozitif iyonlaşma modu, %BSS>30, p<.0.05, DK>1.5, VIP>1.

4.2. İTP Grubunda Tedavi Durumuna Göre Elde Edilen Bulgular

4.2.1. İTP Grubunda Tedavi Durumuna göre Demografik, Hematolojik ve Biyokimyasal Bulgular

Çalışmaya dahil edilen İTP hastalarından herhangi bir tedavi almayan ve çeşitli tedaviler alan (steroid/IVIG, eltrombopag, rituximab, splenektomi, siklosporin, mikofenolat mofetil) bireyler karşılaştırıldı. Çalışmaya dahil edilen 39 kişiden tedavi alan 17 ve tedavi almayan 22 kişi vardı. Çalışmaya dahil edilen İTP hastalarından herhangi bir tedavi alan ile tedavi almayan bireyler karşılaştırıldığında; gruplar arasında yaş ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p=0.687). Tam kan parametreleri değerlendirildiğinde; trombosit, eritrosit, monosit, lökosit, nötrofil, lenfosit, hemoglobin ve hematokrit düzeyleri bakımından tedavi alan ve almayan gruplar arasında anlamlı fark bulunamadı (tüm p>0.05). Ortalama eritrosit hacmi ve ortalama trombosit hacmi değerleri açısından da gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı (p=0.142 ve p=0.069, sırasıyla). Biyokimyasal parametreler incelendiğinde; glukoz düzeyi, tedavi alan grupta tedavi almayan gruba göre daha yüksekti ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu (p=0.039). Diğer parametreler olan üre, kreatinin, glomerüler filtrasyon hızı, aspartat aminotransferaz ve laktat dehidrogenaz, alkalen fosfataz, folat ve serbest T4 değerleri açısından gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı (tüm p>0.05). Non-parametrik olarak değerlendirilen alanin aminotransferaz, gama glutamil transferaz, tiroid uyarıcı hormon ve vitamin B12 düzeyleri açısından da tedavi alan ve tedavi almayan gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi (tüm p>0.05) (Tablo 4.6).

Tablo 4.9. Tedavi alan ve tedavi almayan İTP grubuna ait demografik veriler ve tam kan sayımı değerleri

	Tedavi Almayan (n=22)	**Tedavi Alan (n=17)**	***p* Değeri**
Değişkenler	**Ortalama ±SS**	**Ortalama ±SS**	
Yaş (yıl)	43.00±12.50	44.88±16.48	*0.687**
Trombosit (10^3/µL)	77.18±59.54	108.18±76.33	*0.162**
Eritrosit (10^6/µL)	4.94±0.38	4.85±0.60	*0.590**
Monosit (10^3/µL)	0.67±0.34	0.82±0.45	*0.266**

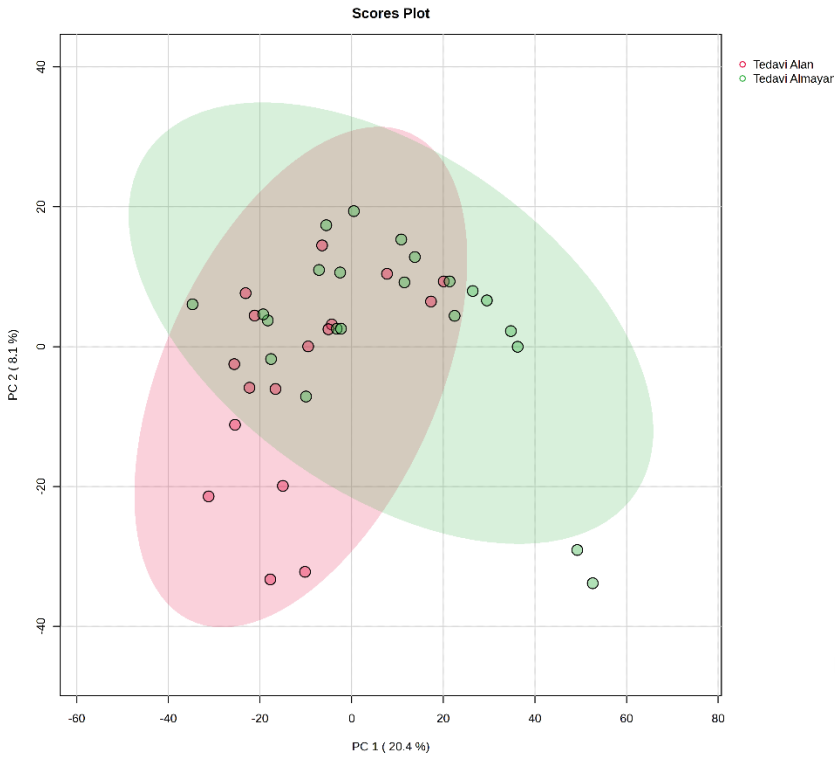
Lökosit (10^3/µL)	8.63±2.20	10.98±6.25	*0.155**
Nötrofil (10^3/µL)	5.40±1.60	7.02±5.15	*0.226**
Lenfosit (10^3/µL)	2.32±0.67	2.79±1.40	*0.171**
Hemoglobin (g/dL)	13.52±1.37	13.51±1.79	*0.981**
Hematokrit (%)	41.92±3.71	41.92±4.49	*0.997**
Ortalama eritrosit hacmi (fL)	84.96±4.12	87.11±4.82	*0.142**
Ortalama trombosit hacmi (fL)	12.80±1.79	11.72±1.79	*0.069**
Glukoz (mg/dL)	85.73±11.31	99.76±24.30	*0.039**
Üre (mg/dL)	24.00±8.32	27.53±7.83	*0.186**
Kreatinin (mg/dL)	0.72±0.14	0.81±0.17	*0.082**
Glomerüler filtrasyon hızı (mL/dk/1.73 m²)	101.64±20.10	100.76±19.17	*0.892**
Aspartat aminotransferaz (U/L)	23.32±22.50	16.76±3.87	*0.244**
Laktat dehidrogenaz (U/L)	207.50±52.92	202.47±70.13	*0.800**
Alkalen fosfataz (U/L)	78.95±25.74	88.47±38.78	*0.364**
Folat (µg)	5.88±2.49 (n=21)	6.66±2.60 (n=16)	*0.363**
Serbest T4 (ng/dL)	1.19±0.26 (n=20)	1.21±0.18 (n=14)	*0.761**
	Median (min-maks)	**Median (min-maks)**	
Alanin aminotransferaz (U/L)	16.50 (9.00-117.0)	19.00 (10.00-65.00)	*0.452***
Gama glutamil transferaz (U/L)	18.00 (7.00-48.00)	14.00 (9.00-47.00)	*0.900***
Tiroid uyarıcı hormon (mIU/L)	1.83 (0.24-6.36)	2.05 (0.34-4.38)	*0.919***
B12 (pg/mL)	306.50 (196.00-1104.00)	314.00 (239.00-444.00)	*0.292***

SS: Standart Sapma, **Bağımsız gruplarda t-testi, **Mann Whithney U Testi, p<0.05.*

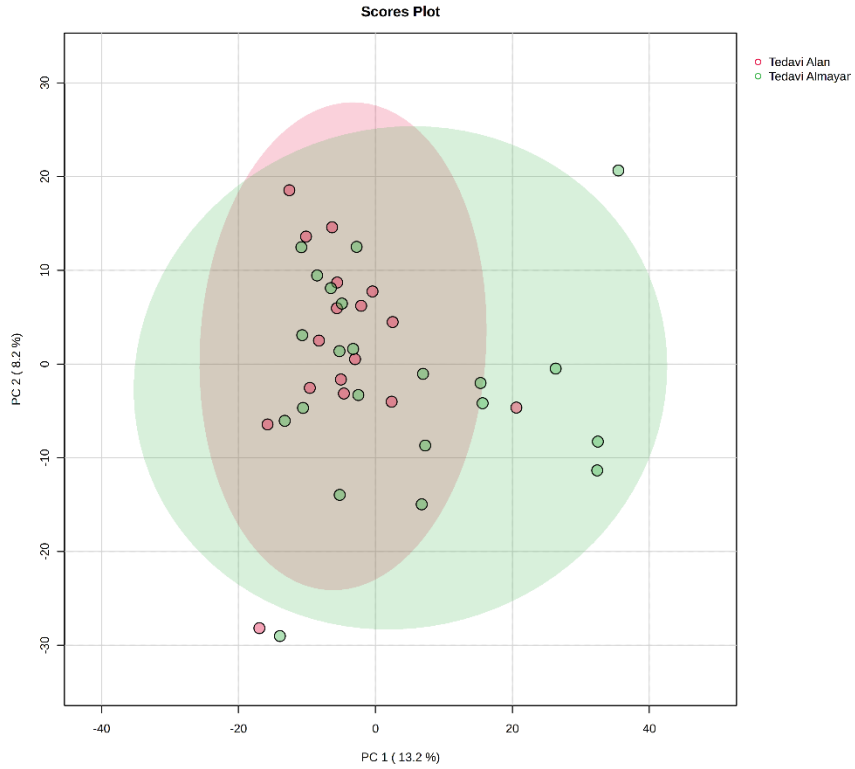
4.2.2. İTP Grubunda Tedavi Durumuna Göre Metabolomik Bulgular

Tedavi alan ve tedavi almayan İTP grubuna ait PCA grafiği incelendiğinde; pozitif iyonlaşma modunda verilerdeki toplam varyansın %28.50'sini oluşturduğu görüldü.

Negatif iyonlaşma modunda verilerdeki toplam varyansın %21.40'ını oluşturduğu görüldü. Tedavi alan ve tedavi almayan gruplar arasında belirgin bir ayrışma olmamakla birlikte, tedavi alan grubunun dağılımı daha geniş ve metabolit profillerinde daha fazla varyasyon olduğu görüldü. Tedavi almayan bireylerin ise daha homojen bir dağılım gösterdiği gözlendi (Şekil 4.12, Şekil 4.13).

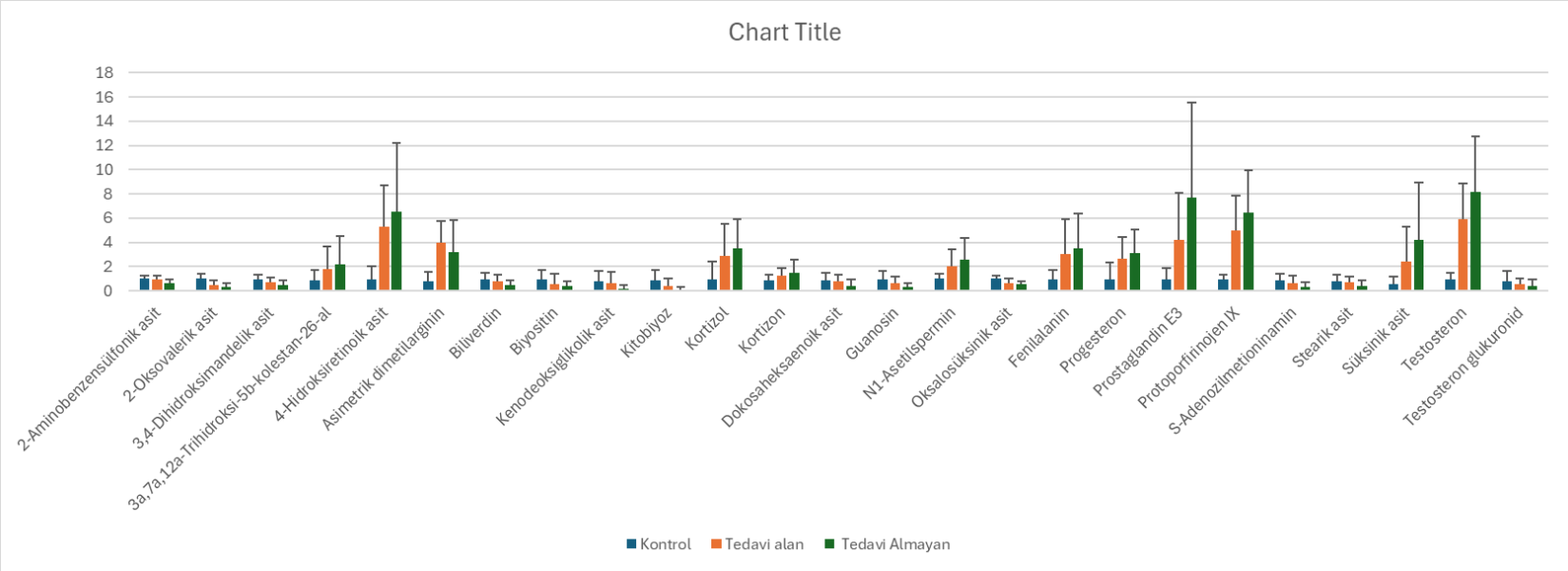


Şekil 4.12. Pozitif iyonlaşma modu tedavi alan ve tedavi almayan İTP gruplarına ait PCA grafiği



Şekil 4.13. Negatif iyonlaşma modu tedavi alan ve tedavi almayan İTP gruplarına ait PCA grafiği

Tedavi alan ve tedavi almayan gruplar karşılatırıldığında; 4-Hydroxyretinoic acid, prostoglandin E3, protoporfirinojen IX, süksinik asit, testosteron, cortisol, progesteron, N1-asetilspermin ortalama değerleri kontrol grubuna göre tedavi alan grupta tedavi almayan gruba göre daha düşük bulundu. 2-oksovalerik asit, biyositin, dokozahekzaenoik asit, stearik asit, kenododeoksikolik asit, kitobiyoz metabolitleri kontrole göre tedavi almayan grupta tedavi alan gruba göre daha düşük olduğu bulundu (Şekil 4.14). Tedavi alan ve almayan İTP gruplarının DK değerleri Tablo 4.7'da sunuldu.



Şekil 4.14. Tedavi alan ve almayan gruplarda metabolitlerin kontrol grubuna göre bar grafiği.

