

EXPERIMED

Volume/Sayı **8** Issue/Cilt **2** August/Ağustos 2018

- » **Meme Kanserinde D Vitamininin Olası Anti Kanser Etkisi**
Özge Bildiren, Buse Cevatemre, Ebru Nur Ay, Güneş Özen, Ceylan Hepokur,
Merve Erkisa, Özlem Küçükhuşeyin, Engin Ulukaya, Serap Kuruca, İlhan Yaylım
- » **Optikospinal Multipl Skleroz**
Özlem Mercan, Zekiye Ülger, Cemile Handan Mısırlı, Recai Türkoğlu
- » **Parkinson'da ve Akciğer Kanserinde PI3K/Akt Yolağı**
Elif Şanlı, Nazlı Yalçınkaya, Erdem Tüzün
- » **Alzheimer Hastalığında miRNA'lar**
Ebru Özer, Gamze Güven, Ebba Lohmann, Çağrı Güleç,
Nihan Erginel-Ünaltuna



EXPERIMED

EDITORS/EDİTÖR

Erdem Tüzün

Istanbul University,
Aziz Sancar Institute of
Experimental Medicine,
Department of Neuroscience,
Istanbul, Turkey

*Istanbul Üniversitesi,
Aziz Sancar Deneysel
Tıp Araştırma Enstitüsü,
Sinirbilim Anabilim Dalı,
Istanbul, Türkiye*

EDITORS/EDİTÖR KURULU

Ümit Zeybek

Istanbul University,
Aziz Sancar Institute of
Experimental Medicine,
Department of Molecular
Medicine, Istanbul, Turkey

*Istanbul Üniversitesi,
Aziz Sancar Deneysel
Tıp Araştırma Enstitüsü,
Moleküler Tıp Anabilim
Dalı, Istanbul, Türkiye*

Cem İsmail Küçükali

Istanbul University,
Aziz Sancar Institute of
Experimental Medicine,
Department of Neuroscience,
Istanbul, Turkey

*Istanbul Üniversitesi,
Aziz Sancar Deneysel
Tıp Araştırma Enstitüsü,
Sinirbilim Anabilim Dalı,
Istanbul, Türkiye*

Gaye Erten

Istanbul University,
Aziz Sancar Institute of
Experimental Medicine,
Department of Immunology,
Istanbul, Turkey

*Istanbul Üniversitesi,
Aziz Sancar Deneysel
Tıp Araştırma Enstitüsü,
İmmünoloji Anabilim Dalı,
Istanbul, Türkiye*

Sema Sırma Ekmekçi

Istanbul University,
Aziz Sancar Institute of
Experimental Medicine,
Department of Genetics,
Istanbul, Turkey

*Istanbul Üniversitesi,
Aziz Sancar Deneysel Tıp
Araştırma Enstitüsü, Genetik
Anabilim Dalı, Istanbul,
Türkiye*

EDITORIAL BOARD/ YAYIN KURULU

İlhan Yaylım

Istanbul University,
Aziz Sancar Institute of
Experimental Medicine,
Department of Molecular
Medicine, Istanbul, Turkey

*Istanbul Üniversitesi,
Aziz Sancar Deneysel
Tıp Araştırma Enstitüsü,
Moleküler Tıp Anabilim
Dalı, Istanbul, Türkiye*

Esin Aktaş Çetin

Istanbul University,
Aziz Sancar Institute of
Experimental Medicine,
Department of Genetics,
Istanbul, Turkey

*Istanbul Üniversitesi,
Aziz Sancar Deneysel Tıp
Araştırma Enstitüsü, Genetik
Anabilim Dalı, Istanbul,
Türkiye*

Feyza Nur Tuncer

Istanbul University,
Aziz Sancar Institute of
Experimental Medicine,
Department of Genetics,
Istanbul, Turkey

*Istanbul Üniversitesi,
Aziz Sancar Deneysel Tıp
Araştırma Enstitüsü, Genetik
Anabilim Dalı, Istanbul,
Türkiye*

Numan Oezguen

Baylor College of Medicine,
Department of Pathology &
Immunology, Texas, USA

*Baylor Üniversitesi Tıp
Fakültesi, Patoloji ve
İmmünoloji Anabilim Dalı,
Texas, ABD*

Gökçe Toruner

MD Anderson Cancer
Center, Department of
Hematopathology, USA

*MD Anderson Kanser
Merkezi, Hematoloji
Anabilim Dalı, ABD*

Elif Özkök

Istanbul University,
Aziz Sancar Institute of
Experimental Medicine,
Department of Neuroscience,
Istanbul, Turkey

*Istanbul Üniversitesi,
Aziz Sancar Deneysel
Tıp Araştırma Enstitüsü,
Sinirbilim Anabilim Dalı,
Istanbul, Türkiye*

Aydın Çevik

Istanbul University,
Aziz Sancar Institute of
Experimental Medicine,
Department of Laboratory
Animals Science, Istanbul,
Turkey

*Istanbul Üniversitesi,
Aziz Sancar Deneysel
Tıp Araştırma Enstitüsü,
Laboratuvar Hayvanları
Bilimi Anabilim Dalı,
Istanbul, Türkiye*

Abid Hussaini

Columbia University, Taub
Institute, Department of
Pathology and Cell Biology,
New York, USA

*Columbia Üniversitesi, Taub
Enstitüsü, Patoloji ve Hücre
Biyolojisi Anabilim Dalı,
New York, ABD*

Ebba Lohmann

University of Tübingen,
Hertie Institute for Clinical
Brain Research, Department
Of Neurodegenerative
Diseases, Tübingen,
Germany

*Tübingen Üniversitesi,
Hertie Institute for
Clinical Brain Research,
Nörodejeneratif Hastalıklar
Anabilim Dalı, Tübingen,
Almanya*

Çağla Eroğlu

Duke University,
Department of Cell Biology,
North Carolina, USA

*Duke Üniversitesi, Hücre
Biyolojisi Anabilim Dalı,
Kuzey Carolina, ABD*

Gürol Tunçman

Harvard University,
Department of Genetics
and Complex Diseases,
Massachusetts, USA

*Harvard Üniversitesi,
Genetik ve Karmaşık
Hastalıklar Anabilim Dalı,
Massachusetts, ABD*



Publisher
İbrahim KARA

Publication Director
Ali ŞAHİN

Finance and Administration
Zeynep YAKIŞIRER

Deputy Publication Director
Gökhan ÇİMEN

Editorial Development
Gizem KAYAN

Publication Coordinators
Betül ÇİMEN

Özlem ÇAKMAK
Okan AYDOĞAN
İrem DELİÇAY
Büşra PARMAKSIZ
Nergis KALKAN
Arzu YILDIRIM

Project Assistants

Ecenur ASLİM
Neslihan KÖKSAL
Cansu ASLAN

Graphics Department

Ünal ÖZER
Deniz DURAN
Beyzanur KARABULUT

Address: Büyükdere Cad. No:
105/9 34394 Mecidiyeköy, Şişli,
Istanbul-Turkey
Phone: +90 212 217 17 00
Fax: +90 212 217 22 92
E-mail: info@avesyayincilik.com

EXPERIMED

SECTION EDITORS/ BÖLÜM EDITÖRLERİ

Neurology/Sinirbilim

Atay Vural

Koç University School of Medicine,
Department of Neurology, İstanbul,
Turkey

*Koç University School of Medicine,
Department of Neurology, İstanbul,
Turkey*

Medical Biology/ Tıbbi Biyoloji

Duygu Gezen-Ak

İstanbul University Cerrahpaşa
School of Medicine, Department
of Medical Biology, İstanbul, Turkey

*İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp
Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim
Dalı, İstanbul, Türkiye*

Immunology/İmmünoloji

Umut Can Küçüksezer

İstanbul University, Aziz Sancar
Institute of Experimental Medicine,
Department of Immunology,
İstanbul, Turkey

*İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar
Deneyel Tıp Araştırma Enstitüsü,
İmmünoloji Anabilim Dalı, İstanbul,
Türkiye*

Molecular Medicine/ Moleküler Tıp

Bedia Çakmakoğlu

İstanbul University, Aziz Sancar
Institute of Experimental Medicine,
Department of Molecular
Medicine, İstanbul, Turkey

*İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar
Deneyel Tıp Araştırma Enstitüsü,
Moleküler Tıp Anabilim Dalı,
İstanbul, Türkiye*

Genetics/Genetik

Evrım Kömürcü Bayrak

İstanbul University, Aziz Sancar
Institute of Experimental Medicine,
Department of Genetic, İstanbul,
Turkey

*İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar
Deneyel Tıp Araştırma Enstitüsü,
Genetik Anabilim Dalı, İstanbul,
Türkiye*

Laboratory Animals Science/ Laboratuvar Hayvanları

Rivaze Kalaycı

İstanbul University, Aziz Sancar
Institute of Experimental Medicine,
Department of Laboratory Animals
Science, İstanbul, Turkey

*İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar
Deneyel Tıp Araştırma Enstitüsü,
Laboratuvar Hayvanları Bilimi
Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye*

Medical Pharmacology/ Farmakoloji

Ahmet Gökhan Akkan

İstanbul University Cerrahpaşa
School of Medicine, Department
of Medical Pharmacology, İstanbul,
Turkey

*İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa
Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji
Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye*

Physiology/Fizyoloji

Gökhan Metin

İstanbul University Cerrahpaşa
School of Medicine, Department
of Physiology, İstanbul, Turkey

*İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp
Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı,
İstanbul, Türkiye*

Biochemistry/Biyokimya

Güzide Şule Seçkin

İstanbul University İstanbul School
of Medicine, Department of
Medical Biochemistry, İstanbul,
Turkey

*İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp
Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim
Dalı, İstanbul, Türkiye*

Sports Medicine/ Spor Bilimleri

Bülent Bayraktar

İstanbul University İstanbul School
of Medicine, Department of Sports
Medicine, İstanbul, Turkey

*İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp
Fakültesi, Spor Hekimliği Anabilim
Dalı, İstanbul, Türkiye*

Biyomedical/Biyomedikal

Olcay Güneş

İstanbul Technical University,
School of Electrical and
Electronics Engineering,
Department of Electronics and
Communication Engineering,
İstanbul, Turkey

*İstanbul Teknik Üniversitesi Elektrik-
Elektronik Fakültesi, Elektronik ve
Haberleşme Mühendisliği Bölümü,
İstanbul, Türkiye*

Internal Medicine/ Dahili Tıp Bilimleri

Esme Ekizoğlu

İstanbul University İstanbul School
of Medicine, Department of
Neurology, İstanbul, Turkey

*İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp
Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı,
İstanbul, Türkiye*

General Surgery/ Cerrahi Tıp Bilimleri

Nihat Aksakal

İstanbul University İstanbul School
of Medicine, Department of
General Surgery, İstanbul, Turkey

*İstanbul Üniversitesi İstanbul
Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Dalı,
İstanbul, Türkiye*

EXPERIMED

AIMS AND SCOPE

Experimed is an international, scientific, open access periodical published in accordance with independent, unbiased, and double-blinded peer-review principles. The journal is the official publication of İstanbul University Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine and it is published triannually on April, August, and December. The publication languages of the journal are Turkish and English.

Experimed aims to contribute to the literature by publishing manuscripts at the highest scientific level on all fields of basic and clinical medical sciences. The journal publishes original articles, case reports, reviews, and letters to the editor that are prepared in accordance with ethical guidelines.

The scope of the journal includes but not limited to; experimental studies in all fields of medical sciences.

The target audience of the journal includes specialists and professionals working and interested in all disciplines of basic and clinical medical sciences.

The editorial and publication processes of the journal are shaped in accordance with the guidelines of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), World Association of Medical Editors (WAME), Council of Science Editors (CSE), Committee on Publication Ethics (COPE), European Association of Science Editors (EASE), and National Information Standards Organization (NISO). The journal is in conformity with the Principles of Transparency and Best Practice in Scholarly Publishing (doaj.org/bestpractice).

Processing and publication are free of charge with the journal. No fees are requested from the authors at any point throughout the evaluation and publication process. All manuscripts must be submitted via the online submission system, which is available at <http://experimed.istanbul.edu.tr/en/>. The journal guidelines, technical information, and the required forms are available on the journal's web page.

All expenses of the journal are covered by the İstanbul University.

Statements or opinions expressed in the manuscripts published in the journal reflect the views of the author(s) and not the opinions of the İstanbul University Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine, editors, editorial board, and/or publisher; the editors, editorial board, and publisher disclaim any responsibility or liability for such materials.

All published content is available online, free of charge at <http://experimed.istanbul.edu.tr/en/>

İstanbul University holds the international copyright of all the content published in the journal.

Editor in Chief: Prof. Erdem Tüzün

Address: Vakıf Gureba Avenue, İstanbul Medical Faculty Campus, 34093, Fatih, İstanbul, Turkey

Phone: 0212-4142000-33356

Fax: 0212-5324171

E-mail: erdemtuzun@istanbul.edu.tr

Publisher: AVES

Address: Büyükdere Avenue, 105/9 34394 Mecidiyeköy, Şişli, İstanbul, Turkey

Phone: +90 212 217 17 00

Fax: +90 212 217 22 92

E-mail: info@avesyayincilik.com

Web page: avesyayincilik.com

EXPERIMED

AMAÇ VE KAPSAM

Experimed; İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Araştırma Enstitüsü'nün çift-kör hakemli, açık erişimli bilimsel yayın organıdır. Dergi Nisan, Ağustos ve Aralık aylarında olmak üzere, yılda 3 sayı olarak yayınlanır. Derginin yayın dili Türkçe ve İngilizce'dir.

Experimed, temel ve klinik tıp bilimlerinin tüm alanlarında orijinal araştırma, olgu sunumu, derleme ve editöre mektup türlerinde makaleler yayınladığı yüksek bilimsel standartlara sahip makalelerle literatüre katkı sunmaktadır.

Derginin hedef kitlesi, temel ve klinik tıbbi bilimler ile ilgilenen ve araştırma yapan tüm uzmanlar ve araştırmacılarıdır.

Derginin editöryel ve yayın süreçleri International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), World Association of Medical Editors (WAME), Council of Science Editors (CSE), Committee on Publication Ethics (COPE), European Association of Science Editors (EASE) ve National Information Standards Organization (NISO) organizasyonlarının kılavuzlarına uygun olarak biçimlendirilir. Experimed, Principles of Transparency and Best Practice in Scholarly Publishing (doaj.org/bestpractice) ilkelerini benimsemiştir.

Makale değerlendirme ve yayın işlemleri için yazarlardan ücret talep edilmemektedir. Tüm makaleler http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/_ sayfasındaki online makale değerlendirme sistemi kullanılarak dergiye gönderilmektedir. Derginin yazım kurallarına, gerekli formlara ve dergiyle ilgili diğer bilgilere web sayfasından erişilebilir.

Derginin tüm masrafları İstanbul Üniversitesi tarafından karşılanmaktadır.

Dergide yayınlanan makalelerde ifade edilen bilgi, fikir ve görüşler İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Baş Editör, Editörler, Yayın Kurulu ve Yayıncı'nın değil, yazar(lar)ın bilgi ve görüşlerini yansıtır. Baş Editör, Editörler, Yayın Kurulu ve Yayıncı, bu gibi yazarlara ait bilgi ve görüşler için hiçbir sorumluluk ya da yükümlülük kabul etmemektedir.

Yayınlanan tüm içeriğe http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/_ adresinden ücretsiz olarak erişilebilir.

Dergide yayınlanan içeriğin tüm telif hakları İstanbul Üniversitesi'ne aittir.

Baş Editör: Prof. Dr. Erdem Tüzün
Address: Vakıf Gureba Caddesi, İstanbul Tıp Fakültesi Kampüsü, 34093, Fatih, İstanbul, Türkiye
Phone: 0212-4142000-33356
Fax: 0212-5324171
E-mail: erdemtuzun@istanbul.edu.tr

Publisher: AVES
Address: Büyükdere Avenue, 105/9 34394 Mecidiyeköy, Şişli, İstanbul, Turkey
Phone: +90 212 217 17 00
Fax: +90 212 217 22 92
E-mail: info@avesyayincilik.com
Web page: avesyayincilik.com

EXPERIMED

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Experimed is an international, scientific, open access periodical published in accordance with independent, unbiased, and double-blinded peer-review principles. The journal is the official publication of İstanbul University Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine and it is published triannually on April, August, and December. The publication languages of the journal are Turkish and English.

Experimed aims to contribute to the literature by publishing manuscripts at the highest scientific level on all fields of basic and clinical medical sciences. The journal publishes original articles, case reports, reviews, and letters to the editor that are prepared in accordance with ethical guidelines.

The editorial and publication processes of the journal are shaped in accordance with the guidelines of the International Council of Medical Journal Editors (ICMJE), the World Association of Medical Editors (WAME), the Council of Science Editors (CSE), the Committee on Publication Ethics (COPE), the European Association of Science Editors (EASE), and National Information Standards Organization (NISO). The journal conforms to the Principles of Transparency and Best Practice in Scholarly Publishing (doaj.org/bestpractice).

Originality, high scientific quality, and citation potential are the most important criteria for a manuscript to be accepted for publication. Manuscripts submitted for evaluation should not have been previously presented or already published in an electronic or printed medium. The journal should be informed of manuscripts that have been submitted to another journal for evaluation and rejected for publication. The submission of previous reviewer reports will expedite the evaluation process. Manuscripts that have been presented in a meeting should be submitted with detailed information on the organization, including the name, date, and location of the organization.

Manuscripts submitted to Experimed will go through a double-blind peer-review process. Each submission will be reviewed by at least two external, independent peer reviewers who are experts in their fields in order to ensure an unbiased evaluation process. The editorial board will invite an external and independent editor to manage the evaluation processes of manuscripts submitted by editors or by the editorial board members of the journal. The Editor in Chief is the final authority in the decision-making process for all submissions.

An approval of research protocols by the Ethics Committee in accordance with international agreements (World Medical Association Declaration of Helsinki "Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects," amended in October 2013, www.wma.net) is required for experimental, clinical, and drug studies and for some case reports. If required, ethics committee reports or an equivalent official document will be requested from the authors. For manuscripts concerning experimental research on humans, a statement should be included that shows that written informed consent of patients and volunteers was obtained following a de-

tailed explanation of the procedures that they may undergo. For studies carried out on animals, the measures taken to prevent pain and suffering of the animals should be stated clearly. Information on patient consent, the name of the ethics committee, and the ethics committee approval number should also be stated in the Materials and Methods section of the manuscript. It is the authors' responsibility to carefully protect the patients' anonymity. For photographs that may reveal the identity of the patients, signed releases of the patient or of their legal representative should be enclosed.

All submissions are screened by a similarity detection software (iThenticate by CrossCheck).

In the event of alleged or suspected research misconduct, e.g., plagiarism, citation manipulation, and data falsification/fabrication, the Editorial Board will follow and act in accordance with COPE guidelines.

Each individual listed as an author should fulfill the authorship criteria recommended by the International Committee of Medical Journal Editors

(ICMJE - www.icmje.org). The ICMJE recommends that authorship be based on the following 4 criteria:

- 1 Substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; AND
- 2 Drafting the work or revising it critically for important intellectual content; AND
- 3 Final approval of the version to be published; AND
- 4 Agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

In addition to being accountable for the parts of the work he/she has done, an author should be able to identify which co-authors are responsible for specific other parts of the work. In addition, authors should have confidence in the integrity of the contributions of their co-authors.

All those designated as authors should meet all four criteria for authorship, and all who meet the four criteria should be identified as authors. Those who do not meet all four criteria should be acknowledged in the title page of the manuscript.

Experimed requires corresponding authors to submit a signed and scanned version of the authorship contribution form (available for download through <http://experimed.istanbul.edu.tr/en/>) during the initial submission process in order to act appropriately on authorship rights and to prevent ghost or honorary authorship. If the editorial board suspects a case of "gift authorship," the submission will be rejected without further review. As part of the submission of the manuscript, the corresponding author should also send a

EXPERIMED

short statement declaring that he/she accepts to undertake all the responsibility for authorship during the submission and review stages of the manuscript.

Experimed requires and encourages the authors and the individuals involved in the evaluation process of submitted manuscripts to disclose any existing or potential conflicts of interests, including financial, consultant, and institutional, that might lead to potential bias or a conflict of interest. Any financial grants or other support received for a submitted study from individuals or institutions should be disclosed to the Editorial Board. To disclose a potential conflict of interest, the ICMJE Potential Conflict of Interest Disclosure Form should be filled in and submitted by all contributing authors. Cases of a potential conflict of interest of the editors, authors, or reviewers are resolved by the journal's Editorial Board within the scope of COPE and ICMJE guidelines.

The Editorial Board of the journal handles all appeal and complaint cases within the scope of COPE guidelines. In such cases, authors should get in direct contact with the editorial office regarding their appeals and complaints. When needed, an ombudsperson may be assigned to resolve cases that cannot be resolved internally. The Editor in Chief is the final authority in the decision-making process for all appeals and complaints.

When submitting a manuscript to Experimed, authors accept to assign the copyright of their manuscript to İstanbul University. If rejected for publication, the copyright of the manuscript will be assigned back to the authors. Experimed requires each submission to be accompanied by a Copyright Transfer Form (available for download at http://experimed.istanbul.edu.tr/en/_). When using previously published content, including figures, tables, or any other material in both print and electronic formats, authors must obtain permission from the copyright holder. Legal, financial and criminal liabilities in this regard belong to the author(s).

Statements or opinions expressed in the manuscripts published in Experimed reflect the views of the author(s) and not the opinions of the editors, the editorial board, or the publisher; the editors, the editorial board, and the publisher disclaim any responsibility or liability for such materials. The final responsibility in regard to the published content rests with the authors.

MANUSCRIPT PREPARATION

The manuscripts should be prepared in accordance with ICMJE-Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals (updated in December 2015 - <http://www.icmje.org/icmje-recommendations.pdf>). Authors are required to prepare manuscripts in accordance with the CONSORT guidelines for randomized research studies, STROBE guidelines for observational original research studies, STARd guidelines for studies on diagnostic accuracy, PRISMA guidelines for systematic reviews and meta-analysis, ARRIVE guidelines for experimental animal studies, and TREND guidelines for non-randomized public behavior.

Manuscripts can only be submitted through the journal's online manuscript submission and evaluation system, available at <http://ex->

perimed.istanbul.edu.tr/en/_. Manuscripts submitted via any other medium will not be evaluated.

Manuscripts submitted to the journal will first go through a technical evaluation process where the editorial office staff will ensure that the manuscript has been prepared and submitted in accordance with the journal's guidelines. Submissions that do not conform to the journal's guidelines will be returned to the submitting author with technical correction requests.

Authors are required to submit the following:

- Copyright Transfer Form,
- Author Contributions Form, and
- ICMJE Potential Conflict of Interest Disclosure Form (should be filled in by all contributing authors)

during the initial submission. These forms are available for download at http://experimed.istanbul.edu.tr/en/_.

