



İSTANBUL
ÜNİVERSİTESİ
YAYINEVİ

jmed.istanbul.edu.tr

İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi



Journal of İstanbul
Faculty of Medicine



İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi

SAHİBİ VE SORUMLU MÜDÜR/ OWNER AND RESPONSIBLE MANAGER

Bahaüddin ÇOLAKOĞLU
İstanbul Tıp Fakültesi Dekanı
Dean of Istanbul Faculty of Medicine

EDİTÖR/EDITOR

M. Lale ÖCAL
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University Istanbul TURKEY

EDİTÖR YARDIMCILARI/ ASSOCIATE EDITORS

Funda GÜNGÖR UĞURLUCAN
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Ayşe KUBAT ÜZÜM
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University Istanbul TURKEY

Halil YAZICI
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University Istanbul TURKEY

YAYIN KURULU/EDITORIAL BOARD

Atila ARINCI
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Seldağ BEKPINAR
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Nilgün BOZBUĞA
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Tülin ÇAĞATAY
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Feza EKİZ
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Şükrü H. EMRE
Yale Üniversitesi, ABD
Yale University, USA

Haluk ERAKSOY
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Hakan ERTİN
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Simin GÖRAL
Pennsylvania Üniversitesi, ABD
University of Pennsylvania, USA

Nilüfer GÖZÜM
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Hülya GÜL
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Birsen KARAMAN
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Çiğdem KEKİK ÇINAR
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Fahrettin KELEŞTEMUR
Türkiye Sağlık Enstitüleri, TÜRKİYE
Health Institutes of Turkey, TURKEY

Abdullah KUTLAR
Augusta Üniversitesi, ABD
Augusta University, USA

Sacit Bülent OMAV
Yale Üniversitesi, ABD
Yale University, USA

Betigül ÖNGEN
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Beyza ÖZÇINAR
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Altay SENCER
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Yasemin ŞANLI
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

M.Öner ŞANLI
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

E. Murat TUZCU
Cleveland Clinic Abu Dhabi, BAE
Cleveland Clinic, UAE

Tufan TÜKEK
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Berrin UMMAN
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Aytül UYAR
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Pınar YAMANTÜRK ÇELİK
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

İSTATİSTİK DANIŞMANI/STATISTICS ADVISOR

Halim İŞSEVER
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University Istanbul TURKEY



Yayıncı / Publisher
İbrahim KARA

**Yayın Yönetmeni /
Publication Director**
Ali ŞAHİN

**Mali ve İdari İşler /
Finance and Administration**
Zeynep YAKIŞIRER

**Yayın Yönetmeni Yardımcısı /
Deputy Publication Director**
Gökhan ÇİMEN

**Editöryel Geliştirme /
Editorial Development**
Gizem KAYAN

**Yayın Koordinatörleri /
Publication Coordinators**
Betül ÇİMEN
Özlem ÇAKMAK
Okan AYDOĞAN
İrem DELİÇAY
Arzu YILDIRIM

**Proje Asistanları /
Project Assistants**
Ecenur ASLIM
Sinem KOZ
Doğan ORUÇ

**Grafik Departmanı /
Graphics Department**
Ünal ÖZER
Deniz DURAN
Beyzanur KARABULUT

İletişim / Contact:
Adres / Address: Büyükdere Cad.
105/9 34394 Mecidiyeköy, Şişli, İstanbul
Telefon / Phone: +90 212 217 17 00
Faks / Fax: +90 212 217 22 92
E-posta / E-mail: info@avesyayincilik.com
Yayın Türü: Yerel Süreli



İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi

AMAÇ VE KAPSAM

İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi (İst Tıp Fak Derg); bağımsız, önyargısız ve çift-kör hakemlik ilkeleri çerçevesinde yayın yapan İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi'nin uluslararası ve açık erişimli bilimsel yayın organıdır. Dergi Mart, Haziran, Eylül ve Aralık aylarında olmak üzere üç ayda bir yayınlanır ve dört sayıda bir cildi tamamlanır. Yayın dili Türkçe ve İngilizce'dir.

İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi (İst Tıp Fak Derg), tıbbın tüm alanlarında klinik ve deneysel özgün araştırmalar, ender görülebilecek olgu sunumları, özel ve aktüel konularda literatür derlemeleri, editöre mektuplar ile yayın tanıtımları ve haberleri yayınlamaktadır. Orijinal metot geliştirme, yeni bir girişim tekniği ve orijinal çalışmaların ön sonuçlarını içeren kısa raporlara da dergide yer verilmektedir.

Derginin hedef kitlesi; sağlık alanındaki tüm disiplinlerde çalışan uzman hekimler ve akademisyenlerdir.

Derginin editörlük 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) kılavuzlarına uygun olarak biçimlendirilmiştir ve Principles of Transparency and Best Practice in Scholarly Publishing (doaj.org/ bestpractice) ilkelerine uygun olarak yürütülmektedir.

İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi (İst Tıp Fak Derg), Web of Science-Emerging Sources Citation Index ve TÜBİTAK ULAKBİM TR Dizin tarafından indekslenmektedir.

Makale değerlendirme ve yayın işlemleri için yazarlardan ücret talep edilmemektedir. Tüm makaleler <http://jmed.istanbul.edu.tr> sayfasındaki online makale değerlendirme sistemi kullanılarak dergiye gönderilmelidir.

Derginin yazım kurallarına, gerekli formlara ve dergiyle ilgili diğer bilgilere web sayfasından erişilebilir.

Derginin tüm masrafları İstanbul Üniversitesi Yayınevi tarafından karşılanmaktadır. Basılı kopyalarda tıbbi ilaç, malzeme ve cihaz üreticilerinin reklamları yayınlanabilir. Reklam vermek isteyenlerin Editör ile iletişime geçmeleri gerekmektedir. Reklam görselleri sadece Editör onayı ile yayınlanmaktadır.

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

Yayınlanan tüm içeriğe <http://jmed.istanbul.edu.tr> adresinden ücretsiz olarak erişilebilir.

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

Editör: M. Lale Öcal

Adres: İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Dekanlığı, Turgut Özal Cad. 34093 Çapa, Fatih, İstanbul, Türkiye

Tel.: +90 212 414 21 61

E-posta: itfdergisi@istanbul.edu.tr

Yayıncı: AVES

Adres: Büyükdere Cad. 105/9 34394 Mecidiyeköy, Şişli, İstanbul, Türkiye

Tel.: +90 212 217 17 00

Faks: +90 212 217 22 92

E-posta: info@avesyayincilik.com

Web sayfası: avesyayincilik.com



İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi

AIMS & SCOPES

Journal of İstanbul Faculty of Medicine (J Ist Faculty Med) 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 İstanbul Faculty of Medicine and it is published quarterly on March, June, September and December. The publication languages of the journal are Turkish and English.

Journal of İstanbul Faculty of Medicine (J Ist Faculty Med) aims to contribute to the literature by publishing manuscripts at the highest scientific level on all fields of medicine. The journal publishes original experimental and clinical research articles, reports of rare cases, reviews that contain sufficient amount of source data conveying the experiences of experts in a particular field, and letters to the editors as well as brief reports on a recently established method or technique or preliminary results of original studies related to all disciplines of medicine from all countries.

The journal's target audience includes researchers, physicians and healthcare professionals who are interested or working in all medical disciplines.

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).

Journal of İstanbul Faculty of Medicine is currently indexed in Web of Science-Emerging Sources Citation Index and TUBITAK ULAKBİM TR Index.

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://jmed.istanbul.edu.tr>. 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 Press. Potential advertisers should contact the Editorial Office. Advertisement images are published only upon the Editor's approval.

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 İstanbul Faculty of 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 jmed.istanbul.edu.tr.

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

Editor: M. Lale Öcal

Address: İstanbul University İstanbul Faculty of Medicine, Turgut Özal Cad. 34093 Çapa, Fatih, İstanbul, Türkiye

Phone: +90 212 414 21 61

E-mail: itfdergisi@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

Web page: avesyayincilik.com



YAZARLARA BİLGİ

Istanbul Tıp Fakültesi Dergisi (İst Tıp Fak Derg); bağımsız, önyargısız ve çift-kör hakemlik ilkeleri çerçevesinde yayın yapan İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi'nin uluslararası ve açık erişimli bilimsel yayın organıdır. Dergi Mart, Haziran, Eylül ve Aralık aylarında olmak üzere üç ayda bir yayınlanır ve dört sayıda bir cildi tamamlanır. Yayın dili Türkçe ve İngilizce'dir.

Istanbul Tıp Fakültesi Dergisi (İst Tıp Fak Derg), tıbbın tüm alanlarında klinik ve deneysel özgün araştırmalar, ender görülebilecek olgu sunumları, özel ve aktüel konularda literatür derlemeleri, editöre mektuplar ile yayın tanıtımları ve haberleri yayınlamaktadır. Orijinal metot geliştirme, yeni bir girişim tekniği ve orijinal çalışmaların ön sonuçlarını içeren kısa raporlara da dergide yer verilmektedir.

Derginin editörlük 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) kılavuzlarına uygun olarak biçimlendirilmiştir ve 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 bilgilendirilebilir. 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.

Istanbul Tıp Fakültesi Dergisi'ne 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 Editördedir.

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 ağrı, acı ve rahatsızlık vermemesi için yapılmış olanlar açık olarak makalede belirtilmelidir. Hasta onamları, Etik Kurul raporunun alındığı kurumun adı, onay belgesinin numarası ve tarihi ana metin dosyasında yer alan Gereç ve Yöntem 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 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 koşullarını karşılaması gerekmektedir.

ICMJE, yazarların aşağıdaki 4 koşulu karşılamasını önermektedir:

1. Çalışmanın konseptine/tasarımına; ya da çalışma için verilerin toplanmasına, analiz edilmesine ve yorumlanmasına önemli katkı sağlamış olmak;
2. Yazı taslağını hazırlamış ya da önemli fikrinsel içeriğin eleştirel incelemelerini yapmış olmak;
3. Yazının yayından önceki son halini gözden geçirmiş ve onaylamış olmak;



YAZARLARA BİLGİ

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 tanımlayabilmelidir. Ayrıca, her yazar diğerlerinin katkı bütünlüğüne güven duymalıdır.

Yazar olarak belirtilen her kişi yazarlığın dört koşulunu karşılamalıdır ve bu dört koşulu karşılayan her kişi yazar olarak tanımlanmalıdır. Dört kriterin tümünü karşılamayan kişilere makalenin başlık sayfasında teşekkür edilmelidir.

Yazarlık haklarına uygun hareket etmek ve hayalet ya da lütuf yazarlığın önlenmesini sağlamak amacıyla sorumlu yazarlar makale yükleme sürecinde jmed.istanbul.edu.tr adresinden erişilebilen Yazar Katkı Formu'nu imzalamalı ve taranmış versiyonunu yazıyla birlikte göndermelidir. Yayın Kurulu'nun gönderilen bir makalede "lütuf 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.

İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi, 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. Editör, yazarlar ve hakemler ile ilgili potansiyel 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. Ya-

zalar, itiraz ve şikayetleri için doğrudan Yayıncılık Birimi 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 Editör verecektir.

İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi'ne makale gönderen yazarlar, makalelerinin telif haklarını İstanbul Tıp Fakültesi'ne devretmeyi kabul ederler. Reddedilen makalelerin telif hakları yazarlarına geri iade edilecektir. İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi her makalenin jmed.istanbul.edu.tr adresinden erişebileceğiniz Yayın Hakkı Devir Formu ile beraber gönderilmesini talep eder. Yazarlar, basılı ya da elektronik formatta yer alan görsel 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 İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi, Editör, Editör Yardımcıları, Yayın Kurulu ve Yayıncı'nın değil, yazar(lar)ın bakış açılarını yansıtır. Editör, Editör Yardımcıları, 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, tanısal 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 jmed.istanbul.edu.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 yayıncı ofisi tarafından kontrol edi-

YAZARLARA BİLGİ

lecek, 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 formlarajmed.istanbul.edu.tr adresinden erişilebilmektedir.

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

- Makalenin Türkçe ve İngilizce başlığını ve 50 karakteri geçmeyen Türkçe ve İngilizce kısa başlığını,
- Yazarların isimlerini, kurumlarını, eğitim derecelerini ve ORCID numaralarını
- Finansal destek bilgisi ve diğer destek kaynakları hakkında detaylı bilgiyi,
- Sorumlu yazarın ismi, adresi, telefon (cep telefonu dahil), numarası 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. Özgün Araştırma makalelerinin özetleri "Amaç", "Gereç ve Yöntem", "Bulgular" ve "Sonuç" alt başlıklarını içerecek biçimde hazırlanmalıdır. Olgu sunumu ve derleme türündeki yazıların Özet bölümleri alt başlık içermemelidir.

Anahtar Sözcükler: Tüm makaleler en az 3 en fazla 6 anahtar kelimeyle birlikte gönderilmeli, anahtar söz-

cükler 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

Özgün Araştırma: Ana metin "Giriş", "Gereç ve Yöntem", "Bulgular" ve "Tartışma" alt başlıklarını içermelidir. Özgün Araştırmalarla ilgili kısıtlamalar 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.

Editör Yorumu: 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

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 görsel
Derleme	5000	250	50	6	10 ya da toplamda 20 görsel
Olgu Sunumu	1000	200	15	Tablo yok	10 ya da toplamda 20 görsel
Editöre Mektup	500	Uygulanamaz	5	Tablo yok	Görsel yok

YAZARLARA BİLGİ

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.

Editöre Mektup: Dergide daha önce yayınlanan bir yazının önemini, gözden kaçan bir ayrıntısını ya da ek sık 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 yazılmalı 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 açılımları 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 olmalıdır.

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 300 DPI 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." konulmalıdır. Ana metinde kaynaklara atıf yapılırken parantez içinde Arap rakamları kullanılmalıdır. Farklı yayın türleri için kaynak düzenlemeleri aşağıdaki örneklerde sunulmuştur:



YAZARLARA BİLGİ

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(5):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: Bengisson 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.

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 hakemin yorumunun ardından yazarın cevabı gelmeli ve değişikliklerin yapıldığı satır numaraları da ayrıca belirtilmelidir. Revize makaleler karar mektubunu takip eden 30 gün içerisinde dergiye gönderilmelidir. Makalenin revize versiyonu belirtilen süre içerisinde yüklenmezse, revizyon seçeneği iptal olabilir. Yazarların revizyon için ek süreye ihtiyaç duymaları durumunda uzatma taleplerini ilk 30 gün sonra 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 formatta dergi web sitesinde yayına alınır. Kabul edilen makalelerin baskıya hazır PDF dosyaları sorumlu yazarlara iletilir ve yayın onaylarının 2 gün içerisinde dergiye iletilmesi istenir.

Editör: M. Lale Öcal
Adres: İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Turgut Özal Cad. 34093 Çapa, Fatih, İstanbul, Türkiye
Telefon: +90 212 414 21 61
E-mail: itfdergisi@istanbul.edu.tr

Yayıncı: AVES
Adres: Büyükdere Cad. 105/9 34394 Mecidiyeköy, Şişli, İstanbul, Turkey
Telefon: +90 212 217 17 00
Faks: +90 212 217 22 92
E-mail: info@avesyayincilik.com
avesyayincilik.com



INTRUCTIONS TO AUTHORS

Journal of İstanbul Faculty of Medicine (J IstFaculty-Med) 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 Faculty of Medicine of İstanbul University and it is published quarterly on March, June, September and December. The publication languages of the journal are Turkish and English.

Journal of İstanbul Faculty of Medicine (J Ist Faculty Med) aims to contribute to the literature by publishing manuscripts at the highest scientific level on all fields of medicine. The journal publishes original experimental and clinical research articles, reports of rare cases, reviews that contain sufficient amount of source data conveying the experiences of experts in a particular field, and letters to the editors as well as brief reports on a recently established method or technique or preliminary results of original studies related to all disciplines of medicine from all countries.

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 Journal of İstanbul Faculty of Medicine 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 detailed 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



INSTRUCTIONS TO AUTHORS

(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.

Journal of Istanbul Faculty of Medicine requires corresponding authors to submit a signed and scanned version of the authorship contribution form (available for download through jmed.istanbul.edu.tr) 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 short statement declaring that he/she accepts to undertake all the responsibility for authorship during the submission and review stages of the manuscript.

Journal of Istanbul Faculty of Medicine 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 ombuds-person 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 Journal of Istanbul Faculty of Medicine, authors accept to assign the copyright of their manuscript to Istanbul Faculty of Medicine. If rejected for publication, the copyright of the manuscript will be assigned back to the authors. Journal of Istanbul Faculty of Medicine requires each submission to be accompanied by a Copyright Transfer Form (available for download at jmed.istanbul.edu.tr). 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 Journal of Istanbul Faculty of Medicine 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



INTRUCTIONS TO AUTHORS

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 jmed.istanbul.edu.tr. 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://jmed.istanbul.edu.tr>.

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, highest academic degree(s) and ORCID ID(s) of the author(s),
- Grant information and detailed information on the other sources of support,

- Name, address, telephone (including the mobile phone number) numbers, and email address of the corresponding author,
- Acknowledgment of the individuals who contributed to the preparation of the manuscript but who do not fulfil 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, Materials and Methods, Results, and Conclusion). Abstracts of Case Reports and Reviews should be unstructured. 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, Materials and Methods, Results, Discussion, and Conclusion subheadings. Please check Table 1 for the limitations of Original Articles.

Statistical analysis to support conclusions is usually necessary. Statistical analyses must be conducted in accordance with international statistical reporting standards. 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).



INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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 sub-headings. 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, Keywords, 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

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
Technical Note	1500	No abstract	15	No tables	10 or total of 20 images
Letter to the Editor	500	No abstract	5	No tables	No media



INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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)"

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: Blasco V, Colavolpe JC, Antonini F, Zieleskiewicz L, Nafati C, Albanèse J, et al. Long-term outcome in kidney recipients from donor treated with hydroxyethylstarch 130/0.4 and hydroxyethylstarch 200/0.6. *Br J Anaesth* 2015;115(5):797-8.

Book Section: Suh KN, Keystone JS. Malaria and babesiosis. Gorbach SL, Barlett JG, Blacklow NR, editors. *Infectious Diseases*. Philadelphia: Lippincott Williams; 2004.p.2290-308.

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 *KidneyInt*: 2004. Report No: 26.