Tablo 4.10. Tedavi alan ve tedavi almayan İTP grubu arasında anlamlı değişen metabolitlerin değişim katsayısı değerleri

	Değişim Katsayısı		
Metabolit	İTP/K	TA/K	TALM/K
11-Dehidrokortikosteron	4.89	5.02	4.77
13-L-Hidroperoksilinoleik asit	5.73	6.88	2.67
13-Oksoode	-7.25	-4.90	-9.74
2-Aminobenzensülfonik asit	1.51	-1.02	-1.55
2-Oksovalerik asit	-2.67	-2.06	-3.44
3,4-Dihidroksimandelik asit	-4.39	-1.30	-2.07
3a,7a,12a-Trihidroksi-5b-kolestan-26-al	2.35	2.10	2.52
3-Bütinoat	-4.71	-4.34	-4.99
4-Guanidinobütanamid	-3.85	-2.64	-5.28
4-Hidroksifenilasetaldehit	1.50	1.89	1.14
4-Hidroksiretinoik asit	6.64	5.82	7.22
5-Metoksiindolasetat	-1.51	-1.49	-1.53
6-Metilmerkaptopürin	-3.49	-4.40	-2.97
Adenozil kobirinik asit a,c diamid	13.33	7.79	12.43
Androstenedion	-3.37	-2.95	-3.90
Androsteron	1.99	2.01	1.97
Androsteron glukuronid	-1.96	-1.87	-2.01
Asimetrik dimetilarginin	4.38	4.93	3.93
Biliverdin	-1.55	-1.22	-1.90
Biyositin	-2.03	-1.65	-2.46
Biyotin	-1.50	-1.45	-1.57
Kalsidiol	-1.95	-2.08	-2.05
Kenodeoksiglikolik asit	-2.13	-1.25	-4.63
Kitobiyoz	-3.80	-2.13	-8.33
Kortizol	3.48	3.11	3.74
Kortizon	2.38	1.45	1.71
Dehidroepiandrosteron sülfat	-4.03	-4.03	-4.00
D-Glukurono-6,3-lakton	-1.94	-1.77	-2.08
D-Glutamin	1.92	2.43	1.52

Dokosaheksaenoik asit	-1.71	-1.18	-2.24
Dolikil b-D-glukozil fosfat	13.02	14.07	10.12
Guanosin	-2.22	-1.62	-3.34
L-Arginin	-1.91	-2.45	-1.60
Lökotrien A4	13.61	17.31	5.94
L-Triptofan	-1.72	-1.90	-1.60
N1, N12-Diasetilspermin	6.20	7.44	5.42
N1-Asetilspermin	2.34	2.00	2.56
N-Asetilnöraminat	-3.72	-4.11	-3.41
N-Metilserotonin	-2.75	-2.50	-2.93
Oksalosüksinik asit	-1.65	-1.51	-1.78
Fenilasetaldehit	-4.06	-3.19	-5.14
Fenilalanin	3.46	3.18	3.65
Progesteron	3.14	2.84	3.36
Prostaglandin A2	6.04	6.79	5.47
Prostaglandin B1	10.95	-2.24	-2.41
Prostaglandin E3	6.63	4.52	8.24
Prostaglandin H2	4.77	4.77	4.78
Protoporfirinojen IX	6.14	5.37	6.92
Psikozin sülfat	5.79	6.23	4.90
S-Adenozilmetioninamin	-1.88	-1.36	-2.65
Salisilik asit	-2.01	-2.50	-1.73
Stearik asit	-1.57	-1.18	-2.01
Stearidonik asit	3.73	-4.50	-1.68
Süksinik asit	6.01	3.98	6.93
Testosteron	7.79	6.51	8.98
Testosteron glukuronid	-1.73	-1.45	-2.02
Tiroksin	-1.53	-1.21	-1.72
Vitamin K1 2,3-epoksit	2.23	2.77	1.94

K: Kontrol, TA: Tedavi alan, TALM: Tedavi almayan

4.3. İTP Grubunda Ek Hastalık Varlığına Göre Bulgular

4.3.1. İTP Grubunda Ek Hastalık Varlığına Göre Demografik, Hematolojik ve Biyokimyasal Bulgular

Çalışmaya dahil edilen İTP tanılı hastalar, ek hastalığı (komorbiditesi) olan (n=13) ve olmayan (n=26) olmak üzere iki gruba ayrıldı. Ek hastalığı olanlar, 5 kişinin romatoid artriti, 3 kişinin diyabeti, 2 kişinin hipertansiyonu, 2 kişinin hiperlipidemisi, 1 kişinin hipotiroidi, 1 kişinin kroner arter hastalığı, 1 kişinin malignitesi 1 kişinin konjenital adrenal hiperplazisi ve 1 kişinin nefrotik sendromu vardı. Bu iki grubun demografik, hematolojik ve biyokimyasal değerleri istatistiksel karşılaştırıldığında; gruplar tüm parametreler açısından benzerdi (tüm $p>0.05$). Katılımcıların yaş ortalamaları, ek hastalığı olan grupta daha yüksek olmasına rağmen (48.38 ± 12.07 yıl vs. 41.54 ± 14.84 yıl), bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0.158). Tam kan parametreleri incelendiğinde; eritrosit sayısı, hematokrit, hemoglobin ve ortalama eritrosit hacmi değerleri iki grup arasında benzer bulundu (tüm $p>0.05$). Trombosit medyan değeri, ek hastalığı olmayan grupta 78.50 (9.00–338.00), ek hastalığı olan grupta 93.00 (3.00–217.00) olup fark anlamlı değildir ($p=0.648$). Lökosit, nötrofil, lenfosit ve monosit sayıları arasında da anlamlı fark yoktu ($p>0.05$). Biyokimyasal parametreler açısından da iki grup arasında fark saptanmadı: glukoz düzeyi, ek hastalığı olan grupta daha yüksek olmasına rağmen (98.54 ± 23.78 mg/dL vs. 88.50 ± 15.96 mg/dL), bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0.125$). Serbest T4, folat, üre, kreatinin, glomerüler filtrasyon hızı, aspartat aminotransferaz, alanin aminotransferaz, laktat dehidrogenaz, alkalen fosfataz ve gama glutamil transferaz değerleri açısından da iki grup arasında anlamlı fark bulunmadı (tüm $p>0.05$) (Tablo 4.8).

Tablo 4.11. Ek hastalığı olmayan ve ek hastalığı olan (romatoid artrit, diyabet, hipertansiyon vs.) immün trombositopeni purpura grubuna ait demografik veriler ve kan değerleri

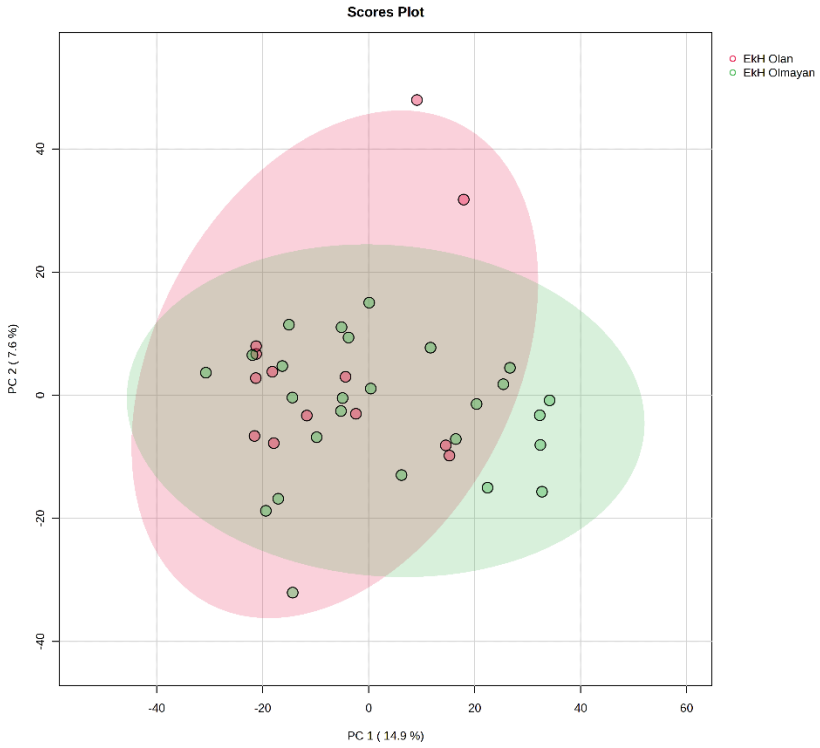
	Ek hastalığı olmayan (n=26)	**Ek hastalığı olan (n=13)**	
Değişkenler	**Ortalama ±SS**	**Ortalama ±SS**	***p* Değeri**
Yaş (yıl)	41.54±14.84	48.38±12.07	0.158*
Eritrosit (10^6/µL)	4.95±0.43	4.80±0.58	0.386*

Hematokrit (%)	42.17±3.89	41.42±4.36	0.591*
Hemoglobin (g/dL)	13.54±1.51	13.46±1.68	0.886*
Ortalama eritrosit hacmi (fL)	85.57±4.57	86.54±4.48	0.886*
Glukoz (mg/dL)	88.50±15.96	98.54±23.78	0.125*
Ortalama trombosit hacmi (fL)	12.44±1.86	12.12±1.88	0.622*
Kreatinin (mg/dL)	0.76±0.17	0.77±0.14	0.784*
Glomerüler filtrasyon hızı (mL/dk/1.73 m²)	102.73±19.40	98.31±19.98	0.510*
Laktat Dehidrogenaz (U/L)	204.31±65.50	207.31±50.34	0.886*
Alkalen fosfataz (U/L)	81.81±36.89	85.69±19.77	0.726*
Gama glutamil transferaz (U/L)	18.65±10.15	24.85±13.85	0.121*
Serbest T4 (ng/dL)	1.14±0.14	1.34±0.34	0.104*
Folat (µg)	6.54±2.73	5.54±1.99	0.267*
	Median (min-maks)	**Median (min-maks)**	
Trombosit (10^3/µL)	78.50 (9.00-338.00)	93.00 (3.00-217.00)	0.648**
Lökosit (10^3/µL)	9.07 (3.67-24.60)	7.87 (6.45-15.66)	0.208**
Monosit (10^3/µL)	0.70 (0.09-1.97)	0.62 (0.42-1.82)	0.965**
Nötrofil (10^3/µL)	6.10 (1.56-21.12)	4.69 (3.83-9.92)	0.219**
Lenfosit (10^3/µL)	2.42 (1.04-6.46)	2.28 (1.12-4.96)	0.435**
Üre (mg/dL)	24.00 (10.00-42.00)	26.00 (16.00-41.00)	0.255**
Aspartat aminotransferaz (U/L)	15.00 (12.00-114.00)	18.00 (11.00-35.00)	0.527**
Alanin aminotransferaz (U/L)	16.00 (9.00-117.00)	19.00 (10.00-36.00)	0.566**
Tiroid uyarıcı hormon (mIU/L)	1.86 (0.34-6.36)	1.61(0.24-3.45)	1.000**
B12 (pg/mL)	303.00(217.00-1002.00)	377.50 (196.00-1104.00)	0.627**

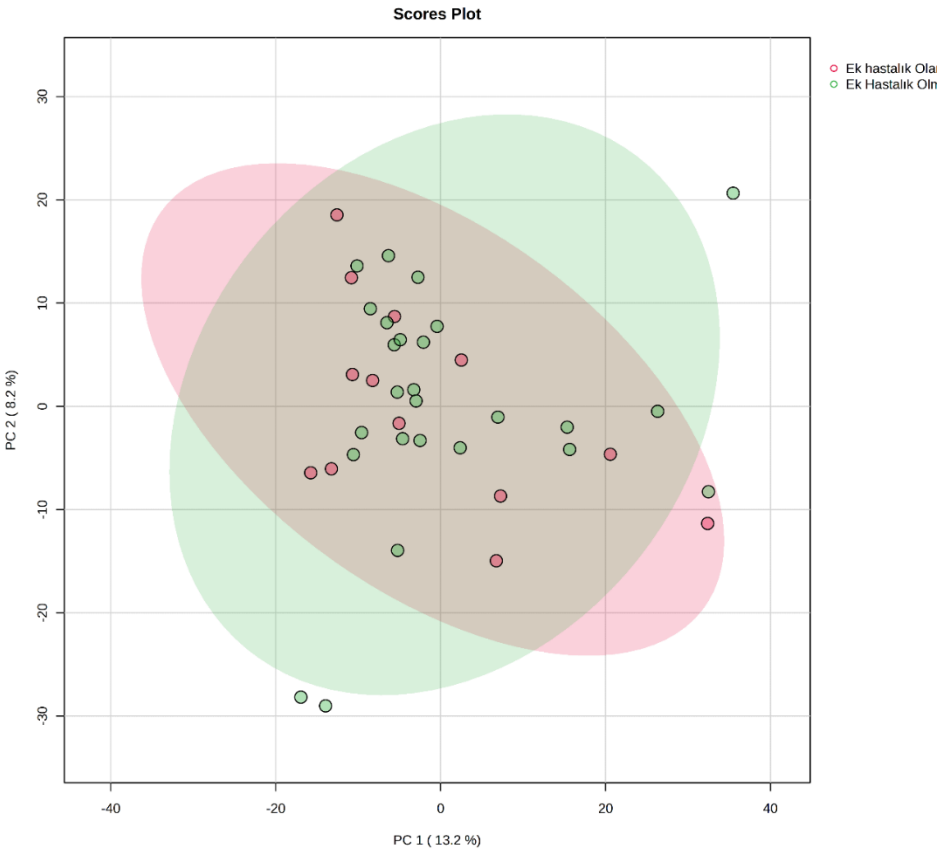
SS: Standart Sapma, *Bağımsız gruplarda t-testi, **Mann Whitney U Testi, p<.0.05.

4.3.2. İTP Grubunda Ek Hastalık Varlığına Göre Metabolomik Bulgular

Ek hastalığı olan ve olmayan İTP grubuna ait PCA grafiği incelendiğinde; pozitif iyonlaşma modunda iki temel bileşen olan PC1 ve PC2'nin sırasıyla %14.90 ve %7.60 olduğu ve verilerdeki toplam varyansın %22.50'sini oluşturduğu görüldü. Negatif iyonlaşma modunda iki temel bileşen olan PC1 ve PC2'nin sırasıyla %13.20 ve %8.20 olduğu ve verilerdeki toplam varyansın %21.40'ını oluşturduğu görüldü. Ek hastalığı olan ve olmayan İTP grubu arasında belirgin bir ayrışma olmamakla birlikte, ek hastalığı olan İTP grubunun dağılımı daha geniş olduğu görüldü (Şekil 4.15, Şekil 4.16).



Şekil 4.15. Pozitif iyonlaşma modu ek hastalığı olan ve olmayan İTP gruplarına ait PCA grafiği



Şekil 4.16. Negatif iyonlaşma ek hastalığı olan ve olmayan İTP gruplarına ait PCA grafiği

Ek hastalığı olan ve olmayan İTP grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim gösteren metabolit tanımlama analizine göre; pozitif ve negatif iyonlaşma modunda istatistiksel olarak anlamlı değişim gösteren toplam 9 metabolit tespit edildi. Tanımlanan metabolitlere ait *m/z* değerleri, alıkonma zamanları, *p* değerleri ve DK değerleri Tablo 4.9'de sunuldu.