Preparation of the Manuscript

Title page: A separate title page should be submitted with all submissions and this page should include:

- The full title of the manuscript as well as a short title (running head) of no more than 50 characters,
- Name(s), affiliations, ORCID IDs and highest academic degree(s) of the author(s),
- Grant information and detailed information on the other sources of support,
- Name, address, telephone (including the mobile phone number) and fax numbers, and email address of the corresponding author,
- Acknowledgment of the individuals who contributed to the preparation of the manuscript but who do not fulfill the authorship criteria.

Abstract: A Turkish and an English abstract should be submitted with all submissions except for Letters to the Editor. Submitting a Turkish abstract is not compulsory for international authors. The abstract of Original Articles should be structured with subheadings (Objective, Material and Method, Results, and Conclusion). Please check Table 1 below for word count specifications.

Keywords: Each submission must be accompanied by a minimum of three to a maximum of six keywords for subject indexing at the end of the abstract. The keywords should be listed in full without abbreviations. The keywords should be selected from the National Library of Medicine, Medical Subject Headings database (<https://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>).

Manuscript Types

Original Articles: This is the most important type of article since it provides new information based on original research. The main text of original articles should be structured with Introduction, Material and Method, Results, and Discussion subheadings. Please check Table 1 for the limitations for Original Articles.

EXPERIMED

Statistical analysis to support conclusions is usually necessary. Statistical analyses must be conducted in accordance with international statistical reporting standards (Altman DG, Gore SM, Gardner MJ, Pocock SJ. Statistical guidelines for contributors to medical journals. *Br Med J* 1983; 7; 1489-93). Information on statistical analyses should be provided with a separate subheading under the Materials and Methods section and the statistical software that was used during the process must be specified.

Units should be prepared in accordance with the International System of Units (SI).

Editorial Comments: Editorial comments aim to provide a brief critical commentary by reviewers with expertise or with high reputation in the topic of the research article published in the journal. Authors are selected and invited by the journal to provide such comments. Abstract, Keywords, and Tables, Figures, Images, and other media are not included.

Review Articles: Reviews prepared by authors who have extensive knowledge on a particular field and whose scientific background has been translated into a high volume of publications with a high citation potential are welcomed. These authors may even be invited by the journal. Reviews should describe, discuss, and evaluate the current level of knowledge of a topic in clinical practice and should guide future studies. The main text should contain Introduction, Clinical and Research Consequences, and Conclusion sections. Please check Table 1 for the limitations for Review Articles.

Case Reports: There is limited space for case reports in the journal and reports on rare cases or conditions that constitute challenges in diagnosis and treatment, those offering new therapies or revealing knowledge not included in the literature, and interesting and educative case reports are accepted for publication. The text should include Introduction, Case Presentation, Discussion, and Conclusion subheadings. Please check Table 1 for the limitations for Case Reports.

Letters to the Editor: This type of manuscript discusses important parts, overlooked aspects, or lacking parts of a previously published article. Articles on subjects within the scope of the journal that might attract the readers' attention, particularly educative cases, may also be submitted in the form of a "Letter to the Editor." Readers can also present their comments on the published manuscripts in the form of a "Letter to the Editor." Abstract, Key-

words, and Tables, Figures, Images, and other media should not be included. The text should be unstructured. The manuscript that is being commented on must be properly cited within this manuscript.

Tables

Tables should be included in the main document, presented after the reference list, and they should be numbered consecutively in the order they are referred to within the main text. A descriptive title must be placed above the tables. Abbreviations used in the tables should be defined below the tables by footnotes (even if they are defined within the main text). Tables should be created using the "insert table" command of the word processing software and they should be arranged clearly to provide easy reading. Data presented in the tables should not be a repetition of the data presented within the main text but should be supporting the main text. Figures and Figure Legends

Figures, graphics, and photographs should be submitted as separate files (in TIFF or JPEG format) through the submission system. The files should not be embedded in a Word document or the main document. When there are figure subunits, the subunits should not be merged to form a single image. Each subunit should be submitted separately through the submission system. Images should not be labeled (a, b, c, etc.) to indicate figure subunits. Thick and thin arrows, arrowheads, stars, asterisks, and similar marks can be used on the images to support figure legends. Like the rest of the submission, the figures too should be blind. Any information within the images that may indicate an individual or institution should be blinded. The minimum resolution of each submitted figure should be 300 DPI. To prevent delays in the evaluation process, all submitted figures should be clear in resolution and large in size (minimum dimensions: 100 × 100 mm). Figure legends should be listed at the end of the main document.

All acronyms and abbreviations used in the manuscript should be defined at first use, both in the abstract and in the main text. The abbreviation should be provided in parentheses following the definition.

When a drug, product, hardware, or software program is mentioned within the main text, product information, including the name of the product, the producer of the product, and city and the country of the company (including the state if in USA), should be provided in parentheses in the following format: "Discovery St PET/CT scanner (General Electric, Milwaukee, WI, USA)"

Table 1. Limitations for each manuscript type

Type of manuscript	Word limit	Abstract word limit	Reference limit	Table limit	Figure limit
Original Article	3500	250 (Structured)	30	6	7 or total of 15 images
Review Article	5000	250	50	6	10 or total of 20 images
Case Report	1000	200	15	No tables	10 or total of 20 images
Letter to the Editor	500	No abstract	5	No tables	No media

EXPERIMED

All references, tables, and figures should be referred to within the main text, and they should be numbered consecutively in the order they are referred to within the main text.

Limitations, drawbacks, and the shortcomings of original articles should be mentioned in the Discussion section before the conclusion paragraph.

References

While citing publications, preference should be given to the latest, most up-to-date publications. If an ahead-of-print publication is cited, the DOI number should be provided. Authors are responsible for the accuracy of references. Journal titles should be abbreviated in accordance with the journal abbreviations in Index Medicus/MEDLINE/PubMed. When there are six or fewer authors, all authors should be listed. If there are seven or more authors, the first six authors should be listed followed by "et al." In the main text of the manuscript, references should be cited using Arabic numbers in parentheses. The reference styles for different types of publications are presented in the following examples.

Journal Article: Rankovic A, Rancic N, Jovanovic M, Ivanovi M, Gajović O, Lazić Z, et al. Impact of imaging diagnostics on the budget – Are we spending too much? *Vojnosanit Pregl* 2013; 70: 709-11.

Book Section: Suh KN, Keystone JS. Malaria and babesiosis. Gorbach SL, Barlett JG, Blacklow NR, editors. *Infectious Diseases*. Philadelphia: Lippincott Williams; 2004.p.299-308.

Books with a Single Author: Sweetman SC. *Martindale the Complete Drug Reference*. 34th ed. London: Pharmaceutical Press; 2005.

Editor(s) as Author: Huizing EH, de Groot JAM, editors. *Functional reconstructive nasal surgery*. Stuttgart-New York: Thieme; 2003.

Conference Proceedings: Bengissson S, Sothemin BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoff O, editors. *MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992 Sept 6-10; Geneva, Switzerland*. Amsterdam: North-Holland; 1992. pp.1561-5.

Scientific or Technical Report: Cusick M, Chew EY, Hoogwerf B, Agrón E, Wu L, Lindley A, et al. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Risk factors for renal replacement therapy in the Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS), Early Treatment Diabetic Retinopathy Study *Kidney Int*: 2004. Report No: 26.

Thesis: Yılmaz B. Ankara Üniversitesindeki Öğrencilerin Beslenme Durumları, Fiziksel Aktiviteleri ve Beden Kitle İndeksleri Kan Lipidleri Arasındaki İlişkiler. H.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi. 2007.

Manuscripts Accepted for Publication, Not Published Yet: Slots J. The microflora of black stain on human primary teeth. *Scand J Dent Res*. 1974.

Epub Ahead of Print Articles: Cai L, Yeh BM, Westphalen AC, Roberts JP, Wang ZJ. Adult living donor liver imaging. *Diagn Interv Radiol*. 2016 Feb 24. doi: 10.5152/dir.2016.15323. [Epub ahead of print].

Manuscripts Published in Electronic Format: Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis (serial online)* 1995 Jan-Mar (cited 1996 June 5): 1(1): (24 screens). Available from: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/cid.htm>.

REVISIONS

When submitting a revised version of a paper, the author must submit a detailed "Response to the reviewers" that states point by point how each issue raised by the reviewers has been covered and where it can be found (each reviewer's comment, followed by the author's reply and line numbers where the changes have been made) as well as an annotated copy of the main document. Revised manuscripts must be submitted within 30 days from the date of the decision letter. If the revised version of the manuscript is not submitted within the allocated time, the revision option may be canceled. If the submitting author(s) believe that additional time is required, they should request this extension before the initial 30-day period is over.

Accepted manuscripts are copy-edited for grammar, punctuation, and format. Once the publication process of a manuscript is completed, it is published online on the journal's webpage as an ahead-of-print publication before it is included in its scheduled issue. A PDF proof of the accepted manuscript is sent to the corresponding author and their publication approval is requested within 2 days of their receipt of the proof.

Editor in Chief: Prof. Erdem Tüzün
Address: Vakıf Gureba Avenue, Istanbul Medical Faculty Campus, 34093, Fatih, İstanbul, Turkey
Phone: 0212-4142000-33356
Fax: 0212-5324171
E-mail: erdemtuzun@istanbul.edu.tr

Publisher: AVES
Address: Büyükdere Cad. 105/9 34394 Mecidiyeköy, Şişli, İstanbul, Turkey
Phone: +90 212 217 17 00
Fax: +90 212 217 22 92
E-mail: info@avesyayincilik.com
avesyayincilik.com

EXPERIMED

YAZARLARA BİLGİ

Experimed; İstanbul Üniversitesi Aziz Sançar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nün çift-kör hakemli açık erişimli bilimsel yayın organıdır. Dergi Nisan, Ağustos ve Aralık aylarında olmak üzere, yılda 3 sayı olarak yayınlanır. Yayın dili Türkçe ve İngilizce'dir.

Experimed, temel ve klinik tıp bilimlerinin tüm alanlarında orijinal araştırma, olgu sunumu, derleme ve editöre mektup türlerinde makaleler yayınlamaktadır.

Derginin editöryel ve yayın süreçleri International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), World Association of Medical Editors (WAME), Council of Science Editors (CSE), Committee on Publication Ethics (COPE), European Association of Science Editors (EASE), ve National Information Standards Organization (NISO) organizasyonlarının kılavuzlarına uygun olarak biçimlendirilmiştir. Experimed'in editöryel ve yayın süreçleri, Principles of Transparency and Best Practice in Scholarly Publishing (doaj.org/bestpractice) ilkelerine uygun olarak yürütülmektedir.

Özgünlük, yüksek bilimsel kalite ve atıf potansiyeli bir makalenin yayına kabulü için en önemli kriterlerdir. Gönderilen yazıların daha önce başka bir elektronik ya da basılı dergide, kitapta veya farklı bir mecrada sunulmamış ya da yayınlanmamış olması gerekir. Daha önce başka bir dergiye gönderilen ancak yayına kabul edilmeyen yazılar hakkında dergi önceden bilgilendirilmelidir. Bu yazıların eski hakem raporlarının Yayın Kuruluna gönderilmesi değerlendirme süresinin hızlanmasını sağlayacaktır. Toplantılarda sunulan çalışmalar için, sunum yapılan organizasyonun tam adı, tarihi, şehri ve ülkesi belirtilmelidir.

Experimed'e gönderilen tüm makaleler çift-kör hakem değerlendirme sürecinden geçmektedir. Tarafsız değerlendirme sürecini sağlamak için her makale alanlarında uzman en az iki dış-bağımsız hakem tarafından değerlendirilir. Dergi Yayın Kurulu üyeleri tarafından gönderilecek makalelerin değerlendirme süreçleri, davet edilecek dış bağımsız editörler tarafından yönetilecektir. Bütün makalelerin karar verme süreçlerinde nihai karar yetkisi Baş Editör'dedir.

Klinik ve deneysel çalışmalar, ilaç araştırmaları ve bazı olgu sunumları için World Medical Association Declaration of Helsinki "Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects", (amended in October 2013, www.wma.net) çerçevesinde hazırlanmış Etik Komisyon raporu gerekmektedir. Gerekli görülmesi halinde Etik Komisyon raporu veya eşdeğeri olan resmi bir yazı yazarlardan talep edilebilir. İnsanlar üzerinde yapılmış deneysel çalışmaların sonuçlarını bildiren yazılarda, çalışmanın yapıldığı kişilere uygulanan prosedürlerin niteliği tümüyle açıklandıktan sonra, onaylarının alındığına ilişkin bir açıklamaya metin içinde yer verilmelidir. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda ise ağır, acı ve rahatsızlık verilmemesi için yapılmış olanlar açık olarak makalede belirtilmelidir. Hasta onamları, Etik Kurul raporun alındığı kurumun adı, onay belgesinin numarası ve tarihi ana metin dosyasında yer alan Yöntemler başlığı altında yazılmalıdır. Hastaların kimliklerinin gizliliğini korumak yazarların sorumluluğundadır. Hastaların kimliğini açığa çıkarabilecek fotoğraflar için hastadan ya da yasal temsilcilerinden alınan imzalı izinlerin de gönderilmesi gereklidir.

Bütün makalelerin benzerlik tespiti denetimi, iThenticate yazılımı aracılığıyla yapılmaktadır.

Yayın Kurulu, dergimize gönderilen çalışmalar hakkındaki intihal, atıf manipülasyonu ve veri sahteciliği iddia ve şüpheleri karşısında COPE kurallarına uygun olarak hareket edecektir.

Yazar olarak listelenen herkesin ICMJE (www.icmje.org) tarafından önerilen yazarlık kriterlerini karşılaması gerekmektedir. ICMJE, yazarların aşağıdaki kriteri karşılamasını önermektedir:

1. Çalışmanın konseptine/tasarımına; ya da çalışma için verilerin toplanmasına, analiz edilmesine ve yorumlanmasına önemli katkı sağlamış olmak; VE
2. Yazı taslağını hazırlamış ya da önemli fikrinsel içeriğin eleştirel incelemelerini yapmış olmak; VE
3. Yazının yayından önceki son halini gözden geçirmiş ve onaylamış olmak; VE
4. Çalışmanın herhangi bir bölümünün geçerliliği ve doğruluğuna ilişkin soruların uygun şekilde soruşturulduğunun ve çözümlendiğinin garantisini vermek amacıyla çalışmanın her yönünden sorumlu olmayı kabul etmek.

Bir yazar, çalışmada katkı sağladığı kısımların sorumluluğunu almasına ek olarak, diğer yazarların çalışmanın hangi kısımlarından sorumlu olduğunu da teşhis edebilmelidir. Ayrıca, yazarlar birbirlerinin katkılarının bütünlüğüne güven duymalıdır.

Yazar olarak belirtilen her kişi yazarlığın dört kriterini karşılamalıdır ve bu dört kriteri karşılayan her kişi yazar olarak tanımlanmalıdır. Dört kriterin hepsini karşılamayan kişilere makalenin başlık sayfasında teşekkür edilmelidir.

Yazarlık haklarına uygun hareket etmek ve hayalet ya da lütf yazarlığın önlenmesini sağlamak amacıyla sorumlu yazarlar makale yükleme sürecinde <http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/> adresinden erişilebilen Yazar Katkı Formu'nu imzalamalı ve taranmış versiyonunu yazıyla birlikte göndermelidir. Yayın Kurulu'nun gönderilen bir makalede "lütf yazarlık" olduğundan şüphelenmesi durumunda söz konusu makale değerlendirme yapılmaksızın reddedilecektir. Makale gönderimi kapsamında; sorumlu yazar makale gönderim ve değerlendirme süreçleri boyunca yazarlık ile ilgili tüm sorumluluğu kabul ettiğini bildiren kısa bir ön yazı göndermelidir.

Experimed; gönderilen makalelerin değerlendirme sürecine dahil olan yazarların ve bireylerin, potansiyel çıkar çatışmasına ya da önyargıya yol açabilecek finansal, kurumsal ve diğer ilişkiler dahil mevcut ya da potansiyel çıkar çatışmalarını beyan etmelerini talep ve teşvik eder.

Bir çalışma için bir birey ya da kurumdan alınan her türlü finansal destek ya da diğer destekler Yayın Kurulu'na beyan edilmeli ve potansiyel çıkar çatışmalarını beyan etmek amacıyla ICMJE Potansiyel Çıkar Çatışmaları Formu katkı sağlayan tüm yazarlar tarafından ayrı ayrı doldurulmalıdır. Editörler, yazarlar ve hakemler ile ilgili potansi-

EXPERIMED

Yer çıkar çatışması vakaları derginin Yayın Kurulu tarafından COPE ve ICMJE rehberleri kapsamında çözülmektedir.

Derginin Yayın Kurulu, itiraz ve şikayet vakalarını, COPE rehberleri kapsamında işleme almaktadır. Yazarlar, itiraz ve şikayetleri için doğrudan Editöryel Ofis ile temasa geçebilirler. İhtiyaç duyulduğunda Yayın Kurulu'nun kendi içinde çözemediği konular için tarafsız bir temsilci atanmaktadır. İtiraz ve şikayetler için karar verme süreçlerinde nihai kararı Baş Editör verecektir.

Experimed'e makale gönderirken yazarlar makalelerinin telif haklarını İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'ne devretmeyi kabul ederler. Reddedilen makalelerin telif hakları yazarlarına geri iade edilecektir. Experimed her makalenin http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/_ adresinden erişebileceğiniz Yayın Hakkı Devir Formu ile beraber gönderilmesini talep eder. Yazarlar, basılı ya da elektronik formatta yer alan resimler, tablolar ya da diğer her türlü içerik dahil daha önce yayınlanmış içeriği kullanırken telif hakkı sahibinden izin almalıdırlar. Bu konudaki yasal, mali ve cezai sorumluluk yazarlara aittir.

Dergide yayınlanan makalelerde ifade edilen görüşler ve fikirler Experimed, Baş Editör, Editörler, Yayın Kurulu ve Yayıncı'nın değil, yazar(lar)ın bakış açılarını yansıtır. Baş Editör, Editörler, Yayın Kurulu ve Yayıncı bu gibi durumlar için hiçbir sorumluluk ya da yükümlülük kabul etmemektedir. Yayınlanan içerik ile ilgili tüm sorumluluk yazarlara aittir.

MAKALE HAZIRLAMA

Makaleler, ICMJE-Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals (updated in December 2015 - <http://www.icmje.org/icmje-recommendations.pdf>) ile uyumlu olarak hazırlanmalıdır. Randomize çalışmalar CONSORT, gözlemsel çalışmalar STROBE, tanısıl değerli çalışmalar STARD, sistematik derleme ve meta-analizler PRISMA, hayvan deneyli çalışmalar ARRIVE ve randomize olmayan davranış ve halk sağlığıyla ilgili çalışmalar TREND kılavuzlarına uyumlu olmalıdır.

Makaleler sadece http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/_ adresinde yer alan derginin online makale yükleme ve değerlendirme sistemi üzerinden gönderilebilir. Diğer mecralardan gönderilen makaleler değerlendirilmeye alınmayacaktır.

Gönderilen makalelerin dergi yazım kurallarına uygunluğu ilk olarak Editöryel Ofis tarafından kontrol edilecek, dergi yazım kurallarına uygun hazırlanmamış makaleler teknik düzeltme talepleri ile birlikte yazarlarına geri gönderilecektir.

Yazarların; Yayın Hakkı Devir Formu, Yazar Katkı Formu ve ICMJE Potansiyel Çıkar Çatışmaları Formu'nu (bu form, tüm yazarlar tarafından doldurulmalıdır) ilk gönderim sırasında online makale sistemine yüklemeleri gerekmektedir. Bu formlara http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/_ adresinden erişilebilmektedir.

Başlık sayfası: Gönderilen tüm makalelerle birlikte ayrı bir başlık sayfası da gönderilmelidir. Bu sayfa;

- Makalenin başlığını ve 50 karakteri geçmeyen kısa başlığını,
- Yazarların isimlerini, kurumlarını, ORCID numaralarını ve eğitim derecelerini,

- Finansal destek bilgisi ve diğer destek kaynakları hakkında detaylı bilgiyi,
- Sorumlu yazarın ismi, adresi, telefonu (cep telefonu dahil ve e-posta adresini),
- Makale hazırlama sürecine katkıda bulunan ama yazarlık kriterlerini karşılamayan bireylerle ilgili bilgileri içermelidir.

Özet: Editöre Mektup türündeki yazılar dışında kalan tüm makalelerin Türkçe ve İngilizce özetleri olmalıdır. rijinal Araştırma makalelerinin özetleri "Amaç", "Gereç ve Yöntem", "Bulgular" ve "Sonuç" alt başlıklarını içerecek biçimde hazırlanmalıdır.

Anahtar Sözcükler: Tüm makaleler en az 3 en fazla 6 anahtar kelimeyle birlikte gönderilmeli, anahtar sözcükler özetin hemen altına yazılmalıdır. Kısaltmalar anahtar sözcük olarak kullanılmamalıdır. Anahtar sözcükler National Library of Medicine (NLM) tarafından hazırlanan Medical Subject Headings (MeSH) veritabanından seçilmelidir.

Makale Türleri

Orijinal Araştırma: Ana metin "Giriş", "Gereç ve Yöntem", "Bulgular" ve "Tartışma" alt başlıklarını içermelidir. Özgün Araştırmalarla ilgili kıstlamalar için lütfen Tablo 1'i inceleyiniz.

Sonucu desteklemek için istatistiksel analiz genellikle gereklidir. İstatistiksel analiz, tıbbi dergilerdeki istatistik verilerini bildirme kurallarına göre yapılmalıdır (Altman DG, Gore SM, Gardner MJ, Pocock SJ. Statistical guidelines for contributors to medical journals. Br Med J 1983; 7; 1489-93). İstatistiksel analiz ile ilgili bilgi, Yöntemler bölümü içinde ayrı bir alt başlık olarak yazılmalı ve kullanılan yazılım kesinlikle tanımlanmalıdır.

Birimler, uluslararası birim sistemi olan International System of Units (SI)'a uygun olarak hazırlanmalıdır.

Editöryel Yorum: Dergide yayınlanan bir araştırmanın, o konunun uzmanı olan veya üst düzeyde değerlendirme yapan bir hakemi tarafından kısaca yorumlanması amacını taşımaktadır. Yazarları, dergi tarafından seçilip davet edilir. Özet, anahtar sözcük, tablo, şekil, resim ve diğer görseller kullanılmaz.

Derleme: Yazının konusunda birikimi olan ve bu birikimleri uluslararası literatüre yayın ve atıf sayısı olarak yansıtmış uzmanlar tarafından hazırlanmış yazılar değerlendirmeye alınır. Yazarları dergi tarafından da davet edilebilir. Bir bilgi ya da konunun klinikte kullanılması için vardığı son düzeyi anlatan, tartışan, değerlendiren ve gelecekte yapılacak olan çalışmalara yön veren bir formatta hazırlanmalıdır. Ana metin "Giriş", "Klinik ve Araştırma Etkileri" ve "Sonuç" bölümlerini içermelidir. Derleme türündeki yazılarla ilgili kısıtlamalar için lütfen Tablo 1'i inceleyiniz.