Thesis: Yılmaz B. Ankara Üniversitesindeki Öğrencilerin Beslenme Durumları, Fiziksel Aktivitelerine 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.



INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Epub Ahead of Print Articles: Cai L, Yeh BM, Westphalen AC, Roberts JP, Wang ZJ. Adult living donor liver imaging. *DiagnIntervRadiol*. 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: M. Lale Öcal

Address: İstanbul University Faculty of Medicine Deanery, Turgut Özal Cad. 34093, Çapa, Fatih, İstanbul, Turkey

Phone: +90 212 414 21 61

E-mail: itfdergisi@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

İÇİNDEKİLER / CONTENTS

ARAŞTIRMA / RESEARCH

- 106** **Diferansiye Tiroid Kanselerinde Radyoaktif İyot Tedavisi sonrası Görüntüleme: SPECT-BT Görüntülemenin Planar Görüntülemeye Katkısı**
Post-Therapy Imaging after Radioactive Iodine Therapy for Differentiated Thyroid Cancer: The Contribution of SPECT-CT Imaging to Planar Imaging
Duygu HAS ŞİMŞEK, Yasemin ŞANLI, Serkan KUYUMCU, Ebru YILMAZ, Zeynep Gözde ÖZKAN, Cüneyt TÜRKMEN, Işık ADALET, Ayşe MUDUN, Seher Nilgün ÜNAL
- 115** **Rutin Sağlık Taraması Yapılan Bireylerde Vitamin D Düzeyleri**
Vitamin D Levels in Routine Medical Examination
Abdülhalim ŞENYİĞİT, Timur ORHANOĞLU, Burak İNCE, Bülent YAPRAK
- 119** **Spermatozoa ve Embriyoların Gen Ekspresyon Analizi öncesinde RNA İzolasyonu ve Hücrel RNA Miktarlarının Belirlenmesi**
RNA Isolation and Detection of Cellular RNA Quantity of Spermatozoa and Embryos Prior to Gene Expression Analyses
Bilge ÖZSAİT SELÇUK, Neslihan ÇOBAN, Dilek SEVER KAYA, Sibel BULGURCUOĞLU KURAN, Selva TÜRKÖLMEZ, Özlem DURAL
- 127** **Radiyal Işın Defektlerinin Klinik Sınıflandırması ve Etiyopatogenezinin Araştırılması**
Clinical Classification of Radial Ray Defects and Research into Etiopathogenesis
Şahin AVCI, Güven TOKSOY, Gülelendam BAĞIROVA, Umut ALTUNOĞLU, Birsen KARAMAN, Seher BAŞARAN, Hülya KAYSERİLİ, Z. Oya UYGUNER
- 139** **Investigation of the Frequency of FC Gamma Receptor IIIA V/158/F Gene Polymorphism and Comparison of Clinical and Laboratory Findings in Rheumatoid Arthritis (RA)**
Romatoid Artrit'te FC Gama Reseptör IIIA V/158/F Gen Polimorfizminin Sıklığının Araştırılması ve Hasta Klinik ve Laboratuar Bulgularıyla Karşılaştırılması
Ali Murat SEDEF, Suzan DİNKÇİ, Eren ERKEN
- 145** **Çocuk Sağlığının Düzenli İzlemi ve Primer İmmun Yetmezlik Hastalarının Erken Tanınabilirliği**
Regular Follow-Up in Child Health and Early Recognition of Primary Immune Deficiency Disorders
Gonca KESKİNDEMİRCİ, Funda ÇİPE, Çiğdem AYDOĞMUŞ

EDİTÖRE MEKTUP / LETTER TO THE EDITOR

- 149** **Hypertension, Pesticide Exposure and Fumigation Worker**
Hipertansiyon, Pestisit Maruziyeti ve Fümigasyon Çalışanı
Sora YASRI, Viroj WIWANITKIT

DİFERANSİYE TİROİD KANSERLERİNDE RADYOAKTİF İYOT TEDAVİSİ SONRASI GÖRÜNTÜLEME: SPECT-BT GÖRÜNTÜLEMENİN PLANAR GÖRÜNTÜLEMeye KATKISI

POST-THERAPY IMAGING AFTER RADIOACTIVE IODINE THERAPY FOR DIFFERENTIATED THYROID CANCER: THE CONTRIBUTION OF SPECT-CT IMAGING TO PLANAR IMAGING

Duygu HAS ŞİMŞEK , Yasemin ŞANLI , Serkan KUYUMCU , Ebru YILMAZ , Zeynep Gözde ÖZKAN ,
Cüneyt TÜRKMEN , Işık ADALET , Ayşe MUDUN , Seher Nilgün ÜNAL 

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Cite this article as: Has Şimşek D, Şanlı Y, Kuyumcu S, Yılmaz E, Özkan ZG, Türkmen C, et al. Post-Therapy Imaging after Radioactive Iodine Therapy for Differentiated Thyroid Cancer: The Contribution of SPECT-CT Imaging to Planar Imaging. J Ist Faculty Med 2018; 81(4): 106-114.

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada differansiye papiller tiroid kanseri (DTK) olan hastalarda tedavi sonrası görüntüleme SPECT-BT'nin planar görüntülemeye katkısını araştırdık.

Gereç ve Yöntem: DTK tanısı ile opere olan ve radyoaktif iyot tedavisi (100-200mCi) uygulanan toplam 325 hastaya tedavi sonrası görüntüleme yapıldı (254 kadın, 71 erkek; yaş aralığı: 15-81). Tüm hastaların tüm vücut planar ile boyun-toraks bölgesinden planar + SPECT-BT görüntüleri alındı. Ek olarak planar görüntülerde şüpheli tutulum saptanan alanlardan SPECT-BT görüntüleme yapıldı. Planar görüntüleme benign, şüpheli ve malign olarak sınıflandırılan iyot pozitif alanlar iki nükleer tıp uzmanı tarafından SPECT-BT görüntüleri ile yeniden değerlendirildi. Nihai tanı histoloji, diğer görüntüleme yöntemleri, klinik-serolojik takipler ile doğrulandı.

Bulgular: Hasta bazlı sonuçlara göre SPECT-BT planar görüntülemeye ek olarak 21 (21/50) hastada metastatik lenf nodları, 2 (2/10) hastada akciğer metastazları, 2 (2/12) hastada kemik metastazları tespit ederek; 83 hastada benign, 48 hastada malign olmak üzere şüpheli tutulumları açıklığa kavuşturarak planar görüntüleme yorumunu değiştirdi. Duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer, negatif prediktif değer ve doğruluk planar görüntüleme için sırasıyla %63,4, %92,7, %67,7, %91,3, %87 iken SPECT-BT için sırasıyla %96,8, %100, %100, %99,2 ve %99,3 olarak hesaplandı. SPECT-BT toplamda 76 hastanın (%23,3) tedavi yönetimini etkiledi.

Sonuç: SPECT-BT görüntüleme, DTK hastalarında tedavi sonrası taramada planar görüntülemenin yanlış negatif/pozitif sonuçlarını azaltarak tanılabilirliği artırmaktadır. Sonuçlarımız DTC'nin en sık metastaz yaptığı boyun ve toraks bölgesinin değerlendirilmesinde SPECT-BT görüntülemenin rutin görüntüleme protokolüne alınmasını önermektedir.

Anahtar Kelimeler: İyot, Radyoaktif, SPECT-BT

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to investigate the contribution of SPECT-CT to planar imaging in patients with differentiated thyroid carcinoma (DTC) following radioiodine therapy.

Materials and Methods: Post-therapy scan was performed on 325 patients (254 women, 71 men; age range 15-81 years) who were operated on for DTC and treated with radioactive iodine (100-200 mCi) therapy. Whole-body planar imaging and neck-chest planar + SPECT-CT imaging were performed on all patients. Additional SPECT-CT scans were performed in other areas where suspicious findings were observed on the planar images. The iodine-positive areas on the planar images were classified as benign, equivocal, or malignant and were also reevaluated by two nuclear medicine physicians using SPECT-CT images. The final diagnosis was verified by histology, other imaging modalities, and clinical-serological follow-up.

Results: Based on patient-based analysis, SPECT/CT altered the interpretation of the planar scans by detecting the following findings: additional metastatic lymph nodes in 21 (21/50) patients, lung metastases in 2 (2/10) patients, and bone metastases in 2 (2/12) patients. Furthermore, SPECT/CT confirmed that equivocal focal uptakes were benign in 83 patients and malign in 48 patients. The sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value, and accuracy were 63.4%, 92.7%, 67.7%, 91.3%, and 87%, respectively, for the planar imaging and 96.8%, 100%, 100%, 99.2%, and 99.3%, respectively, for the SPECT-CT imaging. Overall, SPECT-CT affected therapy management in 76 patients (23.3%).

Conclusion: SPECT-CT imaging improves diagnostic accuracy by reducing false-negative or -positive results in planar imaging in the post-therapy scan in patients with DTC. Our findings suggest that neck-thorax SPECT-CT imaging should be incorporated into the routine imaging protocol for detecting the most metastatic sites of DTC.

Keywords: Iodine, Radioactive, SPECT-CT

İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: dr.duyguhas@hotmail.com

Geliş tarihi/Received Date: 23.10.2017 • **Kabul tarihi/Accepted Date:** 08.08.2018

©Telif Hakkı 2018 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2018 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

GİRİŞ

Tiroid kanseri tüm kanser türleri arasında yaklaşık %1 oranında nadir görülen bir kanser türü olmakla birlikte endokrin kanserleri içerisinde birinci sıradadır. Gelişen görüntüleme yöntemleri ile insidental olarak tanı alan hastaların sıklığı insidansta belirgin artışa neden olmaktadır (1, 2). Histolojik alt tipine göre tiroid kanserleri papiller (%80,2), foliküler (%11,4), hurtle hücreli (%3,1), medüller (%3,5) ve anaplastik (%1,7) olarak gruplandırılırlar (3). Hastaların %80'den fazlası iyi differansiye tiroid kanseri (DTC) olup 20 yıllık mortalite oranı %1'in altındadır. Kalan %20 hasta popülasyonunda ise hastalık gidişatı değişken olup metastatik/rekürren hastalık ile birlikte nadiren kansere bağlı ölümler de görülebilmektedir (4). Prognozu etkileyen faktörlerden başlıcaları; yaş, erkek cinsiyet, tümör boyutu, histolojik alt tip, tanı anındaki evre ve lezyonların iyot tutma özelliğidir (5).

Primer tedavide vakaların büyük bir kısmında total tiroidektomi±lenf nodu disseksiyonu uygulanmaktadır. Cerrahi sonrası hastaların büyük bir kısmına hastalığın takibinde kullanılan serum tiroglobulin (tg) değerinin etkinliğini artıran remnant doku ablasyonu ve rezidü/metastatik hastalığı tedavi amaçlı radyoaktif iyot (RAİ) tedavisi verilmektedir. Takipte hastalara hayat boyu levotiroksin (LT4) replasman tedavisi ile tiroid stimulan hormon (TSH) supresyonu ve tg takibi yapılmaktadır (6).

RAİ tedavisinde kullanılan İyot-131 (I-131), beta ışınları ile terapötik etki gösterirken, gama ışınları ile sintigrafik görüntüleme şansı sunmaktadır. Ancak gama ışınlarının fiziksel özellikleri nedeniyle I-131'in rezolüsyonu düşüktür. Bu nedenle standart olarak kullanılan iki boyutlu planar görüntülemeye remnant tiroid dokusuna ait boyun aktivite, tiroid dışı organ ve dokulardaki aktiviteler ile karışabilmektedir. Tiroid yatağı dışındaki metastazların doğru anatomik lokalizasyonu ve benign tutulumların ayrımı da planar görüntüleme ile zaman zaman sorun olabilmektedir. Radyoaktif iyotun sodyum iyodür simporter taşıyıcı proteini yardımı ile konsantrasyon edilmesi, çeşitli dokulardan pasif diffüzyonu ve sekresyonu gibi pek çok benign sebep artmış tutulumlara neden olabilmektedir (7-9) (Tablo 1). Raporlamada yanlış pozitifliklere yol açabilen bu tutulumlar da metastatik lezyonlar kadar önemlidir. Bu durum hibrid sistemlerin geliştirilmesi ile aşılmaya çalışılmaktadır. Tek foton emisyon tomografi (SPECT) yöntemi, gama ışınlarının tomografik olarak değerlendirildiği kesitsel bir sintigrafik yöntemidir. Bu yöntem bilgisayarlı tomografi (BT) ile aynı sistemde birleştirilerek SPECT-BT hibrid sistemleri oluşturulmuştur. SPECT ile eş zamanlı alınan BT kesitleri SPECT görüntülemesindeki tutulumların anatomik lokalizasyonlarını daha doğru bir şekilde yapılmasını sağlamaktadır. SPECT-BT'nin tanınal doğruluğunun tek başına planar ve SPECT görüntülemelerden çok daha yüksek olduğunu gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır (10-

15). Bu çalışmada RAİ tedavisi sonrası yapılan SPECT-BT görüntülemenin tanınal doğruluğu ve tüm vücut planar görüntülemeye katkısı araştırılmaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEM

İstanbul Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp Anabilim Dalı'nda Ocak 2015 ile Ekim 2016 arasında DTC nedeni ile RAİ tedavisi alan 325 hastanın tedavi sonrası yapılan tüm vücut planar tarama ve SPECT-BT görüntüleri retrospektif olarak incelendi.

Tüm hastalardan rutin olarak yapılan tüm vücut görüntüleme ile planar boyun-toraks görüntülerine ek olarak her hastadan boyun-toraks SPECT-BT ve şüpheli tutulum alanlardan yapılan ek SPECT-BT görüntüleri değerlendirildi. Toplam 325 tüm vücut, 325 boyun-toraks planar görüntüsü ve 374 SPECT-BT görüntüsü incelendi. Hastaların ortalama yaşı 48,3 olup (15-81) 254'ü kadın, 71'i erkekti. Hastaların 133'ü klasik tip, 79'u foliküler tip, 52'si klasik-foliküler tip papiller DTC, 16'sı onkositik DTC, 2'si foliküler DTC ve 43'ü diğer tiplerde DTC idi. Ortalama tg değerleri 25,8 mg/dL (0,04-1000 mg/dL), antitg değerleri 126,7 mg/dL (0,12-4000mg/dL) idi (Tablo 2). Toplam 58 hastada ameliyat sonrası patolojilerinde lenf nodu metastazi saptanmıştı. Evreleme Amerikan kanser komitesinin kılavuzuna göre yapıldı ve tedavi dozları Amerikan Tiroit Derneği'nin 2009 kılavuzuna göre verildi (16, 17). Ortalama RAİ dozu 120 mCi idi (100-200mCi). İlaç kullanımı olan hastalarda LT4 preparatı 4 hafta kesildi ve tüm hastalarda tedavi öncesi TSH değerininin 30 mIU/L ve üzerinde olduğu kontrol edilerek RAİ tedavisi verildi. Tedavi sonrası 5-7. günde görüntüler alındı.

Görüntüleme Protokolü

Hastaların görüntüleri yüksek enerji, yüksek rezolüsyon kolimatörlü General Electric (GE) Discovery 670 (USA) marka SPECT-BT gama camera ile alındı (planar: matriks 256×256, enerji penceresi: 364±10%; tüm vücut: matriks 256×1,024, enerji penceresi: 364±20%; SPECT: matriks: 64×64, enerji penceresi: 364±10%). Eş zamanlı alınan BT kesitleri anatomik korelasyon ve atenuasyon düzeltmesi için kullanıldı (120 keV, 40-100 mAs/kesit, 2-5mm). Tüm vücut görüntüleri 12 mm/dk olacak şekilde anterior-posterior olarak çekildi. SPECT görüntüleri 64 projeksiyon ile 360 derece alındı ve proses işlemleri yapıldı (5 iterasyon, 8 subset).

Görüntülerin Değerlendirilmesi

Hastaların planar, tüm vücut ve SPECT-BT görüntüleri deneyimli 2 ayrı nükleer tıp uzmanı tarafından biyokimya sonuçları, patolojik ve radyolojik bulgular eşliğinde değerlendirildi. RAİ tutulumu çevre zemin aktiviteden fazla olduğunda pozitif kabul edildi.

Planar-tüm vücut görüntülemeye; tiroid yatağındaki fokal tutulumlar remnant doku, tiroid orta hat süperiorundaki tutulumlar tiroglossal trakttaki tiroid dokusu lehine yo-

Tablo 1. Radyoaktif iyotun (RAİ) fizyolojik tutulum mekanizmaları ve yanlış pozitif değerlendirmeye neden olabilecek fizyolojik tutulum örnekleri (9)

Aktivite Kaynağı	RAİ Tutulum Mekanizması	Benign Sebepleri
Total tiroidektomi sonrası remnant tiroid dokusu	Sodyum iyodür simporter yardımı ile konsantre edilir	Tiroglossal traktta, tiroid yatağında remnant doku, piramidal lob
Ektopik tiroid dokusu	Sodyum iyodür simporter yardımı ile konsantre edilir	Lingual tiroid, intrakardiyak tiroid, ovaryan tiroid
Sodyum iyodür simporter eksprese eden tiroid dışı dokular	Sodyum iyodür simporter veya diğer taşıyıcı proteinler yardımı ile konsantre edilir	Tükürük bezleri, koroid plexus, lakrimal bez, nazal mukozaya, timus, meme dokusu, gastrik mukozaya, barret özefagus, meckel divertikülü, gastrointestinal duplikasyon kisti
İntravasküler boşluklar	Kan havuzu	Normal kardiyak kan havuzu, vasküler ektazi
Enterohepatik ve genitoüriner sistemden atılım	RAİ fizyolojik atılım yolları	Safra kesesi, barsaklar, inguinal herni, böbrekler, mesane, hidonefrotik/ektopik ya da transplante böbreğe ait tutulumlar
Hepatik metabolizma	Radyoiodinize tiroksinin hepatik metabolizması	Diffüz hepatik tutulum
RAİ sekresyonu	Tükürük, gözyaşı, nazal sekresyon, anne sütü, mide öz suyu, ter	Orofaringeal alanda, ösefagusta sekresyonlara bağlı tutulumlar, Zenker divertikülü, trakeostomi tüpü, terlemeye bağlı tutulum.
Kontaminasyon	RAİ içeren idrar / feçes bulaşı	Bulaş olan yerde, genellikle cilt üstünde
Kistler	Pasif diffüzyon	Renal, ovaryan, plevraperikardial, bronkojenik kistler
3.boşluklara geçiş	Pasif diffüzyon	Perikardiyal-plevral effüzyon, asit, hidrosel
Enflamasyon-enfeksiyon	Vasodilatasyon, kanlanma ve kapiller permeabilite artışı	Akciğerde enfeksiyon alanlarında tutulum, perikardit, artrit, sialadenit, kronik sinüzit, kolesistit, cilt yanığı-yaralar, iyileşmekte olan cerrahi kesiler
Tiroid dışı neoplaziler	Aktif transport ve bilinmeyen mekanizmalar	Meningioma, tükürük bezi adenokarsinom, küçük hücreli dışı akciğer kanserleri, teratom, ovaryen ve gastrik adenokarsinomlar
Diğer kaynaklar	Çeşitli-bilinmeyen mekanizmalar	Dental materyal, menstrüel uterin tutulum, uterin fibroid, subdural hematoma, posttravmatik ensefalomalazi

RAİ: radyoaktif iyot

rumlandı. Şüpheli olan tutulumlar ayrıca belirtildi. Tiroid dışındaki boyundaki tutulumlar lenf nodu/lenf nodu şüphesi veya benign tutulumlar olarak sınıflandırıldı. Toraks-ta, batin-pelvis ve ekstremitelerdeki tutulumlar lenf nodu/şüphesi, akciğer metastazı/şüphesi, kemik-yumuşak doku metastazı/şüphesi veya benign/benign şüpheli tutulumlar olarak not edildi. Tükürük bezi tutulumları, ösefagustaki lineer aktiviteler, nazofarengeal, gastrointestinal alandaki aktiviteler ve üriner aktiviteler gibi fizyolojik olduğu düşünülen tutulumlar benign olarak yorumlandı.