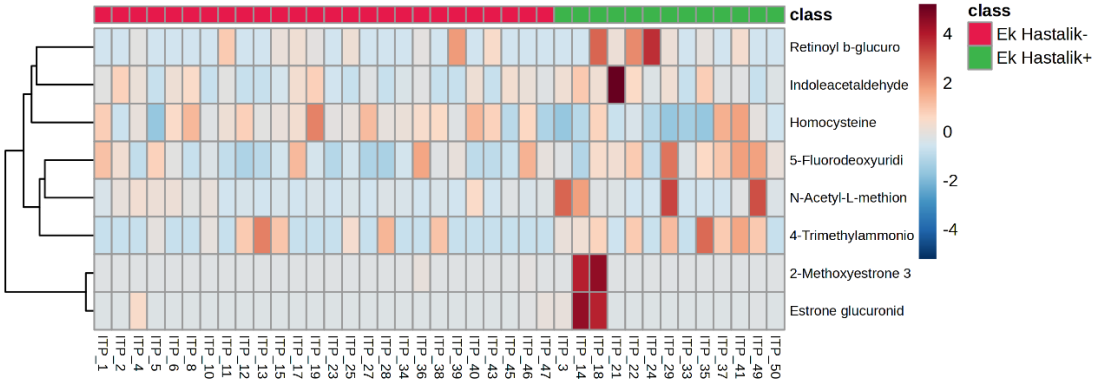
Tablo 4.12. Ek hastalığı olan ve olmayan İTP grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim gösteren metabolitler

Sıra	**Metabolit adı**	**Kütle/yük**	**tR (dak)**	**%BSS**	***p* Değeri**	**DK**	**VIP skor**	**Değişim**	**İyonlaşma**
1	2-Metoksiestron 3-glukuronid	521.2013	0.046	13.17	7.45	14.58	2.23	↓	-
2	4-Trimetilamonyobütanoik asit	181.0868	0.022	26.92	6.64	2.48	2.55	↓	-

3	5-Florodeoksiüridin monofosfat	345.9991	0.018	29.36	1.86	1.57	2.42	↓	-
4	Estron glukuronid	505.2077	0.048	16.75	8.63	14.82	2.22	↓	-
5	Homosistein	154.0537	0.036	19.11	0.76	1.58	0.41	↓	+
6	İndoleasetaldehit	174.0559	0.049	17.75	6.77	2.15	2.20	↓	-
7	N-Asetil-L-metiyonin	148.0792	0.011	22.93	5.22	3.82	0.78	↑	+
8	Retinoil b-glukuronid	491.2308	0.042	21.67	8.97	2.60	2.27	↓	-
9	Sepiapterin	239.0965	0.009	2.30	4.68	2.21	0.57	↑	+

p <0.05 DK ≥1.5, pozitif ve negatif iyonlaşma modu

Ek hastalığı olan ve olmayan İTP grubu arasında istatistiksel olarak değişen metabolitlere ait ısı haritası grafiği incelendiğinde; hiyerarşik kümelenme, ek hastalığı olan İTP grubunda bazı metabolitlerin belirgin şekilde daha yüksek düzeyde olduğu, tedavi almayan grupta ise bu metabolitlerin çoğunun daha düşük düzeylerde olduğu bulundu (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Ek hastalığı olan ve olmayan İTP grubu arasında anlamlı değişen metabolitlere ait ısı haritası grafiği

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, İTP tanısı almış hastaların plazma metabolik profillerinin sağlıklı bireylerden farklılık gösterip göstermediği, Q-TOF LC/MS tabanlı hedeflenmemiş metabolomik ve lipidomik yaklaşım kullanılarak araştırılmıştır. Çalışma, İTP'nin patogenezinde rol oynayan moleküler mekanizmaların metabolit düzeyinde aydınlatılması ve hastalığın tanı, prognoz ve tedavi takibinde kullanılabilecek potansiyel biyobelirteçlerin keşfedilmesi amacıyla tasarlanmıştır. İTP, günümüzde hâlâ dışlama tanısı olarak konulmakta ve hastalığa özgü "altın standart" bir laboratuvar testi bulunmamaktadır. Mevcut tanı yaklaşımı; klinik öykü, fizik muayene, periferik yayma değerlendirmesi ve sekonder nedenlerin dışlanmasına dayanmaktadır. Bu durum, özellikle kronik ve tedaviye dirençli vakalarda tanısal belirsizliklere yol açmakta, tedavi yanıtının öngörülmesini zorlaştırmakta ve bireyselleştirilmiş tedavi stratejilerinin geliştirilmesini engellemektedir. Çalışma, önceki İTP metabolomik araştırmalarının büyük çoğunluğunun kemik iliği veya dalak dokusu üzerinde yoğunlaşmasından farklı olarak, invaziv bir yaklaşımla plazma metabolomik ve lipidomik profilini kapsamlı bir şekilde analiz etmeyi hedeflemiştir. Bu yaklaşım, elde edilen bulguların klinik uygulamaya daha kolay aktarılabilmesi ve rutin hasta takibinde kullanılabilecek aday biyobelirteçlerin belirlenmesi açısından önem taşımaktadır. Bu bağlamda çalışmanın temel hipotezi, İTP hastalarının plazma metabolomik profillerinin sağlıklı bireylerden sistematik olarak farklılaştığı ve bu farklılıkların hastalığın immünopatolojik süreçleriyle ilişkilendirilebileceği şeklinde oluşturulmuştur. Çalışma, üç temel araştırma sorusu etrafında yapılandırılmıştır: Birincisi, Metabolomik veriler, İTP'nin fizyopatolojik mekanizmalarının anlaşılmasında etkili midir? İkincisi, tespit edilen metabolomik farklılıklar hangi metabolik yolaklarla ilişkilidir ve biyokimyasal olarak açıklanabilir mi? Üçüncüsü, bu metabolik değişimler İTP'nin fizyopatolojisi için yeni aday biyobelirteçler olarak önerilebilir mi?

Bu amaçla 39 İTP hastası ve 41 sağlıklı kontrolden elde edilen plazma numuneleri, metanol ile protein çöktürme yöntemiyle ekstrakte edildi ve Q-TOF LC/MS cihazında hem pozitif hem negatif iyonizasyon modlarında metabolomik ve lipidomik analizler gerçekleştirildi. Ham veriler MZmine 2.53 yazılımı ile işlenerek, kör çözelti filtrelemesi ve %BSS filtrelemesi uygulanarak analitik kalite güvencesi sağlandı. İstatistiksel değerlendirmeler MetaboAnalyst 6.0 platformunda yararlanılarak gerçekleştiridi. Gruplar

arasındaki farklılıklar PCA, PLS-DA, volkan grafiği, ısı haritası ve VIP skor analizleri ile ortaya konuldu. Metabolit tanımlaması, hem ticari standart kütüphane eşleşmesi (seviye 1) hem de HMDB/KEGG veri tabanları üzerinden tahmini eşleşme (seviye 2) ile gerçekleştirildi. Ayrıca İTP grubunda tedavi durumu ve ek hastalık varlığına göre alt grup analizleri yapılarak metabolik profillerin bu klinik değişkenlerden nasıl etkilendiği de değerlendirildi.

Çalışmada İTP ve kontrol grupları arasındaki demografik ve hematolojik veriler değerlendirildiğinde; İTP ve kontrol grupları arasında cinsiyet dağılımı açısından belirgin bir farklılık gözlenmiş olup, İTP grubunda kadın oranı anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (%69.20'ye karşı %12.20, $p<0.001$). Bu bulgu, İTP'nin epidemiyolojik özelliklerini yansıtmaktadır. Literatürde ergenlik ve üreme çağındaki kadınlarda İTP prevalansının erkeklere kıyasla daha yüksek olduğu tutarlı şekilde bildirilmektedir (106). Bu cinsiyet farklılığının, östrojenin otoimmüniteyi teşvik edici etkileri ile ilişkilendirildiği düşünülmektedir. Nitekim östrojen, B hücre aktivasyonunu artırarak otoantikor üretimini uyarabilmekte ve T düzenleyici hücre fonksiyonlarını baskılayarak immün toleransın bozulmasına katkıda bulunabilmektedir (107). Bununla birlikte, kontrol grubunun kan bankası gönüllü bağışçılarından oluşması nedeniyle erkek baskınlığı daha yüksek olması gruplar arası cinsiyet dengesizliğine yol açmıştır. Bu durum, metabolomik bulguların yorumlanmasında potansiyel faktör olarak değerlendirilmiştir. Ancak yaş ortalamaları açısından iki grup arasında fark bulunmaması ($p=0.637$), metabolomik farklılıkların yaşa bağlı bir etkiden ziyade hastalıkla ilişkili olabileceğini ve metabolomik verilerin karşılaştırılabilir olması nedeniyle önemlidir.

Hematolojik parametreler incelendiğinde, beklendiği üzere İTP grubunda trombosit sayısı kontrol grubuna göre belirgin şekilde düşük bulunmuştur ($90.70\pm68.23 \times 10^3/\mu L$'ye karşı $215.88\pm34.91 \times 10^3/\mu L$, $p<0.001$). İTP grubundaki geniş standart sapma değeri, hastaların farklı hastalık evrelerinde ve tedavi durumlarında olmasını yansıtmaktadır. Çalışmamıza hem yeni tanı almış hem de kronik İTP hastaları dahil edilmiş olup, trombosit sayıları 3.000/µL ile 338.000/µL arasında geniş bir aralıkta dağılım gösterdi. Bu heterojenite, metabolik profillerin hastalığın farklı klinik tablolarındaki değişkenliğini değerlendirme imkânı sundu.

İTP grubunda eritrosit sayısı, hemoglobin ve hematokrit değerlerinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde düşük bulunması (tüm parametreler için $p<0.01$), dikkat çekici bir bulgudur. Primer İTP'de doğrudan eritrosit yıkımı beklenmemekle birlikte, bu durum birkaç mekanizma ile açıklanabilir. Birincisi, kronik veya tekrarlayan kanama

epizodları demir eksikliği anemisine yol açabilmektedir (108). İTP hastalarında mukozal kanamalar, hipermenore ve gastrointestinal kanamalar sık görülmekte olup, çalışmamızdaki hastaların %74'ünde geçmiş kanama öyküsü mevcuttu. İkincisi, bazı İTP hastalarında eşzamanlı otoimmün hemolitik anemi gelişebilmekte ve bu durum Evans sendromu olarak tanımlanmaktadır (109). Her ne kadar çalışmamızda Evans sendromu dışlanmış olsa da subklinik düzeyde eritrosit otoantikorlarının varlığı göz ardı edilemez. Üçüncüsü, İTP tedavisinde kullanılan bazı ilaçların kemik iliği supresyonu yapabileceği bilinmektedir (110). Ayrıca İTP grubundaki kadın baskınlığı ve buna bağlı hipermenore sıklığı, anemi bulgularının bir kısmını açıklayabilir. Monosit sayısının İTP grubunda anlamlı olarak yüksek bulunması (p=0.002), hastalığın immünopatolojisini destekleyen önemli bir bulgudur. Monositler, İTP patogenezinde merkezi bir role sahiptir. Dalak ve karaciğerdeki doku makrofajları, Fcγ reseptörleri aracılığıyla otoantikorla kaplı trombositleri tanıyarak fagositoz gerçekleştirmektedir (111). Periferik kandaki monosit artışı, sistemik inflamatuar yanıtın ve aktif immün sürecin bir göstergesi olabilir. Ayrıca monositler, proinflamatuar sitokinlerin (IL-1β, TNF-α, IL-6) önemli kaynaklarından birini oluşturmakta ve T hücre polarizasyonunu etkileyerek otoimmün süreci sürdürmektedir (112). Lökosit, nötrofil ve lenfosit sayılarının gruplar arasında farklılık göstermemesi, İTP'nin primer olarak trombosit serisini etkileyen izole bir sitopeniye işaret etmektedir (52). Bu bulgu, çalışmaya dahil edilen hastaların primer İTP tanı kriterlerini karşıladığını ve sekonder nedenlerin başarılı şekilde dışlandığını doğrulamaktadır. Ortalama eritrosit hacminin normal sınırlarda ve gruplar arasında benzer olması, kronik demir eksikliğine bağlı mikrositik anemi gelişmediğini düşündürmektedir.

Çalışmada İTP ve kontrol grupları arasındaki çok değişkenli istatistiksel yöntemlerle değerlendirildiğinde;

Kalite kontrol ve havuz numunelerine ait PCA grafiklerinde, kör numunelerinin diğer numunelerden belirgin şekilde ayrılması, cihaz kaynaklı kontaminasyonun ve arka plan gürültüsünün etkin bir şekilde kontrol altına alındığını göstermektedir. Pozitif iyonizasyon modunda kalite kontrol numunelerinin PC1 ve PC2 bileşenleri tarafından açıklanan toplam varyansın %63.50'ye ulaşması, negatif iyonizasyon modunda ise benzer şekilde %62.80 düzeyinde olması, analitik sürecin kararlılığını ve tekrarlanabilirliğini doğrulamaktadır. Kalite kontrol numunelerinin kendi aralarında sıkı kümelenmesi, cihaz performansının analiz boyunca tutarlı kaldığını ve numuneler arası varyasyonun biyolojik kaynaklı olduğunu desteklemektedir. Bu sonuçlar, Metabolomik Kalite Güvence

Konsorsiyumu'nun önerdiği standartlara uygun olup (113), elde edilen verilerin biyolojik yorumlamaya elverişli kalitede olduğunu ortaya koymaktadır.

İTP ve kontrol gruplarına ait PCA grafikleri incelendiğinde, varyans açıklama oranlarının, kalite kontrol numunelerinde gözlenen değerlere kıyasla belirgin şekilde daha düşük olduğu dikkati çekmektedir. Hedeflenmemiş metabolomik çalışmalarda, özellikle heterojen hasta popülasyonlarının incelendiği durumlarda, toplam varyansın %20–30'unun açıklanması literatürde kabul edilebilir bir düzey olarak değerlendirilmektedir (114). Bu durum, biyolojik numunelerin binlerce metaboliti içermesi ve bireyler arası doğal metabolik varyasyonun yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. PCA skor grafiklerinde, kontrol grubunun her iki iyonizasyon modunda da daha sıkı ve homojen bir kümelenme sergilemesi, sağlıklı bireylerin metabolik profillerinin birbirine daha benzer olduğunu göstermektedir. Buna karşılık, İTP grubunun PCA grafiğinde daha geniş bir varyasyon aralığına yayılması, hasta popülasyonundaki klinik heterojeniteyi yansıtmaktadır. Amerikan Hematoloji Derneği kılavuzlarında da belirtildiği üzere, İTP hastalık süresine bağlı olarak farklı klinik tablolar sergileyebilmekte ve bu durum metabolik profillere yansıyabilmektedir (115). Bu durum çalışmamızda İTP grubunun farklı hastalık evrelerinde (yeni tanı, kalıcı ve kronik), farklı tedavi durumlarında (tedavi alan ve almayan) ve geniş bir trombosit sayısı aralığında (3.000–338.000/μL) hastaların dahil edilmesi ile açıklanabilir.

Volkan grafiği analizinde pozitif iyonizasyon modunda toplam 581 pik, negatif iyonizasyon modunda ise 337 pik istatistiksel olarak anlamlı değişim göstermiştir (p<0.05, DK ≥1.5). Bu toplam 918 pikin her iki iyonizasyon modunda da yaklaşık yarısının artış, yarısının ise azalması İTP'de metabolik değişimlerin tek yönlü olmadığını ve farklı metabolik yolakların farklı şekillerde etkilendiğini ortaya koymaktadır. Metabolomik çalışmalarda genellikle hastalık durumlarında belirli bir yönde baskın değişim beklenmekle birlikte, İTP gibi kompleks otoimmün hastalıklarda hem anabolik hem katabolik süreçlerin eş zamanlı olarak etkilenmesi bu bulguyu açıklayabilir (2). Sonuç olarak, volkan grafiği analizi İTP ve kontrol grupları arasında metabolit profilinde anlamlı değişimler olduğunu ortaya koymuştur.