Olgu Sunumu: Olgu sunumları için sınırlı sayıda yer ayrılmakta ve sadece ender görülen, tanı ve tedavisi güç olan hastalıklarla ilgili, yeni bir yöntem öneren, kitaplarda yer verilmeyen bilgileri yansıtan, ilgi çekici ve öğretici özelliği olan olgular yayına kabul edilmektedir. Ana metin; "Giriş", "Olgu Sunumu", "Tartışma" ve "Sonuç" alt başlıklarını içermelidir. Olgu Sunumlarıyla ilgili kısıtlamalar için lütfen Tablo 1'i inceleyiniz.

EXPERIMED

Editöre Mektup: Dergide daha önce yayınlanan bir yazının önemini, gözden kaçan bir ayrıntısını ya da eksik kısımlarını tartışabilir. Ayrıca derginin kapsamına giren alanlarda okurların ilgisini çekebilecek konular ve özellikle eğitici olgular hakkında da Editöre Mektup formatında yazılar yayınlanabilir. Okuyucular da yayınlanan yazılar hakkında yorum içeren Editöre Mektup formatında yazılarını sunabilirler. Özet, anahtar sözcük, tablo, şekil, resim ve diğer görseller kullanılmaz. Ana metin alt başlıksız olmalıdır. Hakkında mektup yazılan yayına ait cilt, yıl, sayı, sayfa numaraları, yazı başlığı ve yazarların adları açık bir şekilde belirtilmeli, kaynak listesinde yazılması ve metin içinde atıfta bulunulmalıdır.

Tablolar

Tablolar ana dosyaya eklenmeli, kaynak listesi sonrasında sunulmalı, ana metin içerisindeki geçiş sıralarına uygun olarak numaralandırılmaz. Tabloların üzerinde tanımlayıcı bir başlık yer almalı ve tablo içerisinde geçen kısaltmaların açıklamaları tablo altına tanımlanmalıdır. Tablolar Microsoft Office Word dosyası içinde "Tablo Ekle" komutu kullanılarak hazırlanmalı ve kolay okunabilir şekilde düzenlenmelidir. Tablolarda sunulan veriler ana metinde sunulan verilerin tekrarı olmamalı; ana metindeki verileri destekleyici nitelikte olmalılardır.

Resim ve Resim Altyazıları

Resimler, grafikler ve fotoğraflar (TIFF ya da JPEG formatında) ayrı dosyalar halinde sisteme yüklenmelidir. Görseller bir Word dosyası dokümanı ya da ana doküman içerisinde sunulmamalıdır. Alt birimlere ayrılan görseller olduğunda, alt birimler tek bir görsel içerisinde verilmemelidir. Her bir alt birim sisteme ayrı bir dosya olarak yüklenmelidir. Resimler alt birimleri belli etme amacıyla etiketlenmemelidir (a, b, c vb.). Resimlerde altyazıları desteklemek için kalın ve ince oklar, ok başları, yıldızlar, asteriksler ve benzer işaretler kullanılabilir. Makalenin geri kalanında olduğu gibi resimler de kör olmalıdır. Bu sebeple, resimlerde yer alan kişi ve kurum bilgileri de körleştirilmelidir. Görsellerin minimum çözünürlüğü 300DPI olmalıdır. Değerlendirme sürecindeki aksaklıkları önlemek için gönderilen bütün görsellerin çözünürlüğü net ve boyutu büyük (minimum boyutlar 100x100 mm) olmalıdır. Resim altyazıları ana metnin sonunda yer almalıdır.

Makale içerisinde geçen tüm kısaltmalar, ana metin ve özetle ayrı ayrı olmak üzere ilk kez kullanıldıkları yerde tanımlanarak kısaltma tanımının ardından parantez içerisinde verilmelidir.

Ana metin içerisinde cihaz, yazılım, ilaç vb. ürünlerden bahsedildiğinde ürünün ismi, üreticisi, üretildiği şehir ve ülke bilgisini içeren ürün bilgisi parantez içinde verilmelidir; "Discovery St PET/CT scanner (General Electric, Milwaukee, WI, USA)".

Tüm kaynaklar, tablolar ve resimlere ana metin içinde uygun olan yerlerde sırayla numara verilerek atıf yapılmalıdır.

Özgün araştırmaların kısıtlamaları, engelleri ve yetersizliklerinden Sonuç paragrafı öncesi "Tartışma" bölümünde bahsedilmelidir.

Kaynaklar

Atıf yapılırken en son ve en güncel yayınlar tercih edilmelidir. Atıf yapılan erken çevrimiçi makalelerin DOI numaraları mutlaka sağlanmalıdır. Kaynakların doğruluğundan yazarlar sorumludur. Dergi isimleri Index Medicus/Medline/PubMed'de yer alan dergi kısaltmaları ile uyumlu olarak kısaltılmalıdır. Altı ya da daha az yazar olduğunda tüm yazar isimleri listelenmelidir. Eğer 7 ya da daha fazla yazar varsa ilk 6 yazar yazıldıktan sonra "et al" kullanılmalıdır. Ana metinde kaynaklara atıf yapılırken parantez içinde Arapik numaralar kullanılmalıdır. Farklı yayın türleri için kaynak stilleri aşağıdaki örneklerde sunulmuştur:

Dergi makalesi: Blasco V, Colavolpe JC, Antonini F, Zieleskiewicz L, Nafati C, Albanèse J, et al. Long-term outcome in kidney recipients from donors treated with hydroxyethylstarch 130/0.4 and hydroxyethylstarch 200/0.6. *Br J Anaesth* 2015; 115: 797-8.

Kitap bölümü: Sherry S. Detection of thrombi. In: Strauss HE, Pitt B, James AE, editors. *Cardiovascular Medicine*. St Louis: Mosby; 1974.p.273-85.

Tek yazarlı kitap: Cohn PF. *Silent myocardial ischemia and infarction*. 3rd ed. New York: Marcel Dekker; 1993.

Yazar olarak editör(ler): Norman IJ, Redfern SJ, editors. *Mental health care for elderly people*. New York: Churchill Livingstone; 1996.

Toplantıda sunulan yazı: Bengissson S, Sothemin BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoff O, editors. *MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics*; 1992 Sept 6-10; Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992.p.1561-5.

Bilimsel veya teknik rapor: Smith P, Golladay K. Payment for durable medical equipment billed during skilled nursing facility stays. Final report. Dallas (TX) Dept. of Health and Human Services (US). Office of Evaluation and Inspections; 1994 Oct. Report No: HHSIGOE 169200860.

Tablo 1. Makale türleri için kısıtlamalar

Makale türü	Sözcük limiti	Özet sözcük limiti	Kaynak limiti	Tablo limiti	Resim limiti
Özgün Araştırma	3500	250 (Alt başlıklı)	30	6	7 ya da toplamda 15 resim
Derleme	5000	250	50	6	10 ya da toplamda 20 resim
Olgu Sunumu	1000	200	15	Tablo yok	10 ya da toplamda 20 resim
Editöre Mektup	500	Uygulanamaz	5	Tablo yok	Resim yok

EXPERIMED

Tez: Kaplan SI. Post-hospital home health care: the elderly access and utilization (dissertation). St. Louis (MO): Washington Univ. 1995.

Yayına kabul edilmiş ancak henüz basılmamış yazılar: Leshner AI. Molecular mechanisms of cocaine addiction. N Engl J Med In press 1997.

Erken Çevrimiçi Yayın: Aksu HU, Ertürk M, Gül M, Uslu N. Successful treatment of a patient with pulmonary embolism and biatrial thrombus. Anadolu Kardiyol Derg 2012 Dec 26. doi: 10.5152/akd.2013.062. [Epub ahead of print]

Elektronik formatta yayınlanan yazı: Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. Emerg Infect Dis (serial online) 1995 Jan-Mar (cited 1996 June 5): 1(1): (24 screens). Available from: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/cid.htm>.

REVİZYONLAR

Yazarlar makalelerinin revizyon dosyalarını gönderirken, ana metin üzerinde yaptıkları değişiklikleri işaretlemeli, ek olarak, hakemler tarafından öne sürülen önerilerle ilgili notlarını "Hakemlere Cevap" dosyasında göndermelidir. Hakemlere Cevap dosyasında her hake-min yorumunun ardından yazarın cevabı gelmeli ve değişikliklerin yapıldığı satır numaraları da ayrıca belirtilmelidir. Revize makaleler karar mektubunu takip eden 30 gün içerisinde dergiye gönderil-

melidir. Makalenin revize versiyonu belirtilen süre içerisinde yüklenmezse, revizyon seçeneği iptal olabilir. Yazarların revizyon için ek süreye ihtiyaç duymaları durumunda uzatma taleplerini ilk 30 gün sona ermeden dergiye iletmeleri gerekmektedir.

Yayına kabul edilen makaleler dil bilgisi, noktalama ve biçim açısından kontrol edilir. Yayın süreci tamamlanan makaleler, yayın planına dahil edildikleri sayıyla birlikte yayınlanmadan önce erken çevrimiçi formatında dergi web sitesinde yayına alınır. Kabul edilen makalelerin baskıya hazır PDF dosyaları sorumlu yazarlara iletilir ve yayın onaylarının 2 gün içerisinde dergiye iletilmesi istenir.

Editor in Chief: Prof. Erdem Tüzün

Address: Vakıf Gureba Avenue, Istanbul Medical Faculty Campus, 34093, Fatih, İstanbul, Turkey

Phone: 0212-4142000-33356

Fax: 0212-5324171

E-mail: erdemtuzun@istanbul.edu.tr

Publisher: AVES

Address: Büyükdere Cad. 105/9 34394 Mecidiyeköy, Şişli, İstanbul, Turkey

Phone: +90 212 217 17 00

Fax: +90 212 217 22 92

E-mail: info@avesyayincilik.com

avesyayincilik.com

EXPERIMED

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

- 41 An Investigation of Anticancer Effects of Doxorubicin and Calcitriol Combination on MCF-7 Cells**
Özge Bildiren, Buse Cevatemre, Ebru Nur Ay, Güneş Özen, Ceylan Hepokur, Merve Erkisa, Özlem Küçükhüseyin, Engin Ulukaya, Serap Kuruca, İlhan Yaylım
- 47 Opticospinal Multiple Sclerosis Clinical Course and Immunological Parameters**
Özlem Mercan, Zekiye Ülger, Cemile Handan Mısırlı, Recai Türkoğlu
- 52 Comparison of The Expression Levels of PI3K/Akt Pathway Factors in Parkinson's Disease and Lung Cancer**
Elif Şanlı, Nazlı Yalçinkaya, Erdem Tüzün
- 58 Investigation of miR-155 and miR-758 Expression Levels in Peripheral Blood of Alzheimer's Disease Patients**
Ebru Özer, Gamze Güven, Ebba Lohmann, Çağrı Güleç, Nihan Erginel-Ünaltuna

EXPERIMED

İÇİNDEKİLER

ORJİNAL ARAŞTIRMALAR

- 41 Kalsitriol ve Doksorubisin Kombinasyonunun MCF-7 Üzerine Olası Anti Kanser Etkilerinin Araştırılması**
Özge Bildiren, Buse Cevatemre, Ebru Nur Ay, Güneş Özen, Ceylan Hepokur, Merve Erkisa, Özlem Küçük hüseyin, Engin Ulukaya, Serap Kuruca, İlhan Yaylım
- 47 Optikospinal Multipl Skleroz Klinik Seyir ve İmmünojenik Parametreler**
Özlem Mercan, Zekiye Ülger, Cemile Handan Mısırlı, Recai Türkoğlu
- 52 Parkinson Hastalığı ve Akciğer Kanserinde PI3K/Akt Yolağı Faktörlerinin Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması**
Elif Şanlı, Nazlı Yalçinkaya, Erdem Tüzün
- 58 Alzheimer Hastalarının Periferik Kanlarında miR-155 ve miR-758 Anlatım Düzeylerinin İncelenmesi**
Ebru Özer, Gamze Güven, Ebba Lohmann, Çağrı Güleç, Nihan Erginel-Ünaltuna

Kalsitriol ve Doksorubisin Kombinasyonunun MCF-7 Üzerine Olası Anti Kanser Etkilerinin Araştırılması

An Investigation of Anticancer Effects of Doxorubicin and Calcitriol Combination on MCF-7 Cells

Özge Bildiren¹, Buse Cevatemre², Ebru Nur Ay^{1,3}, Güneş Özen¹, Ceylan Hepokur⁴, Merve Erkisa⁵, Özlem Küçük hüseyin¹, Engin Ulukaya⁵, Serap Kuruca⁶, İlhan Yaylım^{1*}

¹Istanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Moleküler Tıp Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, Bursa, İstanbul, Türkiye

³İstinye Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, İstanbul, Türkiye

⁴Cumhuriyet Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, Sivas, Türkiye

⁵İstinye Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

⁶Istanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Fizyoloji Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Cite this article as: Bildiren Ö, Cevatemre B, Ay EN, Özen G, Hepokur C, Erkisa M, et al. An Investigation of Anticancer Effects of Doxorubicin and Calcitriol Combination on MCF-7 Cells. *Experimed* 2018; 8(2): 41-6.

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada amacımız, belirli bir doz üzerinde kardiyak yan etkileri oldukça fazla olan ve meme kanseri tedavisinde kullanılan kemoterapötiklerden doksorubisinin, tedavide kullanım miktarlarını azaltmayı ve etkinliğini arttırmayı sağlayan bir maddeyi saptamaktır. Etkin madde olarak anti proliferatif etkisi olduğu düşünülen vitamin D analoglarından biri olan kalsitriol seçilmiş ve doksorubisin ile kombine tedavisinin, insan meme kanseri hücre hattı MCF-7 üzerine sitotoksik etkisinin saptanması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı kalsitriol ile muamele edilerek, gerçek zamanlı olarak, x-CELLigence cihazında 72 saat inkübasyona bırakıldı ve kalsitriolün anti-proliferatif optimum doz tespiti zamana bağlı hücre indeksi grafiği The xCELLigence Real-Time Cell Analysis (RTCA) software programı kullanılarak yapıldı. Kalsitriol optimum dozu ve doksorubisin farklı dozlarının kombinasyonu MCF-7 hücre kültürü ile muamele edilerek sitotoksikite tayini için Sulforhodamine-B (SRB) uygulaması ve spektrofotometrik ölçüm uygulandı. Spektrofotometrik ölçüm sonuçları anlamlılık sonuçları için Student's t-Testi ile değerlendirildi.

Bulgular: MCF-7 hücrelerinin antiproliferatif optimum kalsitriol doz tespiti zamana bağlı hücre indeksi grafiği RTCA software programı kullanılarak yapılmıştır. Sitotoksikite tayini için uygulanan SRB yöntemi sonucu elde edilen spektrofotometrik ölçüm sonuçları GraphPad Prism programı kullanılarak Student's t-testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Kalsitriol optimum dozu 250 nM tespit edilmiştir. Doksorubisinin farklı dozları (1,84 µM-0,92 µM), kalsitriol (250 nM) ve kalsitriol olmaksızın MCF-7 hücre hattı ile sitotoksik etki saptaması için muamele edilmiştir. 0,46 µM doksorubisin ve optimum kalsitriol kombinasyonunun sitotoksik açıdan diğer dozlara göre anlamlı olduğu (p=0,0087) fakat doksorubisin kullanımında doz azaltımını sağlayacak kadar etkin olmadığı saptanmıştır.

ABSTRACT

Objectives: This study aimed to identify a substance that both increases the efficiency and decreases the dose of doxorubicin. Doxorubicin has considerable cardiac side effects at certain doses when used treating breast cancer. Calcitriol, one of the vitamin D analogs considered to have antiproliferative effects, was selected, and its cytotoxic effects on the human breast cancer cell line MCF-7 were investigated in combination with doxorubicin.

Materials and Methods: MCF-7 cell line was treated with calcitriol in real time for 72 h in x-CELLigence. The antiproliferative optimal dose of calcitriol was determined by time-dependent cell index graph plotted using The xCELLigence Real-Time Cell Analysis (RTCA) software program. The combination of different doses of doxorubicin and this optimal dose of calcitriol was used to treat the MCF-7 cell line. Then, Sulforhodamine-B (SRB) assay was conducted, and spectrophotometric measurements were performed for cytotoxicity assay. The results of these spectrophotometric measurements were analyzed by Student's t-test.

Results: The optimal antiproliferative calcitriol dose detection of MCF-7 cells was performed using the time-dependent cell index graph RTCA software program. Spectrophotometric measurements obtained using the protein-staining sulforhodamine B (SRB) assay for cytotoxicity determination were statistically evaluated by the Student's t-test using the GraphPad Prism program. The optimal dose of calcitriol was determined to be 250 nM. Different doses of doxorubicin (1.84-0.92 µM), calcitriol (250 nM), and calcitriol without the MCF-7 cell line were then used for detecting the cytotoxic effect. The combination of 0.46 µM doxorubicin and the optimal dose of calcitriol was found to be cytotoxic compared with other doses (p=0.0087); however, it was not as effective as the dose reduction obtained when using doxorubicin.

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: İlhan Yaylım **E-mail:** ilhanyaylim@gmail.com

Geliş Tarihi/Received Date: 05.07.2018 **Kabul Tarihi/Accepted Date:** 17.10.2018

© Copyright 2018 by The Istanbul University Faculty of Science • Available online at <http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/>

© Telif Hakkı 2018 İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi • Makale metnine http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/_sayfasından ulaşılabilir.

Sonuç: Doksorubisinin, kalsitriol ile kombine kullanımının günümüzde kullanılan dozlar üzerinde azaltıcı yönde anlamlı bir etkisinin olmadığını saptanmıştır. Vitamin D ve doksorubisin birlikte kullanımının meme kanserinde fayda sağlamayacağını söylemek için ise henüz erkendir. İlerleyen çalışmalarda vitamin D'nin farklı analogları ile çeşitli çalışmalar yapılabilir.

Anahtar Kelimeler: Meme Kanseri, doksorubisin, kalsitriol, MCF-7, hücre kültürü

GİRİŞ

Meme kanseri dünyada kadınlar arasında en sık görülen kanser türlerindedir. Kadınlarda görülen tüm kanserlerin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır. Avrupa'da yılda 180.000, Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda 184.000 yeni olgu saptanmaktadır. Meme kanseri sıklığı dünya üzerinde ülkeden ülkeye farklılık göstermektedir (1). Türkiye'de yapılan kanser taramalarının verilerine göre her yıl yaklaşık 159.000 yeni kanser vakası ortaya çıkmaktadır (2). Meme kanseri, kadınlarda erkeklere oranla daha sık görülmekte ve kanser nedenli ölümlerin başında yer almaktadır. Meme kanseri tedavisinde cerrahi ve adjuvan yöntemler kullanılmaktadır (3). Meme kanseri kemoterapi tedavileri, adjuvan ve neo adjuvan olmak üzere iki şekilde yapılmaktadır. Adjuvan ve neoadjuvan kemoterapide, ortak ilaçlar kullanıldığı gibi farklı anti-kanser ajanlar da kullanılmaktadır (4) Temel tümör biyolojisi ve klinik yenilikler arasındaki etkileşim sonucu ulaşılan bulgular, kemoterapi ajanlarının daha etkin kullanımı ile kanser tedavisinde ilerleme sağlamaktadır. Yaygınlaşan kanser tedavisi, kanser ve tümör baskılayıcıların işleyişinden elde edilen moleküler mekanizmaları hedef almıştır (5).

Doksorubisin, meme kanseri tedavisinde etkin olarak kullanılan bir anti-kanser ajandır (6). Yapılan pek çok çalışma da antiasiklin tipi bir antibiyotik olan doksorubisinin, diğer antrasiklin grup üyeleri gibi DNA ve RNA sentezini üzerindeki etkisi tespit edilmiştir (7). Meme kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan doksorubisin, DNA replikasyonunda kilit bir enzim olan topoizomera II üzerinden DNA'nın makromoleküler biosentezini inhibe eder (6, 8, 9). Doksorubisin akciğer, mesane, tiroid bezi, over kanseri, kemik sarkomu ve yumuşak doku sarkomu, Hodgkin ve Hodgkin dışı lenfomalar, nöroblastoma, Wilmstümörü, akut lenfoblastik lösemi, akut miyeloid lösemi gibi birçok kanserin tedavisinde sıklıkla kullanılan bir tedavi seçeneğidir (10-12). Bunun yanı sıra, Doksorubisinin kardiyotoksitesinin yüksek olması nedeniyle kanser tedavisinde sınırlamaya neden olmaktadır (13).

Vitamin D ise yağda çözünen bir grup steroid ve bunların ilgili metabolitlerini içerir. Doğada, iki büyük vitamin D formu olan, ergokalsiferol (D2 vitamini) ve kolekalsiferol (D3 vitamini) bulunmaktadır. D2 vitamini, bitkilerde fotokimyasal olarak sentezlenir, D3 vitamini ise, hayvan ve insan derisinde güneş ışığına bağlı olarak, özellikle de 290-315 nm UV-B radyasyonlarında üretilir (14). 1,25(OH)₂D₃ (kalsitriol) D vitamininin biyolojik olarak aktif hormonal formunu oluşturur (15).

Conclusion: The combined use of doxorubicin with calcitriol was found to have no significant effect in reducing the doses presently being used. Hence, it is too early to state that a combination of vitamin D and doxorubicin in breast cancer treatment will not have any beneficial effects. Other vitamin D analogs might be potential candidates for breast cancer treatment in further studies.

Keywords: Breast cancer, doxorubicin, calcitriol, MCF-7, cell culture

Vitamin D'nin klasik sentez yolu, karaciğer ve böbrekte vitamin D₂ ve D₃'ün 25 hidroksilaz ve 1α-hidroksilaz aktivitesiyle ilerler. İlk olarak, hidroksilasyon karaciğerde meydana gelir ve 25(OH)D₃ üretilir. 25(OH)D₃ sistemik dolaşıma girer ve 12-19 günlük bir yarılanma ömrüne sahiptir. İkinci, hidroksilasyon böbreklerde oluşur ve 1,25(OH)₂D₃ (kalsitriol) vitamin D'nin biyolojik olarak aktif hormonal formunu oluşturur. 25(OH)D₃ serum seviyeleri, vücuttaki genel vitamin D miktarını vermektedir. Diyetle alınan veya deride sentezlenmiş vitamin D ile ilişkili, dolaşımdaki 1,25(OH)₂D₃ formunda iki temel enzim görev yapmaktadır. Bunlar, hepatik mikrozomal veya mitokondrial D 25-hidroksilaz (CYP27A1) ve renal mitokondriyal enzim 1α-hidroksilaz CYP27B1'dir (6). Bu hidroksilazlar, sitokrom P450 karışık fonksiyonlu mono oksidazları olarak bilinen bir protein sınıfına aittir. Son yıllarda makrofajlar, keratinositler, prostatlar ve kolon kanseri hücreleri de dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde 25 (OH) D₃-1α-hidroksilaz (CYP27B1) aktivitesi bildirilmiştir (16, 17). 1,25(OH)₂D₃'ün çeşitli dokularda lokal olarak üretildiği gösterilmiştir. Hedef dokuların (örneğin, kolon, prostat, meme, akciğer, pankreas) kalsitriolü sentezleyebileceği ve bozabildiği gösterilmiştir. Çeşitli insan kanser türlerinde kalsitriolün lokal üretiminin ve degradasyonunun öneminin olduğu gösterilmiştir (18, 19). Kalsitriol, vitamin D reseptörü (VDR) ve vitamin D yanıt elementlerine (VDRE) bağlıdır. Birkaç transkripsiyon faktörü ile bağlantılı olarak, bu kompleks vitamin D'ye cevap veren genlerin transkripsiyonuna yol açar. Vitamin D / VDR dengesi nedeniyle ortaya çıkan başlıca hücre ve moleküler fonksiyonlar arasında kalsiyum etkileri, antimikrobiyal, doku rejenerasyonu, bağışıklık modülasyonu ve otoantikör üretimi, kas fonksiyonu, steroid etkililiği, epigenetik düzenlenme, immün yanıt, inflamasyon ve hücre proliferasyonu, farklılaşma ve apoptozis yer almaktadır (20).