SPECT-BT görüntülemesinde; planar-tüm vücut görüntülemesinde tutulum görülen tüm bölgeler BT kesitleri ile birlik-

te incelenerek doğru anatomik korelasyonu ve fizyolojik tutulumların ayrımı yapıldı. İki nükleer tıp uzmanının farklı karar vermeleri durumunda üçüncü bir uzman görüşü alındı. Şüpheli SPECT-BT bulguları USG ve MR ile değerlendirildi. Metastaz raporlanan 16 hastada histopatolojik konfirmasyon yapılırken diğer hastalar klinik, biyokimya ve görüntüleme bulguları ile değerlendirildi.

BULGULAR

Boyun-toraks bölgesi: Planar görüntülemesinde 295 hastada tiroid remnant dokusu lehine değerlendirilen fokal RAİ tutulumları SPECT-BT ile konfirme edildi. Bunların 215'inde remnant doku dışında odak saptanmadı. 11

Tablo 2. Hastaların demografik ve klinik özellikleri

Cinsiyet	
Kadın	254
Erkek	71
Tanı anında ortalama yaş	48,3 (15-81)
Histolojik tip	
Foliküler tip papiller tiroid karsinom	133
Klasik tip papiller tiroid karsinom	79
Klasik-foliküler tip papiller tiroid karsinomu	52
Onkositik tip papiller tiroid karsinomu	16
Foliküler tiroid karsinomu	2
Diğer	43
RAİ öncesi ATA risk sınıflaması	
Düşük	197
Orta	118
Yüksek	3
Tedavi sırasında TSH ortalama	141,6 (31-594)
Tedavi sırasında tiroglobulin ortalama	25,8 (0,04-1000)
Tedavi sırasında antitiroglobulin ortalama	126,7 (0,12-4000)

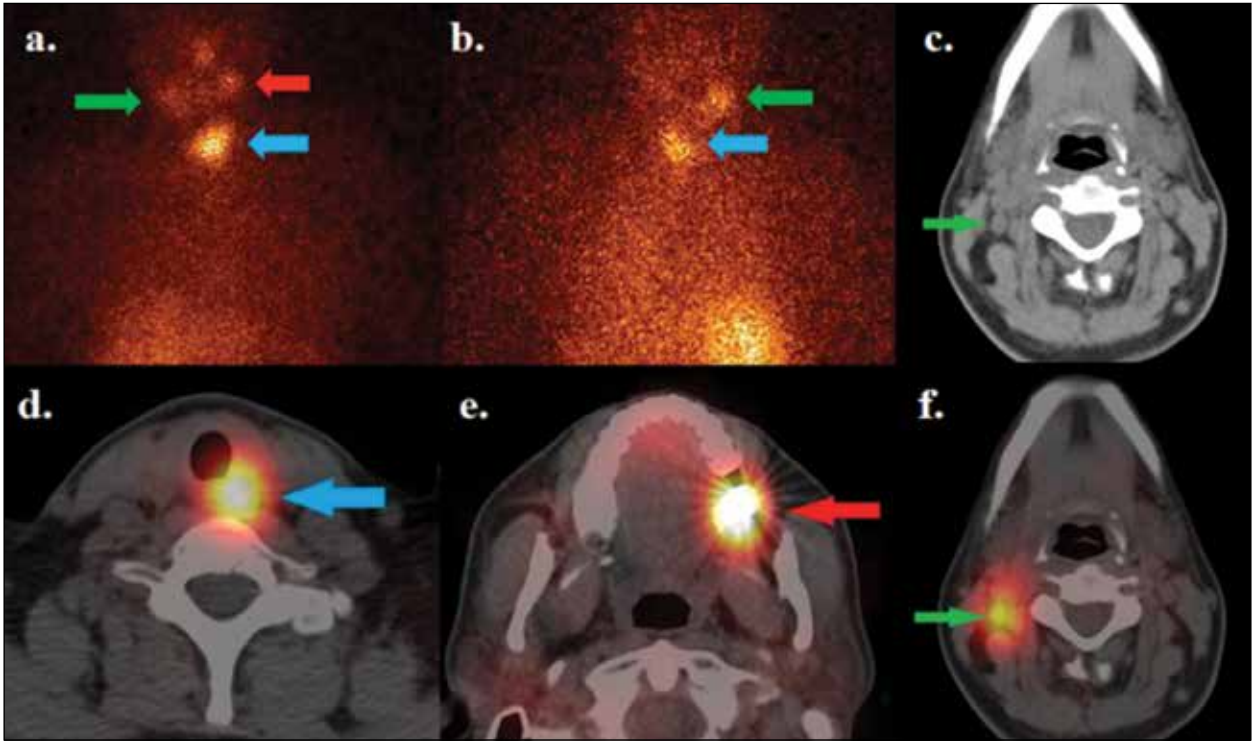
RAİ: radyoaktif iyot; TSH: tiroid stimulan hormon

görüntüleme planar imajlarda remnant doku olarak tariflenen alanlarda SPECT-BT de ek olarak remnant doku komşuluğunda metastatik servikal lenf nodları tespit edildi. Planar görüntü de lenf nodu şüpheli raporlanan 40 görüntülemenin 24'ünde SPECT-BT ile metastatik servikal lenf nodları konfirme edilirken 8 hastada tutulumun sublingual/mandibular glanda, 4 hastada parotis glandına ait asimetric fizyolojik/enflamatuar tutulum olduğu, 3 hastada kontaminasyon ve 1 hastada ise ektopik tiroid dokusuna ait olduğu tespit edildi. Bunların dışında 9 olguda SPECT-BT'de görüntü alanına giren servikal lenfatik istasyonlarda planar görüntülerde saptanmayan çoğunluğu subsantimetrik RAİ pozitif lenf nodları tespit edildi (Şekil 1). Planar görüntüleme 15 hastada mediastinal lenf nodu düşünülen fokal tutulumların SPECT-BT ile 6'sının gerçekten mediastinal lenf noduna ait olduğu, 2'sinin vertebra/sternumdaki kemik lezyonuna ait olduğu görüldü. Kalan 7 hastada tariflenen odakların timusa ait fizyolojik

tutulmuş olduğu saptandı. Ayrıca 20 hastada tükrük bezleri, ösefagus ve meme parenkimine ait benign fizyolojik tutulumlar SPECT-BT ile konfirme edildi. Akciğer metastazı şüphesi uyandıran 14 pozitif görüntülemenin 8'inde akciğer metastazı doğrulanırken 5 olguda bu tutulumların akciğer dışı metastazlara ait olduğu, 1 odağın ise enflamatuar tutulum olduğu görüldü. Bunun dışında tg yüksekliği bulunan 2 olguda akciğerde RAİ tutmayan metastatik lezyonlar SPECT-BT ile saptandı (Şekil 2).

Batın-pelvis bölgesi ve diğer alanlar: Planar görüntüleme şüpheli odak tespit edilen 9 hastanın 8'inde SPECT-BT'de kemik metastazı tespit edilirken kalan 1 hastada benign tutulum olduğu anlaşıldı. Ayrıca tg yüksekliği bulunan 2 olguda iyot negatif kemik metastazları saptandı. Bir olguda batın içerisinde lokalizasyonu net seçilemeyen fokal tutulumların metastatik lenf nodlarına ait olduğu görüldü. Görüntülemelerin 23'ünde saptanan şüpheli tutulumların 15'i fizyolojik barsak aktivitesi, 4'ü kontaminasyon, 2'si böbrek-karaciğerdeki basit kistlere ait benign tutulumlar ve 2'si menstrual siklusa bağlı endometrial tutulum idi.

SPECT-BT'nin hastalığın evresi ve tedavi yönetimi üzerine etkisi: Sonuçlara göre lenf nodu metastazlı olguların 30'u (30/51), akciğer metastazlı olguların 8'i (8/10) ve kemik metastazlı olguların 10'u (10/12) planar görüntüleme ile tespit edilebilirken diğer lezyonlar SPECT-BT ile saptandı. Hastaların 9'unda hem planar hem de SPECT-BT görüntüleme remnant ya da metastaz ile uyumlu odak izlenmemiş olup bunların 7'sinde tg-antitg normal olması nedeniyle negatif kabul edildi. Kalan 2 hastada ise tg>10 mg/dL üzerinde olması nedeniyle yapılan boyun USG'de ve F18-FDG PET-BT'de odak saptanmamış olup hastaların kontrol 5 mCi taramaları ve tg değerleri normaldi. Tg yüksekliğini açıklayacak odak bulunamaması nedeniyle hastalar false negatif olarak değerlendirildi. Hasta bazı değerlendirilmede duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer (PPV), negatif prediktif değer (NPV) ve doğruluğu planar görüntüleme için sırasıyla %63,4, %92,7, %67,7, %91,3 ve %87 iken SPECT-BT için sırasıyla %96,8, %100, %100, %99,2 ve %99,3 olarak hesaplandı. SPECT-BT ile hastaların 29'unda (%8,9) nodal evre yükselirken, 16 hastada (%4,9) nodal evre azaldı veya negatif değerlendirildi. Nod pozitif 29 hastanın 21'i (%6,4) tanı anında N0 idi. Hastaların 17'sinde (%5,2) ise uzak metastazlar nedeniyle klinik evre 4 olarak değişti. SPECT-BT toplamda 83 hastada benign, 48 hastada malign olmak üzere şüpheli tutulumları açıklığa kavuşturarak planar görüntüleme yorumunu değiştiren hastaların 76'sında (%23,3) hasta takibi ve tedavi seçimini etkiledi. SPECT-BT görüntüleri sonrası hastalar ATA kılavuzuna göre yeniden değerlendirildiğinde 8 hasta düşük riskten orta riskli gruba, 4 hasta düşük riskte yüksek riskli gruba, 12 hasta orta riskten yüksek riskli gruba yükseldi.



Şekil 1. a-f. 45 yaşında kadın hasta; klasik varyant papiller tiroid kanseri tanısı ile total tiroidektomi yapılan ve cerrahi sonrası 150 mCi radyoaktif iyot tedavisi uygulanan hastaya tedavi sonrası 5. günde tüm vücut + boyun-toraks bölgesinden planar ve SPECT-BT görüntüleme yapıldı. Hastanın iyot tedavisi sırasında TSH:103 mU/L, tg: 33,7 mU/L, antitg:18,1 mU/L idi. Planar görüntülerde (a, b) boyunda tiroid yatağında izlenen yoğun fokal tutulum (mavi ok) remnant tiroid dokusu lehine değerlendirilirken sağ submandibular lojda (yeşil ok) fizyolojik gland tutulumu ve metastaz ayırımı yapılamayan asimetric fokal artmış RAI tutulumu mevcuttu. Bu bölgeden yapılan SPECT-BT görüntüleri (c:BT, f:SPECT-BT füzyon) incelendiğinde sağ submandibular lojdaki tutulumun sağ seviye 3'de 10x7mm boyutlarında ölçülen lenf noduna ait olduğu görüldü (yeşil ok). Tariflenen lenf nodundan yapılan biyopsi sonucu papiller tiroid kanseri metastazı olarak verifiye edildi. **Planar görüntülerde tiroid yatağında izlenen yoğun fokal aktivite tutulum (a, b: mavi ok) SPECT-BT görüntülerinde sol posterior retrotrakeal alanda remnant tiroid dokusu olarak mavi okla (d) gösterilmektedir. Ayrıca planar görüntülerde (a, b) sol mandibular alanda (kırmızı ok) izlenen fokal aktivite tutulumunun dental materyale ait benign tutulum olduğu (e) görülmektedir (kırmızı ok).

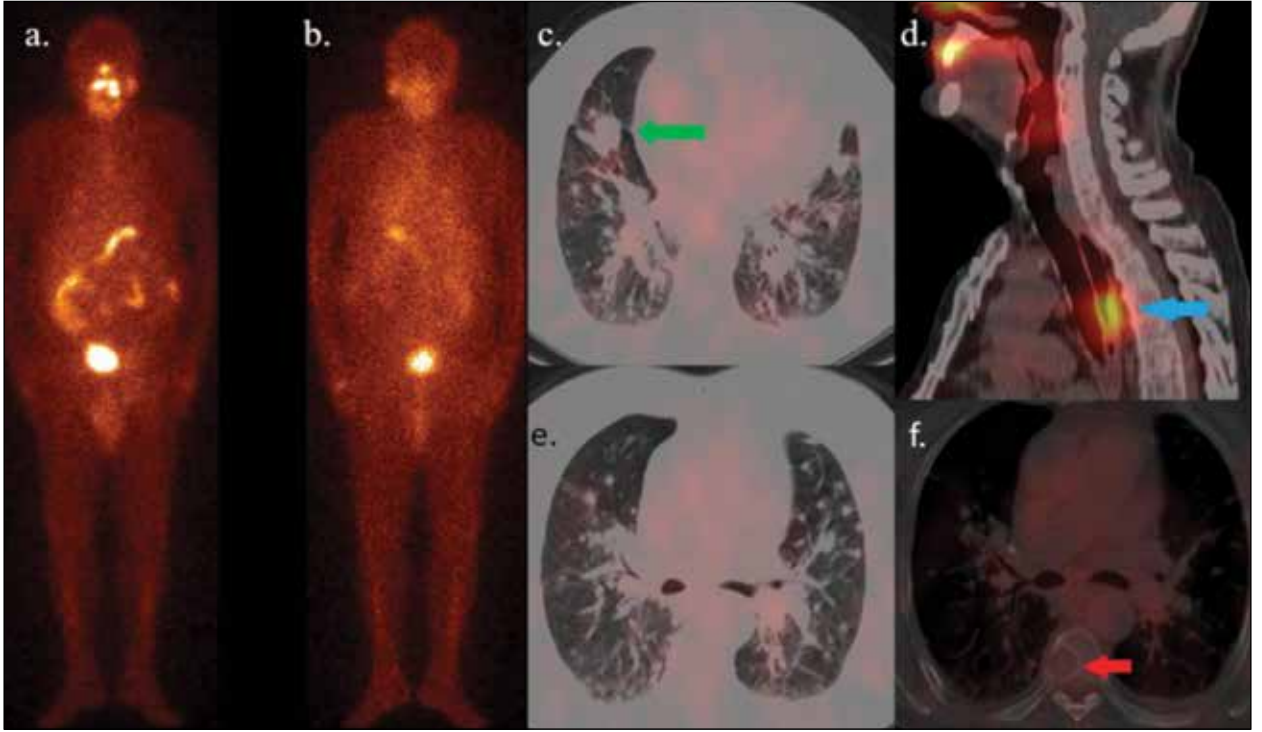
Takipte tüm hastalara 9-12. ayda 5mCi RAI ile tüm vücut tarama testi, TSH, tg/antitg ölçümleri ve 6-12. ayda boyun USG kontrolü yapıldı. Toplam 8 hasta SPECT-BT ile lokalize edilen ve RAI sonrası sebat eden metastatik lenf nodları nedeni ile opere oldu. 70 hastada 6-12. aylar arasında yüksek doz tedavisi tekrarlandı. 4 hastada RAI negatif dediferansiye makro lezyonların tespit edilmesi nedeniyle tirozinkinaz inhibitörleri ile tedaviye başlandı. 7 hastada kemik metastazları lokalize edilerek eksternal RT planlandı.

SPECT-BT'de izlenen insidental BT bulguları: Görüntü alanına giren akciğer parenkimi değerlendirilmesinde 3 hastada santral yerleşimli kitlesel akciğer lezyonları saptandı. Bu hastaların 2'si primer akciğer kanseri tanısı alırken diğer hastada granülomatöz hastalık biyopsi ile verifiye edildi. 5 hastada geniş plevral effüzyon ve bun-

ların 3'ünde eşlik eden yaygın infiltrasyon alanları tespit edilerek göğüs hastalıklarına yönlendirildi.

TARTIŞMA

Tiroid kanserinde cerrahi sonrası en önemli tedavi basamağı olan RAI tedavisinde tedavi sonrası görüntüleme gerek doğru evreleme, gerekse hastalık prognozunu öngörmeye oldukça önemlidir. Yıllardır uygulanan bu tedavide rutin görüntüleme olarak kullanılan planar görüntüleme önemli klinik katkılar sağlamakla birlikte I-131'in biyolojik dağılımı ve fiziksel özellikleri yanlış pozitif-negatif sonuçlara ve şüpheli tutulumlara neden olmaktadır. Bu sorunları çözmek amacıyla iki boyutlu planar görüntülemeye ek olarak yapılan SPECT-BT hibrid görüntülemede SPECT ile üçüncü boyut, BT ile anatomik korelasyon sağlanarak tanısız doğruluk artırılmaya çalışılmıştır.