İTP ve kontrol grubu arasında tanımlanan seviye 1 ve seviye 2 metabolitlerin İTP ile olan bağlantıları değerlendirildiğinde;

Çalışmamızda en yüksek ayırt ediciliğe sahip metabolitler; testosteron, progesteron, kortizol, 11- kortizon, dehidrokortikosteron, dehidroepiandrosteron sülfat düzeyleri İTP grubunda anlamlı olarak değişmişti. Steroid hormonlar, bağışıklık sistemi

hücrelerinin farklı alt tiplerini modüle ederek inflamatuar yanıtları baskılama veya düzenleme rolü üstlenmektedir (116-118). Çalışmamızda testosteron (VIP=3.04, DK=7.79↑) en yüksek ayırt ediciliğe sahip metabolitti ve İTP grubunda 7.79 kat artmıştı. Testosteronun hem erkek hem de kadınlarda sistemik metabolizmanın düzenlenmesindeki önemini vurgulayan kanıtlar mevcuttur (119). Ayrıca testosteron, 11-dehidrokortikosteron 3a,7a-dihidroksi-5β-kolestan-26-al, gibi steroid yapılı metabolitler, steroid sentezi ve immün-endokrin etkileşimleri yansıtan önemli bileşenler olabilir. Progesteron (VIP=2.27, DK=3.14↑), immün baskılayıcı etkileriyle bilinir ve otoimmün süreçlerde düzey değişiklikleri görülebilir (120). Progesteron İTP grubunda 3.14 kat artmıştı. Bu değişimi ise özellikle çalışmamızdaki kadın baskınlığı göz önüne alındığında, gonadal fonksiyonların da etkilendiğine işaret edebilir. Dehidroepiandrosteron sülfat düzeyleri (VIP=2.94, DK=4.03↓) İTP grubunda azalmıştı. Dehidroepiandrosteron sülfat steroidogenez yolunun erken ürünleri olup immün modülasyon üzerinde etkilidir ve otoimmün hastalıklarda düşük düzeyleri sıklıkla bildirilmektedir. Kronik inflamatuar hastalık olan sistemik lupus eritematozus hastalarında serum dehidroepiandrosteron sülfat düzeylerinin azaldığını göstermiştir. (121). Diğer bir önemli bulgu artmış kortizol (VIP=2.17, DK=3.48↑) dehidrokortikosteron (VIP=2.87, DK=4.89↑) düzeyleriydi. Bu değişim hipotalamus-hipofiz-adrenal ekseninde bozulmalar ve gonadal steroid sentezinin düzeyleri değiştiğinin bir göstergesi olabilir. Steroid tedavilerin, endojen kortizolün farmakolojik analogları olmaları nedeniyle hipotalamo-hipofizer-adrenal ekseni üzerinde negatif geri bildirim yoluyla baskılayıcı etki göstererek kortizol sentezini doğrudan etkileyebildiği bilinmektedir. Ancak İTP grubunda bulunan hastaların %27.50'sinin steroid tedavisi aldığı düşünüldüğünde kortizol ve dehidrokortikosteron düzeyindeki değişimlerin hastalık patogenezinden ziyade tedavinin farmakodinamik etkisinin beklenen bir yansıması olarak değerlendirilebilir. Bu bağlamda kortizol, kortizon, 11-dehidrokortikosteron gibi glukokortikoidler ile testosteron, androsteron, androstenedion ve dehidroepiandrosteron sülfat gibi glukokortikoid türevleri, endojen stres yanıtının ve immün düzenleyici mekanizmaların göstergeleri olsa da çalışmamızda steroid hormon metabolizmasında gözlenen belirgin değişimler, İTP ve kontrol gruplarındaki cinsiyet dağılımındaki uyumsuzluğundan ve aldıkları tedavilerden kaynaklanmış olabilir. Bu nedenle her ne kadar istatistiksel olarak yüksek ayırt ediciliğe sahip olsalar da İTP tanı ve tedavisi için zayıf aday biyobelirteçler olarak değerlendirilebilir.

Çalışmamızda diğer bir önemli bulgu araşidonik asit metabolizması ve inflamatuar medyatörlerin değişmesidir. Trombositler, membran fosfolipidlerinden zengin yapıları

nedeniyle araşidonik asit ve türevlerinin önemli bir kaynağıdır. Tespit edilen metabolitlerden prostaglandin H2, prostaglandin A2, prostaglandin E3, prostaglandin B1 ve lökotrien A4 düzeyleri İTP grubunda artmıştı. Bu eikozanoidler, kan damarlarının ve trombositlerin fizyolojik fonksiyonlarının ve patofizyolojik rollerinin yerel modülatörleridir (122). Önceki çalışmalarda trombositlerin aktivasyonu sırasında prostaglandin üretiminin arttığını gösterilmiştir (123). Trombosit fonksiyonu, inflamasyon ve immün yanıtın düzenlenmesinde kritik rol oynar; dolayısıyla İTP patofizyolojisiyle doğrudan ilişkilidir. Örneğin, aktif trombositlerden türetilen siklooksijenaz-1, tromboksan A2'nin primer hemostaz ve aterotromboza katkısının önemi, trombosit siklooksijenaz-1'in seçici bir inhibitörü olan düşük doz aspirin ile ilişkili kanama komplikasyonları ve kardiyoprotektif etkilerle hayvan ve insan modellerinde gösterilmiştir (124). Prostaglandin H2 (VIP=3.09, DK=4.77↑), prostaglandin B1 (VIP=1.79, DK=10.95↑), prostaglandin A2 (VIP=2.35, DK=6.04↑), prostaglandin E3 (VIP=2.17, DK=6.63↑) gibi prostaglandin türevleri, araşidonik asit yolaklarının ara veya son ürünleridir ve trombosit aktivasyonu-esnasındaki fosfolipid sinyalizasyonunu yansıtır. Lökotrien A4 (VIP=2.08, DK=13.61↑), lökotrien yolunun başlıca aracısı olup inflamatuar hücre aktivitesiyle doğrudan bağlantılıdır. 13-okso-ODE ve 13- hidroperoksi-linoleik asit gibi oksilipinler lipid peroksidasyonunun göstergeleridir ve oksidatif stres ile inflamatuar yanıtın arttığı durumlarda yükselir. Dokozahekzaeoik asit (VIP=1.29, DK=1.7↓) İTP grubunda kontrole göre azalmıştı. Dokozahekzaeoik asit, membran fosfolipidlerinden türeyen temel yağ asitlerindendir; aykazonoid sentezi için substrat oluşturmaları nedeniyle trombosit biyolojisinde önem taşır. Çoklu doymamış yağ asitlerinin (omega-3, n-3) trombosit fonksiyonu üzerindeki etkilerinin incelendiği çalışmada n-3 PUFA açısından zengin bir diyetle beslenen farelerin küçük arteriyollerinde veya daha büyük arterlerinde oluşan trombüsler içindeki trombosit birikiminin azaldığı bulunmuştur (125). Bu bağlamda, İTP grubunda gözlenen dokozahekzaeoik asit azalması, trombosit fonksiyonu ve inflamatuar lipid medyatör dengelerindeki bozulmalarla ilişkili olabilecek metabolik değişikliklere işaret etmektedir. Yine doymuş ve çoklu doymamış yağ asitlerinin Toll benzeri reseptör ve inflamasyon sinyallemesinin modülasyonu yoluyla bağışıklık fonksiyonu üzerinde karmaşık ve ikili etkiler sergiler (126). Bu lipid mediatörlerinin değişimi, İTP'deki inflamatuar mikroçevreyi, trombosit aktivasyonunu ve immün düzenleme bozukluğunu metabolik düzeyde doğrular niteliktedir.

L-triptofan (VIP=1.30, DK=1.72↓), 5-metoksiindolasetat (VIP=1.76, DK=1.51↓) ve N-metilserotonin (VIP=1.10, DK=2.75↓) düzeylerinin azalması, triptofan

metabolizmasının İTP'de etkilendiğini göstermektedir. Triptofan-kinürenin yolağı, immün sistem regülasyonunda ve otoimmün hastalıklarla yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir (127). Trombositler, periferik serotoninin başlıca depolama kaynağıdır ve trombosit yıkımının artması serotonin metabolitleri üzerinde de etkili olabilir. Duerschmied ve ark., trombosit kaynaklı serotoninin nötrofil kemotaksisini ve akut inflamatuar yanıtı modüle ettiğini göstermiştir (128). 3,4-dihidroksimandelik asit, norepinefrin ve epinefrinin metabolik son ürünü olup, sempatik sinir sistemi aktivitesinin bir göstergesidir (129). İTP gibi kronik hastalıklarda stres yanıtının aktivasyonu, katekolamin metabolizmasındaki değişimleri açıklayabilir.

N1,N12-diasetilspermin (VIP=2.27, DK=6.20↑) ve N1-asetilspermin (VIP=2.11, DK=2.34↑) düzeylerinin artışı, poliamin metabolizmasının aktive olduğunu göstermektedir. Poliaminler, hücre proliferasyonu, apoptoz ve immün fonksiyonlarla yakından ilişkilidir. Mandal ve ark., spermidin ve spermin tükenmesinin mitokondri aracılı apoptoza yol açtığını göstermiştir (130). Madeo ve ark., spermidinin otofaji indüksiyonu yoluyla anti-inflamatuar etkilere sahip olduğunu ve yaşlanmaya bağlı hastalıklarda koruyucu rol oynadığını bildirmiştir (131).

Asimetrik dimetilarginin düzeyinin artışı (VIP=2.79, DK=4.38↑) klinik açıdan önemli bir bulgudur. Asimetrik dimetilarginin, endojen nitrik oksit sentaz inhibitörü olup, endotel disfonksiyonunun bir belirtecidir. Böger, asimetrik dimetilarginin'nin nitrik oksit sentezini inhibe ederek endotel disfonksiyonuna yol açtığını ve kardiyovasküler risk faktörü olarak önemini kapsamlı derlemelerinde vurgulamıştır (132, 133).

Protoporfirinojen IX ve biliverdin değişimleri, hem biyosentezi ve yıkımı süreçlerinin etkilendiğini göstermektedir. Protoporfirinojen IX (VIP=2.99, DK=6.14↑), hem sentez yolağının bir ara ürünüdür ve değişimi eritropoez veya hepatik hem sentezi üzerindeki etkilere işaret edebilir (134). Biliverdin (VIP=1.33, DK=1.55↓) ise hem oksijenaz enzimi tarafından hemin yıkımıyla oluşan ilk üründür ve antioksidan özelliklere sahiptir. İTP grubunda gözlenen anemi bulguları (düşük eritrosit, hemoglobin, hematokrit) ile değerlendirildiğinde, hem metabolizmasındaki bu değişimler klinik olarak anlamlı görünmektedir.

N-metilserotonin (VIP=1.10, DK=2.75↓) ve 5-metoksiindolasetat (VIP=1.76, DK=1.51↓) düzeylerinin azalması, trombosit yıkımının serotonin metabolizması üzerindeki etkisini yansıtmaktadır. Trombositler periferik serotoninin başlıca depolama kaynağıdır ve 5-hidroksiindolasetik asit serotonin metabolitidir (135). Trombosit

kaynaklı serotoninin inflamasyon ve nötrofil kemotaksisindeki rolü önceki çalışmalarda gösterilmiştir (128).

Kitobiyoz (VIP=1.93, DK=3.80↓) ve kenodeoksiglikolik asit (VIP=1.17, DK=2.13↓) düzeylerinin azalması, bağırsak mikrobiyotası ve safra asidi metabolizmasının etkilendiğine işaret etmektedir. Önceki çalışmalar İTP hastalarının bağırsak mikrobiyom ve metabolomunda belirgin disbiyoz olduğu bildirilmiştir (89). Saki ve ark. da bağırsak mikrobiyom bozukluğunun İTP patogenezinde potansiyel bir rol oynadığını vurgulamıştır (61). Safra asitlerinin anti-trombosit etkileri bilinmekte olup, bu bileşikler dalak tirozin kinaz, protein kinaz B ve ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz 1/2 yolakları üzerinden trombosit aktivasyonunda önemli roller üstlendiği gösterilmiştir (136). Yine safra asitlerinin FXR ve TGR5 gibi reseptörler aracılığıyla hormon-benzeri etki göstererek immün hücre sinyalizasyonunu ve inflamatuar yanıtı modüle edebilmekte (126). Benzer şekilde, safra asidi sinyalizasyonundaki değişimlerin trombosit aktivasyonu ve hemostaz süreçleri ile ilişkili olabileceğine dair bulgular mevcuttur (137). Wang ve ark., İTP'li hastalarda sekonder safra asitleri biyosentezinin azaldığını ve bu durumun glukokortikoid direnci ile ilişkili olabileceğini göstermiştir (11). Zhang ve ark. bağırsak mikrobiyom-metabolom çalışmasında (89), İTP hastalarında belirgin disbiyoz ve metabolit değişiklikleri saptanmıştır. Çalışmamızda tespit edilen kitobiyoz (VIP=1.93, DK=3.80↓) ve kenodeoksiglikolik asit (VIP=1.17, DK=2.13↓) azalmaları, bu disbiyoz bulgularını plazma metabolomik düzeyinde desteklemektedir. Bu bağlantı, bağırsak-bağışıklık ekseni üzerinden İTP patogenezini aydınlatan önemli bir bulgudur.

2-Oksovalerik asit, diğer adıyla alfa-ketoizovalerik asit, kısa zincirli bir keto asittir. Valinin dekarboksilasyonu sırasında üretilir ve mitokondriyal enerji metabolizması ile yakından ilişkilidir. Çalışmamızda 2-oksovalerik asit seviye 1 metabolit olarak tanımlandı ve düzeyleri kontrole göre azalmıştı (VIP=2.82, DK=2.67↓). Literatürde İTP 2-oksovalerik asit arasında doğrudan, hastalığa özgü bir ilişki tanımlanmamıştır. Ancak birçok immün ve inflamatuar hastalıkta enerji metabolizmasının yeniden programlanması, mitokondriyal fonksiyon değişiklikleri ve amino asit metabolizmasında düzensizlikler ile ilişkilendirilmiştir (138). Sonuçlarımızda bu metabolitin azalmış olması, İTP'de enerji metabolizmasının yeniden programlanması, amino asit katabolizmasının veya bu yolakta yer alan ara basamakların baskılandığını düşündürmektedir.

D-Glukurono-6,3-lakton seviye 1 metabolit olarak tanımlandı ve İTP ile dolaylı ilişkilendirilebilir. D-glukaratlar, inflamasyonu ve hücre bölünmesini engellemenin yanı

sıra apoptoza da neden olur. İTP'de azalmış D-glukurono-6,3-lakton düzeyleri (VIP=1.84, DK=1.94↓), inflamasyon ve oksidatif stres ile ilişkili olarak detoksifikasyon ve karbonhidrat metabolizmasında ortaya çıkan metabolik adaptasyonları yansıtıyor olabilir.

2-Aminobenzensülfonik asit seviye 1 metobolit olarak tanımlandı ve düzeyleri İTP hastalarında artmış olarak saptanmıştır (VIP=1.51, DK=1.51↑). Bu metabolit, aromatik bileşik metabolizması ve sülfonasyon ile ilişkili olup, literatürde İTP'ye özgü bir biyobelirteç olarak tanımlanmamıştır. Bununla birlikte, gözlenen artış; İTP'de rapor edilen oksidatif stres, inflamasyon ve detoksifikasyon gereksiniminin artmasına bağlı olarak sülfonasyon yolaklarının aktive olduğunu düşündürmektedir. Özellikle bulgularımızda D-glukurono-6,3-lakton düzeylerindeki azalma ile değerlendirildiğinde, bu bulgu detoksifikasyon süreçlerinde glukuronidasyondan sülfonasyona doğru bir metabolik kaymayı yansıtıyor olabilir.

Salisilik asit seviye 1 metobolit olarak tanımlandı ve düzeylerinin İTP hastalarında azalmış bulunması (VIP=1.68, DK=2.01↓), Salisilik asit, prostaglandin sentezini baskılayıcı ve antitrombotik özellikleri olan bir molekül olup, gözlenen azalma İTP'de anti-inflamatuar karşı düzenleyici mekanizmaların yetersiz kaldığını ve inflamasyonun çözülme fazının baskılandığını göstermektedir. Çalışmada saptanan prostaglandin ve lökotrien artışı ile değerlendirildiğinde, inflamatuar eikozanoid yolaklarının baskın hale geldiğini düşündürmektedir.