Vitamin D ile meme kanseri arasında ilişki olabileceği ve potansiyel biyolojik mekanizmaları aydınlatmak için yapılan temel araştırmalar, normal meme dokusundaki vitamin D sinyalinin moleküler etkilerini tanımlamaya odaklanmıştır. Meme kanseri hücreleri üzerine 1,25 (OH)₂D₃'ün etkileri G0 / G1' de hücre döngüsü durması, farklılaşma belirteçlerinin indüksiyonu ve apoptozun aktivasyonu içermesinin açıklanması ile tanımlanmıştır. İnsan meme kanseri hücrelerinde 1,25 (OH)₂D₃ ile regüle edilen klinik biyolojik belirteçler arasında BRCA1, p21, p53, c-Myc ve siklin D1 bulunur. Bu bulgulara dayanarak, meme kanseri tedavisinde Vitamin D reseptör (VDR) agonistlerinin terapötik kullanımı konusunda büyük ilgi odağı olmuştur. Vitamin D analoglarının kanser tedavisinde potansiyel etkilere sahip olabileceğine dair birçok çalışma bulunmaktadır (21-24) Yapılan *in vitro* ve *in vivo*

çalışmaların bazılarında Vitamin D'nin meme karsinogenezi üzerindeki etkilerini incelemiş ve bu veriler meme kanseri gelişiminde Vitamin D'nin koruyucu bir role sahip olduğunu göstermiştir (25, 26). Örneğin, farelerde Vitamin D yetersizliği, VDR gen ifadesi durdurulmuş farelerde kanser gelişimine yol açmaktadır (27).

Araştırmamızın amacı belirli bir dozun üzerinde yan etkileri oldukça fazla olan kemoterapötiklerden doksorubisinin, meme kanseri tedavisinde kullanım miktarlarını azaltmayı ve etkinliğini arttırmayı sağlayan bir madde saptamaktır. Etken madde olarak anti proliferatif etkisi saptanmış olan vitamin D analoglarından biri olan kalsitriol ile doksorubisin kombine kullanımının MCF-7 insan meme kanseri hücre hattına yönelik etkilerini saptamak üzere çalışmamız gerçekleştirilmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

MCF-7 insan meme kanser hücre hattı, %5 fetal bovine serum, %1 Penisilin-G (100 U/mL)-Streptomisin (100 µg/mL) içeren RPMI besiyerinde hücre sayısı bakımından uygun sayıya ulaşmaya kadar hücre kültüründe çoğaltılması sağlandı. Hücreler besiyeri ortamında 37 °C'de, %5 CO₂'li ortamda kültüre edildi. Deney için uygun koşullara getirilen hücreler, kullanılan 96 kuyulu E-plate içerisindeki her kuyuya 100 µL besiyeri koyularak ve 30 dakika 37 °C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyonu takiben bazal ölçüm yapılmak üzere xCELLigence cihazına yerleştirildi. Ölçüm tamamlandıktan sonra e-plate cihazdan çıkartıldı ve hücre soyları 100 µl besiyeri içerisinde 5×10³ hücre/kuyucuk (3 tekrarlı) olacak şekilde 96 kuyucuklu altın mikroelektrodlarla entegre E-plate'lere ekildi. 24 saat 37 °C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyonu takiben yapılmış olan hücreler üzerinden hücrelere zarar vermeden 100 µl besiyeri uzaklaştırıldı. Kalsitriolün farklı dozları xCELLigence sistemi ile gerçek zamanlı olarak, MCF-7 hücre hattına uygulandı. İnsan meme kanseri hücresi MCF-7 üzerindeki sitotoksik etkileri, hücre büyümesini, proliferasyonunu, morfolojik değişikliklerini, canlılığını görüntülemek ve optimum kalsitriol doz saptamak üzere 48 saatlik işlem devam ettirildi. Zamana bağlı hücre indeksi grafiği 48 saat sonunda RTCA software programı kullanılarak görüntüldü.

Kalsitriolün optimum anti-proliferatif etki gösterdiği 250 nm olarak saptandı. 250 nM'lık kalsitriol ile doksorubisinin seri di-

lüsyon yapılan dozlarının (1,84 µM-0,92 µM) kombinasyonunun insan meme kanseri MCF-7 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisinin saptanmasına yönelik SRB testi uygulamasına geçildi. Bunun için 5000h/kuyu olmak üzere ekimi yapılmış MCF-7 hücrelerinin 24 saat inkübasyonundan sonra, kemoterapi ilaç kombinasyonları ile kalsitriol eklenmiş ve kalsitriol eklenmemiş gruplarını içermek üzere SRB testi için 48 saat inkübe edildi. SRB testi sonucunda spektrofotometrik ölçüm ile sitotoksik etki saptandı.

Vitamin D analogu kalsitriol, doksorubisin ve her ikisinin kombinasyonunun MCF-7 insan meme kanseri hücre hattı üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla 96-kuyucuklu hücre kültür kaplarına her bir doz 3 farklı kuyucuk olacak şekilde ekim yapılmıştır. Ayrıca her bir deney en az 2 ayrı bağımsız deney şeklinde gerçekleştirilmiştir.

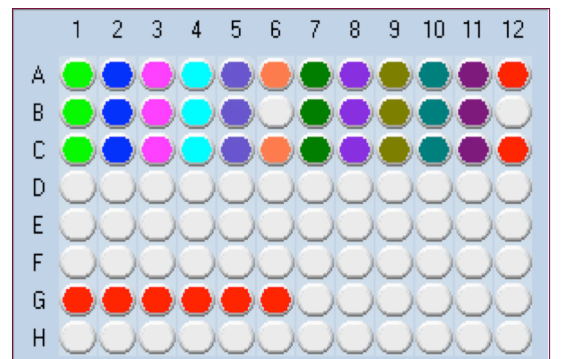
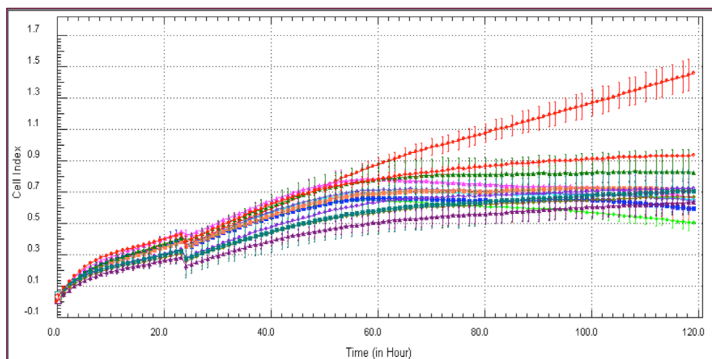
İstatistiksel Analiz

MCF-7 hücrelerinin antiproliferatif optimum kalsitriol doz tespiti zamana bağlı hücre indeksi grafiği RTCA software programı kullanılarak yapılmıştır. Sitotoksikite tayini için uygulanan SRB yöntemi sonucu elde edilen spektrofotometrik ölçüm sonuçları, GraphPad Prism programı kullanılarak student's t testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Anlamlılık değeri p<0,05 olarak kabul edildi.

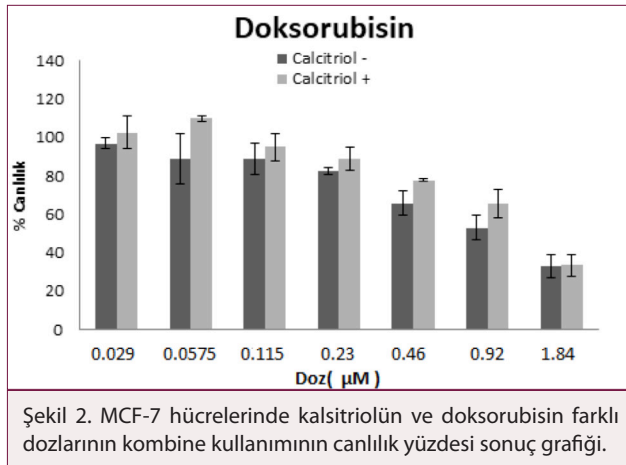
BULGULAR

Kuyulara 4 µM'dan başlayarak seri dilüsyon ile kalsitriol dozları uygulandı (Şekil 1). Deney sonucu uygulanan tüm kalsitriol dozlarının anti-proliferatif etkisi olduğu gözlemlendi. Kalsitriol için seçilen optimum doz 250 nM'dı. Ertesi gün kuyu başına 5000 hücre olmak üzere MCF-7 hücreleri üzerinde tedaviye başlandı. 48 saat inkübasyonda tutulan hücrelerin SRB metodu ile doksorubisin ve kalsitriol kombinasyonlarının sitotoksik etkisi spektrofotometrik ölçüm yoluyla saptandı.

Doksorubisinin farklı dozları (1,84 µM-0,029 µM) ve kalsitriol optimum anti-proliferatif dozunun (250 nM) kombine tedavisinin MCF-7 hücreleri üzerinde SRB metodu ile ölçümü sonucu oluşturulan canlılık yüzdelere grafiği Şekil 2'de yer almaktadır. En yüksek doz 1,84 µM olmak üzere soldan sağa doğru seri



Şekil 1. Chex-CELLigence kalsitriol optimum doz tespit grafiği; 1 numara (4 µM) en yüksek kalsitriol dozunu içermektedir. Kalsitriol farklı dozları 1'den sağa doğru seri dilüsyon ile uygulanmıştır. 5 numaralı örnek grubu (250 nM) optimum doz olarak belirlenmiştir.



Şekil 2. MCF-7 hücrelerinde kalsitriolün ve doksorubisin farklı dozlarının kombine kullanımının canlılık yüzdesi sonuç grafiği.

dilüsyon yapılmıştır. Açık gri ile belirtilen grafik sütunu doksorubisin ve kalsitriol kombinasyonu iken, koyu gri ile gösterilen grafik sütunu sadece doksorubisin etkisini göstermektedir. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. 250 nM kalsitriol ve 1,84 µM doksorubisin kombinasyonu p=0,9171, 250 nM kalsitriol ve 0,94 µM doksorubisin kombinasyonu p=0,0331, 250 nM kalsitriol ve 0,46 µM doksorubisin kombinasyonu p=0,0087, 250 nM kalsitriol ve 0,23 µM doksorubisin kombinasyonu p=0,0757, 250 nM kalsitriol ve 0,115 µM doksorubisin kombinasyonu p=0,2434, 250 nM kalsitriol ve 0,0575 µM doksorubisin kombinasyonu p=0,0176, 250 nM kalsitriol ve 0,029 µM doksorubisin kombinasyonu değerlerine sahiptir. Aynı zaman periyodu içinde kalsitriol varlığı baz alınarak, doksorubisin ile kombine kullanımı ve tek başına doksorubisin kullanımının istatistiksel değerlendirmesi yapılmıştır.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde meme kanseri tedavisinde ilaç kombinasyonlarının kullanılması konusunda yoğun bir ilgi vardır (28-30). Bu fikre uygun olarak, kombinasyon halinde olan ilaçların bireysel etkilerin toplamından daha büyük bir etki üretmesi ve daha etkili bir tedavi sağlaması durumunda, terapötik bir etki elde edileceği düşünülmektedir. MCF-7 insan meme kanseri hücreleri, antitümör ilaçların uygulanmasını araştırmak için yaygın olarak kullanılan bir hücre modelidir. Çeşitli çalışmalar farklı antikanser ilaçların dirençli hücreler üzerindeki antiproliferatif etkilerini ortaya koymuştur (19, 31-36).

Vitamin D ve analoglarının, hücre proliferasyonu ve farklılaşması, apoptozis, anjiyogenez paratiroid hormon ilişkili peptid salgılanması ve tümör metastazları ile ilişkili çeşitli mekanizmalarda etkisi olduğu bilinmektedir (20, 37). *In vivo* ve *in vitro* yapılan çalışmalarda Vitamin D'nin VDR reseptörü ile bağlanmasının hücre döngüsü, apoptozis ve hücre farklılaşması ile ilişkili genlerin transkripsiyonunu regüle ettiği belirtilmektedir. Bu durum vitamin D'nin kanser tedavisinde etkili bir ajan olabileceğini düşündürmektedir (38, 39). VDR nin klasik yerleşimi olan kemik, böbrek ve bağırsak yolu dışında lösemi hücreleri ve birçok malign hücre tipi gibi epitel ve mezenşimal hücrelerde yer alması da bu düşünceyi kuvvetlendirmektedir (20).

Tina Gissel, Lars Rejnmark ve arkadaşlarının vitamin D alımı ve meme kanseri ile ilgili literatürde yer alan çalışmalara dair yaptığı analizde, toplamda 1731 adet meme kanseri ve vitamin D ilişkili yayın bulunduğu fakat bunlardan sadece 6 tanesinin direkt vitamin D alımı ve meme kanseri riskine dair orijinal verileri içerdiğini belirtmektedir. Çalışmalarda 100-400 IU/gün düzeyinde alınan vitamin D'nin, meme kanseri riskinde herhangi bir değişikliğe yol açmadığı, bu düzeyin üzerinde vitamin D alımında ise çalışma sonuçlarının riski düşürmede etkili olabileceğine dair sonuçlar yer almaktadır (33).

Yaptığımız çalışmada görüldüğü üzere Vitamin D'nin optimum anti proliferatif dozu, geçmişte yapılan çalışmalarda ki doz ile farklılık göstermektedir (40, 41). Buna ek olarak vitamin D'nin, uzun süreli kullanımda moleküler yapıyı nasıl etkilediğine ve herhangi bir toksik etkisi olup olmadığına dair yaş, cinsiyet vs. gibi durumlarla ilişkilendirerek daha kapsamlı çalışmalar da yapılmalıdır. Kalsitriolün, anti-proliferatif etkisi olduğu açıktır fakat bunun yanında vitamin D'nin kalsemik etkisi ilaç kombinasyonları ile kullanımında çeşitli zorluklar oluşturabilir.

Çalışmamızın sonucunda, antrasiklin grubu ilaçlardan doksorubisinin, kalsitriol ile kombine kullanımının günümüzde kullanılan dozlar üzerinde azaltıcı yönde anlamlı bir etkisinin olmadığını saptadık. Bunun yanında iki etken maddenin kombine kullanımının herhangi bir etkisinin olmadığını söylemek için ise henüz erkendir. İlerleyen çalışmalarda Vitamin D'nin farklı analogları kullanılarak, kemoterapötik ilaçlar ile etkileşimi incelenebilir. Doksorubisin ile kalsitriolün kombine kullanımının moleküler yollar üzerindeki etkilerini saptamak için çalışmalar yapılması gerekmektedir. Bu nedenle bu alan ayrıca, vitamin D düzeyleri ve tümör gelişimi ile ilişkili moleküler yollarda görevli moleküllerin düzeylerinin değişim ve etkileşimlerine dair yapılacak çalışmalara da ihtiyaç göstermektedir.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - İ.Y.; Tasarım - İ.Y.; Denetleme - İ.Y.; Kaynaklar - E.U., İ.Y., S.K.; Gereçler - E.U., İ.Y.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - Ö.B., B.C.; Analiz ve/veya Yorum - Ö.B., B.C., G.Ö., İ.Y.; Literatür Taraması - : Ö.B., E.N.A.; Yazıyı Yazan - Ö.B., E.N.A., İ.Y.; Eleştirel İnceleme - G.Ö., C.H., M.E., E.U., Ö.K., S.K., İ.Y.

Teşekkür: İstanbul Üniversitesi Bilimsel Projeleri Araştırma Birimi'ne finansal katkıları için teşekkür ederiz.

Çıkar Çatışması: Yazarların beyan edecek çıkar çatışması yoktur.

Finansal Destek: Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Projeleri Araştırma Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 45744).

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - İ.Y.; Design - İ.Y.; Supervision - İ.Y.; Resource - E.U., İ.Y., S.K.; Materials - E.U., İ.Y.; Data Collection and/or Processing - Ö.B., B.C.; Analysis and/or Interpretation - Ö.B., B.C., G.Ö., İ.Y.; Literature Search - Ö.B., E.N.A.; Writing - Ö.B., E.N.A., İ.Y.; Critical Reviews - G.Ö., C.H., M.E., E.U., Ö.K., S.K., İ.Y.

Acknowledgements: Thanks for the Istanbul University Scientific Research Projects Entity's financial supports.

Conflict of Interest: The authors have no conflict of interest to declare.

Financial Disclosure: This research was supported by Istanbul University Scientific Research Projects Entity (Project No: 45744).

KAYNAKLAR

- Haydaroglu A, Dubova S, Özşaran Z. Ege Üniversitesinde Meme Kanseri, 3897 Olgunun Değerlendirilmesi. *Meme Sağlığı Dergisi* 2005; 1.
- Türkiye'de Kansere Önleme ve Taramaları 2014 Kısa Raporu. *Kanser Daire Başkanlığı*.
- Aydıntuğ S. Meme Kanserinde Erken Tanı TTB STED 2004; 6: 228.
- Wang Z, Chen JQ, Liu JL, Qin XG, Serious neutropenia following neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer: A case report. *Oncol Lett* 2016; 11: 1597-9. [CrossRef]
- Norman AW. Sunlight, season, skin pigmentation, vitamin D and 25-hydroxy vitamin D: Integral components of the vitamin D endocrine system. *Am J Clin Nutr* 1998; 67: 1108-10. [CrossRef]
- Harbeck N, Salem M, Nitz U, Gluz O, Liedtke C. Personalized treatment of early-stage breast cancer: present concepts and future directions. *Cancer Treat Rev* 2010; 36: 584-94. [CrossRef]
- Nabholtz JM. Docetaxel-anthracycline combinations in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 79: 3-9. [CrossRef]
- Bagheri F, Safarian S, Eslaminejad M, Sheibani N. Effect of adriamycin on DNA, RNA, and protein synthesis in cell-free systems and intact cells. *Cancer Res* 1976; 36: 2891-5.
- Gudkov AV, Zelnick CR, Kazarov AR, Thimmapaya R, Suttle DP, Beck WT, Roninson IB, Thimmapaya R, Suttle DP, Beck WT, Roninson IB. Isolation of genetic suppressor elements, inducing resistance to topoisomerase II interactive cytotoxic drugs, from human topoisomerase II cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 3231-5. [CrossRef]
- Thorn C, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard, McLeod H, Klein T and Altman R. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics* 2011; 21: 440-6. [CrossRef]
- Dimitrakis P, Romay-Ogando MI, Timolati F, Suter TM, Zuppinger C. Effects of doxorubicin cancer therapy on autophagy and the ubiquitin-proteasome system in long-term cultured adult rat cardiomyocytes. *Cell Tissue Res* 2012; 350: 361-72. [CrossRef]
- Rivankar S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *J Cancer Res Ther* 2014; 10: 853-8. [CrossRef]
- Ayla Ş, Oktar H, Tanrıverdi G, Cengiz M, Özkılıç AÇ, Böttjer N, et al. Doksorubisin ile Oluşturulmuş Deneysel Kardiyotoksiste Üzerine Nikotinamidin Etkisi. *Cerrahpaşa Tıp Derg* 2008; 39: 7-14.
- Barinaga M. From bench top to bedside. *Science* 1997; 278: 1036-9. [CrossRef]
- Cross HS. Extrarenal vitamin D hydroxylase expression and activity in normal and malignant cells: Modification of expression by epigenetic mechanisms and dietary substances. *Nutr Rev* 2007; 65: S108-S112. [CrossRef]
- Robsahm TE, Tretli S, Dahlback A, Moan J. Vitamin D3 from sunlight may improve the prognosis of breast, colon and prostate cancer (Norway). *Cancer Causes Control* 2004; 15: 149-58. [CrossRef]
- Tuohimaa P. Vitamin D, aging, and cancer. *Nutr Rev* 2008; 66: S147-S152. [CrossRef]
- Bernardi RJ, Johnson CS, Modzelewski RA, Trump DL. Antiproliferative effects of 1 alpha, 25-dihydroxy vitamin D3 and vitamin D analogs on tumor-derived endothelial cells. *Endocrinology* 2002; 143: 2508-14. [CrossRef]
- Chen ST, Pan TL, Tsai YC and Huang CM. Proteomics reveals protein profile changes in doxorubicin-treated MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Lett* 2002; 181: 95-107. [CrossRef]
- Hines SL, Jorn HKS, Thompson KM, Larson JM. Breast cancer survivors and vitamin D: A review. *Nutrition* 2010; 26: 255-62. [CrossRef]
- Colston KW, Hansen CM. Mechanisms implicated in the growth regulatory effects of vitamin D in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2001; 9: 45-59. [CrossRef]
- Jensen S, Madsen MW, Lukas J, Binderup L, Bartek J. Inhibitory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the G1-S phase controlling machinery. *Mol Endocrinol* 2001; 15: 1370-80. [CrossRef]
- Mehta RG, Mehta RR. Vitamin D and cancer. *J Nutr Biochem* 2002; 13: 252-64. [CrossRef]
- Welsh JE, Wietzke JA, Zinser GM, Smyczek S, Romu S, Tribble E, et al. Impact of the vitamin D receptor on growth regulatory pathways in mammary gland and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002; 83: 85-92. [CrossRef]
- Fu GK, Lin D, Zhang MY, Bikle DD, Shackleton CH, Miller WL, et al. Cloning of human 25-hydroxyvitamin D-1-hydroxylase and mutations causing vitamin D dependent rickets type I. *Mol Endocrinol* 1997; 11: 1961-70. [CrossRef]
- Takeyama K, Kitanaka S, Sato T, Kobori M, Yanagisawa J, Kato S. 25-Hydroxyvitamin D3-1-hydroxylase and vitamin D synthesis. *Science* 1997; 277: 1827-30. [CrossRef]
- Friedrich M, Reichrath J, Chen T, et al. Expression of 25-hydroxyvitamin D3 1-hydroxylase in breast tissue. In: Anthony W. Norman Jürgen Roth Lelio Orci, eds. *Vitamin D endocrine system: structural, biological, genetic and clinical aspects*. University of Riverside Press, 2000; 189-91.
- Bonadonna G, Brusamolino E, Valagussa P, Rossi A, Brugnattelli L, Brambilla C, et al. Combination chemotherapy as an adjuvant treatment in operable breast cancer. *N Engl J Med* 1976; 294: 405-10. [CrossRef]
- Carter SK. Single and combination nonhormonal chemotherapy in breast cancer. *Cancer* 1972; 30: 1543-55. [CrossRef]
- Jones SE, Durie BG, Salmon SE. Combination chemotherapy with adriamycin and cyclophosphamide for advanced breast cancer. *Cancer* 1975; 36: 90-7. [CrossRef]
- Crown J, O'Leary M, Ooi WS. Docetaxel and paclitaxel in the treatment of breast cancer: a review of clinical experience. *Oncologist* 2004; 9: 24-32. [CrossRef]
- Dieras V. Docetaxel in combination with doxorubicin: a phase I dose-finding study. *Oncology (Williston Park)* 1997; 11: 17-20.
- Kars MD, Iseri OD, Gündüz U, Ural AU, Arpacı F, Molnár J. Development of rational in vitro models for drug resistance in breast cancer and modulation of MDR by selected compounds. *Anticancer Res* 2006; 26: 4559-68.
- Li J, Xu LZ, He KL, Guo WJ, Zheng YH, Xia P, et al. Reversal effects of nomegestrol acetate on multidrug resistance in adriamycin-resistant MCF-7 breast cancer cell line. *Breast Cancer Res* 2001; 3: 253-63. [CrossRef]
- Martin M. Docetaxel, doxorubicin and cyclophosphamide (the TAC regimen): an effective adjuvant treatment for operable breast cancer. *Womens Health (Lond)* 2006; 2: 527-37. [CrossRef]
- Prados J, Melguizo C, Rama AR, Ortiz R, Segura A, Boulaiz H, et al. GEF gene therapy enhances the therapeutic efficacy of doxorubi-

- cin to combat growth of MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010; 66: 69-78. [\[CrossRef\]](#)
37. Bemd GJCM, Chang GTG. Vitamin D and Vitamin D Analogs in Cancer Treatment. *Current Drug Targets* 2002; 3: 85-94.
38. Gissel T, Rejnmark L, Mosekilde L, Vestergaard P. Intake of vitamin D and risk of breast cancer; A meta-analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008; 111: 195-9. [\[CrossRef\]](#)
39. Reichrath J, Friedrich M, Vogt T. Vitamin D and its analogs in cancer prevention and therapy. *Anticancer Res* 2012; 32: 209-10.
40. Holick MF. Vitamin D: Its Role in cancer prevention and treatment. *Prog Biophys Mol Biol* 2006; 92: 49-59. [\[CrossRef\]](#)
41. Trump DL, Hershberger PA, Bernardi RJ, Ahmed S, Muindi J, Fakhri M, et al. Anti Tumor activity of calcitriol. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 89-90: 519-26. [\[CrossRef\]](#)

Optikospinal Multipl Skleroz Klinik Seyir ve İmmünolojik Parametreler

Opticospinal Multiple Sclerosis Clinical Course and Immunological Parameters

Özlem Mercan^{1*} , Zekiye Ülger² , Cemile Handan Mısırlı² , Recai Türkoğlu² 

¹Istanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Nöroloji Ana Bilim Dalı, Algoloji Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Nöroloji Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Cite this article as: Mercan Ö, Ülger Z, Mısırlı CH, Türkoğlu R. Opticospinal Multiple Sclerosis Clinical Course and Immunological Parameters. Experimed 2018; 8(2): 47-51.