Şekil 2. a-d. Foliküler diferansiyeli tiroid kanseri tanısı ile total tiroidektomi yapılan 56 yaşında kadın hastanın tiroglobulin değeri yüksekliği nedeniyle yapılan toraks BT görüntülemesinde multiple akciğer metastazları mevcuttu. Rekombinant TSH uygulaması ile 200 mCi radyoaktif iyot tedavisi uygulanan hastaya tedavi sonrası 5. günde tüm vücut+boyun-toraks bölgesinden planar ve SPECT-BT görüntüleme yapıldı. Hastanın iyot tedavisi sırasında TSH: 209 mU/L , tg: 671 mU/L, antitg: 18,9 mU/L idi. Planar görüntülerde (a, b) mediastende orta hatta düşük yoğunlukta aktivite tutulumu izlenen olguda toraks SPECT-BT görüntüleri (c, d, e, f) incelendiğinde mediastendeki tutulumun fizyolojik ösefagus aktivitesi olduğu görüldü (mavi ok). BT görüntüleri değerlendirildiğinde büyüğü sağ akciğer orta lobda (yeşil ok) olmak üzere her iki akciğer parankimi içerisinde izlenen multiple metastatik lezyonlarda (c, e) belirgin radyoaktif iyot tutulumunun olmadığı görüldü. Ayrıca BT görüntülerinde dorsal 7. vertebra korpusu sağ yarımında radyoaktif iyot tutulumu göstermeyen litik kemik lezyonu (kırmızı ok) saptanan hastada SPECT-BT planar görüntülemeye negatif olan lezyonların tespitini sağladı.

Hibrid kameraların yaygınlaşması ile SPECT-BT onkolojiden kardiyojiyeye pek çok disiplinde yaygın kullanım alanı bulmuştur. RAI tedavisi sonrası SPECT-BT görüntülemenin tanısal doğruluğunun tek başına planar ve SPECT görüntülemelerden daha yüksek olduğunu gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Ancak bu çalışmalarda klinik katkı %11-58 arasında oldukça değişken raporlanmış olup nispeten küçük hasta gruplarının verileri analiz edilmiştir (10, 13, 15, 18-20). Çalışmamızda geniş bir seride RAI tedavisi sonrası yapılan SPECT-BT görüntülemenin tanısal doğruluğu ve tüm vücut planar görüntülemeye katkısı araştırılmaktadır.

Çalışma sonucu SPECT-BT'nin duyarlılık, özgüllük ve doğruluğu sırasıyla % 96,8, %100 ve %99,3 ile planar görüntülemeye göre üstün bulunmuştur. RAI görüntülemesinde SPECT-BT'nin planar görüntülemeye göre tanısal üstünlüğü pek çok çalışmada bizim sonuçlarımız ile benzer şekildedir (21-23). OH Jr. ve ark. (24) çalışmasında ise

özgüllük yüksek iken duyarlılık %65 oranında düşüktür. Bu çalışmada yanlış negatif olarak raporlanan vakaların büyük bir kısmı FDG pozitif akciğer lezyonları olup çalışma dizaynı gereği iyot negatif odaklar değerlendirilmediğinden duyarlılığın planar ile benzer şekilde düşük raporlandığı varsayılmıştır. Bizim çalışmamızda yanlış negatif olarak yorumlanan iki vakada boyun USG'de ve F18-FDG PET-BT'de tg yüksekliğini açıklayacak odak saptanmamıştı. Bu hastaların kontrol 5 mCi taramaları ve tg değerlerinin normal olması nedeniyle rezolüsyon sınırı altındaki mikrometazların tg yüksekliğine neden olan olabileceği düşünüldü.

Çalışmamızda yalnızca tedavi amaçlı RAI verilen hastaların görüntüleri kullanılmıştır. Ancak Menges ve ark.'nın (25) çalışmasında görüntülerin çoğunluğu tedavi öncesi diagnostik veya nüks arama amaçlı yapılan düşük doz tarama görüntülerinden oluşmaktadır. Bu çalışmada SPECT-BT'nin planar görüntülemeye göre duyarlılığında

belirgin fark saptanmamış olup bizim çalışmamızdaki kullanılan RAİ dozları ile kıyaslandığında verilen diagnostik RAİ tarama dozları oldukça düşüktür (ortalama: 11,6 mCi). Düşük doz ile görüntüleme doza bağlı rezolüsyon azalabileceğinden duyarlılığının buna bağlı olarak nispeten düşük olduğu düşünülmektedir.

Verilerimize göre SPECT-BT hastaların %10,1'inde planar görüntülerde izlenen şüpheli-metastatik odakların benign patolojilere ait olduğunu göstermiş, %15,3'ünde şüpheli-benign odakları doğrularak raporlama kısmında nükleer tıp uzmanlarına oldukça yardımcı olmuştur. Wang ve ark. (21) çalışmasında hastaların %70'inde hibrid görüntülemenin raporlamada hekimin güvenini artırdığını belirtmiştir. Bu tip şüpheli vakaların tek başına planar görüntüler ile yorumlanması sıklıkla ek çekim ve ek radyolojik görüntüleme ihtiyacı doğurduğundan SPECT-BT'nin gereksiz görüntülemeyi ortadan kaldırarak kazanç sağladığı görülmüştür.

Sonuçlarımıza göre SPECT-BT hastaların %23,3'ünde takip ve tedavi seçimini etkilemiştir. Bu konuda yapılan çalışmaların sonuçları (%11-58) değişiklik göstermektedir (10, 12, 13, 15, 18-20). Çalışmalarda kullanılan yöntemlerdeki farklılığın sonuçları etkilediği düşünülmektedir. Geç görüntüleme yapılan olgularda zemin aktivitenin azalması nedeniyle lezyonların tespiti kolaylaşmakta, fizyolojik tutulumların ayırımı daha kolay yapılmaktadır. Salvatori ve ark.'nın (26) çalışmasında SPECT-BT'de erken görüntülemeye göre geç görüntülemeye daha fazla lezyon tespit edildiği raporlanmıştır. Bizim çalışmamızda post RAİ görüntüleme 5-7. günlerde yapılmış olup daha erken görüntüleme yapılan Hassan ve ark.'nın (13) çalışmasında SPECT-BT'nin klinik katkısının %14 gibi nispeten düşük raporlanmasının görüntüleme süresinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Farklı sonuçları olan diğer çalışmalarda ise hasta seçiminde farklı risk gruplarını içeren heterojen ve nispeten az sayıdaki hasta popülasyonu ile yapılan değerlendirmelerin uyumsuzluğa neden olduğu varsayılmaktadır (12, 18).

Çalışmamızda SPECT-BT ile hastaların toplam % 13,8'inde nodal evrenin değiştiği gösterilmiştir. SPECT-BT'nin nodal evrelemeye katkısı önceki çalışmalarda %15-40 oranlarında raporlanmıştır (10, 15, 21, 27). Bizim gibi hastaların tamamına rutin boyun-toraks SPECT-BT uygulanan Grewal ve ark.'nın çalışmasında tedavi sonrası görüntülenen olgularda SPECT-BT'nin nodal evrelemeye katkısı %15 olarak raporlanmış olup çalışmamız ile benzerdir (15). Yalnızca planar görüntülemeye şüpheli pozitif tutulum olan olgulara SPECT-BT yapılan Kohlfuerst ve ark.'nın (10) çalışmasında bu oran %36 olarak belirtilmiş olup verilerin değerlendirilmesinde yalnızca bu vakaların kullanılmasının daha yüksek sonuçlara neden olduğu düşünülmektedir. Bunun dışında çalışmamızdaki rutin SPECT-BT uygulaması, planar görüntüde negatif değerlendirilen

20 olgudaki RAİ+ metastatik servikal lenf nodlarının SPECT-BT ile tespitini sağlamıştır. Bu nedenle DTC'nin sık metastaz yaptığı lenfatik istasyonların görüntülenmesinde SPECT-BT'nin rutin uygulanmasının yanlış negatiflikleri azaltacağı düşünülmektedir.

Uzak metastaz değerlendirilmesinde SPECT-BT sonrası hastaların 17'sinde (%5,2) saptanan metastatik odaklar nedeniyle klinik evre 4 olarak değişmiştir. Bu hastalarda 1'i akciğer, 1'i kemik, 1'i kemik + akciğer olmak üzere iyot negatif metastatik lezyonlar SPECT-BT'nin BT komponenti sayesinde tespit edilmiş olup iyot negatif makro lezyonların tespiti ile hastaların tedavi rejimleri değişmiştir. Benzer şekilde Sergieva ve ark. (28) da tedavi sonrası değerlendirmede SPECT-BT ile hastaların %7,8'inde planar görüntüler ile saptanamayan iyot negatif lezyonları tespit edilmesi ile hastanın tedavi yönetiminin önemli ölçüde değiştiğini belirtmişlerdir. Sonuçlarımıza göre rutin SPECT-BT görüntülemeye akciğerlerin de eklenmesi DTC'nin en sık uzak metastaz yaptığı organlardan akciğerin iyot negatif dediferansiye metastazlarının da saptanmasında faydalı olacağı öngörülmektedir.

Çalışmamızın limitasyonlarına bakıldığında; metastatik lezyonların yalnızca bir kısmında histopatolojik verifikasyon bulunmakta olup etik ve klinik nedenlerden ötürü diğer lezyonlardan biyopsi verifikasyonu yapılamamıştır. Uzaysal rezolüsyonun sınırları parsiyel volüm etkisi nedeniyle küçük lezyonların tespitini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle yanlış negatif değerlendirilen tg yüksekliği bulunan iki hastamızda metastatik odak tespit edilememiştir. Diğer çalışmalarda büyük rezidü tiroid dokusunun komşu yapıların değerlendirilmesini zorlaştırdığı tarif edilmekle birlikte bizim hasta grubumuzda rezidü dokudaki aktivite etrafındaki anatomik yapıların değerlendirilmesini etkilememiştir.

SONUÇ

SPECT-BT hibrid görüntüleme, DTC nedeniyle RAİ tedavisi alan olgularda tedavi sonrası görüntülemeye yanlış negatif/pozitif yorumları azaltarak tanısız doğruluğu artırmakta ve tedavi planlanmasına önemli klinik katkılar sunmaktadır. Şüpheli tutulumların değerlendirilmesinde 3 boyutlu görüntüleme ve BT'nin avantajlarının kullanılmasını ek görüntüleme ihtiyacını azaltarak kazanç sağlamıştır. Çalışmamızda planar görüntülemeye negatif olan vakaların bir kısmında rezolüsyon sınırındaki RAİ pozitif lezyonlar ve iyot negatif metastazlar saptanması nedeniyle DTC'nin sık metastaz yaptığı boyun ve toraks bölgesinden SPECT-BT görüntülemenin rutin görüntüleme protokolüne alınması gerektiği düşünülmektedir.

Hasta Onamı: Tüm hastalardan yazılı onam alındı.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - D.H.Ş., Y.Ş.; Tasarım - D.H.Ş., S.K., E.Y.; Denetleme - C.T., I.A., A.M., S.N.Ü.; Kaynaklar - D.H.Ş.; Malzemeler - D.H.Ş.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - D.H.Ş.; Analiz ve/veya Yorum - D.H.Ş., Y.Ş.; Literatür Taraması - D.H.Ş., Z.G.Ö.; Yazıyı Yazan - D.H.Ş.; Eleştirel İnceleme: C.T., S.N.Ü.

Teşekkür: Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje Numarası: 29740 ve 29929). İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinasyon Birimi'ne desteğinden ötürü teşekkür ederiz.

Çıkar Çatışması: Yazarların çıkar çatışması yoktur.

Finansal Destek: Bu çalışma "İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi" tarafından desteklenmiştir (Proje Numarası:29740 ve 29929).

Informed Consent: Written informed consent was obtained from all patients.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - D.H.Ş., Y.Ş.; Design - D.H.Ş., S.K., E.Y.; Supervision - C.T., I.A., A. M., S.N.Ü.; Resources - D.H.Ş.; Materials - D.H.Ş.; Data Collection and/or Processing - D.H.Ş.; Analysis and/or Interpretation - D.H.Ş., Y.Ş.; Literature Search - D.H.Ş., Z.G.Ö.; Writing Manuscript - D.H.Ş.; Critical Review - C.T., S.N.Ü.

Acknowledgements: This study was supported by Istanbul University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project number: 29740 and 29929). We thank Istanbul University Scientific Research Projects Coordination Unit for their support.

Conflict of Interest: Authors have no conflict of interest to declare.

Financial Disclosure: This study was supported by Istanbul University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project number: 29740 and 29929).

KAYNAKLAR

1. Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. *JAMA* 2006;295(18):2164-7. [\[CrossRef\]](#)
2. Davies L, Welch HG. Current thyroid cancer trends in the United States. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 2014;140(4):317-22. [\[CrossRef\]](#)
3. Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR. A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the US, 1985-1995. *Cancer* 1998;83(12):2638-48. [\[CrossRef\]](#)
4. Randolph GW, Thompson GB, Branovan DI, Tuttle RM. Treatment of thyroid cancer: 2007—a basic review. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;69(2):S92-S7. [\[CrossRef\]](#)
5. Abraham T, Schöder H, editors. Thyroid cancer-indications and opportunities for positron emission tomography/computed tomography imaging. *Seminars in nuclear medicine*; 2011: Elsevier.
6. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, et al. 2015 American Thyroid Association management guidelines for adult patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: the American Thyroid Association guidelines task force on thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2016;26(1):1-133. [\[CrossRef\]](#)
7. Burlison JS, Hartshorne MF, Voda AM, Cocks FH, Fair JR. SPECT/CT localization of oral radioiodine activity: a retrospective study and in-vitro assessment. *Nucl Med Commun* 2013;34(12):1216-22. [\[CrossRef\]](#)
8. Shapiro B, Rufini V, Jarwan A, Geatti O, Kearfott KJ, Fig LM, et al. editors. Artifacts, anatomical and physiological variants, and unrelated diseases that might cause false-positive whole-body 131-I scans in patients with thyroid cancer. *Seminars in nuclear medicine*; 2000: Elsevier.
9. Glazer DI, Brown RK, Wong KK, Savas H, Gross MD, Avram AM. SPECT/CT evaluation of unusual physiologic radioiodine biodistributions: pearls and pitfalls in image interpretation. *Radiographics* 2013;33(2):397-418. [\[CrossRef\]](#)
10. Kohlfuerst S, Igerc I, Lobnig M, Gallowitsch H, Gomez-Segovia I, Matschnig S, et al. Posttherapeutic 131I SPECT-CT offers high diagnostic accuracy when the findings on conventional planar imaging are inconclusive and allows a tailored patient treatment regimen. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2009;36(6):886-93. [\[CrossRef\]](#)
11. Ciappuccini R, Heutte N, Trzepla G, Rame JP, Vaur D, Aide N, et al. Postablation (131I) scintigraphy with neck and thorax SPECT-CT and stimulated serum thyroglobulin level predict the outcome of patients with differentiated thyroid cancer. *Eur J Endocrinol* 2011;164(6):961-9. [\[CrossRef\]](#)
12. Chen L, Luo Q, Shen Y, Yu Y, Yuan Z, Lu H, et al. Incremental value of 131I SPECT/CT in the management of patients with differentiated thyroid carcinoma. *J Nucl Med* 2008;49(12):1952-7. [\[CrossRef\]](#)
13. Hassan FU, Mohan HK. Clinical utility of SPECT/CT imaging post-radioiodine therapy: does it enhance patient management in thyroid cancer? *Eur Thyroid J* 2015;4(4):239-45. [\[CrossRef\]](#)
14. Barwick TD, Dhawan RT, Lewington V. Role of SPECT/CT in differentiated thyroid cancer. *Nucl Med Commun* 2012;33(8):787-98. [\[CrossRef\]](#)
15. Grewal RK, Tuttle RM, Fox J, Borkar S, Chou JF, Gonen M, et al. The effect of posttherapy 131I SPECT/CT on risk classification and management of patients with differentiated thyroid cancer. *J Nucl Med* 2010;51(9):1361-7. [\[CrossRef\]](#)
16. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, et al. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: the American Thyroid Association (ATA) guidelines taskforce on thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 2009;19(11):1167-214. [\[CrossRef\]](#)
17. Edge S, Byrd D, Compton C, Fritz A, Greene F, Trotti A, editors: *AJCC cancer staging manual*. New York: Springer. 2010.
18. Wong KK, Sisson JC, Koral KF, Frey KA, Avram AM. Staging of differentiated thyroid carcinoma using diagnostic 131I SPECT/CT. *AJR Am J Roentgenol* 2010;195(3):730-6. [\[CrossRef\]](#)
19. Barwick T, Murray I, Megadmi H, Drake WM, Plowman PN, Akker SA, et al. Single photon emission computed tomography (SPECT)/computed tomography using Iodine-123 in patients with differentiated thyroid cancer: additional value over whole body planar imaging and SPECT. *Eur J Endocrinol* 2010;162(6):1131-9. [\[CrossRef\]](#)

20. Wang H, Fu HL, Li JN, Zou RJ, Gu ZH, Wu JC. The role of single-photon emission computed tomography/computed tomography for precise localization of metastases in patients with differentiated thyroid cancer. *Clinical Imaging* 2009;33(1):49-54. [\[CrossRef\]](#)
21. Wong KK, Zazhevsky N, Cahill JM, Frey KA, Avram AM. Incremental value of diagnostic ¹³¹I SPECT/CT fusion imaging in the evaluation of differentiated thyroid carcinoma. *AJR Am J Roentgenol* 2008;191(6):1785-94. [\[CrossRef\]](#)
22. Aide N, Heutte N, Rame JP, Rousseau E, Loiseau C, Henry-Amar M, et al. Clinical relevance of single-photon emission computed tomography/computed tomography of the neck and thorax in postablation ¹³¹I scintigraphy for thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94(6):2075-84. [\[CrossRef\]](#)
23. de Pont C, Halders S, Bucerius J, Mottaghy F, Brans B. ¹²⁴I PET/CT in the pretherapeutic staging of differentiated thyroid carcinoma: comparison with posttherapy ¹³¹I SPECT/CT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2013;40(5):693-700. [\[CrossRef\]](#)
24. Oh JR, Byun BH, Hong SP, Chong A, Kim J, Yoo SW, et al. Comparison of ¹³¹I whole-body imaging, ¹³¹I SPECT/CT, and ¹⁸F-FDG PET/CT in the detection of metastatic thyroid cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2011;38(8):1459-68. [\[CrossRef\]](#)
25. Menges M, Uder M, Kuwert T, Schmidt D. ¹³¹I SPECT/CT in the follow-up of patients with differentiated thyroid carcinoma. *Clin Nucl Med* 2012;37(6):555-60. [\[CrossRef\]](#)
26. Salvatori M, Perotti G, Villani MF, Mazza R, Maussier ML, Indovina L, et al. Determining the appropriate time of execution of an I-¹³¹ post-therapy whole-body scan: comparison between early and late imaging. *Nucl Med Commun* 2013;34(9):900-8. [\[CrossRef\]](#)
27. Mustafa M, Kuwert T, Weber K, Knesewitsch P, Negele T, Haug A, et al. Regional lymph node involvement in T1 papillary thyroid carcinoma: a bicentric prospective SPECT/CT study. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2010;37(8):1462-6. [\[CrossRef\]](#)
28. Sergieva S, Robev B. ¹³¹I SPECT-CT imaging in management of differentiated thyroid carcinoma (DTC). *J Nucl Med* 2016;57(Suppl. 2):1517.