Bu bulgular tanımlanan 58 metabolitin önemli bir kısmının İTP'nin bilinen patofizyolojik mekanizmalarıyla uyumlu olduğu göstermektedir.

Cinsiyet farklılığının boyutu ve metabolomik sonuçlara etkisi;

Çalışmamızda İTP ve kontrol grupları arasında cinsiyet dağılımındaki farklılık, İTP'nin epidemiyolojik özelliklerinin (üreme çağındaki kadınlarda daha yüksek prevalans) ve kontrol grubunun kan bankası gönüllü bağışçılarından oluşmasının (erkek baskınlığı) doğal bir yansımasıdır. Ancak bu farklılığın, hedeflenmemiş metabolomik analizlerde elde edilen sonuçların yorumlanması üzerinde kritik bir karıştırıcı faktör (*confounding factor*) olabilir. Nitekim İTP ve kontrol grupları arasında cinsiyet-spesifik bir PLS-DA modeli oluşturulduğunda, kadın ve erkek İTP hastaları arasında yüksek VIP skorlarına sahip çok sayıda metabolitin bulunduğu ve bu metabolitlerin önemli bir kısmının İTP-kontrol karşılaştırmasında da anlamlı bulunan metabolitlerle örtüştüğü belirlenmiştir.

58 anlamlı metabolitin cinsiyet bağımlılığı açısından değerlendirilmesi sonucunda, toplam 11 metabolitin doğrudan cinsiyete bağlı olduğu ve bu metabolitlerin İTP-kontrol karşılaştırmasındaki anlamlılığının büyük ölçüde gruplar arası cinsiyet farklılığından kaynaklanıyor olabileceği belirlenmiştir. Bu metabolitler arasında özellikle testosteron (VIP=3.04) dikkat çekmektedir. Testosteron, erkeklerde kadınlara kıyasla yaklaşık 10-20 kat daha yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Kontrol grubunun %87.80'inin erkeklerden oluşması, kontrol grubunun ortalama testosteron düzeyini doğal olarak yükseltirken, %69.20'si kadın olan İTP grubunun ortalamasını düşürmesi beklenir. Ancak bu fark İTP patofizyolojisinden ziyade gruplar arasındaki cinsiyet farklılığından ve steroid tedavisi alan hastaların (%27.50) etkisinin hormonal düzeyde bir yansıması olabileceği değerlendirilmiştir. Ayrıca protoporfirinojen IX'un (cinsiyet VIP=1.60) testosteron ile aynı alıkonma zamanını (tR=4.15 dak) paylaşması, olası bir ko-elüsyondan kaynaklanabilir. Dehidroepiandrosteron sülfat düzeylerindeki azalma (VIP=2.94, DK=4.03↓) da benzer şekilde değerlendirilmelidir. Dehidroepiandrosteron sülfat erkeklerde kadınlara kıyasla belirgin şekilde daha yüksek düzeylerde bulunan en bilinen cinsiyete bağlı metabolitlerden biridir (139). Kadın-baskın İTP grubunda dehidroepiandrosteron sülfat'ın azalmış bulunması, hastalık etkisinden bağımsız olarak yalnızca cinsiyet oranlarındaki farklılıkla açıklanabilir. Androjen ve östrojen metabolizması yolağına eşleşen diğer metabolitler (androstenedion, androsteron, androsteron glukuronid, testosteron glukuronid) de aynı karıştırıcı faktörden etkilenmektedir. Kortizol (VIP=2.17) ve 11-dehidrokortikosteron (VIP=2.87) gibi hipotalamus-hipofiz-adrenal eksen metabolitleri ise hem cinsiyet hem de İTP tedavisinde yaygın olarak kullanılan kortikosteroidlerin farmakodinamik etkisinden etkilenmektedir. İTP grubundaki hastaların %27.50'sinin steroid tedavisi altında olması, bu metabolitlerdeki değişimin hastalık biyobelirteci olarak yorumlanmasını güçleştirmektedir.

PLS-DA modelinde anlamlı VIP skorlarına sahip olup cinsiyet hormonu sınıfında yer almayan stearik asit (cinsiyet VIP=1.74 > İTP VIP=1.17) ve stearidonik asit (cinsiyet VIP=1.39 > İTP VIP=1.01) metabolitlerinde cinsiyet bazlı olarak incelendiğinde cinsiyet VIP skorunun İTP VIP skorunu aştığı görülmektedir. Bu durum, söz konusu metabolitlerdeki grup farklılığının hastalıktan ziyade cinsiyet farklılığından atfedilebileceğini düşündürmektedir. Düşük cinsiyet riski taşıyan lökotrien A4 (cinsiyet VIP=1.01) ve süksinik asit (cinsiyet VIP=1.11) metabolitler İTP-kontrol farklılığı kısmen

gerçek bir hastalık etkisini, kısmen de cinsiyet dengesizliğinin dolaylı etkisini yansıtıyor olabilir.

Cinsiyet etkisinden bağımsız güçlü aday biyobelirteç olabilecek metabolitler: Prostaglandin H2 (VIP=3.09), çalışmanın en yüksek VIP skoruna sahip metaboliti olarak öne çıkmaktadır ve trombosit siklooksijenaz yolağının bir ürünü olarak İTP patofizyolojisi ile doğrudan ilişkilendirilebilir. Asimetrik dimetilarginin (VIP=2.79) nitrik oksit sentaz inhibitörü olarak endotel disfonksiyonu ve vasküler inflamasyon süreçlerini yansıtmaktadır. N1,N12-diasetilspermin ve N1-asetilspermin gibi poliamin metabolitleri, hücre proliferasyonu ve immün hücre aktivasyonu ile ilişkili olup, otoimmün süreçlerdeki değişimleri yansıtıyor olabilir. 2-Oksovalerik asit ve oksalosüksinik asit gibi TCA döngüsü ve aminoasit katabolizması metabolitlerindeki azalma ise İTP'de enerji metabolizmasının bozulduğuna işaret edebilir. Fenilalanin artışı, tetrahidrobiopterin yolağı ve inflamatuar süreçlerle ilişkilendirilmektedir. Bu 9 metabolitin, cinsiyet dengesizliğinden bağımsız olarak İTP fizyopatolojisini yansıtan gerçek biyobelirteç adayları olduğu ve gelecekteki validasyon çalışmalarında öncelikli olarak değerlendirilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Sonuç olarak çalışmamızda İTP ve kontrol grupları arasında tespit edilen 58 anlamlı metabolitin cinsiyet farklılığı bağlamında sistematik değerlendirilmesi sonucunda; 11 metabolitin doğrudan cinsiyet farklılıından etkilendiği ve biyobelirteç adayı olarak güvenilir olmadığı; 8 metabolitin kısmen cinsiyet etkisi taşıdığı ve dikkatli yorumlanması gerektiği; 9 metabolitin ise cinsiyet etkisinden bağımsız göründüğü ve güçlü biyobelirteç adayları olarak öne çıktığı söylenebilir.

İTP ve kontrol grubu arasında değişen yolaklar değerlendirildiğinde;

Androstenedion metabolizması: Çalışmamızda en yüksek anlamlılık düzeyine sahip yolak olarak tespit edilmiştir. Androstenedion, adrenal korteks ve gonadlarda üretilen ve testosteron ile östrojenlerin öncüsü olan bir steroid hormondur (140). Androjenler, immün hücre fonksiyonlarını ve gelişimini doğrudan etkiler; otoimmün süreçlere karşı doku ve hücre duyarlılığını modüle eder (141). Literatürde androjen hormonların (dihidrotestosteron, testosteron, androstenedion) immün yanıtları baskılayıcı etkileri gösterilmiştir (142). Otoimmün hastalıkların daha sık görülmesi, androjenlerin immün düzenleyici rollerini desteklemektedir.

Androjen ve östrojen metabolizması: Bu yolaktaki değişimler, İTP'nin kadınlarda erkeklere göre daha yüksek prevalansa sahip olmasıyla uyumludur. Seks hormonlarının B ve T lenfositleri, dentritik hücreler ve makrofajlar üzerindeki etkileri kapsamlı olarak

araştırılmıştır (143). Sistemik lupus eritematozus'de danazol (sentetik androjen) tedavisinin trombositopeni dahil hematolojik bulgularda etkili olduğu gösterilmiştir (144). Bu bulgu, androjen metabolizmasındaki değişimlerin İTP patogenezinde terapötik hedef olabileceğini düşündürmektedir.

Biyotin metabolizması: Biyotin metabolizmasının İTP'de değişmesi dikkat çekici bir bulgudur. Biyotin (vitamin B7), beş karboksilaz enzimi için kofaktör olarak görev yapmakta ve yağ asidi, glukoz ve amino asit metabolizmasında kritik rol oynamaktadır (145). Biyotin eksikliğinin inflamatuar yanıtları artırdığı ve otoimmün hastalıklarla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Güncel çalışmalar, biyotin eksikliğinin dendritik hücrelerde IL-12 ve IL-23 üretimini artırarak Th1/Th17 polarizasyonunu indüklediğini ortaya koymuştur (146). mTOR sinyal yolağının aktivasyonu aracılığıyla biyotin eksikliği CD4+ T hücrelerinde proinflamatuar yanıtları tetiklemektedir (147). Bu mekanizma, İTP'de gözlenen T hücre disregülasyonu ile uyumludur. Biyotinin NF-κB ve Sp1/3 gibi transkripsiyon faktörlerini etkileyerek immünolojik ve inflamatuar fonksiyonları düzenlediği bildirilmiştir (148). Bu bulgular, İTP'de gözlenen immün disregülasyonun biyotin metabolizması ile bağlantılı olabileceğini düşündürmektedir.

Steroidogenez: Steroidogenez yolağındaki anlamlı değişim, çalışmamızın önemli bulgularından biridir. Adrenal korteks, glukokortikoidler (kortizol), mineralokortikoidler (aldosteron) ve adrenal androjenlerin (dehidrokortikosteron, dehidrokortikosteron sülfat, androstenedion) üretiminden sorumludur (149). Çalışmamızda gözlenen dehidrokortikosteron sülfat azalması ve kortizol artışı, kronik immün aktivasyon ve hipotalamus-hipofiz-adrenal eksenin disregülasyonunu yansıtmaktadır. Romatoid artritte de benzer steroidogenez değişiklikleri bildirilmiş olup, bu otoimmün hastalıklar arasında ortak patofizyolojik mekanizmalara işaret etmektedir (150).

Yolak analizinde cinsiyet farklılığının etkisi;

Bazı yolakların anlamlılığının büyük ölçüde cinsiyet-bağımlı metabolitlerden kaynaklandığını ortaya koymaktadır. Çalışmada en anlamlı bulunan iki yolak olan androstenedion metabolizması (p=0.007) ve androjen ve östrojen metabolizması (p=0.023) yolaklarına eşleşen metabolitlerin tamamı androjen veya cinsiyet hormonu sınıfındadır. Bu yolakların istatistiksel olarak anlamlı çıkması, İTP patofizyolojisinden ziyade gruplar arasındaki cinsiyet farklılığının doğrudan bir yansıması olarak değerlendirilebilir. Steroidogenez yolağı da (p=0.053) benzer şekilde cinsiyet ve tedavi etkilerinden önemli ölçüde etkilenmektedir. Buna karşın, biyotin metabolizması

yolağının cinsiyet etkisinden bağımsız göründüğü ve gerçek bir hastalık ilişkisini yansıtabileceği değerlendirilebilir.

İTP ve kontrol grubu arasında tanımlanan lipidomik veriler değerlendirildiğinde;

İTP hastalarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı değişen 24 lipid türü tanımlandı. Lipid türlerinden MG sınıfına ait MG (16:1)'in İTP grubunda artmış olması, trigliserid hidrolizi ve lipolitik aktivitenin arttığını düşündürmektedir. Monoasilgliseroller yalnızca enerji metabolizmasının ara ürünleri olmayıp, aynı zamanda hücresel sinyal iletiminde görev alan biyolojik aktif lipidlerdir. Bu artış, İTP'de inflamasyon ve bağışıklık hücresi aktivasyonu ile ilişkili metabolik yeniden programlamayı yansıtıyor olabilir. LPIP ve lizofosfolipitler, membran fosfolipit döngüsünün aktif bileşenleri olup, hücre içi sinyalizasyon, kalsiyum mobilizasyonu ve immün hücre aktivasyonu ile doğrudan ilişkilidir (151). LPIP (26:1)'in artışı, İTP'de trombosit aktivasyonu ve immün hücreler arası sinyal iletiminin değiştiğine işaret edebilir. Lizofosfolipitlerin inflamatuar yanıtların düzenlenmesinde rol oynadığı bilindiğinden, bu bulgu İTP patofizyolojisi açısından biyolojik olarak anlamlıdır. Sfingolipidler, özellikle seramidler, apoptoz, inflamasyon ve immün yanıtların düzenlenmesinde kritik rol oynar (152). Bu çalışmada Cer(d14:0/10:0)'ın artmış, GalCer ve PE-bağlı seramidlerin ise azalmış olması, sfingolipid metabolizmasında bir dengesizlik olduğunu düşündürmektedir. Seramid birikimi, inflamatuar sinyal yollarının aktivasyonu ve hücresel stres yanıtları ile ilişkilendirilmiştir. Bu durum, İTP'de bağışıklık aracılı trombosit yıkımının metabolik bir yansıması olarak değerlendirilebilir. Sfingolipid metabolizması da İTP patofizyolojisi ile güçlü bir ilişki göstermiştir. Özellikle seramid ve seramid fosfat düzeylerindeki artışlar, apoptotik sinyal yolaklarının aktive olduğunu desteklemektedir. PE ve PA gibi fosfolipidler, membran bütünlüğü ve hücresel sinyal iletimi açısından merkezi öneme sahiptir. Özellikle PA türlerinin artışı, fosfolipaz D aktivasyonunu ve inflamasyonla ilişkili lipid sinyal yolaklarının aktive olabileceğini düşündürmektedir. PA, aynı zamanda mTOR ve MAPK gibi hücre içi sinyal yolaklarının düzenlenmesinde rol oynayan bir lipid haberci moleküldür (153). Genel olarak VIP skoru yüksek lipidlerin, enerji metabolizması, membran yeniden düzenlenmesi, inflamasyon ve bağışıklık sinyalizasyonu ile ilişkili yolaklarda yer alması, İTP'de gözlenen metabolik değişimlerin rastlantısal olmadığını göstermektedir. Bu lipid profili, İTP patogenezinde bağışıklık aracılı süreçlerin lipid metabolizması ile yakından ilişkili olduğunu desteklemekte ve söz konusu lipidlerin aday biyobelirteçler olarak değerlendirilmesi için bir temel oluşturmaktadır. Ancak bu lipidlerin klinik kullanım potansiyelinin değerlendirilebilmesi

için daha geniş kohortlarda ve hedeflenmiş doğrulama çalışmalarına ihtiyaç bulunmaktadır.