ÖZ

Amaç: Optikospinal multipl sklerozun (OSMS) klinik seyrinin klasik multipl sklerozdan (MS) farklı olduğu bilinmekte, nöromyelitis optika (NMO) ile de benzerliği dikkat çekmektedir. Biz bu çalışmayla OSMS'î klasik MS ve NM'dan ayıracak immunolojik parametreler tanımlayıp hastalığın seyri ve tedavi seçimi açısından fikir vermesini amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya 20 MS, 14 OSMS, 18 NMO ve 21 sağlıklı kontrol olgusu alındı. Serum sitokin düzeyleri çoklu boncuk yöntemi ile ölçüldü. Sonuçlar ANOVA ve Tukey'in post hoc testi ile karşılaştırıldı.

Bulgular: IL-8 düzeyleri MS ve OSMS gruplarında NMO ve sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük saptandı ($p<0,0001$). IL-6 düzeyleri ise NMO ve sağlıklı kontrol gruplarında MS ve OSMS grubundan anlamlı derecede düşüktü ($p=0,042$). Tümör nekrotizan faktör alfa (TNF- α) düzeyine bakıldığında NMO ve sağlıklı kontrol gruplarının MS ve OSMS gruplarından anlamlı derecede düşük olduğu görüldü ($p<0,0001$).

Sonuç: Çalışmamız OSMS ve NMO hastalarında birbirinden farklı sitokin düzeylerinin olduğunu göstermiş ve özellikle spinal longitudinal lezyonu olmayan, Aquaporin-4 (Aqp-4) negatif OSMS'nin bir NMO spektrum hastalığı varyantı olmadığını destekleyen bulgular sunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Optik sinir, spinal kord, demiyelinizan

GİRİŞ

Multipl Skleroz (MS) T lenfosit aracılı, relapslarla seyreden demiyelinizan, otoimmün hastalık olarak bilinmektedir. Optikospinal Multipl Skleroz (OSMS)'nin klinik seyrinin, klasik MS'ten farklı olduğu yönünde çalışmalar vardır. Ayrıca OSMS hastalarının semptom ve bulguları bir diğer otoim-

ABSTRACT

Objectives: The clinical course of opticospinal multiple sclerosis (OSMS) is different from that of classical multiple sclerosis (MS) and exhibits a remarkable similarity with that of neuromyelitis optica (NMO). This study aimed to define the immunological parameters of OSMS to distinguish OSMS from classic MS and NMO and to highlight the pathology of OSMS and treatment choice.

Material and Method: In total, 20 patients with MS, 14 with OSMS, 18 with NMO, and 21 healthy controls were enrolled in the study. Serum cytokine levels were measured using the multiple bead method, and the results were compared with those obtained using the post hoc analysis of variance and Tukey's test.

Results: Interleukin (IL)-8 levels were significantly lower in the MS and OSMS groups than in the NMO and control groups ($p<0.0001$). IL-6 levels were found to be significantly lower in the NMO and control groups than in the MS and OSMS groups ($p=0.042$). Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) levels were significantly lower in the NMO and control groups than in the MS and OSMS groups ($p<0.0001$).

Conclusion: The findings of our study suggest that people with OSMS and NMO exhibit different levels of cytokines and that Aqp-4-negative OSMS, which is not a spinal longitudinal disease, is not a variant of NMO.

Keywords: Optic nerve, spinal cord, demyelinating

mün hastalık olan nöromyelitis optika (NMO) ile büyük benzerlik taşımaktadır.

OSMS ve NMO'nun tedavisi farklıdır, önemli bir nokta olarak OSMS'te kullanılan bazı immünomodulator ilaçlar NMO bulgularında kötüleşmeye sebep olmaktadır. İkisinin ayırıcı tanısında kullanılan aquaporin-4 (Aqp-4) antikoru NMO hastalarının %40-50'sinde negatiftir. Bu yüzden NMO

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Özlem Mercan **E-mail:** ozlemmercans3@gmail.com

Geliş Tarihi/Received Date: 01.09.2018 **Kabul Tarihi/Accepted Date:** 06.09.2018

© Copyright 2018 by The Istanbul University Faculty of Science • Available online at <http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/>

© Telif Hakkı 2018 İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi • Makale metnine http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/_sayfasından ulaşılabilir.

ve MS'yi ayırmak için kullanılacak ek laboratuvar yöntemlere ihtiyaç vardır.

Ayrıca spinal tutulumu olan MS hastalarında olmayan MS hastalarına göre farklı mekanizmaların işlediği gösterilmiştir. Spinal tutulumun ön planda olduğu OSMS ve NMO olguları ile serebral lezyonların ön planda olduğu klasik MS olguları arasında immünopatojenik farklılıkların varlığı günümüze kadar detaylı araştırılmamıştır.

Biz bu çalışmayı OSMS ve NMO ayırımını sağlayacak ek serum belirteçleri saptamak ve spinal tutulumun ön planda olduğu otoimmün demiyelinizan hastalıklarla klasik MS arasında var olabilecek immünopatolojik farklılıkları belirtmek amacıyla planladık.

TNF- α önemli ölçüde aktif mononükleer fagositler, T lenfositler ve nötrofillerden salgılanan bir sitokindir. TNF- α sayesinde çoğalan kemokinler ve adezyon molekülleri immün hücrelerin inflamasyon alanına kemotaksisini sağlar. IL-1 ve TNF- α , IL-6 sentezini tetikler (1). Edinsel immün sistemde ana hedefi B lenfositlerdir, antikör üretiminin uyarılmasında etkin rol oynar (1). IL-6'nın kronik inflamatuvar yanıtı ve yine inflamatuvar sitokin olan Th22 ve Th 17 dönüşümünde rol aldığı bilinmektedir (2).

Antiinflamatuvar sitokinlerden olan IL-10 aktive monositler/makrofajlar ve düzenleyici T hücreler tarafından salgılanır. Ancak birçok immün hücre de (B lenfosit, NK hücre, mast hücresi) belirli ölçüde IL-10 üretebilir. IL-10 sınıf II MHC düzeyini azaltır, proinflamatuvar sitokinlerin sentezini ve bunların reseptörleri azaltır. Bu nedenle antiinflamatuvar ve otokrin sitokin olarak bilinir.

Kemokinler (kemotaktik sitokinler) inflamasyon sırasında lökosit kemotaksisini uyarır. Homeostatik lökosit trafiği, lenfoid dokuların gelişimi, yara iyileşmesi, hematopoez, immün hücrelerin farklılaşması gibi pek çok hadisede rolü vardır (3). Kemokinler farklı oranlarda aminoasit dizi benzerliği gösterir. Amino ucuna yakın ilk sistein (C) yerleşimi ve sayısına göre dört sınıfa ayrılır. Buna göre: tek sistein içeren C, ardışık iki sistein içeren CC, iki sistein arasında başka bir aminoasit içeren CXC, veya iki sistein arasında başka üç aminoasit içeren CX3C olarak belirlenmiştir (4). CXC ailesinin en önemli üyesi IL-8'dir. CXCL1, CXCL11, CXCL2 ve CXCL5 inflamatuvar kemokinlerdendir (4, 5).

GEREÇ ve YÖNTEM

Olgular

Çalışmaya 20 MS, 14 OSMS, 18 NMO ve 21 sağlıklı kontrol olgusu dahil edildi. NMO olgularının tümü NMOSD kriterlerini dolduruyordu (6). Ayrıca bu grubun tümünün öyküsünde klasik NMO tanımına da uygun olacak şekilde en az birer adet longitudinal uzanımlı transvers myelit ve optik nörit atağı vardı, ayrıca hepsinin Aqp-4 antikoru pozitif. OSMS olguları ise en az bir transvers myelit ve optik nörit öyküsü olan, MS ile uyumlu beyin lezyonları olsa da klinik olarak serebral ve serebellar atakları olmayan olgular arasından çalışmaya dahil edildi ve hiçbir NMOSD ve McDonald kriterlerini doldurmuyordu (7, 8). Olguların hiçbirinde longitudinal uzanımlı (en az üç vertebra uzunluğunda) omurilik lezyonu yoktu. Kontrol MS olguları NMO ve OSMS olgularına benzerlik göstermesi amacıyla en az bir optik nörit ve transvers myelit atağı geçirmiş olan, longitudinal uzanımlı spinal lezyonu olmayan ve klinik-radyolojik bulguları McDonald kriterlerini (9) dolduran klasik MS olguları arasından seçildi. Tüm olgular serum örneği alındığı esnada remisyon dönemindeydi. Son 2 ay içinde atak öyküsü veya immünsüpresan kullanımı dışlama kriteri olarak kabul edildi. Etik Kurul onaylı (28.11.2016 tarihli ve HNEAH-KAEK2016 /KK/110 onaylı) bu çalışmada gönüllülere detaylı bilgi verilerek çalışmaya ait bilgilendirilmiş gönüllü olur formu okutuldu ve imzaları alındı.

Serum Sitokin Düzeylerinin Çoklu Boncuk Yöntemi ile Ölçümü
Luminex, bir manyetik boncuk teknolojisi. Temelde streptavidinin, manyetik boncuk-protein kompleksine bağlanması esasına dayanır (Şekil 1). Serumda IL-6, IL-8, IL-10, ve TNF- α düzeylerini ölçmek üzere Bio-Rad, Bio-Plex Pro Human Cytokine Assay kiti kullanıldı.

96 kuyucuklu plağa belirlemek istediğimiz sitokinlere özgü olan manyetik boncuklardan 50 mikrolitre konuldu.

Aqp-4 Antikor Tayini

Çalışmaya alınan tüm olguların serum örneklerinde Aqp-4 antikor bakıldı. Bu amaçla Aqp-4 transfekte insan embriyonal böbrek hücreleri (HEK-293), beyin, serebellum ve optik sinir kesitleri içeren indirekt immüno floresan boyama temelli kit kullanıldı (Euroimmun, Luebeck, Almanya).

İstatistiksel Analiz

Tüm grupların serum sitokin düzeyleri ANOVA ve Tukey'in post hoc testi ile karşılaştırıldı. Serum sitokin düzeyleri ile olguların yaş, hastalık süresi, hastalık başlangıç yaşı, EDSS, progresyon indeksi, toplam atak sayısı ve yıllık atak sayısı değerleri arasındaki olası korelasyonlar Pearson ve Spearman korelasyon testleri ile araştırıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Olguların Klinik Özellikleri

Çalışmaya dahil edilen MS, NMO ve OSMS olgularının yaş, hastalık başlangıç yaşı, hastalık süresi, toplam atak sayısı ve yıllık atak sayısı parametreleri açısından gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı (Tablo 1).

Sitokin Düzeyleri

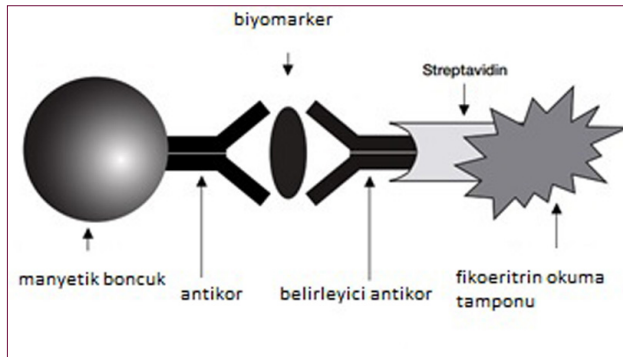
Serum IL-8 düzeyine bakıldığında MS ve OSMS grubunda NMO ve sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı düşük saptandı ($p < 0,0001$). MS ve OSMS ile NMO ve sağlıklı kontrol arasında anlamlı fark yoktu (Şekil 2).

Serum IL-6 düzeylerine bakıldığında ise NMO ve sağlıklı kontrol gruplarında MS ve OSMS grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu görüldü ($p = 0,042$). İkili grup karşılaştırmalarında ise NMO-MS ve NMO-OSMS grupları arasında anlamlı fark yoktu. MS ve OSMS olguları ile NMO ve sağlıklı kontrol arasında anlamlı fark saptanmadı (Şekil 3).

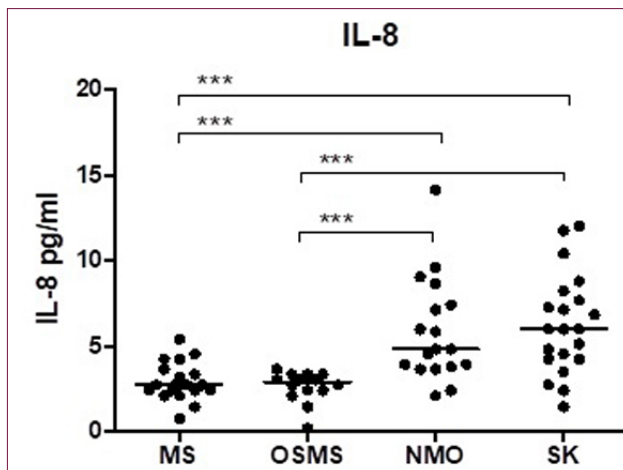
Tablo 1. Olguların demografik ve klinik özellikleri

	MS (20)	OSMS (14)	NMO (18)	Sağlıklı kontrol (21)	p
Ortalama Yaş±SD	42,3±9,2	38,8±8,1	40,1±12,9	39,6±7,4	0,765
Cinsiyet:					
Kadın/Erkek	15/5	6/8	12/6	14/7	0,272
Ortalama başlangıç yaşı±SD	27,3±9,3	30,8±7,9	29,5±4,1	-	0,644
Ortalama hastalık süresi±SD	14,9±5,0	8,0±5,2	12,1±4,8	-	0,701
Ortalama EDSS±SD	3,8±1,5	3,0±1,8	3,6±2,2	-	0,566
Toplam atak sayısı±SD	8,1±3,5	6,4±4,2	6,6±3,9	-	0,569
Yıllık atak sayısı±SD	0,5±0,3	0,9±0,5	0,6±0,3	-	0,108
Progresyon indeksi±SD	0,2±0,1	0,5±0,3	0,3±0,2	-	0,127

Progresyon indeksi: EDSS/hastalık süresi; SD: standart deviasyon; MS: multipl skleroz; OSMS: Optikospinal multipl skleroz; NMO: nöromyelitis optika



Şekil 1. Çoklu boncuk yönteminin işleyişi



Şekil 2. Serum IL-8 düzeyleri ***, p<0,001

TNF- α düzeyleri NMO ve sağlıklı kontrol gruplarında MS ve OSMS'e göre anlamlı derecede düşüktü ($p<0,0001$). NMO-MS ve NMO-OSMS grupları arasında anlamlı fark saptandı. Sağlıklı kontrol-MS grupları arasında da anlamlı fark varken sağlıklı kontrol ve OSMS gruplarının arasında fark yoktu. Ayrıca, MS ve

OSMS olguları ile NMO ve sağlıklı kontrol olgularının TNF- α düzeyleri arasında anlamlı fark görülmedi (Şekil 4).

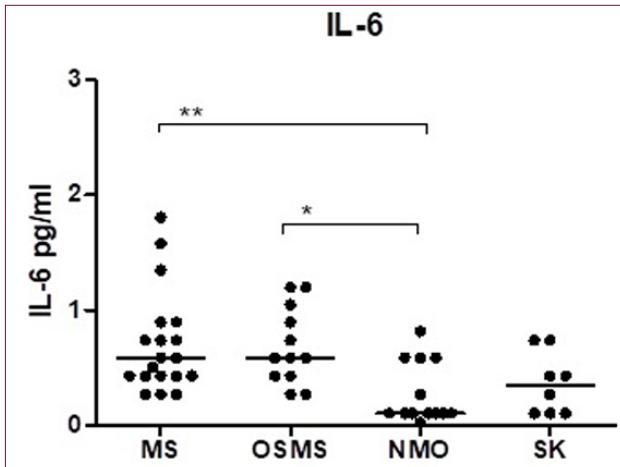
Sağlıklı kontrol ve NMO gruplarının IL-10 düzeyleri MS ve OSMS gruplarına göre daha yüksekti ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,0587$). İkili grup karşılaştırmalarında NMO olgularının serum IL-10 düzeylerinin OSMS olgularına göre anlamlı derecede daha yüksek olduğu saptandı. MS -OSMS ile NMO-sağlıklı kontrol arasında anlamlı fark görülmedi (Şekil 5).

Korelasyon Çalışmaları

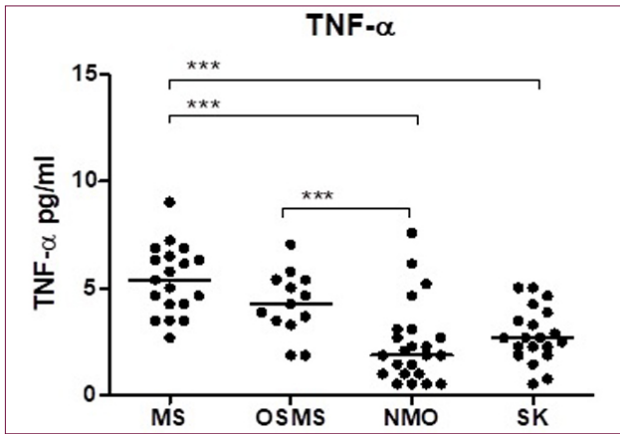
MS grubunda serum TNF- α düzeyleri ile progresyon indeksi ve vrilere arasında anlamlı korelasyon saptandı ($p=0,013$, korelasyon katsayısı $R=0,574$). Benzer şekilde progresyon indeksi değerleri ile IL-6 ($p=0,057$, $R=0,452$) ve IL-8 ($p=0,058$, $R=0,422$) düzeyleri arasında anlamlılığa yakın korelasyon vardı. OSMS ve NMO gruplarının progresyon indeksi ve sitokin düzeyleri arasında ise korelasyon yoktu. OSMS hastalarının serum IL-6 düzeyleri ile atak sayıları arasında ters korelasyon görüldü ($p=0,029$, $R=-0,650$). MS ve NMO gruplarında sitokin düzeyleri ve atak sayıları arasında korelasyon görülmedi.

TARTIŞMA

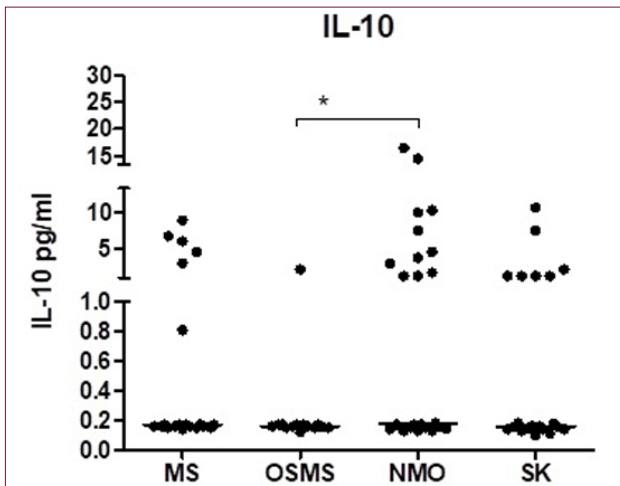
NMOSD merkezi sinir sisteminin esasen omurilik ve optik sinir tutulumu ile seyreden inflamatuvar demiyelinizan bir hastalıdır. Aqp-4 antikorunun tanımlanmasıyla diğer otoimmün demiyelinizan hastalıklarından ayırımında büyük kolaylık sağlanmıştır. Ancak seronegatif olup MS ile uyumlu kranyal lezyonları olan NMOSD olgularının varlığı da bilinmektedir. Bununla birlikte 3 vertebra boyundan kısa spinal lezyonu olan, sadece optik sinir ve medulla spinalis tutulumu ile seyreden, klinik olarak sessiz serebral MS plakları olsa da lezyonların Barkhof kriterlerini doldurmadığı bir OSMS grubu da vardır (10). Aqp-4 antikorunu negatif olan bu olguların klinik ve fizyopatolojik olarak MS veya NMOSD grubuna yakınlıkları belirsizdir. Biz bu çalışmada, bu ayırma katkısı olması amacıyla OSMS ve NMOSD olguları ile omurilik ve optik sinir tutulumu olan MS grubunda başka



Şekil 3. Serum IL-6 düzeyleri *, p<0,05; **, p<0,01



Şekil 4. Serum TNF- α düzeyleri ***, p<0,001



Şekil 5. Serum IL-10 düzeyleri *, p<0,05

çalışmalarda NMOSD ile ilişkisi gösterilmiş (11-13) sitokinlerin serum düzeylerini ölçtük. MS ve OSMS gruplarında IL-8 ve IL-10 düzeylerinin diğer gruplara göre düşük olduğu görülürken, TNF-α ve IL-6 düzeyleri yüksekti. OSMS ve NMO olgularının se-

rum sitokin düzeylerinin ilk olarak karşılaştırıldığı çalışmamızın sonuçları genel olarak NMO ve OSMS gruplarının birbirinden farklı sitokin paternleri gösterdiğini ve bu açıdan OSMS'in MS grubuna daha yakın olduğunu gösterdi.