RUTİN SAĞLIK TARAMASI YAPILAN BİREYLERDE VİTAMİN D DÜZEYLERİ

VİTAMİN D LEVELS IN ROUTINE MEDICAL EXAMINATION

Abdülhalim Şenyiğit* , Timur Orhanoğlu* , Burak İnce** , Bülent Yaprak*** 

*Biruni Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı ve Istanbul Medicine Hospital, İstanbul, Türkiye

**İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

***Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Cite this article as: Şenyiğit A, Orhanoğlu T, İnce B, Yaprak B. Vitamin D Levels in Routine Medical Examination. J Ist Faculty Med 2018; 81(4): 115-118.

ÖZET

Amaç: D vitamini eksikliği dünya genelindeki gibi Türkiye’de de önemli halk sağlığı sorunlarından ve literatürde özellikle yaşlı popülasyonda osteoporoz, düşme riski ve kırıklar gibi birçok morbidite ile ilişkili olduğunu gösteren veriler mevcuttur.

Gereç ve Yöntem: 2013-2016 yılları arasında rutin sağlık taraması amacıyla Istanbul Medicine Hospital’e başvuran 23-92 yaşları arasında 688 bireyin serum 25-hidroksi (OH) vitamin D düzeyleri retrospektif olarak incelendi.

Bulgular: Olguların %72’sinde vitamin D eksikliği olduğu izlendi (25-OH vitamin D <20 ng/mL). 65 yaş üstü olgularda (n=136) 25-OH Vitamin D düzeyi gençlere göre anlamlı olarak düşük izlendi (n=552) (16,9±12,5 vs. 15,6±13,9 ng/mL, p<0,05). Ayrıca kadın olgularda 25-OH vitamin D düzeyinin erkeklere göre anlamlı olarak düşük olduğu saptandı. (17,2±11,5 vs. 15,9±14,4 ng/mL, p<0,01). Her iki yaş grubu cinsiyetlere göre ayrı ayrı değerlendirildiğinde istatistiksel anlamlılığın devam ettiği görüldü.

Sonuç: 65 yaş üstü kadın olgular başta olmak üzere tüm toplumda vitamin D eksikliği taramaları etkin bir şekilde yapılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Rutin sağlık taraması, Vitamin D eksikliği, yaşlı kadın

GİRİŞ

D vitamini yağda eriyen vitaminlerden biridir. Az sayıda gıdada bulunur bu yüzden deri sentezi, D vitamininin ana kaynağıdır. Diyet ile alınan ve deride sentezlenen vitamin D biyolojik olarak aktif değildir. Aktif metabolitlere enzimatik dönüşüm gerekir.

D vitamini enzimatik olarak karaciğerde 25-hidroksi vitamin D’ye (25 (OH) D) ve böbreklerde aktif form olan 1,25-dihid-

ABSTRACT

Objective: Vitamin D deficiency is a serious public healthcare problem throughout the world and is related to multiple comorbidities, including osteoporosis, falls, and fractures, particularly in the geriatric population.

Materials and Methods: We retrospectively determined the serum 25 hydroxy (OH) vitamin D levels in 688 patients admitted to Istanbul Medicine Hospital for routine medical examination between 2013 and 2016.

Results: Serum 25 OH vitamin D levels were <20 ng/mL in 72% of subjects (vitamin D deficiency). The 25 OH vitamin D levels in subjects aged >65 years (n=136) were significantly lower than those in the younger cohort (n=552) (16.9±12.5 vs. 15.6±13.9 ng/mL, p<0.05). Women (n=290) had significantly lower levels than men (n=398) (17.2±11.5 vs. 15.9±14.4 ng/mL, p<0.01). A significant difference was observed between age groups in both genders separately.

Conclusion: Vitamin D levels must be monitored widely among the population, especially in elderly women.

Keywords: Elderly women, routine medical examination, vitamin D deficiency

roksi vitamin D’ye dönüştürülür. D vitamini eksikliği deride yetersiz yapım, diyetle alımda bozulma, karaciğer ve böbrekte aktivasyonunda bozulma ve biyolojik etkilere direnç gelişimiyle meydana gelir. Kış mevsimi, yüksek rakım, güneşe maruz kalma süresi ve güneşe maruz kalan cilt alanı gibi faktörler sentezini etkileyebilir (1-3). Erişkinlerde D vitamini eksikliği klinikte sıklıkla hipofosfatemi ve hipokalsemiyle ortaya çıkar. Özellikle hipofosfatemi erken dönemde tespit edilebilir. Mevcut eksikler osteomalaziye yol açar.

İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: drburakinca@gmail.com

Geliş tarihi/Received Date: 06.02.2018 • **Kabul tarihi/Accepted Date:** 17.07.2018

©Copyright 2018 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

©Telif Hakkı 2018 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

Subklinik D vitamini eksikliği gelişmiş ülkelerde de sıklıkla ortaya çıkmaktadır ve osteoporoz, düşme riski ve kırıklarla ilişkilidir (4). D vitamini yeterliliğinin en iyi laboratuvar göstergesi serum 25 (OH) D konsantrasyonudur (5). 25 (OH) D düzeyleri için normalin alt sınırı, referans popülasyonun coğrafi konumuna ve güneş ışığına maruz kalma oranına bağlı olarak değişir. Bununla birlikte, iskelet veya iskelet dışı sağlık açısından optimum 25 (OH) D konsantrasyonu üzerinde fikir birliği bulunmamaktadır. Serum paratiroid hormon düzeyleri de tipik olarak 25 (OH) D düzeyleri ile ters korelasyonda olduğu için kullanılabilir ikincil bir parametre olarak düşünülmektedir.

Türkiye'de vitamin D eksikliği ve yetersizliği önemli sağlık sorunlarından biridir. Bu çalışmada, daha önce hastanemize başvurmuş onsekiz yaş üzeri bireylerde D vitamini eksikliğinin sıklığı ve yaş ile cinsiyete göre 25 (OH) D düzeyleri arasında anlamlı bir fark olup olmadığı araştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

2013-2016 yılları arasında İstanbul Medicine Hastanesi'ne rutin sağlık taraması amacı ile başvuran hastalardan 25 (OH) D düzeyi çalışılanlar hastane otomasyon sistemi üzerinden retrospektif olarak incelendi. Tarama retrospektif olarak gerçekleştirildiği ve rutin tarama esnasında elde edilen veriler kullanıldığı için etik kurul başvurusu ve aydınlatılmış onam alınmadı. İntestinal malabsorpsiyon, renal disfonksiyon, hipo-hipertiroidi, kalsiyum ve fosforun tubuler reabsorpsiyonunu etkileyen ilaç ya da D vitamini supplement kullanımı mevcut olan hastalar çalışma dışı bırakıldı. Araştırmaya katılan hastalar (n=688) yaş gruplarına göre sınıflandırıldı. 25 (OH) D düzeyleri, ağır vitamin D eksikliği (<10 ng/mL), vitamin D eksikliği (≤20 ng/mL), vitamin D yetersizliği (21-29 ng/mL), yeterli vitamin D (≥30 ng/mL) şeklinde gruplara ayrıldı.

25 (OH) D vitamini düzeyleri Roche Cobas E 601 cihazında elektrokemiluminesans immunoassay (ECLIA) yöntemi ile çalışıldı.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler için NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007 İstatistiksel Yazılımı (Utah, USA) programı kullanıldı. Verilerin değerlendirilmesinde tanımlayıcı istatistiksel metodların (Ortalama, Standart sapma, medyan, sıklık, oran) yanısıra normal dağılım göstermeyen parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Kruskal Wallis test ve farklılığa neden çıkan grubun tespitinde ve iki grup değerlendirmelerinde Mann Whitney U test kullanıldı. Sonuçlar %95'lik güven aralığında, anlamlılık p<0,05 düzeyinde değerlendirildi.

BULGULAR

Olguların %42,2'si (n=290) kadın, %57,8'i (n=398) erkek olmak üzere 688 olgu ile gerçekleştirilmiştir. Olgula-

Tablo 1. Tanımlayıcı özelliklerin dağılımları

Yaş (yıl)	Min-Mak (Medyan)	23-92 (50)
	Ort±Ss	51,96±13,89
	<65	552 (80,2)
	>65	136 (19,8)
Cinsiyet; n (%)	Kadın	290 (42,2)
	Erkek	398 (57,8)
25-Hidroksi Vitamin D (n=680)	Min-Mak (Medyan)	1,20-126,0 (13,05)
	Ort±Ss	16,64±12,81
	<10	255 (37,1)
	10-20	240 (34,9)
	21-30	126 (18,3)
	>30	59 (8,6)

Min: minimum; mak: maksimum; ort±ss: ortalama±standart sapma

rın yaşları 23 ile 92 arasında değişmekte olup, ortalama 51,96±13,89 yıldır (Tablo 1).

Cinsiyetlere göre 25 (OH) D düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır (p<0,01); kadın olgularda 25 (OH) D düzeyi erkeklerden anlamlı olarak düşük bulunmuştur (Tablo 2).

Yaşlara göre de 25 (OH) D düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır (p<0,05); 65 yaş üzeri olgularda 25 (OH) D düzeyi 65 yaş altındakilerden anlamlı olarak düşük bulunmuştur (Tablo 2).

Yaşı 65'in altında olan olgularda; cinsiyetlere göre 25 (OH) D düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır (p<0,01); kadın olgularda 25 (OH) D düzeyi erkeklerden anlamlı olarak düşük bulunmuştur (Tablo 2).

Yaşı 65 ve üzerinde olan olgularda; cinsiyetlere göre 25 (OH) D düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır (p<0,05); kadın olgularda 25 (OH) D düzeyi erkeklerden anlamlı olarak düşük bulunmuştur (Tablo 2).

TARTIŞMA

Institute of Medicine (IOM), 20 ng/mL (50 nmol/L) serum 25 (OH) D konsantrasyonunun çoğu birey için yeterli olduğu sonucuna varmıştır (5). Fakat bir çok dernek (Endokrin Derneği, Ulusal Osteoporoz Vakfı [NOF], Uluslararası Osteoporoz Vakfı [IOF], Amerikan Geriatri Topluluğu [AGS]), yaşlılarda 25 (OH) D konsantrasyonunun minimum 30 ng/mL (75 nmol/L) düzeyinin düşme ve kırılma riskini en aza

Tablo 2. 25-Hidroksi vitamin D düzeyleri değerlendirmeleri

25-Hidroksi Vitamin D	Cinsiyet		Yaş		<65 yaş		≥65 yaş	
	Erkek	Kadın	<65	≥65	Erkek	Kadın	Erkek	Kadın
N	393	287	545	135	348	197	45	90
Min-Mak (medyan)	4-126 (14,7)	1,2- 6 (10,4)	1,2-126 (13,3)	4-126 (11,2)	4-92,9 (14,6)	1,2-126 (11,1)	5-126 (15,2)	4-64,4 (9,4)
ort±SD	17,18±11,49	15,91±14,43	16,92±12,52	15,55±13,94	17,18±10,51	16,46±15,48	17,24±17,51	14,7±11,78
ap	0,001**		0,016*		0,001**		0,015*	
<10	115 (29,3)	140 (48,8)	194 (35,6)	61 (45,2)	103 (29,6)	91 (46,2)	12 (26,7)	49 (54,4)
10-20	162 (41,2)	78 (27,2)	194 (35,6)	46 (34,1)	139 (39,9)	55 (27,9)	23 (51,1)	23 (25,6)
21-30	86 (21,9)	40 (13,9)	108 (19,8)	18 (13,3)	77 (22,1)	31 (15,7)	9 (20)	9 (10)
>30	30 (7,6)	29 (10,1)	49 (9)	10 (7,4)	29 (8,3)	20 (10,2)	1 (2,2)	9 (10)

^aMann Whitney U test

*p<0,05, **p<0,01

min: minimum; mak: maksimum; ort±ss: ortalama±standart sapma

indirmek için gerekli olduğunu belirtmişlerdir (6-10). AGS ve NOF, yaşlı erişkinlere (≥65 yaş) Vitamin D takviyesinin günlük 1000 IU olması önermektedir.

Vitamin D eksikliğini değerlendiren bir çalışmada, (<20 veya <30 ng/mL) vitamin D seviyeleri baz alınarak 2005-2006 yılları arasında yapılan Ulusal Sağlık ve Beslenme İnceleme Anketi'nde (NHANES) (≥20 yaş), % 41,6 erişkinde 25 (OH) D düzeyleri 20 ng / mL'nin (50 nmol/L) altında saptanmıştır (11). Bizim çalışmamızda, ağır vitamin D eksikliği %37,1, vitamin D eksikliği %34,9, vitamin D yetersizliği %18,3, vitamin D yeterliliği %8,6 oranında saptanmıştır. Karachi bölgesinde (Pakistan) yapılan çalışmada, ortalama vitamin D düzeyi 16.44 ng/mL saptanmış ve 20 ng/ml değerini vitamin D eksikliği için sınır değer olarak aldıklarında %69,9 vitamin D eksikliği ve %21,1 oranında vitamin D yetersizliği tespit etmişlerdir (12). Vitamin D yetersizliği, ABD'de sağlıklı genç erişkinlerde % 36 ve genel toplumda % 57 oranında bildirilmiştir (13).

Vitamin D eksikliğinin cinsiyetlere göre dağılımı konusunda literatürde çelişkili sonuçlar mevcuttur. Al-Horani ve ark. (14) gerçekleştirdiği vitamin D eksikliğinin hiperlipidemi ile ilişkisini inceleyen 390 kişilik çalışmada, vitamin D eksikliği çalışmamıza benzer şekilde kadın olgularda daha sık saptanmıştır. Norveçte yapılan 2126 hastanın katıldığı çalışmada ise erkeklerde daha yüksek oranda görüldüğü bildirilmiştir (15). Çalışmamızda her iki yaş grubunda; cinsiyetlere göre vitamin D düzeyleri arasında anlamlı farklılık saptanmıştır ve kadın olgularda anlamlı olarak erkeklerden düşük bulunmuştur ancak, ülkemizde Mert ve ark. (16) tarafından gerçekleştirilen ve 760 hastanın katıldığı çalışmada hastaların cinsiyetlere

göre 25 (OH) D, düzeltilmiş kalsiyum ve fosfor düzeyleri arasında fark saptanmamıştır. Çalışmamızın retrospektif olması nedeniyle olgularımız arasındaki mevsimsel fark değerlendirilememiştir. Yine aynı nedenle değerlendirilememiş olmasına rağmen, merkezimizin bulunduğu bölge itibarıyla kadın popülasyonun büyük kısmının tesettürlü olmasının kadın olgulardaki yüksek vitamin D eksikliğine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Bu veri kronik hastalıklar, polifarmasi, sosyoekonomik düzey, diyet farklılıkları, mevsimsel farklılıklar ve güneş ışığına yeterli maruziyet açısından daha geniş gruplarda değerlendirilmelidir.

D vitamininin deri ile üretimi ileri yaş ile ve kuzey enlemlerinde azalmaktadır (3). Buna ek olarak, yaşlı bireylerde D vitamini alımı genellikle düşüktür. Örnek olarak, Fransa'da yaşayan postmenopozal kadınlar üzerine yapılan çalışmada, gıdalar ile günlük ortalama D vitamini alım miktarının 144,8 IU/gün, hastaların 1/3'ünde ise <100 IU/gün olduğu tespit edilmiş (17). Çalışmamızda 65 yaş üzeri olgularda vitamin D düzeyi 65 yaş altındakilerden anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Özellikle yaşlı popülasyonda vitamin D eksikliğinin immobilitate, düşme ve fragilite fraktürü riskinin yanında, kardiyovasküler ölüm, tip 2 diyabet, kolorektal malignite riskinde artışla ilişkisini bildiren yayınlar mevcuttur (18, 19).

SONUÇ

Geriatrik popülasyon ön planda olmak üzere tüm toplumda D vitamini düzeyi taramalarının yaygınlaşması ve uygun replasmanın sağlanması bir halk sağlığı sorunu olarak ele alınmalıdır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - A.Ş.; Tasarım - A.Ş., T.O.; Denetleme - T.O.; Kaynaklar - A.Ş.; Malzemeler - T.O.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - A.Ş., T.O., B.İ.; Analiz ve/veya Yorum - T.O., B.İ.; Literatür Taraması - B.İ., B.Y.; Yazıyı Yazan - B.İ.; Eleştirel İnceleme -B.Y.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - A.Ş.; Design - A.Ş., T.O.; Supervision - T.O.; Resources - A.Ş.; Materials - T.O.; Data Collection and/or Processing - A.Ş., T.O., B.İ.; Analysis and/or Interpretation - T.O., B.İ.; Literature Search - B.İ., B.Y.; Writing Manuscript - B.İ.; Critical Review - B.Y.