Metabolomik ve lipidomik bulgular, İTP'nin patogenezine ilişkin güncel metabolomik ve lipidomik veriler ile karşılaştırıldığında;

Zhang ve ark. 2022 yılında yayımladığı GC-MS tabanlı plazma metabolomik çalışmasında, İTP hastaları ile sağlıklı kontroller arasında farklılaşan 17 metabolit tanımlanmış ve gözlenen metabolik bozuklukların özellikle fenilalanin, tirozin ve triptofan biyosentez yolları ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (10). Söz konusu çalışmada gliserol monostearat, 1-monopalmitin, gliserol, dokozahekzaenoik asit, oktadekadienoik asit, izovalerik asit (2-okzovalerik asit), cis-akonitat, D-fruktoz, galaktitol, myo-inozitol, L-valin, fenilalanin, L-prolin, glisin, 3-hidroksibütirat, kreatinin ve 3-hidroksipropiyonik asit; İTP hastalarını sağlıklı kontrollerden ayırt etmede tanısal potansiyele sahip metabolitler olarak rapor edilmiştir. Bu çalışmada ise Q-TOF LC/MS platformu kullanılarak daha geniş bir metabolit spektrumu taranmış ve gruplar arası ayrımda fenilalanin (VIP=2.09), dokozahekzaenoik asit (VIP=1.29) ve 2-oksovalerik asit (VIP=2.82) Zhang ve ark. bulgularıyla uyumlu şekilde tanımlanmıştır. Bu örtüşme, çalışmamızda elde edilen sonuçların literatürle tutarlılığını desteklemektedir. Bununla birlikte, yüksek çözünürlüklü Q-TOF LC/MS analizleri sayesinde çalışmamızda toplam 58 metabolit tanımlanmış olup, önceki GC-MS temelli çalışmalara kıyasla daha kapsamlı bir metabolik profil sunulmuştur. Çalışmamızda ayrıca prostaglandin H_2 (VIP=3.09), testosteron (VIP=3.04), protoporfirinojen IX (VIP=2.99), 11-dehidrokortikosteron (VIP=2.87), asimetrik dimetilarginin (VIP=2.79), 4-hidroksiretinoik asit (VIP=2.63), prostaglandin A2 (VIP=2.35), progesteron (VIP=2.27), N1,N12-diasetilspermin (VIP=2.27), prostaglandin E3 (VIP=2.17), kortizol (VIP=2.17), dolikil-β-D-glukozil fosfat (VIP=2.12), N1-asetilspermin (VIP=2.11) ve lökotrien A4 (VIP=2.08) gibi metabolitler, çok değişkenli istatistiksel analizlerle de doğrulanarak İTP için tanısal potansiyele sahip yeni aday biyobelirteçler olarak ortaya konmuştur. Özellikle lökotrien A4'ün 13.61 kat artışı, İTP'de inflamatuar lipid medyatörlerinin rolüne ilişkin daha önce bildirilmemiş bir bulgudur. Lökotrienler, lökosit kemotaksisi ve inflamatuar yanıtın güçlü aracılarıdır ve İTP'nin immün patogenezinde potansiyel hedefler olarak değerlendirilebilir.

Wen ve ark. İTP hastalarının dalaktaki metabolomik değişikliklerinin araştırıldığı çalışmada İTP hastalarının dalak dokusu sağlıklı bireyler ile karşılaştırıldığında, asetat, alanin, glutamin, gliserol, izolösin, lizin, valin, fenilalanin, lösin 3-hidroksibütirik asit,

askorbat, asparajin, glikojen, düşük yoğunluk lipoproteini, malonat, miyo -inositol, piroglutamat ve taurin miktarı değişen metabolitlerdi (12). Çalışmamızda benzer şekilde glutamin, fenilalanin, PC anlamlı değişen metabolitlerdi. Bu çalışmadan farklı olarak çalışmamızda L-arginin ve L-triptofan İTP grubunda azalması Wen ve ark. amino asit metaboliması ve dallı zincirli amino asitler yolağının değişmesi bulgularıyla uyumludur.

Wang ve ark. çalışmalarında, dışkı örneklerinde İTP'li bireylerin bağırsak mikrobiyotasında ikincil safra asidi biyosentezinin azaldığını bulmuştur. Ayrıca, kortikosteroid tedavisinin İTP'li bireylerin bağırsak mikrobiyomunu etkilediğini bildirmişlerdir. Kortikosteroidlere duyarlı İTP hastalarıyla karşılaştırıldığında, kortikosteroidlere dirençli İTP hastalarının, tedavi görmemiş İTP hastalarından farklı, belirgin bir bağırsak mikrobiyomuna sahip olduğunu tespit edilmiştir. Çalışmamızda kitobiyoz ve kenodeoksiglikolik asit düzeylerinin azalması, bağırsak mikrobiyotası ve safra asidi metabolizmasının etkilendiğine işaret etmektedir. Bu yolakların dışkı yerine plazma örneklerinde de saptanmış olması, İTP'nin yalnızca lokal bağırsak düzeyinde değil, sistemik metabolik ve immün ağlar üzerinden de mikrobiyota–konak etkileşimini etkileyen çok boyutlu bir hastalık olduğunu düşündürmektedir.

Li ve ark. kemik iliği biyopsi örneklerinde metabolomik çalışmasında (9), İTP hastalarında steroid metabolizmasının etkilendiği gösterilmiştir. Bu bulgular, Li ve ark. kemik iliği biyopsilerinde tanımladığı metabolik değişimlerle büyük ölçüde uyumlu olup, çalışmamızda da sfingolipid metabolizması ve triptofan metabolizmasının etkilenen yolaklar arasında yer aldığı gösterilmiştir. Bu benzerlik, İTP'de farklı biyolojik örneklerde (kemik iliği ve plazma) ortak patofizyolojik metabolik mekanizmaların devrede olduğunu desteklemektedir. Ayrıca çalışmamız İTP'de daha önce raporlanmamış olan dehidroepiandrosteron sülfat/kortizol dengesizliğini ortaya koymuştur. Dehidroepiandrosteron sülfat'ın belirgin azalması ve kortizolün artışı kronik stres ve hipotalamus-hipofiz-adrenal ekseni aktivasyonunun İTP'deki rolüne ilişkin yeni kanıtlar sunabilir.

Han ve ark. çalışmalarında deneysel olarak oluşturulan İTP'li fare serum numunelerinde ksantosin, 2′-Deoksiadenozin, litokolik asit 3-O-sülfat ve 20-hidroksieikosatetraenoik asit ayırt edici aday biyobelirteçler olarak önerilmiştir (92). Çalışmamaızda bu verilere ek olarak guanozin, kenodeoksikolik asit ve dokozahekzaenoik asit ilave aday biyobelirteçler olarak önerilebilir.

Bu bulgular tanımlanan metabolitlerin önemli bir kısmının güncel literatürle uyumlu olduğunu ve tanımlanan metabolitlerden fenilalanin, dokozahekzaenoik asit, 2-

okzovalerik asit ve glutamin İTP'nin tanısı için aday biyobeliteçler olarak önerilebileceğini göstermektedir.

İTP hastalarının tedavi durumuna göre metabolomik verileri değerlendirildiğinde;

Hem pozitif hem negatif iyonlaşma modunda PCA skor grafiğinde tedavi alan ve tedavi almayan İTP hastaları arasında belirgin ve tam bir ayrışma gözlenmemekle birlikte, gruplar arasında dikkat çekici bir kısmi ayrışma eğilimi mevcuttu. Bu durum, uygulanan tedavinin hastaların metabolomik profillerini tamamen normalleştirmediğini, ancak metabolik dağılım üzerinde yönlendirici ve kısmen düzenleyici bir etki oluşturduğunu düşündürmektedir. Elipslerin önemli ölçüde örtüşmesi, İTP'nin heterojen doğasına ve tedavi yanıtlarının bireyler arasında farklılık göstermesine işaret ederken, tedavinin metabolik etkilerinin tüm hastalarda homojen şekilde ortaya çıkmadığını da ortaya koymaktadır. Buna karşılık, tedavi almayan grupta gözlenen daha geniş varyasyon, hastalığın kontrolsüz inflamatuar süreçleri ve buna eşlik eden metabolik düzensizliklerin daha belirgin ve değişken bir metabolomik profil oluşturduğunu düşündürmektedir. Bu geniş dağılım, İTP'de inflamasyon şiddeti, hastalık süresi ve bireysel immün yanıt farklılıklarının metabolik düzeyde heterojen yansımaları olabileceğini göstermektedir. Öte yandan, tedavi alan gruptaki daha kompakt dağılım, steroid ve/veya intravenöz immünoglobulin tedavisinin inflamatuar ve metabolik dalgalanmaları kısmen sınırlayarak daha stabil bir metabolik fenotip oluşmasına katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir.

İTP ve kontrol grubu arasında anlamlı değişen metabolitler İTP grubunda tedavi alan ve almayan gruplar arasında kontrol grubuna göre normalize edilen değerler üzerinden değerlendirilmiş tedavi sonrası metabolit düzeylerinin kontrol değerine (1'e) yaklaşması, tedavinin ilgili metabolik bozukluğu düzelttiğinin göstergesi olarak kabul edilmiştir. Tedavi alan İTP hastalarında artış gösteren metabolitler; 4-hidroksifenilalanin, asimetrik dimetilarginin, kortizol, kortizon, N^1-asetilspermin, fenilalanin, progesteron, prostaglandin E3, protoporfirin IX, süksinik asit ve testosteron metabolitlerinin kontrol değerlerine yaklaşma eğilimi gösterdiğini, 2-aminobenzensülfonik asit, 2-oksovalerik asit, 3,4-dihidroksimandelik asit, bilirubin, biyosin, ksenodeoksikolik asit, kitobiyoz, dokosahekzaenoik asit, guanosin, oksalosüksinik asit, S-adenozilmetiyonin, stearik asit ve testosteron glukuronid ise kontrolden uzaklaşmaya devam ettiğini ortaya koymuştur. Bu bulgular, tedavinin İTP'de metabolomik profili tamamen sağlıklı bireylerinkine benzer hâle getirmekten ziyade, hastalığa bağlı metabolik düzensizlikleri belirli ölçüde dengeleyen ve yönlendiren bir rol oynadığını ortaya koymaktadır ve metabolomik

değişimlerin tedavi yanıtının değerlendirilmesinde potansiyel tamamlayıcı biyobelirteçler olarak kullanılabileceğine işaret etmektedir. Ancak tedavi durumuna göre metabolik profil karşılaştırmasında çalışmamızdaki bazı önemli sınırlılıklar göz önünde bulundurulduğunda; (1) tedavi alan grupta farklı tedavi modaliteleri (kortikosteroid, IVIG, TPO-RA, rituksimab vb.) mevcuttu ve spesifik tedavilerin metabolomik etkileri ayırt edilememiştir. Çalışmada tedavi süresi ve doz bilgileri değerlendirilmemiştir. Bu kesitsel bir karşılaştırma olup, aynı hastaların tedavi öncesi ve sonrası metabolik profillerini karşılaştıran bir çalışma değildir. Bu nedenle tedavi durumuna göre değişen metabolitler belirli yolaklar üzerinde kısmi ve seçici bir düzenleyici etki oluşturduğunu düşündürse de İTP tedavisi için zayıf aday biyobelirteçler olarak değerlendirilmiştir.

İTP tanılı hastalar ek hastalık varlığına göre metabolik profilleri değerlendirildiğinde;

PCA analizinde ek hastalığı olan ve olmayan gruplar arasında belirgin bir ayrışma gözlenmemekle birlikte, ek hastalığı olan grubun PCA uzayında daha geniş bir dağılım sergilemesi, komorbiditelerin metabolik heterojeniteyi artırdığını göstermektedir. Bu bulgu klinik açıdan beklenen bir sonuçtur. Farklı komorbiditelerin (otoimmün hastalık, metabolik sendrom, kardiyovasküler hastalık vb.) her biri kendine özgü metabolik değişikliklere yol açmakta ve bu durum grup içi varyasyonu artırmaktadır. Ek hastalığı olan ve olmayan İTP grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim gösteren 9 metabolit tanımlanmıştır. İki grup arasında dokuz metabolitin anlamlı düzeyde farklılaşması, ek hastalıkların belirli metabolik yolaklar üzerinde seçici etkiler yarattığını düşündürmektedir. Özellikle steroid hormon metabolizmasına ait östrojen glukuronidleri; 2-Metoksiestron 3-glukuronid (DK=14.58↓) ve estron glukuronid (DK=14.82↓) düzeylerinin ek hastalığı olan grupta azalması, kronik inflamasyon ve hepatik faz II metabolizmasının komorbiditelerden etkilenebileceğine işaret etmektedir. Bu durum, otoimmün ve metabolik hastalıkların steroid hormon homeostazını bozabileceğini bildiren literatürle uyumludur. Metiyonin döngüsünde gözlenen N-asetil-L-metiyonin artışı ve homosistein azalması, metilasyon ve transsülfürasyon yolaklarında bir yeniden düzenlenmeye işaret etmektedir. Ayrıca triptofan metabolizmasına ait indoleasetaldehit düzeylerindeki azalma, ek hastalıkların triptofan–serotonin ekseni üzerinde etkili olabileceğini düşündürmektedir. Retinoil β-glukuronid düzeylerinin azalması ise vitamin A metabolizmasının ve immün regülasyonun komorbiditelerden etkilendiğini ortaya koymaktadır. Sepiapterin artışı, tetrahidrobiyopterin metabolizmasındaki değişimleri ve buna bağlı olarak nörotransmitter sentezi ile nitrik oksit üretiminin etkilenmiş

olabileceğini düşündürmektedir. Buna ek olarak, γ-butirobetain düzeylerindeki azalma, karnitin biyosentezi ve mitokondriyal enerji metabolizmasının ek hastalık varlığında baskılanabileceğine işaret etmektedir.

Genel olarak, ek hastalık varlığı İTP hastalarında metabolik profil heterojenitesini artırmaktadır. Bununla birlikte, ana İTP/kontrol karşılaştırmasında tanımlanan metabolitlerin büyük kısmının ek hastalık varlığından bağımsız olarak anlamlılığını koruması, bu metabolitlerin İTP'ye özgü biyolojik değişimleri yansıttığını desteklemektedir. Bu bulgular, İTP'de biyobelirteç geliştirme çalışmalarında komorbiditelerin dikkate alınmasının önemini vurgulamakta ve hastalığın değerlendirilmesinde kişiselleştirilmiş yaklaşımların gerekliliğine işaret etmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma ile İTP tanısı alan hastaların ve sağlıklı kontrollerin metabolomik ve lipidomik profili Q-TOF LC/MS yöntemi kullanılarak güvenilir ve kapsamlı bir biçimde ortaya konulmuştur. Tek ve çok değişkenli istatistiksel analizlerin uygulanması ve metabolit tanımlamasında uygulanan iki aşamalı strateji İTP'ye özgü metabolik değişimlerin ayrıntılı şekilde değerlendirilmesine olanak sağlamıştır.

İstatistiksel analizler sonucunda, İTP hastaları ile sağlıklı kontrollerin metabolomik ve lipidomik profillerinin belirgin biçimde farklı olduğu gösterilmiştir. Bu farklılıklar, tedavi durumu ve eşlik eden hastalık varlığına göre yapılan alt grup analizlerinde de korunmuştur.

Tedavi durumu ve ek hastalık bulguları İTP'de biyobelirteç geliştirme çalışmalarında komorbiditelerin, uygulanan tedavi şeklinin ve kişiselleştirilmiş yaklaşımların gerekliliğine işaret etmiştir.

Lipidomik analiz sonucunda tanımlanan lipidlerin yapısal doğrulamasının sağlanabilmesi amacıyla, gelecekte yapılacak çalışmalarda standartlarla doğrulama ve hedefe yönelik analizlerin gerçekleştirilmesi önerilmektedir.