Mevcut sonuçlar OSMS'yi bir NMOSD varyantı olarak ifade eden görüşün yanlış olabileceğini düşündürmektedir. Aynı zamanda bulgularımız OSMS'nin MS'e benzer mekanizmalarla gerçekleştiğini düşündürmektedir. En azından OSMS ve MS olgularının sitokin paternlerinin birbirine benzediğini söylemek mümkündür. Öte yandan MS'te TNF-α, IL-6 ve IL-8 ile progresyon indeksi arasında görülen anlamlı veya anlamlıya yakın korelasyonların OSMS olgularında saptayamamız iki hastalığın mekanizmaları arasında bazı farklılıklar olduğunu düşündürmektedir. Bununla uyumlu olarak daha önceki çalışmalarda OSMS olgularının serumlarında, MS olgularına kıyasla, CD4+ ve CD8+ T hücresinin daha yüksek olduğu ve Th1-tipi sitokin yanıtlarının da daha belirgin olduğu gösterilmiştir (14). Bu sebeple bundan sonra yapılacak çalışmalarda MS ve OSMS gruplarının immün fenotiplerinin iredelenmesinin iki hastalık arasındaki farkları daha net ortaya koyması mümkündür.

MS ve OSMS olgularında yüksek saptadığımız TNF-α ve IL-6 öncelikli olarak doğal bağışıklık hücrelerinden salgılanmaktadır (15). Bu yüzden bu sonucumuz doğal bağışıklığın MS-OSMS olgularında NMO olgularına göre daha özellikli rol oynadığını düşündürebilir. Th2 tipi lenfositlerden salgılanan IL-10 düzeylerinin de NMO olgularında normalden MS ve OSMS gruplarında düşük olması MS-OSMS olgularında azalmış anti-inflamatuar yanıt olarak düşünülebilir. NMO'da ise Th17-tipi bağışıklık yanında Th2-tipi bağışıklığın da rol oynuyor olması IL-10 düzeylerinin OSMS olgularına göre yüksek saptanmasına sebep olmuş olabilir. IL-8 MS lezyonlarında nötrofil ve lenfosit birikiminden sorumlu olan ve düzeyi sağlıklılara göre yüksek saptanan bir kemokindir (15). Çalışmamızda MS-OSMS grubunda baskılanmış saptanmasının nedeni uzun süreli immünsüpresif kullanımı olabilir. Nitekim kortikosteroidin de interferon-β gibi immünomodulatuar ilaçlarında IL-8 düzeylerini azalttığı gösterilmiştir (16, 17). Öte yandan saptadığımız NMO grubunda MS grubuna göre yüksek IL-8 düzeyi literatürle uyumludur (13). NMO ve sağlıklı kontrollerin serum sitokin düzeylerinin aynı çıkması bu hastalıkta inflammatuar değişikliklerin esasen intratekal alanda gerçekleştiğini ve serum sitokin ölçümlerinin hastalığın fizyopatolojisine dair bir yorum yapmak için doğru ve yeterli veri olmayacağını düşündürmektedir. Nitekim daha önceki çalışmalarda NMO ile ilişkisi gösterilen sitokin ve kemokinler esas olarak BOS ölçümleriyle belirlenmiştir (13).

Çalışmamızın sınırlamaları ender hastalıklar olmaları sebebiyle NMOSD ve OSMS olgu gruplarının sayılarının düşük olması, sitokinlerin BOS'ta değerlendirilememiş olması ve tüm hasta gruplarında farklı tedavilerin uygulanıyor olmasıdır. IL-8 örneğinde olduğu gibi gözlediğimiz değişikliklerin bazılarının tedaviye bağlı olması da mümkündür.

SONUÇ

Sonuç olarak çalışmamız OSMS ve NMO hastalıklarının sitokin paterni açısından farklı olduğunu ve özellikle longitudinal uzanımlı lezyonu olmayan Aqp-4 negatif OSMS'nin bir NMOSD varyantı olmadığını destekler bulgular göstermiştir. Daha sonra yapılacak olan çalışmalarda incelenen sitokin paternlerinin geniş tutulması ve immünofenotipleme çalışmalarının eklenmesi ile bu iki klinik antite daha iyi ayırmaya sağlayacak kanıtların elde edilmesi mümkün olacaktır.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik kurul onayı Haydarpaşa Numune Eğitim Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır (HNEAH-KAEK 2016/107).

Hasta Onamı: Yazılı hasta onamı bu çalışmaya katılan hastalardan alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - Ö.M., R.T.; Tasarım Ö.M., Z.Ü.; Denetleme - C.H.M.; Kaynaklar - Ö.M., R.T.; Gereçler - Ö.M., Z.Ü., C.H.M.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - Ö.M., R.T., C.H.M.; Analiz ve/veya Yorum - Ö.M., Z.Ü.; Literatür Taraması - Ö.M.; Yazan - Ö.M., C.H.M.; Eleştirel İnceleme - Ö.M., R.T.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışmada finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the Ethics Committee of Haydarpaşa Numune Training and Research Hospital Clinical Research Commission (HNEAH-KAEK 2016/107).

Informed Consent: Written informed consent was obtained from the patients who participated in this study.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - Ö.M., R.T.; Design - Ö.M., Z.Ü.; Supervision - C.H.M.; Resource - Ö.M., R.T.; Materials - Ö.M., Z.Ü., C.H.M.; Data Collection and/or Processing - Ö.M., R.T., C.H.M.; Analysis and/or Interpretation - Ö.M., Z.Ü.; Literature Search - Ö.M.; Writing - Ö.M., C.H.M.; Critical Reviews - Ö.M., R.T.

Conflict of Interest: The authors have no conflict of interest to declare.

Financial Disclosure: The authors declared that this study has received no financial support.

KAYNAKLAR

1. Akdis M, Burgler S, Cramer R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E, et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions,

- and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127: 701-21. [CrossRef]
2. Pan HF, Li XP, Zheng SG, Ye DQ. Emerging role of interleukin-22 in autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 2013; 24: 51-7. [CrossRef]
3. Ransohoff RM. Chemokines and chemokine receptors: standing at the crossroads of immunobiology and neurobiology. *Immunity* 2009; 31: 711-21. [CrossRef]
4. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 217-42. [CrossRef]
5. Olson TS, Ley K. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 283: R7-R28. [CrossRef]
6. Wingerchuk DM, Banwell B, Bennett JL, Cabre P, Carroll W, Chitnis T, et al. International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology* 2015; 85: 177-89. [CrossRef]
7. Kira J. Multiple sclerosis in the Japanese population. *Lancet Neurol* 2003; 2: 117-27. [CrossRef]
8. Lucchinetti CF, Mandler RN, McGavern D, Bruck W, Gleich G, Ransohoff RM, et al. A role for humoral mechanisms in the pathogenesis of Devic's neuromyelitis optica. *Brain* 2002; 125: 1450-61. [CrossRef]
9. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011; 69: 292-302. [CrossRef]
10. Ramanathan S, Sato S, Matsushita T, Masaki K, Yamasaki R, Dale RC, et al. Antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein are uncommon in Japanese optospinal multiple sclerosis. *Mult Scler* 2015; 22: 127-8. [CrossRef]
11. Ishizu T, Osoegawa M, Mei FJ, Kikuchi H, Tanaka M, Takakura Y, et al. Intrathecal activation of the IL-17/IL-8 axis in optospinal multiple sclerosis. *Brain* 2005; 128: 988-1002. [CrossRef]
12. İçöz S, Tüzün E, Kürtüncü M, Durmuş H, Mutlu M, Eraksoy M, et al. Enhanced IL-6 production in aquaporin-4 antibody positive neuromyelitis optica patients. *Int J Neurosci* 2010; 120: 71-5. [CrossRef]
13. Uzawa A, Mori M, Arai K, Sato Y, Hayakawa S, Masuda S, et al. Cytokine and chemokine profiles in neuromyelitis optica: significance of interleukin-6. *Mult Scler* 2010; 16: 1443-52. [CrossRef]
14. Ochi H, Wu XM, Osoegawa M, Horiuchi I, Minohara M, Murai H, et al. Tc1/Tc2 and Th1/Th2 balance in Asian and Western types of multiple sclerosis, HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis and hyperIgEaemic myelitis. *J Neuroimmunol* 2001; 119: 297-305. [CrossRef]
15. Akdis M, Aab A, Altunbulakli C, Azkur K, Costa RA, Cramer R, et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2016; 138: 984-1010. [CrossRef]
16. Lund BT1, Ashikian N, Ta HQ, Chakryan Y, Manoukian K, Groshen S, et al. Increased CXCL8 (IL-8) expression in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2004; 155: 161-71. [CrossRef]
17. Nozell S, Laver T, Patel K, Benveniste EN. Mechanism of IFN- β -mediated inhibition of IL-8 gene expression in astrogloma cells. *J Immunol* 2006; 177: 822-30. [CrossRef]

Parkinson Hastalığı ve Akciğer Kanserinde PI3K/Akt Yolağı Faktörlerinin Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması

Comparison of The Expression Levels of PI3K/Akt Pathway Factors in Parkinson's Disease and Lung Cancer

Elif Şanlı^{1*}, Nazlı Yalçınkaya², Erdem Tüzün¹

¹İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Sinirbilim Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²Baylor College of Medicine, Patoloji Ana Bilim Dalı, Houston, Texas, ABD

Cite this article as: Şanlı E, Yalçınkaya N, Tüzün E. Comparison of The Expression Levels of PI3K/Akt Pathway Factors in Parkinson's Disease and Lung Cancer. Experimed 2018; 8(2): 52-7.

ÖZ

Amaç: Parkinson hastalığı (PH) kırk yaş üzeri popülasyonun %0,2'ni etkileyen en sık görülen nörodegeneratif hastalıklardan biridir. Yapılan çalışmalarla PH'de kanser prevalansının düşük olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar sebebiyle fosfoinositidil-3-kinaz (PI3K)/Akt sağkalım yolağı dikkatleri çekmiştir. Bu yolağa ait gen ekspresyon değişikliklerinin incelenmesi, PH tedavi ve biyobelirteçlerinin bulunması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda, PH, akciğer kanseri (AK) hastalarından ve sağlıklı kontrollerden alınan periferik kan mononükleer hücrelerinde DJ-1-PI3K/Akt sinyal yolağı komponentlerinin ve bu yolağı etkileyen proteinlerin ekspresyonu ölçülmüş, ekspresyon düzeylerinin PH'nin klinik parametreleri ile korelasyonu araştırılmıştır.

Bulgular: Fosfatase ve tensin homolog (PTEN) ve mitokondriyal apoptoz-indükleyici faktör 1 (Aifm1)'in PH'de sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede azaldığı ve insülin-benzeri büyüme faktörü (IGF-1)'in anlamlı derecede arttığı saptandı. AK hastalarında ise PTEN, kaspaz-3 ve α -sinükleinin ekspresyonlarının anlamlı derecede arttığı, IGF-1'in anlamlı derecede azaldığı saptandı. Ayrıca α -sinüklein, IGF-1, kaspaz-3, DJ-1, memeli hedef rapamisin (mTOR), Mdm2 ve Akt-1 faktörleriyle PH'nin klinik alt tipleri arasında korelasyon belirlendi.

Sonuç: Pro-apoptotik PTEN ve anti-apoptotik PI3K/Akt yolağının ekspresyon seviyelerinde görülen değişiklik PH'de artan nöronal yıkımı kompanse etmek amacıyla anti-apoptotik yolaklarının etkinleştirildiğini düşündürmektedir. Çeşitli PI3K/Akt yolağı ekspresyon düzeyleri ile klinik parametreler arasında korelasyon saptanması PH olgularında bu faktörlerin özüllülük ve prognoz belirteci olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Özellikle postural instabilite ile anti-apoptotik faktör arasındaki ekspresyon değişikliği nöronal yıkımı akla getirmektedir.

Anahtar Kelimeler: Parkinson Hastalığı, apoptoz, PTEN, alfa-sinüklein, PI3K/Akt

ABSTRACT

Objectives: Parkinson's disease (PD) is a common neurodegenerative disorder that affects >0.2% of the population aged >40 years. Several studies have reported a low prevalence of cancer in individuals with PD. Therefore, the PI3K/Akt signaling pathway has received increasing research attention. Investigating variations in expression levels of components associated with this pathway might aid in improving novel treatment methods and biomarkers for PD.

Material and Method: We evaluated expression levels of components of the DJ-1-PI3K/Akt signaling pathway in the peripheral blood mononuclear cells of patients with PD, those with lung cancer (LC), and healthy controls and attempted to identify a possible correlation between expression levels and clinical features of PD.

Results: Levels of phosphatase and tensin homolog (PTEN) and apoptosis-inducing factor-1 significantly decreased, whereas those of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) significantly increased in patients with PD than in healthy controls. In patients with LC, levels of PTEN, caspase-3, and α -synuclein significantly increased, whereas those of IGF-1 significantly decreased. Furthermore, a correlation was observed between the clinical subtypes of PD and levels of α -synuclein, IGF-1, caspase-3, DJ-1, mechanistic target of rapamycin, Mdm2, and Akt-1 factors.

Conclusion: Patients with PD showed decreased expression levels of proapoptotic PTEN and increased levels of components of the antiapoptotic PI3K/Akt pathway, which suggests an activation of the antiapoptotic pathway to compensate for the increased neuronal destruction in PD. The correlation between expression levels of components of several PI3K/Akt signaling pathway and clinical parameters suggests that these factors can be used as disability and prognostic markers in patients with PD. Decreased expression levels of antiapoptotic factors in patients with PD having postural instability, in particular, suggests a close relationship between neuronal destruction and this symptom.

Keywords: Parkinson's disease, apoptosis, PTEN, alpha-synuclein, PI3K/Akt

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Elif Şanlı E-mail: elifsanli12@gmail.com

Geliş Tarihi/Received Date: 13.09.2018 **Kabul Tarihi/Accepted Date:** 14.09.2018

© Copyright 2018 by The Istanbul University Faculty of Science • Available online at <http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/>

© Telif Hakkı 2018 İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi • Makale metnine http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/_sayfasından ulaşılabilir.

GİRİŞ

Parkinson hastalığı (PH) 65 yaş üzeri popülasyonda en sık görülen nörodejeneratif hastalıklardan biri olmakta ve yaşla birlikte insidansı artmaktadır (1, 2). Farklı patolojik süreçlerin rol oynadığı bilinen PH, özellikle substantia nigra pars kompakta (SNpc)'da bulunan dopaminerjik nöronların ölümüyle karakterize edilir (3, 4). Yapılan çalışmalar, kanser insidansının PH tanısı konulmadan önce düşük olduğuna işaret etmekte ve bu iki hastalığın ortak biyolojik yolları kullandığı düşünülmektedir (5-8). PARK1, PARK2 ve α -sinüklein gibi nörodejeneratif hastalıklarda rolü olduğu bilinen genlerin kanserle olan ilişkisi gösterilmiştir. Aynı zamanda, PTEN gibi tümör baskılayıcı genlerin de PH olgularında ekspresyonlarının değiştiği gösterilmiştir (9). Mutasyonlar sonucu hücrelerin apoptoza yatkınlığının PH riskini artırması ve kanser riskinde azalmaya yol açması beklenirken, apoptoza yatkınlığı azaltan mutasyonların da kanser riskini artırması ve nöronal apoptozu engelleyerek PH riskini azaltabileceğini düşündürmektedir.

Önemli sağkalım yollarından biri olan fosfoinositidil-3-kinaz (PI3K)/Akt yolağı (10, 11), ailevi PH olgularında görülen PTEN-Uyarılmış Putatif Kinaz 1 (PINK1), DJ1, parkin, α -sinüklein gibi proteinlerin mutasyonlarıyla ilişkili bulunması (12-14), çeşitli sağkalım-ölüm mekanizmalarında rol alması (15) ve PH olgularında SN'de Akt ekspresyonunun azaldığının görülmesi (16, 17), bu yolağa olan dikkati artırmış ve üzerinde çok sayıda araştırma yapılmıştır (18-22). Hücrel sağkalımda rolü olan Akt'nin ilgi odağı olmasının sebeplerinden birisi halihazırda olan PH tedavi yöntemlerinin nöron dejenerasyonunu tamamen engelleyici etkiye sahip olmamasıdır. Büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından uyarılmış PI3K'nin Akt'yi aktiflemesiyle, Akt serin/treonin kinaz fonksiyonuyla birçok hücrel süreçleri düzenlemeye başlar (10, 11, 23). PI3K/Akt yolağı hücrel sağkalımdaki etkisini özellikle anti-apoptotik mekanizmalar üzerinden gerçekleştirmektedir. Hücrelerin sağkalımına etkisi olan Akt aktivasyonunun, PTEN ve DJ-1 gibi PH olgularında ekspresyonlarının değiştiği gösterilen genlerle ilişkili olduğu gösterilmiştir (12) ve DJ-1'in PTEN'i baskılayarak PI3K/Akt sinyal yolağının aktivasyonunu sağladığı bildirilmiştir (24-26).

Bu çıktılar doğrultusunda PI3K/Akt yolağına ait ekspresyon değişimlerinin araştırılmasının PH'ye yönelik tedavi ve prognostik/diagnostik biyobelirteçlerin bulunmasına yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Periferik kanda PH fizyopatolojisini yansıtan ekspresyon değişikliklerinin saptanması kolay kullanımlı tanılabilir laboratuvar testlerinin geliştirilmesini mümkün kılacaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Parkinson ve Akciğer Kanseri Hastaları ve Sağlıklı Kontroller

Bu çalışmaya 49 idiyopatik PH, 23 AK hastası ve yaş-uyumlu 49 sağlıklı kontrol alındı. Birleşik Krallık Parkinson Hastalığı Derneği Beyin Bankası Kriterlerine göre klinik olarak kesin PH tanısı almış tedavi altındaki olgular dahil edildi. Akciğer kanseri hastaları ise görüntüleme ve patolojik inceleme ile tanısı konulmuş 2. ve 3.

evre, tedavi altındaki akciğer adenokanser hastalarından oluşmaktadır. Sağlıklı kontrollerin herhangi bir şikayetlerinin olmasına ve tam kan sayımı, sedimentasyon ve rutin biyokimya testlerinin normal sonuçlanmasına dikkat edilmiştir.

Gerçek zamanlı PZR

PH, AK olgularından ve sağlıklı kontrollerden EDTA'lı tüplere alınan 10 mL periferik venöz kan örneklerinden periferik kan mononükleer hücreleri izole edildi ve -80°C derin dondurucuda saklandı.

PI3K/AKT yolağı faktörlerinin (Akt-1, mTOR, kaspaz 9, MDM2), bu yolağı regüle eden faktörlerin (DJ-1, PTEN, α -sinüklein, IGF-1) ve apoptoz ile ilişkili faktörlerin (Bcl-2, kaspaz 3, Aifm1) ekspresyon düzeyleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile PH ve kontrol olgularında incelenmiştir. Light Cycler 480 II (LightCycler® 480 Real-Time PCR System, Roche Applied Science, İstanbul-Türkiye) cihazı ve Light Cycler 480 SYBR Green (LightCycler® SYBR Green I Master, Roche Applied Science, İstanbul-Türkiye) kit kullanılarak PI3K/Akt sinyal yolağına ait araştırılacak genler uygun primerlerle amplifiye edildi. Deney sonuçları AbsQuant/2nd DerivativeMax, Tm Calling programlarında analiz edilerek örneklerin ekspresyona başladıkları sikluslar (Cp değerleri) not edilmiştir. Çoğaltılan DNA'nın istenilen hedef bölge olup olmadığını anlayabilmek ve primer-dimer gibi ürünleri analizden çıkartabilmek için erime eğrisi analizi ("melting curve") yapıldı. Ekspresyon düzey tayini için rölatif kantifikasyon yapılması amacıyla tek bir örnekte iki farklı dizinin (hedef gen ve referans gen) ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı ve örnek normalizasyonuna temel oluşturmak üzere bu çalışmada GAPDH geni referans olarak kullanıldı. Ekspresyon düzeyinin belirlenmesi için $\Delta\Delta Ct$ yöntemi ile Graph-Pad Prism 6 paket programı kullanıldı (27, 28).

Cell Death Detection ELISA Kiti ile Apoptoz Tayini

Periferik kan mononükleer hücre ölümünün hangi formda (nekroz yada apoptoz) olduğunu anlayabilmek için, hücrel süpernatantta mono- veya oligonükleozom varlığı incelenerek, anti-histon antikorları ile apoptotik hücre ölümü ELISA temelli bir yöntemle ölçülmüştür.