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. Arioğlu S. Yaşlıda malnütrisyon ve tedavisi. 2013.
2. Pearce SH, Cheetham TD. Diagnosis and management of vitamin D deficiency. *BMJ* 2010;340:b5664. [CrossRef]
3. MacLaughlin J, Holick MF. Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D3. *J Clin Invest* 1985;76(4):1536-8. [CrossRef]
4. Webb AR, Kline L, Holick MF. Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D3: exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D3 synthesis in human skin. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;67(2):373-8. [CrossRef]
5. IOM (Institute of Medicine). 2011. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Washington, DC: The National Academies Press. p:345-362.
6. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(7):1911-30. [CrossRef]
7. Vieth R. What is the optimal vitamin D status for health? *Prog Biophys Mol Biol* 2006;92(1):26-32. [CrossRef]
8. Dawson-Hughes B, Mithal A, Bonjour JP, Boonen S, Burckhardt P, Fuleihan GE, et al. IOF position statement: vitamin D recommendations for older adults. *Osteoporos Int* 2010;21(7):1151-4. [CrossRef]
9. American Geriatrics Society Workgroup on Vitamin DSfOA. Recommendations abstracted from the American Geriatrics Society Consensus Statement on vitamin D for prevention of falls and their consequences. *J Am Geriatr Soc* 2014;62(1):147-52. [CrossRef]
10. Cosman F, de Beur SJ, LeBoff MS, Lewiecki EM, Tanner B, Randall S, et al. Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. *Osteoporos Int* 2014;25(10):2359-81. [CrossRef]
11. Forrest KY, Stuhldreher WL. Prevalence and correlates of vitamin D deficiency in US adults. *Nutr Res* 2011;31(1):48-54. [CrossRef]
12. Mansoor S, Habib A, Ghani F, Fatmi Z, Badruddin S, Mansoor S, et al. Prevalence and significance of vitamin D deficiency and insufficiency among apparently healthy adults. *Clin Biochem* 2010;43(18):1431-5. [CrossRef]
13. Holick MF. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc* 2006;81(3):353-73. [CrossRef]
14. Al-Horani H, Abu Dayyih W, Mallah E, Hamad M, Mima M, Awad R, et al. Nationality, gender, age, and body mass index influences on vitamin D concentration among elderly patients and young Iraqi and Jordanian in Jordan. *Biochem Res Int* 2016;2016:8920503. [CrossRef]
15. Lagunova Z, Porojnicu AC, Lindberg F, Hexeberg S, Moan J. The dependency of vitamin D status on body mass index, gender, age and season. *Anticancer Res* 2009;29(9):3713-20. [CrossRef]
16. Mert M, Tamer G, Gunay N, Kartal I, Piskinpasa H, Karakaya P, et al. Is there any threshold for vitamin D that elevates parathyroid hormone. *Open J Endocr Metab Dis* 2017;7:97-110. [CrossRef]
17. Czernichow S, Fan T, Nocea G, Sen SS. Calcium and vitamin D intake by postmenopausal women with osteoporosis in France. *Curr Med Res Opin* 2010;26(7):1667-74. [CrossRef]
18. Boucher BJ. The problems of vitamin d insufficiency in older people. *Aging Dis* 2012;3(4):313-29.
19. Janssen HC, Samson MM, Verhaar HJ. Vitamin D deficiency, muscle function, and falls in elderly people. *Am J Clin Nutr* 2002;75(4):611-5. [CrossRef]

SPERMATOZOA VE EMBRİYOLARIN GEN EKSPRESYON ANALİZİ ÖNCESİNDE RNA İZOLASYONU VE HÜCRESEL RNA MİKTARLARININ BELİRLENMESİ

RNA ISOLATION AND DETECTION OF CELLULAR RNA QUANTITY OF SPERMATOZOA AND EMBRYOS PRIOR TO GENE EXPRESSION ANALYSES

Bilge ÖZSAİT SELÇUK* , Neslihan ÇOBAN** , Dilek SEVER KAYA** , Sibel BULGURCUOĞLU KURAN*** , Selva TÜRKÖLMEZ**, Özlem DURAL***

*İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Ana Bilim Dalı ve İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Ana Bilim Dalı, Reprodüktif Endokrinoloji ve İnfertilite Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

**İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

***İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Ana Bilim Dalı, Reprodüktif Endokrinoloji ve İnfertilite Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Cite this article as: Özsait Selçuk B, Çoban N, Sever Kaya D, Bulgurcuoğlu Kuran S, Türkölmez S, Dural Ö. RNA Isolation and Detection of Cellular RNA Quantity of Spermatozoa and Embryos Prior to Gene Expression Analyses. J Ist Faculty Med 2018; 81(4): 119-126.

ÖZET

Amaç: Üreme biyolojisi araştırmalarında kullanılan örnekler genellikle, zor ulaşılabilir, nadir ve tekrarı olmayan hücre gruplarıdır. Diğer yandan, az sayıda hücre ile çalışıldığından dolayı, genetik analizlerde standart olarak kullanılan yöntemlerde modifikasyonlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada amacımız, gen ekspresyonu araştırmalarında kullanılabilecek optimal düzeydeki total RNA'nın elde edilebilmesi amacı ile spermatozoa ve embriyo örneklerinden RNA izolasyon yönteminin geliştirilmesidir.

Gereç ve Yöntem: Yardımla üreme tedavisi kapsamında kullanılmak amacı ile hazırlanan ve fertilizasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra geriye kalan spermatozoa örneği diğer kontaminant hücrelerden saflaştırılarak dondurulmuştur. Diğer yandan, embriyo transferinden sonra geriye kalan preimplantasyon dönem embriyolar fosfat tamponlu tuz – polivinil alkol (PBS-PVA) karışımı içerisinde dondurularak saklanmıştır. Spermatozoa ve embriyolardan optimal düzeyde total RNA elde edilmesi amacı ile çeşitli optimizasyonlar yapılmıştır. Elde edilen total RNA'lar kaliteleri ve miktarları açısından değerlendirilmiştir. Spermatozoonda 28S ribozomal RNA (rRNA)'nın seçimli olarak degrade olmasından dolayı total RNA kalitesi, Bioanalyzer cihazı ile gerçekleştirilen analize ek olarak gerçek zamanlı kantitatif PCR ile gen amplifikasyonu yapılarak da kontrol edilmiştir.

Bulgular: İzolasyonda yapılan uyarlamalardan sonra, takip eden gen ekspresyonu çalışmalarında kullanılabilecek kalitede ve miktarda total RNA elde edilmiştir. Ek olarak, örneklerden elde edilen hücresel total RNA miktarlarının önceki çalışmalar ile uyumlu olduğu belirlenmiştir.

ABSTRACT

Objective: Biological samples that are analyzed in reproductive biology are generally rare, difficult to obtain, and a nonreplicable group of cells. Furthermore, investigating low numbers of cells requires modifications to the routine methods used in genetic analyses. The aim of our study was to improve RNA isolation methods for obtaining a sufficient amount of total RNA from spermatozoa and embryo samples for downstream gene expression analyses.

Materials and Methods: Excess spermatozoa samples (that had been prepared in the scope of assisted reproduction treatment) were purified of any contaminant cells and then frozen. Preimplantation stage embryos that had not been selected for embryo transfer were frozen in a phosphate-buffered saline–polyvinyl alcohol (PBS–PVA) solution. Modifications were done to obtain the optimal amount of total RNA from the spermatozoa and embryos, and subsequently both the quality and the quantity of the total RNA samples were assessed. Because of the selective degradation of 28S RNA samples in the spermatozoa, the total RNA quality was evaluated by gene amplification using quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) in addition to Bioanalyzer analysis.

Results: Following the modifications to the isolation technique, a sufficient quality and quantity of total RNA were obtained from the spermatozoa and embryo samples, which could be used in downstream gene expression analyses. Furthermore, the amount of cellular total RNAs was consistent to that reported in previous studies.

İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: ozsaitb@istanbul.edu.tr

Geliş tarihi/Received Date: 19.04.2018 • **Kabul tarihi/Accepted Date:** 23.07.2018

©Copyright 2018 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

©Telif Hakkı 2018 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

Sonuç: Daha sonra yapılması planlanan transkript profillemeye araştırmaları için ön bir çalışma olarak gerçekleştirilen bu deneylerin sonucunda elde edilen bulgular, RNA izolasyon protokollerinde yapılan uyarlamaların etkin olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Spermatozoon, preimplantasyon dönem embriyo, RNA

Conclusion: Results obtained from these experiments - conducted as a preliminary work for further transcript profiling studies - indicate that the modifications used in the RNA isolation techniques were effective.

Keywords: Spermatozoon, preimplantation stage embryo, RNA

GİRİŞ

İnfertilite, üreme çağındaki bireylerin yaklaşık %15'ini etkileyen bir sorundur (1). İnfertil çiftlerin tedavisinde kullanılan yardımcı üreme teknikleri, normal şartlarda gebeliğin oluşamayacağı durumlarda bireylere kendi genetik özelliklerini taşıyan çocuk sahibi olma şansını tanımaktadır. Yardımla üreme tedavisi (YÜT) sırasında oosit ve spermatozoonun özelliklerine ve de infertilite nedenine bağlı olarak çeşitli kalitede embriyolar elde edilebilmektedir. Bu tedavi kapsamında embriyo transferi için kaliteli embriyonun seçimi temel olarak, gelişen embriyoların morfolojik özelliklerine dayanarak yapılmaktadır (2-4). Diğer yandan, YÜT'nin başarısı sadece transfer edilen embriyo kalitesi ile ilişkili değil, anne adayının yaşı, endometrium kalitesi, hormon profili ve çiftin infertilite hikayesi gibi diğer değişkenler ile de bağlantılıdır. Ancak, henüz kesin olarak açıklanamayan moleküler nedenlerden dolayı, bazı olgularda tüm tedavi ve teknik basamaklar en iyi şekilde sonuçlansa bile kaliteli embriyo gelişimi olmamakta ya da kaliteli embriyoların anne adayına transferinden sonra gebelik elde edilememektedir. Güncel verilerin sonuçlarına göre, uygulanan her üç tedavi siklusundan iki tanesi implantasyon başarısızlığı ile sonuçlanmakta ve transfer edilen her on embriyodan sekizi implante olamamaktadır (5).

Fertilizasyondan sonra oosit evresinden zigot aşamasına geçiş ve sonrasında erken bölünme evresindeki embriyonun gelişimi son derece yüksek düzeyde kontrol edilen karmaşık mekanizmalar ile düzenlenmektedir (6). Bu mekanizmaların tanımlanması amacı ile genom, transkriptom, proteom, metabolom ve sekretom analizlerinden oluşan ve geniş bir yelpazeyi kapsayan araştırmalar yapılmaktadır (7-10). Bu analizlerden elde edilen bulgular, preimplantasyon dönem embriyolarının gelişim özellikleri hakkındaki bilgilerimize önemli katkı yapmış olsa da henüz kesinleşmiş verilere ulaşamamıştır (8).

Transkriptom, bir dokuya ya da gelişim evresine özgü gen ekspresyon ürünlerinin (transkriptlerin) tümü olarak tanımlanmaktadır. Transkript profillemeye araştırmalarında güncel olarak kullanılan yöntemler arasında RNA dizileme (RNA-seq) yöntemi, mikroarray analizi ve kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) sayılabilir (11). Üreme biyolojisinde araştırmalarda kullanılan örnekler genellikle, zor ulaşılabilir, nadir ve tekrarı olmayan hücre gruplarıdır. Preimplantasyon dönemde embriyo gelişimi ve araştırılmasında yürütülen transkriptomik analizler, granülosa, kümülüs, oosit, spermatozoa ve embriyolardan elde edilen blastomer hücreleri ve follikül sıvısını kapsamaktadır (12-14).

Diğer yandan, örneğin spermatozoa hücrelerinde olduğu gibi diğer somatik hücrelere kıyasla çok daha az oranda RNA (15-17) ile uğraşıldığından dolayı genetik analizlerde kullanılan standart yöntemlerde modifikasyonlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada amacımız, spermatozoa ve embriyo hücrelerinden gen ekspresyonu araştırmalarında kullanılacak optimal düzeyde total RNA'nın elde edilebilmesi amacı ile RNA izolasyon yönteminin geliştirilmesidir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hasta Seçimi

Çalışmada kullanılan örnekler, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Reprodüktif Endokrinoloji ve İnfertilite Bilim Dalı'na infertilite tedavisi amacıyla başvuran ve yardımcı üreme tekniklerinden yararlanan çiftlerin rızası ile alınmıştır. Spermatozoa değerlendirilmesi için çalışmaya davet edilme kriterleri, yardımcı üreme tekniklerinin uygulanacağı gün yapılan spermiyogram analizinde, Dünya Sağlık Örgütü'nün 2010 kriterlerine (18) göre normozoospermi, oligozoospermi, teratozoospermi veya astenozoospermi gözlenen örneğe sahip erkek bireyin olması ve tanısı koyulan herhangi bir kadın faktörünün olmadığı durumdur. Çalışma dışı bırakılma kriterleri ise, (1) spermiyogramda 1×10^6 /ml ve üzerinde yuvarlak hücre ya da enfeksiyon varlığının belirlenmesi; (2) erkek faktörü haricinde eşlik eden kadın infertilite endikasyonlarının varlığı şeklindedir.

Embriyo değerlendirilmesi için dahil edilme kriterleri, (1) embriyo transferinden sonra geriye kalan fazla sayıda embriyoların olması ancak, embriyoların kriyoprezervasyon için yeterli kalitede olmaması nedeni ile hali hazırda imha edilecek olması, (2) embriyo transferi sonrasında kriyoprezervasyon için uygun kalitede embriyoların var olması ancak, çiftin bu işlemi kabul etmemesi nedeni ile embriyoların hali hazırda imha edilecek olması şeklinde belirlenmiştir.

Bu çalışmada kullanılan örnekler için İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun onayı alınmıştır (Belge No: 737, 937 ve 1360).

Örneklerin Hazırlanması

Bu çalışmada, YÜT'de kullanılmak amacı ile 90:45 yoğunluk gradient yöntemi hazırlanmış olan ve fertilizasyon işlemi sonrasında artan spermatozoa örnekleri çalışılmıştır. Örnekler, semende bulunabilecek olan rezidüel cisim-

çik, epitel ve lenfosit hücre kontaminasyonunu önlemek amacı ile ikinci kere 90:45 yoğunluk gradient yöntemi hazırlanarak saflaştırılmıştır (19). Ardından, ışık mikroskobu altında değerlendirilerek sayım yapılmış ve epitel ve lenfosit hücrelerinin olmadığı doğrulanmıştır. Daha sonra örnekler, 600 g'de 5 dk santrifüj edilmiş ve elde edilen pellet üzerine RNaz içermeyecek şekilde hazırlanmış olan ve buz soğukluğundaki fosfat tamponlu tuz solusyonundan (PBS) 1,5 mL eklenerek pipetleme yolu ile yıkanmıştır. Sonrasında 600 g'de 5 dk santrifüj ile elde edilen hücre pelleti sıvı azotta şok dondurulmuştur. Genetik analiz yapılabildiği kadar örnekler sıvı azotta saklanmıştır.

Embriyo transferinden sonra geriye kalan ve kriyoprezervasyon uygulanmayan preimplantasyon dönem embriyolar, RNaz içermeyecek şekilde hazırlanan ve buz soğukluğundaki PBS-polivinil alkol (PBS-PVA) içerisinde iki kere pipetlenme yolu ile yıkanmıştır. Örnekler, sıvı azotta şok dondurulmuş ve genetik araştırma için kullanılabildiği kadar sıvı azotta saklanmıştır. Bu aşamadan sonra tüm örnekler sadece genetik analizlerde kullanılacak niteliktedirler.

Total RNA İzolasyonu

Spermatozoa ve testis biyopsisi dokusundan total RNA izolasyonu

Pellet halinde dondurularak saklanmış olan spermatozoa örneklerinden RNeasy Mini Kit (Qiagen) kullanılarak ve kit protokolünde uyarlamalar yapılarak total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Spermatozoa sayısı az olan örneklerde RNA elde etme verimliliğini arttırmak amacı çeşitli optimizasyonlar yapılmıştır. Kısaca, normozoospermik örneklerden farklı spermatozoa dilusyonları ve ağır oligozoospermi hastalarından elde edilen örnekler kullanılarak farklı koşullarda RNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Bu optimizasyonların sonucunda, kitin önerdiği şekilde RNA izolasyonuna başlamadan önce, spermatozoa pelletinin kitin homojenizasyon tamponu (RLT Buffer, Qiagen) ile enjektörden geçirilmesi ve ardından 65°C'de 30 dk inkübasyon basamakları eklendiği durumda en iyi total RNA eldesinin olduğu belirlenmiştir. Total RNA'lar 30µL RNaz içermeyen su içerisinde çözülerek -80°C'de saklanmıştır.

Testis dokusundan RNA izolasyonu için öncelikle doku homojenizasyonu yapılmış, ardından RNeasy Mini Kit (Qiagen) kullanılarak ve kitin önerdiği şekilde total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Total RNA'lar 50µL RNaz içermeyen su içerisinde çözülerek -80°C'de saklanmıştır.

Preimplantasyon dönem embriyo ve granülosa hücrelerinden total RNA izolasyonu

PBS-PVA solüsyonu içerisinde dondurulmuş olan preimplantasyon dönem embriyolar buz içerisine alınarak çözümleri sağlanmıştır. Ardından, RNAqueous-Micro Total RNA Isolation Kit (Ambion) kullanılarak ve kit prosedüründe çeşitli uyarlamalar yapılarak total RNA elde edilmiştir. Kısaca, embriyoları içeren tüpler buz üzerinde çözüldük-

ten sonra 14000 g'de 5 dk santrifüj yapılmıştır. Üst sıvı faz atılarak kit içeriğinde bulunan patlatma tamponundan (Lysis Buffer, Ambion) 100µL tüpe eklenmiş ve 3 dk süresince şiddetli vortex yapılmıştır. Bu süre içerisinde her 30 saniyede bir 15 sn süresince buzda bekletilmiş ve böylece ısınma sonucunda meydana gelecek olan RNA degradasyonu önlenmeye çalışılmıştır. Bu basamakların ardından, kit içerisinde tarif edildiği şekilde izolasyona devam edilmiştir. Bu uygulamaların sonucunda RNA amplifikasyonu ve sonrasında gen ekspresyon analizi (mikroarray ya da RNA-seq) için yeterli olarak kabul edilebilecek kalitede RNA elde edilmiştir.