Biyolojik olarak doğrudan cinsiyete bağımlı olmayan prostaglandin H2, asimetrik dimetilarginin, 4-hidroksiretinoik asit, 2-oksovalerik asit, oksalosüksinik asit, N1,N12-diasetilspermin, prostaglandin E3, N1-asetilspermin, fenilalanin metabolitleri, İTP'ye özgü gerçek biyobelirteç adayları olarak daha güvenilir bir şekilde değerlendirilebilir. Bu 9 metabolitin, cinsiyet farklılığından bağımsız olarak İTP patofizyolojisini yansıtan gerçek biyobelirteç adayları olduğu ve gelecekteki validasyon çalışmalarında öncelikli olarak değerlendirilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Elde edilen bulguların, gelecek çalışmalarda daha geniş hasta kohortlarında doğrulanması, hedefli metabolomik yaklaşımlarla nicel analizlerin yapılması ve klinik parametrelerle entegrasyonunun sağlanması önerilmektedir. Ayrıca uygulanan Q-TOF LC/MS tabanlı analitik yöntemin yalnızca İTP değil; kanser, diyabet, kardiyovasküler ve diğer hematolojik hastalıkların metabolik profillerinin araştırılmasında da etkili bir şekilde uygulanabileceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Tarniceriu CC, Hurjui LL, Florea ID, Hurjui I, Gradinaru I, Tanase DM, et al. Immune Thrombocytopenic Purpura as a Hemorrhagic Versus Thrombotic Disease: An Updated Insight into Pathophysiological Mechanisms. Medicina (Kaunas). 2022;58(2).
2. Bennett CM, Neunert C, Grace RF, Buchanan G, Imbach P, Vesely SK, et al. Predictors of remission in children with newly diagnosed immune thrombocytopenia: Data from the Intercontinental Cooperative ITP Study Group Registry II participants. Pediatr Blood Cancer. 2018;65(1).
3. Onisai M, Vladareanu AM, Spinu A, Gaman M, Bumbea H. Idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) - new era for an old disease. Rom J Intern Med. 2019;57(4):273-83.
4. Lin HC, Huang J, Huang J, Zhang LJ, Yin XW, Yang JC, et al. Concurrence of immune thrombocytopenic purpura and thrombotic thrombocytopenic purpura: a case report and review of the literature. J Med Case Rep. 2023;17(1):38.
5. Provan D, Arnold DM, Bussel JB, Chong BH, Cooper N, Gernsheimer T, et al. Updated international consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. Blood Adv. 2019;3(22):3780-817.
6. Kapur R. Broadening the horizon of immune thrombocytopenia through Omics approaches. Br J Haematol. 2024;204(6):2159-61.
7. Ozan Kaplan MÇ. Past, present and future of metabolomic studies. Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences. 2020;40(3):366-74.
8. Zullig T, Kofeler HC. High Resolution Mass Spectrometry in Lipidomics. Mass Spectrom Rev. 2021;40(3):162-76.
9. Li Y, Sun T, Chen J, Liu X, Fu R, Xue F, et al. Metabolomics profile and machine learning prediction of treatment responses in immune thrombocytopenia: A prospective cohort study. Br J Haematol. 2024;204(6):2405-17.
10. Zhang Z, Wu X, Zhou M, Qi J, Zhang R, Li X, et al. Plasma Metabolomics Identifies the Dysregulated Metabolic Profile of Primary Immune Thrombocytopenia (ITP) Based on GC-MS. Front Pharmacol. 2022;13:845275.

11. Wang Y, Liu F, Zhang G, Su Y, Sun X, Chen Q, et al. Gut microbiome alterations and its link to corticosteroid resistance in immune thrombocytopenia. Sci China Life Sci. 2021;64(5):766-83.
12. Wen S, Wang Z, Feng J, Yang Y, Lin X, Huang H. NMR-Based Metabolomics Identify Metabolic Change in Spleen of Idiopathic Thrombocytopenic Purpura Patients. Metabolites. 2022;12(6).
13. Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. Blood Rev. 2009;23(4):177-89.
14. Semple JW, Italiano JE, Jr., Freedman J. Platelets and the immune continuum. Nat Rev Immunol. 2011;11(4):264-74.
15. Lefrancais E, Looney MR. Platelet Biogenesis in the Lung Circulation. Physiology (Bethesda). 2019;34(6):392-401.
16. Sharda A, Flaumenhaft R. The life cycle of platelet granules. F1000Res. 2018;7:236.
17. Ali RA, Wuescher LM, Worth RG. Platelets: essential components of the immune system. Curr Trends Immunol. 2015;16:65-78.
18. Xu XR, Zhang D, Oswald BE, Carrim N, Wang X, Hou Y, et al. Platelets are versatile cells: New discoveries in hemostasis, thrombosis, immune responses, tumor metastasis and beyond. Crit Rev Clin Lab Sci. 2016;53(6):409-30.
19. Heijnen H, van der Sluijs P. Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules ... or not? J Thromb Haemost. 2015;13(12):2141-51.
20. Chatterjee M, Huang Z, Zhang W, Jiang L, Hultenby K, Zhu L, et al. Distinct platelet packaging, release, and surface expression of proangiogenic and antiangiogenic factors on different platelet stimuli. Blood. 2011;117(14):3907-11.
21. Xu XR, Carrim N, Neves MA, McKeown T, Stratton TW, Coelho RM, et al. Platelets and platelet adhesion molecules: novel mechanisms of thrombosis and anti-thrombotic therapies. Thromb J. 2016;14(Suppl 1):29.
22. An O, Deppermann C. Platelet lifespan and mechanisms for clearance. Curr Opin Hematol. 2024;31(1):6-15.
23. Cattaneo M. P2Y12 receptors: structure and function. J Thromb Haemost. 2015;13 Suppl 1:S10-6.
24. Eisinger F, Patzelt J, Langer HF. The Platelet Response to Tissue Injury. Front Med (Lausanne). 2018;5:317.

25. Shevchuk O, Begonja AJ, Gambaryan S, Totzeck M, Rassaf T, Huber TB, et al. Proteomics: A Tool to Study Platelet Function. Int J Mol Sci. 2021;22(9).
26. Noh JY. Megakaryopoiesis and Platelet Biology: Roles of Transcription Factors and Emerging Clinical Implications. Int J Mol Sci. 2021;22(17).
27. Patel SR, Hartwig JH, Italiano JE, Jr. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. J Clin Invest. 2005;115(12):3348-54.
28. Roweth HG, Parvin S, Machlus KR. Megakaryocyte modification of platelets in thrombocytopenia. Curr Opin Hematol. 2018;25(5):410-5.
29. de Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD, Malloy BE, Gurney AL, Spencer SA, et al. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. Nature. 1994;369(6481):533-8.
30. Alexander WS. Thrombopoietin. Growth Factors. 1999;17(1):13-24.
31. Kaakoush NO, Pickford R, Jaffe A, Ooi CY. Is there a role for stool metabolomics in cystic fibrosis? Pediatr Int. 2016;58(8):808-11.
32. Grozovsky R, Giannini S, Falet H, Hoffmeister KM. Novel mechanisms of platelet clearance and thrombopoietin regulation. Curr Opin Hematol. 2015;22(5):445-51.
33. Sun S, Urbanus RT, Ten Cate H, de Groot PG, de Laat B, Heemskerk JWM, et al. Platelet Activation Mechanisms and Consequences of Immune Thrombocytopenia. Cells. 2021;10(12).
34. Andrews RK, Berndt MC. Platelet physiology and thrombosis. Thromb Res. 2004;114(5-6):447-53.
35. Nurden AT. Platelets and tissue remodeling: extending the role of the blood clotting system. Endocrinology. 2007;148(7):3053-5.
36. Li R, Hoffmeister KM, Falet H. Glycans and the platelet life cycle. Platelets. 2016;27(6):505-11.
37. Reusswig F, An O, Deppermann C. Platelet life cycle during aging: function, production and clearance. Platelets. 2024;35(1):2433750.
38. Bendas G, Schlesinger M. The GPIb-IX complex on platelets: insight into its novel physiological functions affecting immune surveillance, hepatic thrombopoietin generation, platelet clearance and its relevance for cancer development and metastasis. Exp Hematol Oncol. 2022;11(1):19.
39. Krishnegowda M, Rajashekaraiah V. Platelet disorders: an overview. Blood Coagul Fibrinolysis. 2015;26(5):479-91.

40. Hanna R, Gibney R, Boysen-Osborn M. Thrombotic Microangiopathies. Emerg Med Clin North Am. 2025;43(3):407-20.
41. Kaur R, Kaur M, Singh J. Endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in type 2 diabetes mellitus: molecular insights and therapeutic strategies. Cardiovasc Diabetol. 2018;17(1):121.
42. Danese E, Montagnana M, Favaloro EJ, Lippi G. Drug-Induced Thrombocytopenia: Mechanisms and Laboratory Diagnostics. Semin Thromb Hemost. 2020;46(3):264-74.
43. Bakchoul T, Marini I. Drug-associated thrombocytopenia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2018;2018(1):576-83.
44. Berndt MC, Andrews RK. Bernard-Soulier syndrome. Haematologica. 2011;96(3):355-9.
45. Gauer RL, Braun MM. Thrombocytopenia. Am Fam Physician. 2012;85(6):612-22.
46. Consolini R, Legitimo A, Caparello MC. The Centenary of Immune Thrombocytopenia - Part 1: Revising Nomenclature and Pathogenesis. Front Pediatr. 2016;4:102.
47. Crickx E, Mahevas M, Michel M, Godeau B. Older Adults and Immune Thrombocytopenia: Considerations for the Clinician. Clin Interv Aging. 2023;18:115-30.
48. Gonzalez-Lopez TJ, Provan D, Barez A, Bernardo-Gutierrez A, Bernat S, Martinez-Carballeira D, et al. Primary and secondary immune thrombocytopenia (ITP): Time for a rethink. Blood Rev. 2023;61:101112.
49. Fillitz M, Dixer B, Keil F. Practical considerations for the management of immune thrombocytopenic purpura. Memo. 2021;14(4):350-4.
50. Liu XG, Bai XC, Chen FP, Cheng YF, Dai KS, Fang MY, et al. Chinese guidelines for treatment of adult primary immune thrombocytopenia. Int J Hematol. 2018;107(6):615-23.
51. Portielje JE, Westendorp RG, Kluin-Nelemans HC, Brand A. Morbidity and mortality in adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. Blood. 2001;97(9):2549-54.
52. Cooper N, Ghanima W. Immune Thrombocytopenia. N Engl J Med. 2019;381(10):945-55.
53. Kohli R, Chaturvedi S. Epidemiology and Clinical Manifestations of Immune Thrombocytopenia. Hamostaseologie. 2019;39(3):238-49.

54. Moulis G, Lapeyre-Mestre M, Adoue D, Sailler L. [Epidemiology and pharmacoepidemiology of immune thrombocytopenia]. Rev Med Interne. 2017;38(7):444-9.
55. Koylu A, Pamuk GE, Uyanik MS, Demir M, Pamuk ON. Immune thrombocytopenia: epidemiological and clinical features of 216 patients in northwestern Turkey. Ann Hematol. 2015;94(3):459-66.
56. Zhang X, Zhang D, Liu W, Li H, Fu R, Liu X, et al. Abnormal lipid rafts related ganglioside expression and signaling in T lymphocytes in immune thrombocytopenia patients. Autoimmunity. 2016;49(1):58-68.
57. Yin DM, Yuan D, Sun RJ, Xu HZ, Hun SY, Sui XH, et al. Identification of ORM1, vWF, SPARC, and PPBP as immune-related proteins involved in immune thrombocytopenia by quantitative LC-MS/MS. Clin Proteomics. 2023;20(1):24.
58. Allegra A, Cicero N, Mirabile G, Giorgianni CM, Gangemi S. Novel Biomarkers for Diagnosis and Monitoring of Immune Thrombocytopenia. Int J Mol Sci. 2023;24(5).
59. Zufferey A, Kapur R, Semple JW. Pathogenesis and Therapeutic Mechanisms in Immune Thrombocytopenia (ITP). J Clin Med. 2017;6(2).
60. Li Q, Marcoux G, Hu Y, Rebetz J, Guo L, Semple E, et al. Autoimmune effector mechanisms associated with a defective immunosuppressive axis in immune thrombocytopenia (ITP). Autoimmun Rev. 2024;23(12):103677.
61. Saki N, Hadi H, Keikhaei B, Mirzaei A, Purrahman D. Gut microbiome composition and dysbiosis in immune thrombocytopenia: A review of literature. Blood Rev. 2024;67:101219.
62. Cooper N, Kruse A, Kruse C, Watson S, Morgan M, Provan D, et al. Immune thrombocytopenia (ITP) World Impact Survey (iWISh): Patient and physician perceptions of diagnosis, signs and symptoms, and treatment. Am J Hematol. 2021;96(2):188-98.
63. Provan D, Stasi R, Newland AC, Blanchette VS, Bolton-Maggs P, Bussel JB, et al. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. Blood. 2010;115(2):168-86.
64. Mithoowani S, Gregory-Miller K, Goy J, Miller MC, Wang G, Noroozi N, et al. High-dose dexamethasone compared with prednisone for previously untreated primary immune thrombocytopenia: a systematic review and meta-analysis. Lancet Haematol. 2016;3(10):e489-e96.

65. Al-Samkari H, Kuter DJ. Immune Thrombocytopenia in Adults: Modern Approaches to Diagnosis and Treatment. Semin Thromb Hemost. 2020;46(3):275-88.
66. Saldanha A, Colella MP, Villaca PR, Thachil J, Orsi FA. The immune thrombocytopenia paradox: Should we be concerned about thrombosis in ITP? Thromb Res. 2024;241:109109.
67. Pearson-Shaver NMPNGAAJVAL. Immune Thrombocytopenia. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562282/ ISITIFSPJ-Af, editor2024.
68. Lucchini E, Zaja F, Bussel J. Rituximab in the treatment of immune thrombocytopenia: what is the role of this agent in 2019? Haematologica. 2019;104(6):1124-35.
69. Mishra K, Kumar S, Sandal R, Jandial A, Sahu KK, Singh K, et al. Safety and efficacy of splenectomy in immune thrombocytopenia. Am J Blood Res. 2021;11(4):361-72.
70. Mamani-Matsuda M, Cosma A, Weller S, Faili A, Staib C, Garçon L, et al. The human spleen is a major reservoir for long-lived vaccinia virus-specific memory B cells. Blood. 2008;111(9):4653-9.
71. Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. Nat Rev Immunol. 2005;5(8):606-16.
72. Bussel J. Treatment of immune thrombocytopenic purpura in adults. Semin Hematol. 2006;43(3 Suppl 5):S3-10; discussion S8-9.
73. Sandal R, Mishra K, Jandial A, Sahu KK, Siddiqui AD. Update on diagnosis and treatment of immune thrombocytopenia. Expert Rev Clin Pharmacol. 2021;14(5):553-68.
74. Cooper N, Kruse A, Kruse C, Watson S, Morgan M, Provan D, et al. Immune thrombocytopenia (ITP) World Impact Survey (I-WISh): Impact of ITP on health-related quality of life. Am J Hematol. 2021;96(2):199-207.
75. Dalamaga M. Clinical metabolomics: Useful insights, perspectives and challenges. Metabol Open. 2024;22:100290.
76. Martias C, Baroukh N, Mavel S, Blasco H, Lefevre A, Roch L, et al. Optimization of Sample Preparation for Metabolomics Exploration of Urine, Feces, Blood and Saliva in Humans Using Combined NMR and UHPLC-HRMS Platforms. Molecules. 2021;26(14).