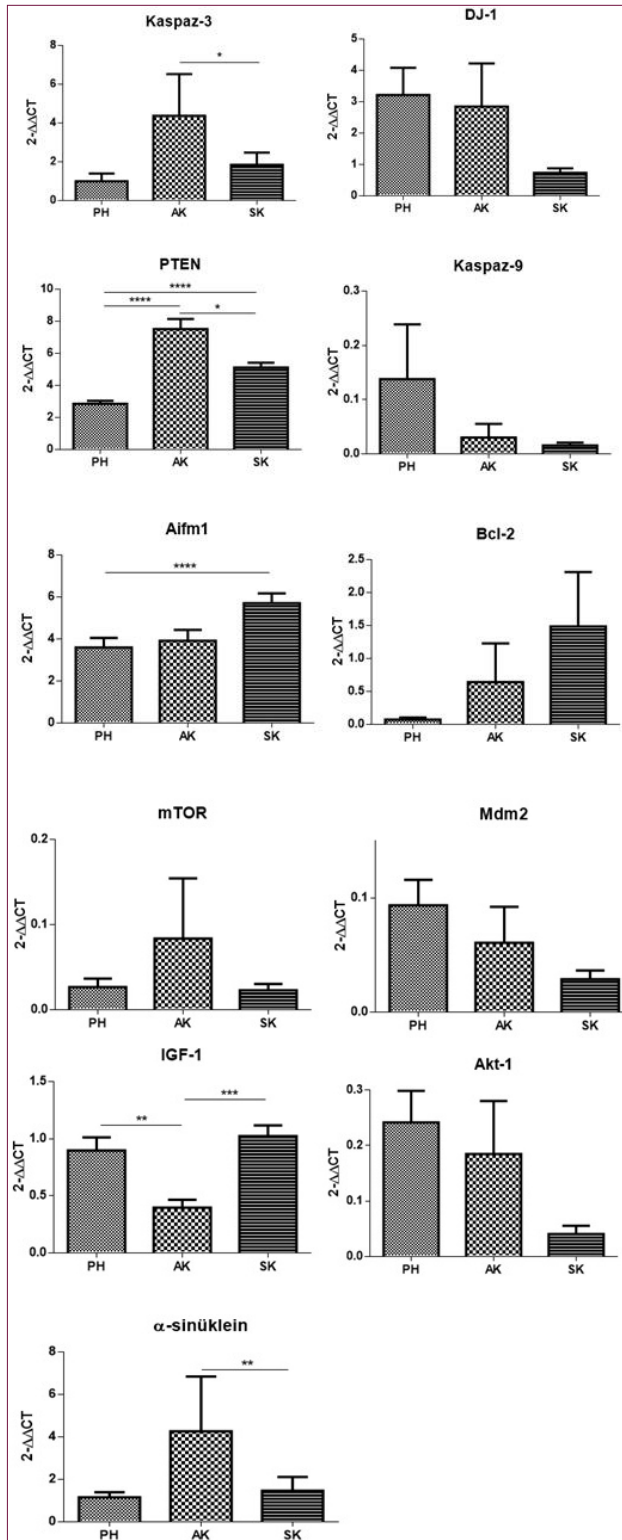
İstatistiksel Analiz

Kolmogorov-Smirnov yöntemiyle verilerin gruplar içinde normal dağılım göstermediği saptandığından, ekspresyon değerlerinin gruplar arasında karşılaştırılması amacıyla parametrik olmayan yöntemler kullanıldı. İkili grupların karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi, üçlü grup karşıştırmalarında ise Kruskal-Wallis testi ve post-hoc Dunn testi kullanıldı. Klinik parametreler ve gen ekspresyon düzeyleri ve genlerin ekspresyon düzeylerinin birbirleriyle korelasyonları Spearman korelasyon testi ile değerlendirildi ve korelasyon kat sayıları (R) hesaplandı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Araştırma Grubu Bireylerinin Demografik Özellikleri

Çalışmaya 22'si kadın ve 27'si erkek olmak üzere toplamda 49 Parkinson hastası katılmıştır ve katılan grubun yaş ortala-



Şekil 1. Ekspresyonu çalışılan genlerin 2-ΔΔCT değerlerinin Parkinson hastalığı (PH), akciğer kanseri (AK) ve sağlıklı kontrol (SK) olguları arasında karşılaştırılması. Dikey çizgiler standart sapmaları göstermektedir. Yatay çizgiler post-hoc analize göre anlamlı sonuçlanan ikili grup karşılaştırmalarını göstermektedir (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001).

ması (±standart sapma, minimum-maksimum) 57,4±10,1 (39-84)'dir. Hastalık başlangıç yaşı ortalaması 50,9±13,7 ve hastalık süresi 4,6±3,4 yıl (1-13)'dir. Parkinson hastalarının tremor (18 olgu), bradikinezi (24 olgu), rijidite (30 olgu), postural instabilite (11 olgu) semptomlarına sahip oldukları kayıt edilmiştir. Hoehn-Yahr skoru ortalamaları ise 2,14±0,7 (1-3) olarak hesaplanmıştır. Akciğer kanseri hasta grubu 2'si kadın ve 21'i erkek olmak üzere toplamda 23 hastadan oluşmaktadır. Hastaların yaş ortalaması 56,4±11,9 (37-72)'dir. Sağlıklı kontrol grubu ise 28 kadın, 21 erkek toplam 49 sağlıklı kontrolden oluşmaktadır ve yaş ortalamaları 56,2±7,3 (45-79) olarak hesaplanmıştır. Grupların yaş değerleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır. AK ve diğer gruplar arasında (PH ve SK) cinsiyet dağılımları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir (ki-kare testi ile p=0,0005).

PI3K/Akt Sinyal Yolağı İlişkili Genlerin Ekspresyonu

PI3K/Akt sinyal yolağında yer alan parametrelerin PH, AK ve SK gruplarındaki ekspresyon seviyelerindeki gerçek zamanlı PZR yöntemi ile saptandı. PH olgularında PTEN, Aifm1 ve Bcl-2 ekspresyon düzeylerinin azaldığı, DJ-1, kaspaz-9, Mdm-2 ve Akt-1 ekspresyon düzeylerinin arttığı saptandı. AK olgularında ise kaspaz-3, PTEN, mTOR ve α-sinüklein ekspresyon düzeyleri farklı derecelerde yüksek bulunurken, IGF-1 düzeyi düşük bulundu (Şekil 1).

Ekspresyon Değişiklikleri ve Klinik Parametreler Arasındaki Korelasyonlar

PI3K/Akt yolağında araştırılan genlerin ekspresyon düzeyleri PH olgularının klinik parametreleriyle korelasyonlarına bakıldığında, IGF-1 ile hastalık başlangıç yaşı arasında negatif korelasyon (p=0,003 R=-0,586), Aifm-1 ile Hoehn-Yahr skoru arasında pozitif korelasyon (p=0,030, R=0,578) saptandı. Ayrıca Hoehn-Yahr skoru ile IGF-1 geninin ekspresyon düzeyi arasında anlamlılığa yakın pozitif korelasyon saptandı (p=0,094 R=0,464). Diğer klinik parametrelerle ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı korelasyon saptanmadı.

Apoptoz ve Sağkalım Faktörlerinin Ekspresyon Düzeylerinin Parkinson Hastaları ve Sağlıklı Kontrollerde Birbirine Korelasyonları

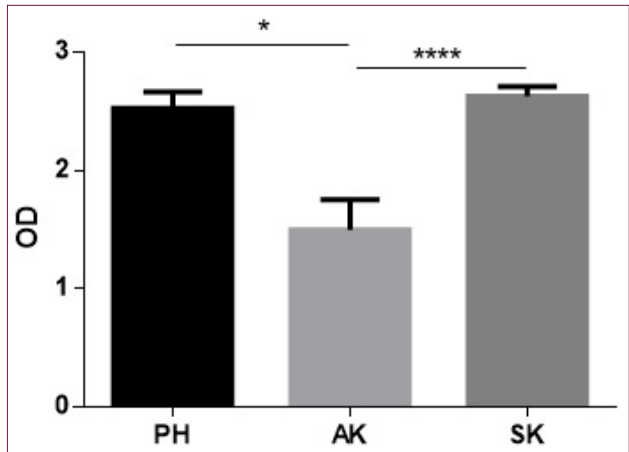
PH olgularında kaspaz-3, kaspaz-9, mTOR, Mdm2, α-sinüklein, Aifm1, IGF-1, DJ-1, PTEN ve Akt-1'in gen ekspresyonları arasında doğru korelasyon varken, Bcl-2'nin hiçbir genle korelasyon göstermediği bulundu. Bu bulgu Bcl-2'nin PI3K/Akt sinyal yolağı üzerinde yer almaması ile ilişkilendirildi. Bonferroni düzeltmesi sonrasında (p=0,05/55 istatistiksel karşılaştırma=0,0009) bütün bu korelasyon değerlerinin anlamlı kalmaya devam ettiği görüldü.

Sağlıklı kontrollerde ise Bonferroni düzeltmesinden sonra kaspaz-3, kaspaz-9, Akt-1 ve α-sinüklein gen ekspresyonları arasında anlamlı doğru korelasyon vardı. Bunlardan sadece kaspaz-3 - α-sinüklein, kaspaz-9 - α-sinüklein ve kaspaz-9 - Akt-1 arasındaki korelasyonların hem PH hemde sağlıklı kontrol olgularında anlamlı olduğu görüldü.

Apoptoz ve Sağkalım Faktörlerinin Ekspresyon Düzeylerinin Parkinson Hastaları Klinik Alt Tipleriyle Karşılaştırılması

Aifm1 gen ekspresyon düzeyleri kadın Parkinson hastalarında erkek Parkinson hastalarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu. Diğer faktörlerin ekspresyonunun cinsiyete bağlı olarak değişmediği gözlemlendi. Klinik bulgulara göre ekspresyon değerleri karşılaştırıldığında bradikinezi ve rijiditesi olan olgularda sırasıyla α -sinüklein ve IGF-1 düzeylerinin anlamlı derecede arttığı saptandı. Postural instabilitesi olanlarda ise çok sayıda sağkalım artırıcı ve apoptoz baskılayıcı gen ekspresyonunun belirgin derecede azaldığı gözlemlendi (Tablo 1).

Tablo 1. Çalışmaya dahil edilen MS ve sağlıklı olguların demografik ve klinik özellikleri			
	Kadın	Erkek	p
Aifm1	4,8±3,4	2,6±2,6	0,009
Faktörler – Klinik Alt Tipler	Pozitif	Negatif	p
α -sinüklein – Bradikinezi	1,7±1,9	0,6±1,0	0,003
IGF-1 – Rijidite	1,0±0,9	0,7±0,4	0,04
Kasp3 - Postural İnstabilite	0,07±0,6	1,0±2,1	0,02
DJ-1 - Postural İnstabilite	0,7±1,1	4,2±7,1	0,005
mTOR - Postural İnstabilite	0,003±0,0003	0,03±0,05	0,03
Mdm2 - Postural İnstabilite	0,1±0,1	0,02±0,02	0,01
α -sinüklein - Postural İnstabilite	0,4±0,6	1,4±1,7	0,01
Akt-1 Postural İnstabilite	0,05±0,05	0,3±0,4	0,002



Şekil 2. Parkinson hastaları (PH), akciğer kanseri (AK) olguları ve sağlıklı kontrollerin serumlarında Cell Death Detection ELISA Kiti ile saptanan nükleozom düzeyleri. Dikey çizgiler standart sapmaları göstermektedir. Yatay çizgiler post-hoc analize göre anlamlı sonuçlanan ikili grup karşılaştırmalarını göstermektedir (*p<0,05; ****p<0,0001).

Serum Nükleozom Seviyesi ve Hasta Grupları ve Sağlıklı Kontroller Arasındaki Korelasyon

PH, AK olgularının ve sağlıklı kontrollerin serumlarında bir apoptotik hücre ölümü belirteci olarak mono- veya oligonükleozom düzeyleri ELISA yöntemiyle ölçülmüştür. AK hastalarında sağlıklı kontrollere ve PH olgularına kıyasla azalma görülürken, PH olgularında periferik kan örneklerinde nükleozom düzeyinde anlamlı bir değişiklik görülmemiştir (Şekil 2).

Bu çalışma için etik komite onayı İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden alınmıştır (2012/1415-1203). Yazılı hasta onamı bu çalışmaya katılan hastalardan alınmıştır.

TARTIŞMA

Çalışmamızda ortaya çıkan ekspresyon düzey paterni genel olarak PH olgularında pro-apoptotik faktörlerin (PTEN, kaspaz-3 ve Aifm1) azaldığını, anti-apoptotik Akt yolağı ilişkili faktörlerin (Akt-1, Mdm2, DJ-1) ise arttığını düşündürmüştür. Bu bulguların PH'deki artmış oksidatif stres ve apoptotik nöron ölümünü telafi etmeye çalışan sağkalım mekanizmalarının etkinleşmesine bağlı olması mümkündür.

Hasta grupları arasındaki en belirgin fark ise PTEN ekspresyonunun PH olgularında azalırken, AK olgularında artması olmuştur. PTEN lokusunda bulunan mutasyonlar ve delesyonlar birçok kanserle ilişkili bulunmuştur (29). PTEN tümör baskılayıcı etkisini PIP₃'ü defosforile ederek ve böylece PI3K/Akt yolağını baskılayarak gösterir (30). Ayrıca çalışmamızda DJ-1'in ekspresyon düzeylerinde, PH olgularında sağlıklı kontrollere göre artma eğilimi görülmektedir. PTEN'in aşırı ekspresyonu birincil olarak hücre döngüsünü durdurarak, hücre büyümesini engeller (9). Dolayısıyla bulgularımız pro-apoptotik PTEN ekspresyonunun, PH olgularında artmış nöronal apoptozu azaltmak için azaldığını, AK olgularında ise kanser hücrelerinin apoptotik temizlenmesini artırmak amacıyla yükseldiğini düşündürmektedir.

AK olgularının pro-apoptotik ve anti-apoptotik gen ekspresyonlarında ve Akt yolağını düzenleyen PTEN ve IGF-1 faktörleriyle Akt yolağı faktörlerinin anlatımında, PH olgularındaki benzer bir korelasyon bulunmamaktadır. Örneğin, pro-apoptotik kaspaz-3, PTEN artarken diğer pro-apoptotik faktörlerden kaspaz-9 ve Aifm1 azalma eğilimi göstermiştir. Ayrıca AK olgularında PTEN ve IGF-1 ekspresyonu değişiklikleri Akt-1 ekspresyonunda belirgin değişikliğe yol açmamıştır. Bu bulgular PH'den farklı olarak AK olgularında sağkalım süreçlerinin sadece Akt-1 yolağı ile sınırlı olmayan daha karmaşık mekanizmalarla yönetildiğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda PH olgularında IGF-1 ekspresyon düzeyi istatistiksel olarak anlamlı derecede artarken, α -sinüklein ekspresyon düzeyleri diğer gruplara göre azalma eğilimi göstermektedir. Bu bulgular da α -sinüklein ve IGF-1 moleküllerinin, aynı DJ-1 ve PTEN molekülleri gibi, PH olgularında artmış nöronal apoptozu baskılamak amacıyla kompensasyona yönelik ekspresyon değişikliğine uğradığını düşündürmektedir. PI3K/Akt yolağındaki genlerin ekspresyon düzeyleri PH olgularının klinik para-

metreleriyle karşılaştırıldığında, IGF-1 ile hastalık başlangıç yaşı arasında negatif korelasyon, ayrıca Hoehn-Yahr skoru ile IGF-1 geninin ekspresyon düzeyi arasında anlamlılığa yakın pozitif korelasyon saptandı. Bu bulgular IGF-1 ekspresyonunun klinik kötüleşme parametresi olarak kullanılabilirliğini düşündürmektedir. Ek olarak Aifm-1 ile Hoehn-Yahr skoru arasında korelasyon saptanması non-kaspaz apoptoz yollarının PH patogenezinde önemli rol oynadığını düşündürmektedir.

Sonuç olarak, PH olgularında pro-apoptotik PTEN ekspresyonunun düşmesi ve anti-apoptotik PI3K/Akt yolağının ekspresyonunun artması, PH'de artan nöronal yıkımı kompense etmek amacıyla anti-apoptotik yolların etkinleştiğini düşündürmektedir. Çeşitli PI3K/Akt yolağı ekspresyon düzeyleri ile klinik parametreler arasında korelasyon saptanması PH olgularında bu faktörlerin özüllülük ve prognoz belirteci olarak kullanılabilirliğini göstermektedir.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden alınmıştır (2012/1415-1203).

Hasta Onamı: Yazılı hasta onamı bu çalışmaya katılan hastalardan alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - E.Ş., N.Y., E.T.; Tasarım - E.Ş., N.Y., E.T.; Denetleme - E.T.; Kaynaklar - E.Ş., N.Y., E.T.; Gereçler - E.Ş., N.Y., E.T.; Veri Toplanması ve/veya İşlenmesi - E.Ş., N.Y., E.T.; Analiz ve/veya Yorum - E.Ş., N.Y., E.T.; Literatür Taraması - E.Ş., N.Y., E.T.; Yazıyı Yazan - E.Ş., N.Y., E.T.; Eleştirel İnceleme E.T.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir (Proje no: 31110).

Ethics Committee Approval: Ethics Committee Approval was received for this study from the Ethics Committee of Istanbul University School of Medicine (2012/1415-1203).

Informed Consent: Written informed consent was obtained from the patients who participated in this study.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - E.Ş., N.Y., E.T.; Design - E.Ş., N.Y., E.T.; Supervision - E.T.; Resource - E.Ş., N.Y., E.T.; Materials - E.Ş., N.Y., E.T.; Data Collection and/or Processing - E.Ş., N.Y., E.T.; Analysis and/or Interpretation - E.Ş., N.Y., E.T.; Literature Search - E.Ş., N.Y., E.T.; Writing - E.Ş., N.Y., E.T.; Critical Reviews E.T.

Conflict of Interest: The authors have no conflict of interest to declare.

Financial Disclosure: This work was supported by the Research Fund of the İstanbul University (Project no: 31110).

KAYNAKLAR

1. de Rijk MC, Tzourio C, Breteler MM, Dartigues JF, Amaducci L, Lopez-Pousa S, et al. Prevalence of parkinsonism and Parkinson's

disease in Europe: the EUROPARKINSON Collaborative Study. European Community Concerted Action on the Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997; 62: 10-5. [CrossRef]

- Van Den Eeden SK, Tanner CM, Bernstein AL, Fross RD, Leimpeter A, Bloch DA, et al. Incidence of Parkinson's Disease: Variation by Age, Gender, and Race/Ethnicity. *Am J Epidemiol* 2003; 157: 1015-22. [CrossRef]
- Hirsch E, Graybiel A, Agid Y. Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* 1988; 334(6180): 345-8. [CrossRef]
- Dias V, Junn E, Mouradian MM. The role of oxidative stress in parkinson's disease. *J Parkinsons Dis* 2013; 3: 461-91.
- Jansson B, Jankovic J. Low cancer rates among patients with Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1985; 17: 505-9. [CrossRef]
- Olsen J, Friis S, Frederiksen K. Malignant Melanoma and Other Types of Cancer Preceding Parkinson Disease. *Epidemiology* 2006; 17: 582-7. [CrossRef]
- D'Amelio M, Ragonese P, Morgante L, Epifanio A, Callari G, Salemi G, et al. Tumor diagnosis preceding Parkinson's disease: A case-control study. *Mov Disord* 2004; 19: 807-11. [CrossRef]
- Elbaz A, Peterson B, Yang P, Van Gerpen J, Bower J, Maraganore D, et al. Nonfatal cancer preceding parkinson's disease: a case-control study. *Epidemiology* 2002; 13: 157-64. [CrossRef]
- Kim R, Mak T. Tumours and tremors: how PTEN regulation underlies both. *Br J Cancer* 2006; 94: 620-4. [CrossRef]
- Cheng CM, Reinhardt RR, Lee WH, Joncas G, Patel SC, Bondy CA. Insulin-like growth factor 1 regulates developing brain glucose metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 10236-41. [CrossRef]
- Huang T, Verkhatsky A, Fernyhough P. Insulin enhances mitochondrial inner membrane potential and increases ATP levels through phosphoinositide 3-kinase in adult sensory neurons. *Mol Cell Neurosci* 2005; 28: 42-54. [CrossRef]
- Kim RH, Peters M, Jang Y, Shi W, Pintlilie M, Fletcher GC, et al. DJ-1, a novel regulator of the tumor suppressor PTEN. *Cancer Cell* 2005; 7: 263-73. [CrossRef]
- Yang Y, Gehrke S, Haque M, Imai Y, Kosek J, Yang L et al. Inactivation of Drosophila DJ-1 leads to impairments of oxidative stress response and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 13670-5. [CrossRef]
- Fallon L, Bélanger CM, Corera AT, Kontogianna M, Regan-Klapisz E, Moreau F, et al. A regulated interaction with the UIM protein Eps15 implicates parkin in EGF receptor trafficking and PI(3)K-Akt signalling. *Nat Cell Biol* 2006; 8: 834-42. [CrossRef]
- Kim RH, Smith PD, Aleyasin H, Hayley S, Mount MP, Pownall S, et al. Hypersensitivity of DJ-1-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 5215-20. [CrossRef]
- Malagelada C, Jin ZH, Greene LA. RTP801 Is Induced in Parkinson's disease and mediates neuron death by inhibiting Akt phosphorylation/activation. *J Neurosci* 2008; 28: 14363-71. [CrossRef]
- Timmons S, Coakley MF, Moloney AM, O'Neill C. Akt signal transduction dysfunction in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2009; 467: 30-5. [CrossRef]
- Namikawa K, Honma M, Abe K, Takeda M, Mansur K, Obata T, et al. Akt/protein kinase B prevents injury-induced motoneuron death and accelerates axonal regeneration. *J Neurosci* 2000; 20: 2875-86. [CrossRef]
- D'Astous M, Mendez P, Morissette M, Garcia-Segura LM, Di Paolo T. Implication of the phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B signaling pathway in the neuroprotective effect of estradiol in the

- striatum of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine mice. *Mol Pharmacol* 2006; 69: 1492-8. [\[CrossRef\]](#)
20. Ruan, H, Yang Y, Zhu X, Wang X, Chen R. Neuroprotective effects of (\pm)-catechin against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) - induced dopaminergic neurotoxicity in mice. *Neurosci Lett* 2009; 450: 152-7. [\[CrossRef\]](#)
 21. Fukui M, Choi HJ, Zhu BT. Mechanism for the protective effect of resveratrol against oxidative stress-induced neuronal death. *Free Radic Biol Med* 2010; 49: 800-13. [\[CrossRef\]](#)
 22. Qin R, Li X, Li G, Tao L, Li Y, Sun J, et al. Protection by tetrahydroxystilbene glucoside against neurotoxicity induced by MPP+: The involvement of PI3K/Akt pathway activation. *Toxicol Lett* 2011; 202: 1-7. [\[CrossRef\]](#)
 23. Jiang H, Guo W, Liang X, Rao Y. Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: Critical roles of GSK-3 β and its upstream regulators. *Cell* 2005; 120: 123-35. [\[CrossRef\]](#)
 24. Canet-Aviles RM, Wilson MA, Miller DW, Ahmad R, McLendon C, Bandyopadhyay S, et al. The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101: 9103-8. [\[CrossRef\]](#)
 25. Zhang L, Shimoji M, Thomas B, Moore DJ, Yu SW, Marupudi NI, et al. Mitochondrial localization of the Parkinson's disease related protein DJ-1: Implications for pathogenesis. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 2063-73. [\[CrossRef\]](#)
 26. Blackinton J, Kumaran R, van der Brug MP, Ahmad R, Olson L, Galter D, et al. Post-transcriptional regulation of mRNA associated with DJ-1 in sporadic Parkinson disease. *Neurosci Lett* 2009; 452: 8-11. [\[CrossRef\]](#)
 27. Cohen AS, Lin DD, Quirk GL, Coulter DA. Dentate granule cell GABA receptors in epileptic hippocampus: Enhanced synaptic efficacy and altered pharmacology. *Eur J Neurosci* 2003; 17: 1607-16. [\[CrossRef\]](#)
 28. Ludwig A, Li H, Saarma M, Kaila K, Rivera C. Developmental up-regulation of KCC2 in the absence of GABAergic and glutamatergic transmission. *Eur J Neurosci* 2003; 18: 3199-206. [\[CrossRef\]](#)
 29. Ali IU, Schriml LM, Dean M. Mutational spectra of PTEN/MMAC1 gene: A tumor suppressor with lipid phosphatase activity. *J Nat Cancer Inst* 1999; 91: 1922-32. [\[CrossRef\]](#)
 30. Maehama T, Taylor GS, Dixon JE. PTEN and myotubularin: novel phosphoinositide phosphatases. *Annu Rev Biochem* 2001;70: 247-79. [\[CrossRef\]](#)

Alzheimer Hastalarının Periferik Kanlarında miR-155 ve miR-758 Anlatım Düzeylerinin İncelenmesi

Investigation of miR-155 and miR-758 Expression Levels in Peripheral Blood of Alzheimer's Disease Patients

Ebru Özer¹, Gamze Güven¹, Ebba Lohmann^{2,3,4}, Çağrı Güleç⁵, Nihan Erginel-Ünaltuna^{*1}

¹Istanbul Üniversitesi, Aziz Sançar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²Istanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Nöroloji Ana Bilim Dalı, Davranış Nörolojisi ve Hareket Bozuklukları Dalı, İstanbul, Türkiye

³Tübingen Üniversitesi, Hertie Enstitüsü, Nörodejeneratif Hastalıklar, Tübingen, Almanya

⁴Alman Nörodejeneratif Hastalıklar Merkezi, Tübingen, Almanya

⁵Istanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Cite this article as: Özer E, Güven G, Lohmann E, Güleç Ç, Erginel-Ünaltuna N. Investigation of miR-155 and miR-758 Expression Levels in Peripheral Blood of Alzheimer's Disease Patients. Experimed 2018; 8(2): 58-61.