Ek olarak, farklı embriyo evrelerinin yanı sıra izolasyon kontrolünde kullanılmak amacı ile farklı kalitelere granülosa hücrelerinden de total RNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon, RNAqueous-Micro Total RNA Isolation Kit (Ambion) kullanılarak ve kit prosedüründe çeşitli uyarlamalar yapılarak gerçekleştirilmiştir. Kısaca, RNA izolasyonundan önce homojenizasyon amacı ile granülosa pelleti kitin içerisinde bulunan patlatma tamponu (Lysis Buffer, Ambion) ile enjektörden geçirilmiştir. Bu işlem buz üstünde uygulanmıştır. Ardından, kitin önerdiği şekilde izolasyona devam edilmiştir.

Total RNA kalitesinin ve miktarının değerlendirilmesi

Spermatozoa ve testis biyopsisi dokularından elde edilen total RNA'nın kalitesi ve miktarının değerlendirilmesi, Agilent Bioanalyzer 2100 cihazı ve Agilent RNA 6000 Nano Kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Embriyo ve granülosa hücrelerinden elde edilen total RNA'nın değerlendirmesi ise Agilent RNA 6000 Pico Kit kullanılarak yapılmıştır. Bu değerlendirmelerde RNA fragmentasyonu ve 18S ve 28S RNA miktarları göz önüne alınmıştır.

Spermatozoa total RNA'sından cDNA sentezi

RNA izolasyon etkinliğinin test edilmesi amacı ile spermatozoal cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem, QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) ve 100 ng total RNA örneği kullanılarak yapılmıştır.

Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR Yöntemi ile Gen Amplifikasyonu

RNA izolasyon etkinliğinin test edilmesi amacı ile spermatozoal cDNA sentezi sonrasında qRT-PCR yöntemi ile beta-aktin (*ACTB*) geninin amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu işlem, LightCycler 480 sistemi, Roche LightCycler 480 SYBR Green I Master Kit (Roche) ve gene özgü primerler kullanılarak yapılmıştır. Tüm örnekler çift çalışılmış ve ortalama değerleri alınmıştır. Amplifikasyonu yapılan genin özgüllüğü "melting curve" analizi ile değerlendirilmiştir.

Amplifikasyonda kullanılan primerler manuel olarak tasarlanmıştır ve Oligoanalyzer 3.1 (IDT Technologies) ve GeneWalker (Cybergene AB) programlarından yararlanılmıştır. Primerlerin dizi özgüllükleri Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) veritabanında kontrol edilmiştir.

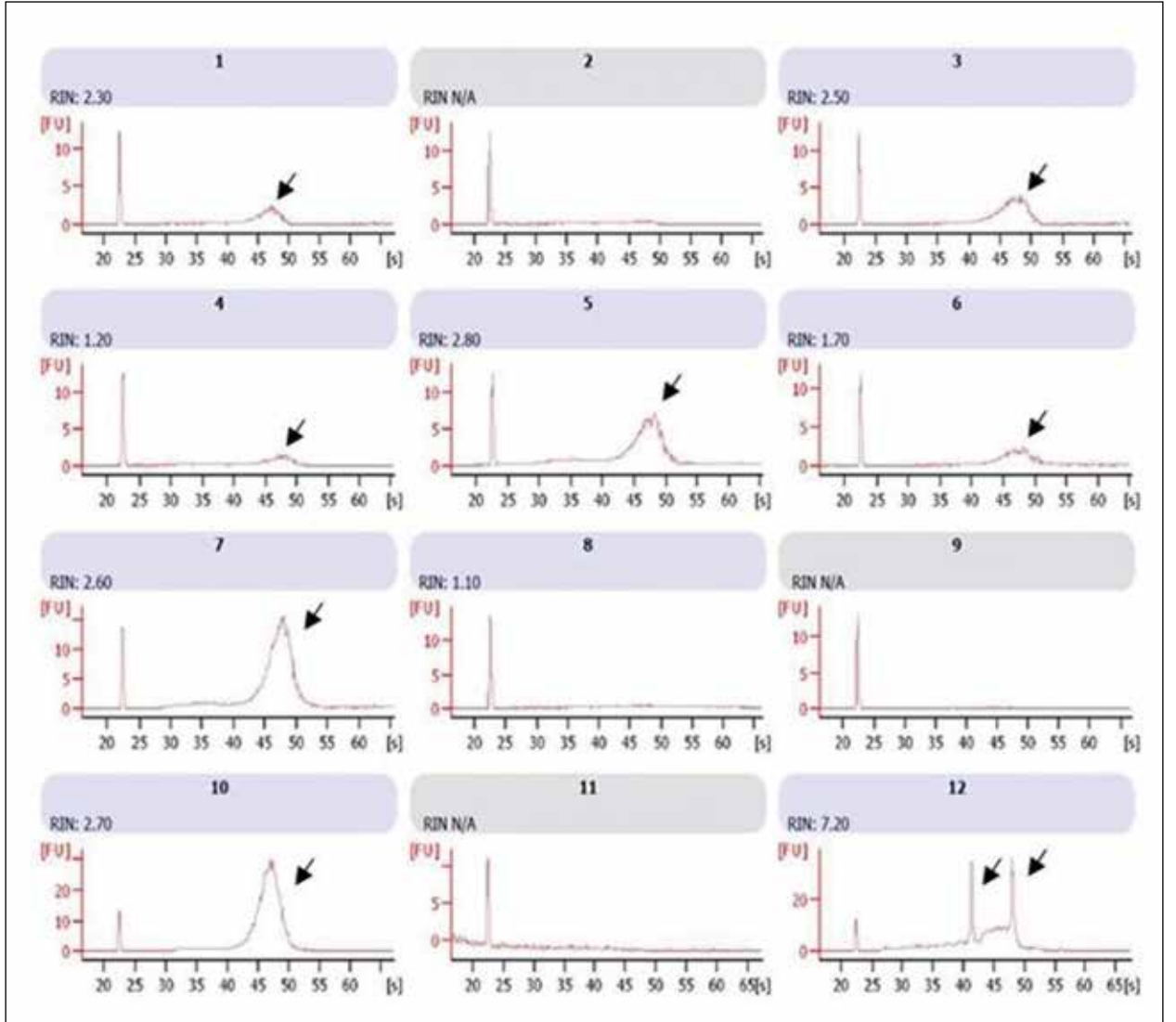
BULGULAR

Spermatozoal RNA İzolasyonu

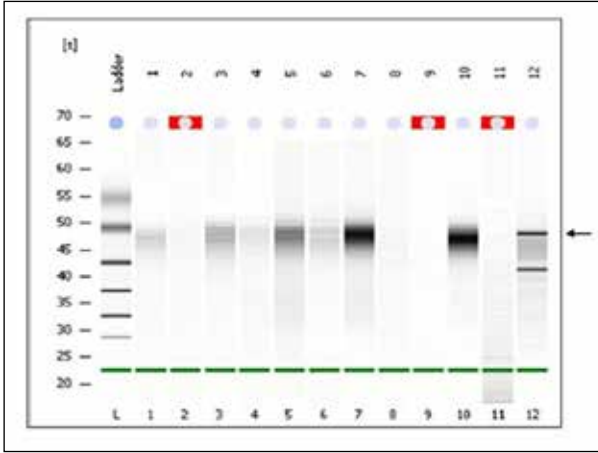
Bu çalışma kapsamında, YÜT gören ve çalışmaya katılmayı kabul eden toplam 41 adet infertil bireyden (9 normozoospermi, 18 teratozoospermi, 12 oligoastenoospermi ve 2 TESE örneği) elde edilen spermatozoa örneği hazırlanarak dondurulmuştur. Kullanılan ticari kitin prosedüründe, düşük miktarda hücre ve RNA içeren örneklerden yeterli miktarda total RNA elde edilebilecek şekilde RNA izolasyon tekniklerinde gerekli optimizasyonlar yapılmıştır. Diğer yandan, testiküler biyopsi dokularından elde edilen total RNA'lar gen ekspresyonlarının analizinde çalışma içi kontrol olarak kullanılmıştır.

Spermatozoa hücrelerinden izole edilen total RNA'ların kaliteleri ve miktarları değerlendirildiğinde elde edilen bulgular beklediğimiz sonuçlar ile uyumludur. Spermatozoal total RNA örneklerinde 28S rRNA'ya ait eğri gözlenmez iken testis dokusuna ait total RNA örneklerinde her iki rRNA eğrisi (18S ve 28S rRNA'lar) net ve degrade olmamış bir şekilde gözlenmiştir. Şekil 1'de 12 örnekten oluşan bir grubun Bioanalyzer cihazı ile analiz sonuçlarına dair elektroferogram görüntüleri sunulmuştur. Şekil 2'de ise aynı örneklerin Bioanalyzer cihazından elde edilen jel-benzeri ortamdaki görüntüsü izlenebilmektedir.

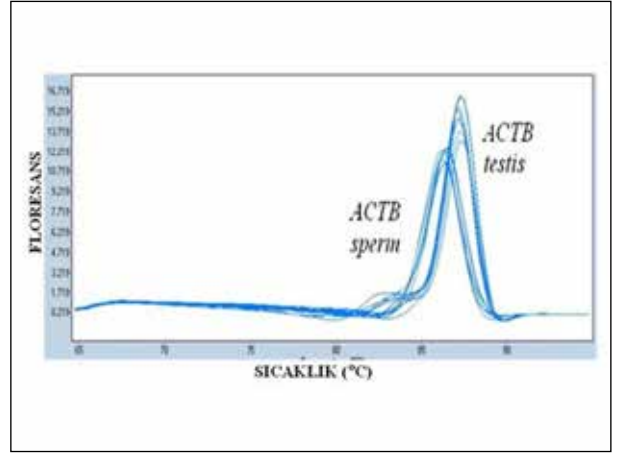
RNA izolasyonundan sonra, elde edilen total RNA miktarının hücre sayıları ile uyumlu olduğu gözlenmiştir. Bekle-



Şekil 1. Spermatozoa hücrelerinden izole edilen total RNA'ların Agilent Bioanalyzer 2100 cihazı kullanılarak yapılan değerlendirilmesi sonucunda elde edilen elektroferogram görüntüsü. İlk 11 örnekte spermatozoal RNA ve 12. örnekte testis dokusuna ait RNA örneklerinin özellikleri görülmektedir. Oklar, spermatozoada degrade durumdaki ve testis dokusundaki intakt haldeki ribozomal RNA'ları göstermektedir. 2, 8, 9 ve 11. örneklerde izolasyon başarılı olmamıştır.



Şekil 2. Spermatozoa hücrelerinden izole edilen total RNA'ların Agilent Bioanalyzer 2100 cihazı kullanılarak yapılan değerlendirilmesi sonucunda elde edilen jel-benzeri ortamda görüntüsü. İlk 11 örnekte spermatozoal RNA ve 12. örnekte testis dokusuna ait RNA örneklerinin özellikleri görülmektedir. Spermatozoal RNA'larda 28S rRNA'nın degradasyonu belirgin olarak gözlenmektedir (ok).



Şekil 3. Spermatozoa ve testis dokusuna özgü cDNA'lar ve ACTB genine özgü primerler kullanılarak gerçekleştirilen qRT-PCR ürünlerinin çözülme eğrisi ("melting curve") analizi. Analizde amplifikasyonu yapılan ürünlerin hücre/doku tipine özgü (spermatozoa ve testis) özgüllüğü izlenmektedir. Her hücre/doku tipine ait amplifikasyon ürünleri aynı sıcaklıkta çözülme göstermektedir.

nildiği üzere, oligozoospermi örneklerinde hücre sayısının azalması ile ilişkili olarak elde edilen RNA oranlarında azalma tespit edilmiştir. İzolasyon sonrasında ortalama 10-60 ng/µL total RNA elde edilmiştir. Spermatozoon başına düşen total RNA oranı ortalama olarak 86 fg (± 61) olarak tespit edilmiştir.

Spermatozoada ACTB gen amplifikasyonu

Spermatozoal RNA'nın kalitesinin değerlendirilmesi amacı ile beta-aktin geninin amplifikasyonu yapılmıştır. Spermatozoa ve testis cDNA örnekleri kullanılarak yapılan bu yöntemde elde edilen amplifikasyon ürünlerinin özgüllüğünün değerlendirildiği "melting curve" analizinde dokuya özgü farklılıkların olduğu gözlenmiştir. Bununla beraber her dokudan elde edilen ürünlerin kendi içerisinde tutarlı olduğu belirlenmiştir (Şekil 3).

Embriyo total RNA izolasyonu

Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda, yeterli miktarda RNA elde edilebilmesi için her alt grup havuzunda yaklaşık 30 adet embriyonun var olmasının gerektiği tespit edilmiştir. Her izolasyon havuzunda yaklaşık 30 adet embriyo olacak şekilde farklı koşullarda RNA izolasyonu yapılmıştır. Şekil 4'de embriyo havuzu ve granülosa hücrelerinden elde edilen total RNA'ların kalitesini gösteren elektroferogram ve jel benzeri görüntüler görülmektedir. Granülosa hücreleri, kit etkinliğinin belirlenmesi amacıyla karşılaştırma örneği olarak kullanılmıştır. İzolasyonda kullanılan embriyonik hücre sayısı granülosa hücre sayısına göre daha düşüktür, bu nedenle elde edilen total RNA miktarının daha az olması beklenmektedir. Yine aynı nedenle, jel benzeri görüntülerde de görüldüğü gibi (Şekil 5) 18S ve

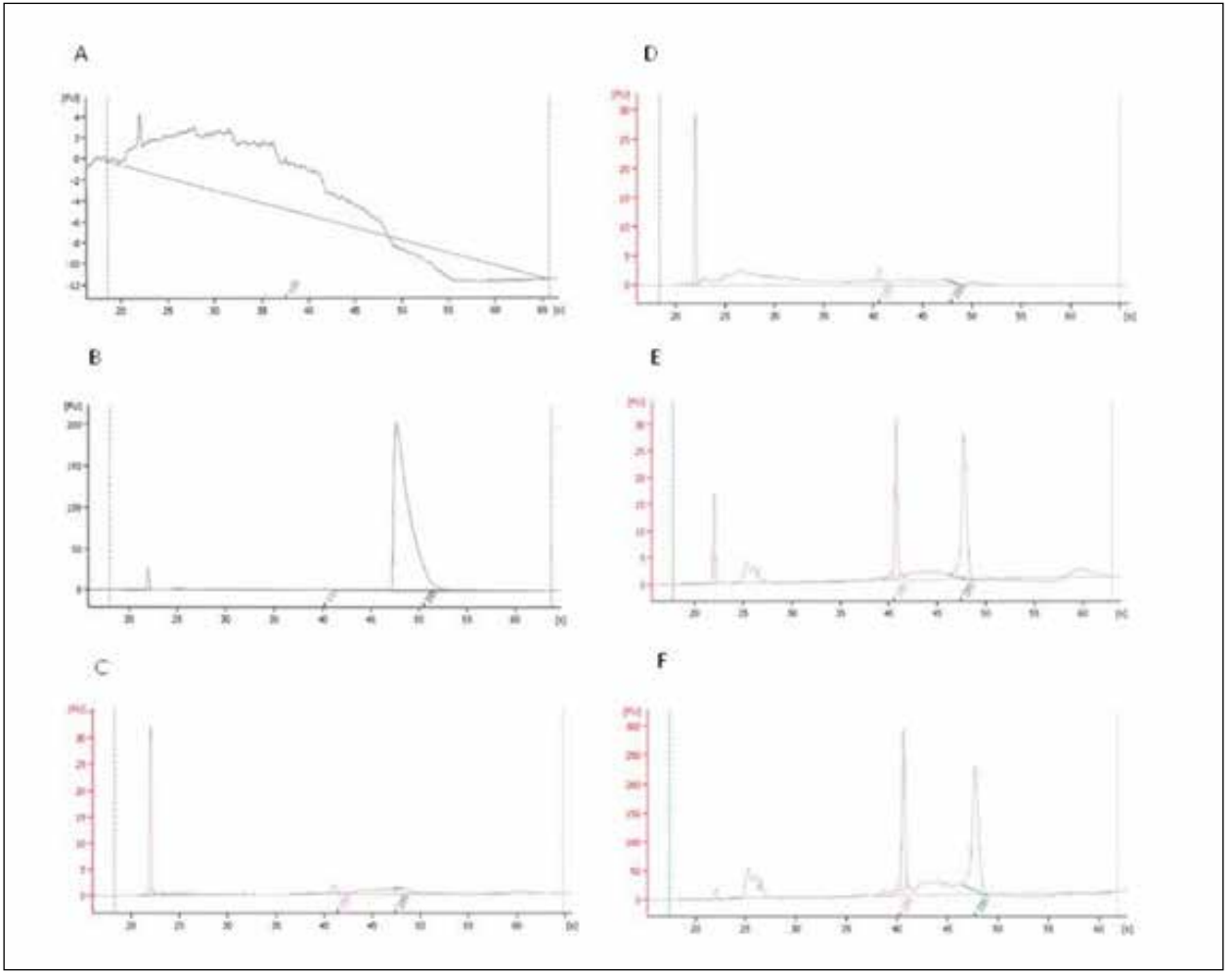
28S rRNA'lara ait bantlar granülosa hücrelerinde olduğu kadar belirgin değildir. Optimizasyon çalışmalarından sonra embriyo havuzlarında 18S ve 28S rRNA'lar daha kaliteli olarak elde edilmiştir. Ek olarak, RNA miktarı transkript profillemeye çalışmasından (RNA-seq ya da mikroarray) önce uygulanacak olan RNA amplifikasyonu için yeterli düzeye yükselmiştir. Şekil 4c ve Şekil 4d'deki görüntülerden 18S ve 28S rRNA elektroferogram görüntüleri benzer olsa da jel benzeri görüntüde bantların çok daha net ve belirgin olduğu, ekstra bantların giderildiği gözlenmektedir (Şekil 5c, d). Şekil 4a ve Şekil 4b'de optimizasyon sürecindeki sonuçlar görülmektedir.

Gelişimin üçüncü gününde 8 hücre aşamasındaki embriyo havuzunun izolasyonu sonucunda elde edilen embriyo başına total RNA eldesi 58.50 pg şeklinde olmuştur. Diğer yandan, 8 hücreli embriyoda hücre başına yaklaşık 7.31 pg total RNA elde edilmiştir.