77. Worheide MA, Krumsiek J, Kastenmuller G, Arnold M. Multi-omics integration in biomedical research - A metabolomics-centric review. Anal Chim Acta. 2021;1141:144-62.
78. Hu T, Liu CH, Lei M, Zeng Q, Li L, Tang H, et al. Metabolic regulation of the immune system in health and diseases: mechanisms and interventions. Signal Transduct Target Ther. 2024;9(1):268.
79. Wishart DS. Metabolomics for Investigating Physiological and Pathophysiological Processes. Physiol Rev. 2019;99(4):1819-75.
80. Odom JD, Sutton VR. Metabolomics in Clinical Practice: Improving Diagnosis and Informing Management. Clin Chem. 2021;67(12):1606-17.
81. Bar N, Korem T, Weissbrod O, Zeevi D, Rothschild D, Leviatan S, et al. A reference map of potential determinants for the human serum metabolome. Nature. 2020;588(7836):135-40.
82. Roberts LD, Souza AL, Gerszten RE, Clish CB. Targeted metabolomics. Curr Protoc Mol Biol. 2012;Chapter 30:Unit 30 2 1-24.
83. Gika HG, Theodoridis GA, Plumb RS, Wilson ID. Current practice of liquid chromatography-mass spectrometry in metabolomics and metabonomics. J Pharm Biomed Anal. 2014;87:12-25.
84. Han X, Gross RW. The foundations and development of lipidomics. J Lipid Res. 2022;63(2):100164.
85. Aerqin Q, Wang ZT, Wu KM, He XY, Dong Q, Yu JT. Omics-based biomarkers discovery for Alzheimer's disease. Cell Mol Life Sci. 2022;79(12):585.
86. McCartney A, Vignoli A, Biganzoli L, Love R, Tenori L, Luchinat C, et al. Metabolomics in breast cancer: A decade in review. Cancer Treat Rev. 2018;67:88-96.
87. Wei S, Liu L, Zhang J, Bowers J, Gowda GA, Seeger H, et al. Metabolomics approach for predicting response to neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. Mol Oncol. 2013;7(3):297-307.
88. Sun T, Chen J, Xu Y, Li Y, Liu XF, Li HY, et al. Proteomics landscape and machine learning prediction of long-term response to splenectomy in primary immune thrombocytopenia. Brit J Haematol. 2024;204(6):2418-28.
89. Zhang X, Gu S, You L, Xu Y, Zhou D, Chen Y, et al. Gut Microbiome and Metabolome Were Altered and Strongly Associated With Platelet Count in Adult Patients With Primary Immune Thrombocytopenia. Front Microbiol. 2020;11:1550.

90. Wojcik I, Schmidt DE, de Neef LA, Rab MAE, Meek B, de Weerdt O, et al. A functional spleen contributes to afucosylated IgG in humans. Sci Rep. 2021;11(1):24045.
91. Batty CA, Cauchi M, Hunter JO, Woolner J, Baglin T, Turner C. Differences in microbial metabolites in urine headspace of subjects with Immune Thrombocytopenia (ITP) detected by volatile organic compound (VOC) analysis and metabolomics. Clin Chim Acta. 2016;461:61-8.
92. Han J, Wang Q. Identification of potential biomarkers for the study of the mechanisms of immune thrombocytopenia using bioinformatics and metabolomics. Biochem Biophys Res Commun. 2025;779:152470.
93. Liu SY, Yuan D, Sun RJ, Zhu JJ, Shan NN. Significant reductions in apoptosis-related proteins (HSPA6, HSPA8, ITGB3, YWHAH, and PRDX6) are involved in immune thrombocytopenia. J Thromb Thrombolysis. 2021;51(4):905-14.
94. Zhang W, Yuan X, Wang Z, Xu J, Ye S, Jiang P, et al. Study on the Treatment of ITP Mice with IVIG Sourced from Distinct Sex-Special Plasma (DSP-IVIG). Int J Mol Sci. 2023;24(21).
95. Gonzalez-Dominguez A, Duran-Guerrero E, Fernandez-Recamales A, Lechuga-Sancho AM, Sayago A, Schwarz M, et al. An Overview on the Importance of Combining Complementary Analytical Platforms in Metabolomic Research. Curr Top Med Chem. 2017;17(30):3289-95.
96. Zhang B, Schmidlin T. Recent advances in cardiovascular disease research driven by metabolomics technologies in the context of systems biology. NPJ Metab Health Dis. 2024;2(1):25.
97. Gouellec AL, Plazy C, Toussaint B. What clinical metabolomics will bring to the medicine of tomorrow. Front Anal Sci. 2023;3.
98. Broeckling CD, Beger RD, Cheng LL, Cumeras R, Cuthbertson DJ, Dasari S, et al. Current Practices in LC-MS Untargeted Metabolomics: A Scoping Review on the Use of Pooled Quality Control Samples. Anal Chem. 2023;95(51):18645-54.
99. Fiehn O. Metabolomics by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Combined Targeted and Untargeted Profiling. Curr Protoc Mol Biol. 2016;114:30 4 1- 4 2.
100. De Castro F, Benedetti M, Del Coco L, Fanizzi FP. NMR-Based Metabolomics in Metal-Based Drug Research. Molecules. 2019;24(12).
101. Zhang W, Ramautar R. CE-MS for metabolomics: Developments and applications in the period 2018-2020. Electrophoresis. 2021;42(4):381-401.

102. Villas-Boas SG, Mas S, Akesson M, Smedsgaard J, Nielsen J. Mass spectrometry in metabolome analysis. Mass Spectrom Rev. 2005;24(5):613-46.
103. Skogvold HB, Sand ES, Elgstoen KBP. Global Metabolomics Using LC-MS for Clinical Applications. Methods Mol Biol. 2025;2855:23-39.
104. Chen CJ, Lee DY, Yu J, Lin YN, Lin TM. Recent advances in LC-MS-based metabolomics for clinical biomarker discovery. Mass Spectrom Rev. 2023;42(6):2349-78.
105. Fahy E, Subramaniam S. RefMet: a reference nomenclature for metabolomics. Nat Methods. 2020;17(12):1173-4.
106. Neunert C, Terrell DR, Arnold DM, Buchanan G, Cines DB, Cooper N, et al. American Society of Hematology 2019 guidelines for immune thrombocytopenia. Blood Adv. 2019;3(23):3829-66.
107. Nussinovitch U, Shoenfeld Y. The role of gender and organ specific autoimmunity. Autoimmun Rev. 2012;11(6-7):A377-85.
108. Nairz M, Theurl I, Wolf D, Weiss G. Iron deficiency or anemia of inflammation? : Differential diagnosis and mechanisms of anemia of inflammation. Wien Med Wochenschr. 2016;166(13-14):411-23.
109. Michel M, Chanet V, Dechartres A, Morin AS, Piette JC, Cirasino L, et al. The spectrum of Evans syndrome in adults: new insight into the disease based on the analysis of 68 cases. Blood. 2009;114(15):3167-72.
110. Cuker A, Neunert CE. How I treat refractory immune thrombocytopenia. Blood. 2016;128(12):1547-54.
111. McKenzie CG, Guo L, Freedman J, Semple JW. Cellular immune dysfunction in immune thrombocytopenia (ITP). Br J Haematol. 2013;163(1):10-23.
112. Olsson B, Andersson PO, Jernas M, Jacobsson S, Carlsson B, Carlsson LM, et al. T-cell-mediated cytotoxicity toward platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. Nat Med. 2003;9(9):1123-4.
113. Dunn WB, Broadhurst D, Begley P, Zelena E, Francis-McIntyre S, Anderson N, et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Nat Protoc. 2011;6(7):1060-83.
114. Pinto RC. Chemometrics Methods and Strategies in Metabolomics. Adv Exp Med Biol. 2017;965:163-90.

115. Neunert CE, Arnold DM, Grace RF, Kuhne T, McCrae KR, Terrell DR. The 2022 review of the 2019 American Society of Hematology guidelines on immune thrombocytopenia. Blood Adv. 2024;8(13):3578-82.
116. Guo C, Xie S, Chi Z, Zhang J, Liu Y, Zhang L, et al. Bile Acids Control Inflammation and Metabolic Disorder through Inhibition of NLRP3 Inflammasome. Immunity. 2016;45(4):944.
117. Ikuta K, Ejima A, Abe S, Shimba A. Control of immunity and allergy by steroid hormones. Allergol Int. 2022;71(4):432-6.
118. Smith LC, Ramar M, Riley GL, 3rd, Mathias CB, Lee JY. Steroid hormone regulation of immunometabolism and inflammation. Front Immunol. 2025;16:1654034.
119. Mauvais-Jarvis F, Bhasin S. Metabolic Messengers: testosterone. Nat Metab. 2026.
120. Zwahlen M, Stute P. Impact of progesterone on the immune system in women: a systematic literature review. Arch Gynecol Obstet. 2024;309(1):37-46.
121. Sawalha AH, Kovats S. Dehydroepiandrosterone in systemic lupus erythematosus. Curr Rheumatol Rep. 2008;10(4):286-91.
122. Ritorto G, Ussia S, Macri R, Serra M, Tavernese A, Altomare C, et al. From Vascular Dysfunction to Atherothrombosis: The Pivotal Role of Eicosanoids and Their Receptors in Platelet and Endothelial Imbalance: A Scoping Review. Int J Mol Sci. 2025;27(1).
123. Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. Proc Natl Acad Sci U S A. 1975;72(8):2994-8.
124. Badimon L, Vilahur G, Rocca B, Patrono C. The key contribution of platelet and vascular arachidonic acid metabolism to the pathophysiology of atherothrombosis. Cardiovasc Res. 2021;117(9):2001-15.
125. Adili R, Voigt EM, Bormann JL, Foss KN, Hurley LJ, Meyer ES, et al. In vivo modeling of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid-mediated inhibition of both platelet function and accumulation in arterial thrombi. Platelets. 2019;30(2):271-9.
126. Chevre R, Silvestre-Roig C, Soehnlein O. Nutritional Modulation of Innate Immunity: The Fat-Bile-Gut Connection. Trends Endocrinol Metab. 2018;29(10):686-98.

127. Tsuji A, Ikeda Y, Yoshikawa S, Taniguchi K, Sawamura H, Morikawa S, et al. The Tryptophan and Kynurenine Pathway Involved in the Development of Immune-Related Diseases. Int J Mol Sci. 2023;24(6).
128. Duerschmied D, Suidan GL, Demers M, Herr N, Carbo C, Brill A, et al. Platelet serotonin promotes the recruitment of neutrophils to sites of acute inflammation in mice. Blood. 2013;121(6):1008-15.
129. Eisenhofer G, Kopin IJ, Goldstein DS. Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. Pharmacol Rev. 2004;56(3):331-49.
130. Mandal S, Mandal A, Park MH. Depletion of the polyamines spermidine and spermine by overexpression of spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase 1 (SAT1) leads to mitochondria-mediated apoptosis in mammalian cells. Biochem J. 2015;468(3):435-47.
131. Madeo F, Eisenberg T, Pietrocola F, Kroemer G. Spermidine in health and disease. Science. 2018;359(6374).
132. Boger RH. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the "L-arginine paradox" and acts as a novel cardiovascular risk factor. J Nutr. 2004;134(10 Suppl):2842S-7S; discussion 53S.
133. Sibal L, Agarwal SC, Home PD, Boger RH. The Role of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disease. Curr Cardiol Rev. 2010;6(2):82-90.
134. Heinemann IU, Jahn M, Jahn D. The biochemistry of heme biosynthesis. Arch Biochem Biophys. 2008;474(2):238-51.
135. Kema IP, de Vries EG, Schellings AM, Postmus PE, Muskiet FA. Improved diagnosis of carcinoid tumors by measurement of platelet serotonin. Clin Chem. 1992;38(4):534-40.
136. Zhou X, Zhou X, Zhang Z, Zhu R, Lu M, Lv K, et al. Mechanism of Bile Acid in Regulating Platelet Function and Thrombotic Diseases. Adv Sci (Weinh). 2024;11(32):e2401683.
137. Reusswig F, Reich M, Wienands L, Herebian D, Keitel-Anselmino V, Elvers M. The bile acid receptor TGR5 inhibits platelet activation and thrombus formation. Platelets. 2024;35(1):2322733.

138. Wang PF, Jiang F, Zeng QM, Yin WF, Hu YZ, Li Q, et al. Mitochondrial and metabolic dysfunction of peripheral immune cells in multiple sclerosis. J Neuroinflammation. 2024;21(1):28.
139. Nenezic N, Kostic S, Strac DS, Grunauer M, Nenezic D, Radosavljevic M, et al. Dehydroepiandrosterone (DHEA): Pharmacological Effects and Potential Therapeutic Application. Mini Rev Med Chem. 2023;23(8):941-52.
140. Miller WL, Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. Endocr Rev. 2011;32(1):81-151.
141. Gubbels Bupp MR, Jorgensen TN. Androgen-Induced Immunosuppression. Front Immunol. 2018;9:794.
142. Ainslie RJ, Simitsidellis I, Kirkwood PM, Gibson DA. RISING STARS: Androgens and immune cell function. J Endocrinol. 2024;261(3).
143. Cutolo M, Straub RH. Sex steroids and autoimmune rheumatic diseases: state of the art. Nat Rev Rheumatol. 2020;16(11):628-44.
144. Cervera R, Boffa MC, Khamashta MA, Hughes GR. The Euro-Phospholipid project: epidemiology of the antiphospholipid syndrome in Europe. Lupus. 2009;18(10):889-93.
145. Zempleni J, Wijeratne SS, Hassan YI. Biotin. Biofactors. 2009;35(1):36-46.
146. Agrawal S, Agrawal A, Said HM. Biotin deficiency enhances the inflammatory response of human dendritic cells. Am J Physiol Cell Physiol. 2016;311(3):C386-91.
147. Elahi A, Sabui S, Narasappa NN, Agrawal S, Lambrecht NW, Agrawal A, et al. Biotin Deficiency Induces Th1- and Th17-Mediated Proinflammatory Responses in Human CD4(+) T Lymphocytes via Activation of the mTOR Signaling Pathway. J Immunol. 2018;200(8):2563-70.
148. Kuroishi T. Regulation of immunological and inflammatory functions by biotin. Can J Physiol Pharmacol. 2015;93(12):1091-6.
149. Turcu AF, Auchus RJ. Adrenal steroidogenesis and congenital adrenal hyperplasia. Endocrinol Metab Clin North Am. 2015;44(2):275-96.
150. Straub RH, Cutolo M. Involvement of the hypothalamic--pituitary--adrenal/gonadal axis and the peripheral nervous system in rheumatoid arthritis: viewpoint based on a systemic pathogenetic role. Arthritis Rheum. 2001;44(3):493-507.

151. Kano K, Aoki J, Hla T. Lysophospholipid Mediators in Health and Disease. Annu Rev Pathol. 2022;17:459-83.
152. Hannun YA, Obeid LM. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. Nat Rev Mol Cell Biol. 2018;19(3):175-91.
153. Yang Y, Lee M, Fairn GD. Phospholipid subcellular localization and dynamics. J Biol Chem. 2018;293(17):6230-40.

EKLER

EK-1. Özgeçmiş

EK 2. Etik Kurul Onay Belgesi