ÖZ

Amaç: Alzheimer hastalığı (AH), dünya genelinde prevalansı gittikçe artış gösteren, geri dönüşümsüz, nörodejeneratif bir hastalıktır ve patogenezinde genetik yatkınlığın yanında çok sayıda farklı faktör etken rol oynamaktadır. Hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve metabolizma gibi birçok biyolojik süreçte görev alan mikro RNA'ların (miRNA), AH patogenezinde de rol oynadıkları düşünülmektedir. miRNA'ların hedef gen yelpazelerinin çok geniş olması, birbiri ile ilişkisiz görünen farklı hastalıkları moleküler düzeyde ilişkilendirmek ve farklı hastalıkların ortak noktalarını tanımlamak açısından araştırmacılara yeni alanlar sunmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda, belirli miRNA'ların periferik kandaki anlatım düzeylerini incelemeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Lipid ve kolesterol transportunun AH patogenezinde oynadığı önemli rol ve miRNA'ların bu transport üzerindeki etkisini göz önünde bulundurarak, Alzheimer hasta grubu ve kontrol grubunda, miR-155 ve miR-758'in periferik kandaki anlatım düzeylerini gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile incelemeyi amaçladık.

Bulgular: Çalışmamızın sonucunda, miR-155 anlatımının Alzheimer hasta grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı, ancak miR-758 anlatımı açısından Alzheimer hasta grubu ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılığın olmadığı belirlendi.

Sonuç: Alzheimer hastalarının periferik kanlarındaki azalmış miR-155 anlatımı, bu miRNA'nın hedef genleri aracılığıyla AH patogenezine etki edebileceğini düşündürmektedir. Ancak miR-155 anlatım düzeyindeki değişim ile AH arasında gösterdiğimiz bu ilişkinin fonksiyonel çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer hastalığı, kolesterol metabolizması, mikro RNA

ABSTRACT

Objectives: Alzheimer's disease (AD) is an irreversible, neurodegenerative disease with an increasing worldwide prevalence. Several different factors are known to play a role in its pathogenesis and genetic predisposition. MicroRNAs (miRNAs), which are involved in several biological processes such as cell proliferation, cell differentiation, and metabolism, are also believed to play a role in the pathogenesis of AD. These miRNAs present new areas of interest to researchers in terms of their broad range of target genes, the association with different diseases that appear to be unrelated to each other at the molecular level, and the identification of commonalities between different diseases. Therefore, we aimed at investigating the expression levels of specific miRNAs related to cholesterol metabolism in peripheral blood.

Material and Method: Considering the important role of lipid and cholesterol transport in the pathogenesis of AD and the effect of miRNAs on this transport, we intended to investigate the expression levels of miR-155 and -758 in patients with AD and controls using the real-time polymerase chain reaction method.

Results: Our results demonstrated that the expression of miR-155 was significantly decreased in patients with AD compared to that in controls. However, there was no significant difference in the expression of miR-758 between patients with AD and controls.

Conclusion: A decreased miR-155 expression in the peripheral blood of patients with AD suggests that this miRNA is involved in the pathogenesis of AD through its target genes. However, this relationship between the changes in miR-155 expression and AD need to be reinforced by functional studies.

Keywords: Alzheimer's disease, cholesterol metabolism, microRNA

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Nihan Erginel-Ünaltuna **E-mail:** unaltuna@istanbul.edu.tr

Geliş Tarihi/Received Date: 26.09.2018 **Kabul Tarihi/Accepted Date:** 03.10.2018

© Copyright 2018 by The Istanbul University Faculty of Science • Available online at <http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/>

© Telif Hakkı 2018 İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi • Makale metnine http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/_sayfasından ulaşılabilir.

GİRİŞ

Alzheimer hastalığı (AH) ise çağımızın hastalığı olarak görülen ve tüm dünyada özellikle gelişmekte ve gelişmiş ülkelerde insidansı ve prevalansı son yıllarda büyük oranda artış gösteren kritik öneme sahip kompleks bir hastalıktır. AH, günlük yaşamsal aktivitelerde azalma ve bilişsel yeteneklerde bozulma ile karakterize geri dönüşümsüz ve ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır. Hastalığın semptomları arasında bellek kaybı, yargılamada problemler, kişilik değişiklikleri, oryantasyon bozuklukları ve dil yeteneklerinde kayıplar bulunmaktadır. AH demansın en yaygın formu olup tüm demans vakalarının %50-70'ini oluşturmaktadır. AH'nin dünyada görülme sıklığı 65 yaş üzerinde %6-10, 85 yaşın üzerinde % 30-70 olarak ifade edilmektedir (1). Hastalığın temel patolojik özelliği β -amiloid plak (A β) olarak adlandırılan hücre dışı protein birikimleri ve tau proteininin aşırı fosforilasyonu sonucu oluşan hücre içi nörofibriller yumaklardır. Hastalığın patogenezini çok sayıda farklı faktörün etkilediği ortaya konulmuştur. Son yıllarda yapılan çalışmalar, kolesterolün AH patogenezinde rolü olduğunu göstermiştir. Kolesterolün hücre içindeki düzeyi ve dağılımının APP metabolizması üzerine etkisi büyüktür. Kolesterolün hücre membranının akışkan ve katı olma gibi özelliklerini ve sekretaz enzimlerinin aktivitelerini etkileyerek amyloid beta klirensi ve nörofibriller yumak oluşumunu tetiklediği düşünülmektedir (2).

MiRNA'lar yaklaşık olarak 22 nükleotid uzunluğunda, protein kodlayan genlerin post transkripsiyonel düzenlemelerinde rol olan küçük RNA parçalarıdır. Bu küçük moleküller pek çok biyolojik süreçte önemli rollere sahiptirler. miRNA'lar enflamasyon gibi birçok önemli hücre yolakta düzenleyici rol oynamaktadırlar ve ekspresyon düzeylerindeki değişimler çok sayıda hastalık ile direkt ilişkilidir. Giderek artan sayıda çalışma, AH patogenezinde rol oynayan proteinlerin anlatımlarının düzenlenmesine katılan miRNA'ların varlığını ve AH'deki rollerini ortaya koymaktadır (3-5). Diğer önemli bir nokta, miRNA'ların ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin sadece hastalık ile ilişkili beyin bölgelerinde değil periferik kan hücrelerinde de görülmüş olmasıdır (6).

Lipid ve kolesterol transportunun AH patogenezinde oynadığı önemli rol ve miRNA'ların bu transport üzerindeki etkisini göz önünde bulundurarak çalışmamızda, Alzheimer hasta grubu ve kontrol grubunda, miR-155 ve miR-758'in periferik kandaki anlatım düzeylerini incelemeyi amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Grubu

Çalışmaya nörolojik muayene, nöropsikolojik testler, görüntüleme yöntemleri, laboratuvar incelemeleri dikkate alınarak belirlenen ve NINCDS-ADRDA ve DSM-IV tanı kriterlerine göre Alzheimer tanısı alan 24 hasta katıldı. Sağlıklı kontrol grubu muayene sırasında herhangi bir nörolojik bulguya rastlanmayan 16 bireyden oluşturuldu. Hastalar ve kontroller çalışma hakkında bilgilendirildikten ve yazılı olarak gönüllü olur onayı alındıktan sonra çalışmaya dahil edildi. Çalışma için İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul onayı alınmıştır. Kan örnekleri pıhtılaşmayı engellemek için etilendiamintetraasetik asitli (EDTA) tüplere alındı.

Kantitatif Gerçek-Zamanlı PZR (qRT-PZR)

Periferik kandan ayrıştırılan lökositlerden total RNA izolasyonu Trizol yöntemi ile gerçekleştirildi. Lökositlerden elde edilen total RNA'lardan 'stem loop' ters transkriptaz ile cDNA sentezi 'Bioline EPIK miRNA Lo-Rox Kit' ile kit protokolüne uygun şekilde gerçekleştirildi. miRNA'ların anlatım düzeyleri SYBR Green boyası kullanılarak 'Light Cycler 480' cihazında qRT-PZR yöntemi kullanılarak belirlendi. qRT-PZR, 'Bioline EPIK miRNA Select Lo-Rox Kit' kullanılarak gerçekleştirildi. miR-155 ve miR-758'den elde edilen verilerin normalizasyonda referans olarak RNU6 kullanıldı ve her bir cDNA örneği duplika olarak çalışıldı. Ekspresyon düzeyini rölatif olarak hesaplamada Delta Delta Ct metodu kullanılmıştır.

İstatistiksel Analiz

Kategorik değişkenler Pearson χ^2 testi ile, sürekli değişkenler ise Student's t-test ile karşılaştırıldı. Alzheimer hastaları ve kontrol grupları arasındaki miRNA anlatım düzeylerinin karşılaştırılmasında non parametrik 'Mann-Whitney' testi kullanıldı. İki değişken arasındaki ilişkinin yönü ve derecesinin belirlenmesinde 'Spearman's korelasyon' analizinden yararlanıldı. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0,05$ düzeyinde kabul edildi. Tüm istatistiksel hesaplamalar SPSS 21.0 (IBM Corp.; Armonk, NY, ABD) programı kullanılarak yapıldı.

BULGULAR

Çalışma Grubunun Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Hasta ve kontrollerin karşılaştırmalı tanımlayıcı özellikleri Tablo 1'de verilmiştir. Hasta ve sağlıklı kontrol seçimlerinde, kolesterol metabolizması üzerinde ve AH riskini arttırmasında önemli rolü bulunan ApoE ϵ 4 allel taşıyıcılığı olan kişiler dışlanmıştır.

miRNA Anlatım Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Çalışmamızda Alzheimer hasta grubunda miR-155 anlatım düzeyinin kontrollere göre anlamlı derecede ($p=0,022$) düşük olduğu belirlendi (Şekil 1). Ancak Alzheimer hasta grubu ve kontroller arasında miR-758 anlatım düzeyi bakımından istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,064$) bir farklılık bulunamadı (Şekil 2). Bazı miRNA'ların anlatım düzeylerinin yaşa ve MMSE (*Mini mental state examination*, Mini mental durum değerlendirme testi) skoruna bağlı olarak değişiklik gösterdiği bilindiği için, hasta ve kontrol grubunda yaş, hasta grubunda başlangıç yaşı ve MMSE skoru ile çalışılan miRNA'ların anlatım düzeyleri arasındaki ilişki korelasyon analizi ile incelendi. Ancak çalışılan miRNA'ların anlatım düzeyleri ile yaş, başlangıç yaşı ve MMSE skoru arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmadı. Ayrıca miRNA anlatım düzeyleri ve biyokimyasal parametreler arasındaki ilişki korelasyon analizi ile değerlendirildiğinde miR-758 ve HDL düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif bir korelasyon olduğu görüldü ($r=-0,392$ $p=0,016$).

TARTIŞMA

Çalışmamızda, kolesterol metabolizması ile ilişkili miRNA'ların anlatım düzeylerini Alzheimer hasta grubunda incelemeyi amaçladık ve dikkat çekici olarak miR-155 ve miR-758 anlatım düzeylerinin, kontrol grubuna göre AH grubunda düşük oldu-

ğunu belirledik. miR-155, iltihabi ve allerjik hastalıklar, kanser ve hipertansiyon gibi birçok patolojik durum ile ilişkilendirilmiş bir miRNA'dır. Alzheimer hastalığı ile de ilişkilendirilmiş olan miR-155'in, amiloid beta birikimini nöro-inflamasyon üzerinden etkilediği düşünülmekte, bu nedenle de AH tedavisi için uygun bir hedef olarak kabul edilmektedir (7-9). Bizim çalışmamızda da Alzheimer hastalarının miR-155 düzeyinin düşük bulunması, bu hastalığın patogenezinde kolesterol transportunun önemli rol oynadığı varsayımını desteklemektedir. Ancak, periferik kandaki düşük ekspresyon düzeyinin AH riskini nasıl arttırdığını açıklayabilmek için, miR-155'in ve hedef genlerinin incelenmesi gerekmektedir.

Çalıştığımız diğer miRNA miR-758, hastalıklarla ilişkisi yeterince araştırılmamış olmasına rağmen, kolesterol metabolizmasındaki rolü nedeniyle özellikle kardiyovasküler hastalıklar için önemli bir miRNA adayı olarak kabul edilmektedir. miR-758'in, tanımlanmış hedef genleri arasında yer alan ABCA1'in ekspresyonunu baskılayarak, makrofajlardan kolesterol uzaklaştırılmasını kontrol ettiği bilinmektedir (10). Bizim çalışmamızda da istatistiksel olarak anlamlı olmasa da Alzheimer hastalarının miR-758 düzeyinin düşük bulunması, bu hastalığın patogenezinde kolesterol transportunun önemli rol oynadığı varsayımını destekleyebilir. Bununla birlikte, miR758'in hedef genleri arasında olan TLR3 ve TLR7'nin AH ile de ilişkili olması, bu hastalığın

patogenezinde, kolesterol ile birlikte iltihabi yanıtın da kilit rol oynayabileceğini göstermektedir (11).

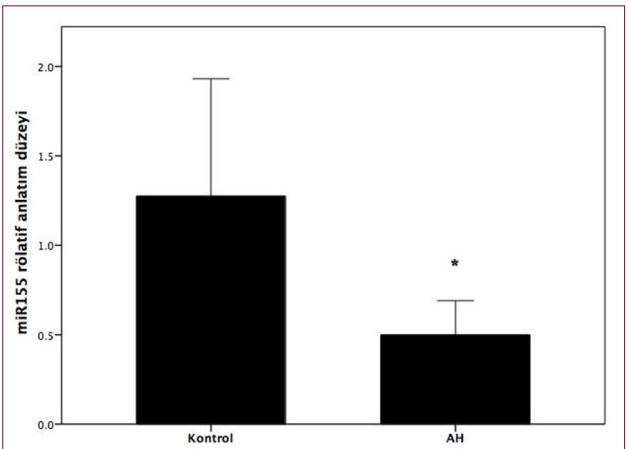
APOE ε4 allel varlığının AH için bir risk faktörü oluşturması (12), beyindeki glia hücrelerindeki kolesterol taşınmasını etkileyen bir bozukluğun AH'ye yol açabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda APOE ε4 allel taşıyıcılarının dışlanmış olmasına rağmen APOE ile birlikte kolesterol transportunda görev alan ABCA1'in düzenleyici miRNA'sının da AH ile ilişkili olabileceğini gösterdik.

Çalışmamızın sonuçları, kolesterol transportu, metabolizması ve bu süreçlerde görev alan miRNA'ların, AH patogenezinde rol oynayabileceğini akla getirmektedir. Ancak, hastalığın patogenezinde etkili olduğu bilinen başka yolların da varlığı gözardı edilmemelidir. Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz bulguların daha geniş hasta gruplarında test edilmesi ve fonksiyonel çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir.

Tablo 1. Alzheimer hastaları ve kontrol grubunun özellikleri

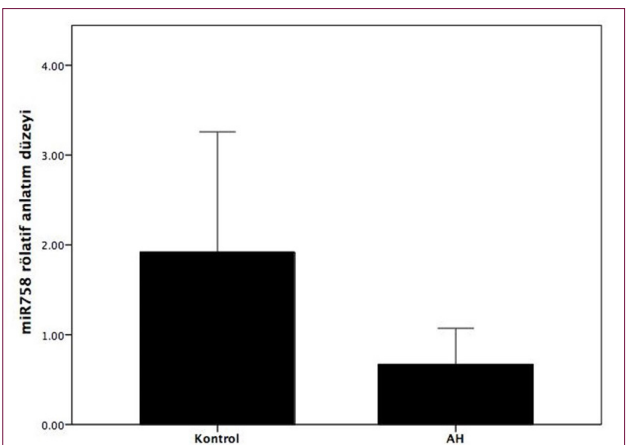
Özellikler	Alzheimer Hastaları (n=24)	Kontrol (n=16)	p
Cinsiyet	13 E, 11 K	8 E, 8 K	0,796
Yaş	77±5,0	75±7	0,306
Başlangıç yaşı	72,2±4,9	-	
MMSE skoru	18,7±6,2	29±1,2	<0,001
Kilo (kg)	73,4±11,7	78±13,8	0,293
Boy (cm)	163,4±7,5	162,3±10,2	0,718
Bel çevresi (cm)	102,1±10,4	100,5±15,7	0,709
Glukoz (mg/dL)	111,5±52,5	99,4±24,6	0,409
Trigliserid (mg/dL)	166,8±63,7	150,9±77	0,484
HDL (mg/dL)	65,3±18	57,5±18,6	0,158
LDL (mg/dL)	117,2±36,8	118±48,8	0,953
Kolesterol (mg/dL)	215,8±56	205,7±51,9	0,472
SKB (mmHg)	120,6±6,8	116,4±7,1	0,099
DKB (mmHg)	77,3±6,8	77,7±6,8	0,861

MMSE: Mini mental state examination, HDL: high density lipoprotein, LDL: low density lipoprotein, SKB. Sistolik kan basıncı, DKB: diyastolik kan basıncı Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.



Şekil 1. Alzheimer hasta grubu ve kontrollerin rölatif miR-155 anlatım düzeyi

* kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir.



Şekil 2. Alzheimer hasta grubu ve kontrollerin rölatif miR-758 anlatım düzeyi

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için Etik Kurul onayı İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul'undan alınmıştır.

Hasta Onamı: Çalışmaya katılan tüm hastalardan imzalı onam formu alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir – N.U.; Tasarım – N.U.; Denetleme – N.U., G.G.; Kaynaklar – N.U.; Gereçler – N.U., E.O., G.G.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi – E.O., N.U.; Analiz ve/veya Yorum – E.O., G.G., Ç.G.; Literatür Taraması – E.O., Ç.G.; Yazıyı Yazan – E.O., G.G.; Eleştirel İnceleme – N.U., G.G., Ç.G.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi ve TÜBİTAK (Proje No: 214S340) tarafından desteklenmiştir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the Ethics Committee of İstanbul University, İstanbul School of Medicine.

Informed Consent: Written informed consent were obtained from all patients included in the study

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept – N.U.; Design – N.U.; Supervision – N.U., G.G.; Resource – N.U.; Materials – N.U., E.O., G.G.; Data Collection and/or Processing – E.O., N.U.; Analysis and/or Interpretation – E.O., G.G., Ç.G.; Literature Search – E.O., Ç.G.; Writing – E.O., G.G.; Critical Reviews – N.U., G.G., Ç.G.

Conflict of Interest: The authors have no conflict of interest to declare.

Financial Disclosure: This work was supported by the Research Fund of İstanbul University and TÜBİTAK (Project Number 214S340).

KAYNAKLAR

1. Bachman DL, Wolf PA, Linn R, Knoefel JE, Cobb J, Belanger A, et al. Prevalence of dementia and probable senile dementia of the Alzheimer type in the Framingham study. *Neurology* 1992; 42: 115-9. [\[CrossRef\]](#)
2. Wahrle S, Das P, Nyborg AC, McLendon C, Shoji M, Kawarabayashi T, et al. Cholesterol dependent gamma- secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains. *Neurobiol Dis* 2002; 9: 11-23. [\[CrossRef\]](#)
3. Patel N, Hoang D, Miller N, Ansaloni S, Huang Q, Rogers JT, et al. MicroRNAs can regulate human APP levels. *Mol Neurodegener* 2008; 3: 10. [\[CrossRef\]](#)
4. Liu W, Liu C, Zhu J, Shu P, Yin B, Gong, et al. MicroRNA-16 targets amyloid precursor protein to potentially modulate Alzheimer's-associated pathogenesis in SAMP8 mice. *Neurobiol Aging* 2012; 33: 522-34. [\[CrossRef\]](#)
5. Long JM, Lahiri DK. MicroRNA-101 downregulates Alzheimer's amyloid-beta precursor protein levels in human cell cultures and is differentially expressed. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 404: 889-95. [\[CrossRef\]](#)
6. Ren RJ, Zhang YF, Dammer EB, Zhou Y, Wang LL, Liu X, et al. Peripheral Blood MicroRNA Expression Profiles in Alzheimer's Disease: Screening, Validation, Association with Clinical Phenotype and Implications for Molecular Mechanism. *Mol Neurobiol* 2016; 53: 5772-81. [\[CrossRef\]](#)
7. Guedes JR, Custodia CM, Silva RJ, de Almeida LP, Pedrosa de Lima MC, Cardoso AL. Early miR-155 upregulation contributes to neuroinflammation in Alzheimer's disease triple transgenic mouse model. *Hum Mol Genet* 2014; 23: 6286-301. [\[CrossRef\]](#)
8. Guedes JR, Santana I, Cunha C, Duro D, Almeida MR, Cardoso AM, et al. MicroRNA deregulation and chemotaxis and phagocytosis impairment in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (Amst)* 2016; 3: 7-17. [\[CrossRef\]](#)
9. Culpan D, Kehoe PG, Love S. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and miRNA expression in frontal and temporal neocortex in Alzheimer's disease and the effect of TNF-alpha on miRNA expression in vitro. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2011; 2: 156-62.
10. Ramirez CM, Davalos A, Goedeke L, Salerno AG, Warriar N, Cira-Salinas D, et al. MicroRNA-758 regulates cholesterol efflux through posttranscriptional repression of ATP-binding cassette transporter A1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31: 2707-14. [\[CrossRef\]](#)
11. Yang Q, Fu S, Wang J. Hepatitis C virus infection decreases the expression of Toll-like receptors 3 and 7 via upregulation of miR-758. *Arch Virol* 2014; 159: 2997-3003. [\[CrossRef\]](#)
12. Kim J, Basak JM, Holtzman DM. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron* 2009; 63: 287-303. [\[CrossRef\]](#)