TARTIŞMA

Hücre ya da doku tipine özel olarak tüm genomdan farklı seviyelerde eksprese olan RNA'lar, o hücre ya da dokunun işlevini yansıtan bir profil sunmaktadır. Çalışmamızda, spermatozoa ve preimplantasyon dönem embriyolardan gen ekspresyon analizi için optimal seviyede total RNA elde edilmesi için araştırma yapılmış ve hücresel total RNA miktarları belirlenmiştir.

Bu çalışmada karşılaşılan güçlüklerden birisi, spermatozoal RNA'ların analizinin diğer hücrelerle karşılaştırıldığında daha zor olmasıdır. Spermatozoada translasyonel sessizliğinin sağlanması amacı ile 28S rRNA seçimli olarak



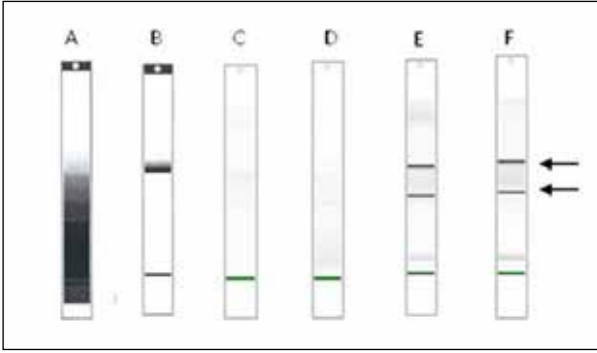
Şekil 4. a-f. Preimplantasyon dönem embriyo ve granülosa hücrelerinden izole edilen total RNA'ların Agilent Bioanalyzer 2100 cihazı kullanılarak yapılan değerlendirilmesi sonucunda elde edilen elektroferogram görüntüsü. Elektroferogramlar RNA izolasyon optimizasyonu sürecindeki çeşitli aşamaları göstermektedir. a-d embriyolara ait ve e, f granülosa hücrelerine ait görüntülerdir.

yıkıma uğramaktadır (17). Bu durum, normalde RNA kalitesinin değerlendirilmesinde kullanılan 18S/28S RNA oranının tespit edilememesine neden olmaktadır. Dolayısı ile standart bir kalite göstergesi kullanılamamaktadır. Çalışmamızda, hassas bir yöntem olan gerçek zamanlı PCR ile gen amplifikasyonu yaparak elde ettiğimiz total RNA'ların kalitesi dolaylı olarak değerlendirilmiştir. Ardından, melting curve analizi ile amplifikasyon ürünlerinin özgülüğü değerlendirilmiştir.

Spermatozal RNA çalışmalarındaki ikinci zorluk ise total RNA miktarıdır. Somatik bir hücrede yaklaşık olarak 10 pg RNA bulunurken, bu hücrelerden 200 kat daha az sitoplazmaya sahip olan bir spermatozoonda yaklaşık olarak 10-50fg RNA bulunmaktadır (15-17). Bu nedenle, herhangi bir somatik hücre ile kontaminasyon analiz sonrasında gerçek sonuçların maskelenmesine neden olmaktadır

(15). Çalışmamızda, spermatozoa hazırlığı diğer somatik hücreler ve olgun olmayan germ hücrelerinden arındırılacak şekilde yapılmıştır ve izolasyon sonrasında ortalama 10-60 ng/ μ L total RNA elde edilmiştir. Bu değer literatürdeki diğer araştırmacıların sonuçları ile uyumludur (17, 20, 21). Bu bulgu, uyguladığımız metodun güvenilirliğini desteklemektedir.

İnsan çalışmalarında kullanılan embriyolar yardımıyla üreme tedavisi gören hastalar tarafından bağışlanan ve transfer için seçilmeyen embriyolardan oluşmaktadır (22-24). Yapılan araştırmalarda, gelişimin 2. günündeki insan embriyolarında yaklaşık 12 pg ve 3. gününde yaklaşık 20 pg mRNA olduğu belirlenmiştir (25). Çalışmamızda, mRNA miktarları ayrı olarak değerlendirilmemiştir ancak bu veriye uyumlu olarak gelişim 3. günündeki 8 hücreli embriyoda total RNA miktarı 58.50 pg olarak tespit edilmiştir.



Şekil 5. a-f. Preimplantasyon dönem embriyo ve granülosa hücrelerinden izole edilen total RNA'ların Agilent Bioanalyzer 2100 cihazı kullanılarak yapılan değerlendirilmesi sonucunda elde edilen jel-benzeri ortamda görüntüsü. Jel-benzeri görüntüler RNA izolasyonu optimizasyonu sürecindeki çeşitli aşamaları göstermektedir. a-d embriyolara ait ve e, f granülosa hücrelerine ait görüntülerdir. Üst ok 28S rRNA, alt ok ise 18S rRNA'yı işaret etmektedir.

Örnek miktarının az olması ve embriyoların her zaman kolay elde edilememesi iki sonucu doğurmuştur. Bunlardan birincisi, incelenecek olan embriyoların havuz oluşturacak şekilde toplanmasıdır. Gelişim çalışmalarında örneklerin havuzda toplanarak analiz edilmesinin ek bir avantajı da benzer özellikteki embriyoların bir arada incelenmesi ile bireysel farklılıkların dışlanarak ortak bir sonucun elde edilmesidir (26, 27). Böylece, analiz sonucunda, her bir embriyoya ait özel bir genetik bilgi elde edilmemekte, benzer özellikteki embriyolarda ön plana çıkan genler hakkında toplu olarak bilgi elde edilmektedir. Bu nedenle, bu yaklaşım mikroarray ve diğer gen ekspresyonu çalışmalarında uygulanması önerilen bir yöntemdir (26). Çalışmamızda bu yaklaşım benimsenerek embriyolardan örnek havuzu oluşturduktan sonra total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Embriyo araştırmalarında örnek miktarının ve RNA kaynağının az olmasının doğurduğu ikinci sonuç ise araştırmacıların, diğer doku ve hastalıklara özgü genlerin başarı ile profilendiği ve çok sayıda transkriptin aynı anda incelenebildiği tekniklere yönelmesi olmuştur (25, 28). Embriyolardaki RNA miktarının az olması yapılan çalışmaları kısıtlamakla beraber, PCR temelli diferansiyel display ve "subtractive" cDNA kütüphanelerinin oluşturulması teknikleri başarı ile gerçekleştirilmiştir (29). Bununla birlikte, ancak mikroarray platformlarının geliştirilmesi sayesinde daha kısa bir süre içerisinde oosit ve preimplantasyon dönem embriyolarının global gen ekspresyon profilleri incelenebilmiştir (30).

SONUÇ

Daha sonra yapılması planlanan transkript profillemeye araştırmaları için ön bir çalışma olarak gerçekleştirilen bu

deneyle sonuçta elde edilen bulgular, RNA izolasyon protokollerinde yapılan uyarlamaların etkin olduğunu göstermektedir.

Etik Komite Onayı: Bu çalışmada İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun onayı alınmıştır (Belge No: 737, 937 ve 1360).

Hasta Onamı: Bu çalışmaya katılan hastalardan yazılı hasta onamı alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - B.Ö.S.; Tasarım - B.Ö.S.; Denetleme - B.Ö.S., S.B.K.; Kaynaklar - B.Ö.S., Malzemeler - B.Ö.S.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - B.Ö.S., S.B.K., Ö.D.; Analiz ve/veya Yorum - B.Ö.S., N.Ç., D.S.K., S.T.; Literatür Taraması - B.Ö.S., S.T.; Yazıyı Yazan - B.Ö.S.; Eleştirel İnceleme - N.Ç., D.S.K., S.B.K., Ö.D.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma İstanbul Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje Kodu: 33527, 53931, 45101, 32661 ve 13930).

Ethics Committee Approval: This study was approved by the Ethics Committee of Istanbul University Istanbul Medical School (No: 737, 937 ve 1360).

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

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - B.O.S.; Design - B.O.S.; Supervision - B.O.S., S.B.K.; Resources - B.O.S.; Materials - B.O.S.; Data Collection and/or Processing - B.O.S., S.B.K., O.D.; Analysis and/or Interpretation - B.O.S., N.Ç., D.S.K., S.T.; Literature Search - B.O.S., S.T.; Writing Manuscript - B.O.S.; Critical Review - N.C., D.S.K., S.B.K., O.D.

Conflict of Interest: Authors have no conflict of interest to declare.

Financial Disclosure: This study was supported by the Scientific Research Projects Coordination Unit of İstanbul University (Project numbers: 33527, 53931, 45101, 32661 and 13930).









KAYNAKLAR

1. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, et al. The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology. Hum Reprod 2009; 24: 2683-7. [CrossRef]
2. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Tews G. Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review. Hum Reprod Update 2003;9:251-62. [CrossRef]

3. Siristatidis C, Komitopoulou MA, Makris A, Sialakouma A, Botzaki M, Mastorakos G, et al. Morphokinetic parameters of early embryo development via time lapse monitoring and their effect on embryo selection and ICSI outcomes: a prospective cohort study. *J Assist Reprod Genet* 2015;32(4):563-70. [\[CrossRef\]](#)
4. Pribenszky C, Nilselid AM, Montag M. Time-lapse culture with morphokinetic embryo selection improves pregnancy and live birth chances and reduces early pregnancy loss: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2017;35(5):511-20. [\[CrossRef\]](#)
5. Bromer JG, Seli E. Assesment of embryo viability in assisted reproductive technologies: shortcomings of current approaches and the emerging role of metabolomics. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008;20(3):234-41. [\[CrossRef\]](#)
6. Evsikov AV, de Evsikova CM. Gene expression during the oocyte-to-embryo transition in mammals. *Mol Reprod Dev* 2009;76(9):805-18. [\[CrossRef\]](#)
7. Katz-Jaffe MG, Schoolcraft WB, Gardner DK. Analysis of protein expression (secretome) by human and mouse preimplantation embryos. *Fertil Steril* 2006;86(3):678-85. [\[CrossRef\]](#)
8. Seli E, Robert C, Sirard M. OMICS in assisted reproduction: possibilities and pitfalls. *Mol Hum Reprod* 2010;16(8):513-30. [\[CrossRef\]](#)
9. Uyar A, Seli E. Metabolomic assessment of embryo viability. *Semin Reprod Med* 2014;32(2):141-52. [\[CrossRef\]](#)
10. Ventura-Juncá P, Irrarázaval I, Rolle AJ, Gutiérrez JI, Moreno RD, Santos MJ. In vitro fertilization (IVF) in mammals: epigenetic and developmental alterations. Scientific and bioethical implications for IVF in humans. *Biol Res* 2015;48:68. [\[CrossRef\]](#)
11. Lowe R, Shirley N, Bleackley M, Dolan S, Shafee T. Transcriptomics technologies. *PLoS Comput Biol* 2017;13(5):e1005457. [\[CrossRef\]](#)
12. Moreno JM, Núñez MJ, Quiñonero A, Martínez S, de la Orden M, Simón C, et al. Follicular fluid and mural granulosa cells microRNA profiles vary in in vitro fertilization patients depending on their age and oocyte maturation stage. *Fertil Steril* 2015;104(4):1037-46.e1. [\[CrossRef\]](#)
13. Burnik Papler T, Vrtacnik Bokal E, Maver A, Kopitar AN, Lovrečić L. Transcriptomic analysis and meta-analysis of human granulosa and cumulus cells. *PLoS One* 2015;10(8):e0136473. [\[CrossRef\]](#)
14. Montjean D, De La Grange P, Gentien D, Rapinat A, Belloc S, Cohen-Bacrie P, et al. Sperm transcriptome profiling in oligozoospermia. *J Assist Reprod Genet* 2012;29(1):3-10. [\[CrossRef\]](#)
15. Krawetz SA. Paternal contribution: new insights and future challenges. *Nat Rev Genet* 2005;6(8):633-42. [\[CrossRef\]](#)
16. Miller D, Ostermeier GC, Krawetz SA. The controversy, potential and roles of spermatozoal RNA. *Trends Mol Med* 2005;11(4):156-63. [\[CrossRef\]](#)
17. Cappallo-Obermann H, Schulze W, Jastrow H, Baukloh V, Spiess AN. Highly purified spermatozoal RNA obtained by a novel method indicates an unusual 28S/18S rRNA ratio and suggests impaired ribosome assembly. *Mol Hum Reprod* 2011;17(11):669-78. [\[CrossRef\]](#)
18. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th Ed. WHO, 2010.
19. Ostermeier GC, Dix DJ, Miller D, Khatri P, Krawetz SA. Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet* 2002;360(9335):772-7. [\[CrossRef\]](#)
20. Goodrich RJ, Anton E, Krawetz SA. Isolating mRNA and small noncoding RNAs from human sperm. *Methods Mol Biol* 2013;927:385-96. [\[CrossRef\]](#)
21. Mao S, Sendler E, Goodrich RJ, Hauser R, Krawetz SA. A comparison of sperm RNA-seq methods. *Syst Biol Reprod Med* 2014;60(5):308-15. [\[CrossRef\]](#)
22. Wells D, Bermúdez MG, Steuerwald N, Malter HE, Thornhill AR, Cohen J. Association of abnormal morphology and altered gene expression in human preimplantation embryos. *Fertil Steril* 2005;84(2):343-55. [\[CrossRef\]](#)
23. Kleijkers SH, Eijssen LM, Coonen E, Derhaag JG, Mantikou E, Jonker MJ, et al. Differences in gene expression profiles between human preimplantation embryos cultured in two different IVF culture media. *Hum Reprod* 2015;30(10):2303-11. [\[CrossRef\]](#)
24. Mantikou E, Jonker MJ, Wong KM, van Montfoort AP, de Jong M, Breit TM, et al. Factors affecting the gene expression of in vitro cultured human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 2016;31(2):298-311.
25. Dobson AT, Raja R, Abeyta MJ, Taylor T, Shen S, Haqq C, et al. The unique transcriptome through day 3 of human preimplantation development. *Hum Mol Genet* 2004;13(14):1461-70. [\[CrossRef\]](#)
26. Zhang SD, Gant TW. Effect of pooling samples on the efficiency of comparative studies using microarrays. *Bioinformatics* 2005;21(24):4378-83. [\[CrossRef\]](#)
27. Peng X, Wod CL, Blalock EM, Chen KC, Landfield PW, Stromberg AJ. Statistical implications of pooling RNA samples for microarray experiments. *BMC Bioinformatics* 2003;4:26. [\[CrossRef\]](#)
28. Zhang P, Zucchelli M, Bruce S, Hambiliki F, Stavreus-Evers A, Levkov L, Skottman H, Kerkela E, Kere J, Hovatta O. Transcriptome Profiling of Human Pre-implantation Development. *Plos One* 2009;4(11):e7844. [\[CrossRef\]](#)
29. Zeng F, Schultz RM. Gene expression in mouse oocytes and preimplantation embryos: use of suppression subtractive hybridization to identify oocyte- and embryo-specific genes. *Biol Reprod* 2003;68(1):31-9. [\[CrossRef\]](#)
30. Carter MG, Hamatani T, Sharov AA, Carmack CE, Qian Y, Aiba K, et al. In situ-synthesized novel microarray optimized for mouse stem cell and early developmental expression profiling. *Genome Res* 2003;13(5):1011-21. [\[CrossRef\]](#)

RADİYAL İŞİN DEFEKTLERİNİN KLİNİK SINIFLANDIRMASI VE ETYOPATOGENEZİNİN ARAŞTIRILMASI

CLINICAL CLASSIFICATION OF RADIAL RAY DEFECTS AND RESEARCH INTO ETIOPATHOGENESIS

Şahin Avcı* , Güven Toksoy* , Güleendam Bağirova* , Umur Altunoğlu* , Birsen Karaman* , Seher Başaran* , Hülya Kayserili** , Z. Oya Uyguner* 

*İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

**Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Cite this article as: Avcı Ş, Toksoy G, Bağirova G, Altunoğlu U, Karaman B, Başaran S, et al. Clinical Classification of Radial Ray Defects and Research into Etiopathogenesis. J Ist Faculty Med 2018; 81(4): 127-138.

ÖZET

Amaç: Radyal ışın defektleri (RID) 1/30.000 prevalansı ile üst ekstremitenin en sık gözlenen konjenital anomalisidir. Olguların yaklaşık %30'unda RID izole olarak, %70'inde ek anomaliler veya sendromlar ile birlikte gözlenir. Bu nedenle, olgularda tanının kesinleşmesi, izlemi, ailelere özgün genetik danışma verilmesi ve sonraki gebeliklerinde prenatal tanı seçeneğinin sunulabilmesi için önemlidir. Bu çalışma ile RID olgularının ayırıcı tanısında yol gösterici olması, moleküler tanıya katkı sağlaması amacıyla yeni nesil dizileme (YND) gen-paneli oluşturuldu ve panelin moleküler tanıdaki etkinliği araştırıldı.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada, 2004-2014 yılları arasında kliniğimizde RID bulgusu ile değerlendirilen 37 aileden 48 etkilenmiş olgunun klinik, moleküler ve sitogenetik bulguları değerlendirildi. Karyotipi normal saptanan ve moleküler tanısı olmayan 31 ailenin indeks olgusunda 14 farklı fenotip ile ilişkili 43 gen, RID için tasarladığımız hedefe yönelik YND paneli ile dizilendi.

Bulgular: Sitogenetik analiz ile bir olguda trizomi 18 ve diğer bir olguda ise ailevi t(2;12)(q31;q24.3) translokasyonu saptandı. Dört ailede ilişkili genlerdeki (*SF3B4*, *SALL4*, *TBX5*, *FANCA*) mutasyonlar çalışma öncesinde moleküler analizlerle belirlenmişti. Tanısı olmayan 31 indeks olgunun 5'inde (%16), 4 farklı gende (*FANCA*, *NIPBL*, *ESCO2*, *BRIP1*) 6 farklı mutasyon saptandı.

Sonuç: RID nedeniyle değerlendirilen 37 ailenin 2'sinde (%5.4) kromozom anomalisi ve 9'unda (%24.3) 7 farklı gende 9 farklı mutasyon saptandı. Bulgularımız, RID olgularında özgün tasarlanan yeni nesil dizileme panelimizin moleküler tanıya önemli oranda katkı sağladığını; RID'in etyopatogenezinde kromozom anomalilerinin de yer aldığını, ayırıcı tanıda yer alması ve RID-panel çalışmasından önce kromozom anomalilerinin dışlanması gerektiğini gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Fanconi anemisi, radial ışın defektleri, yeni nesil dizileme

ABSTRACT

Objective: Radial ray defects (RRDs) are the most common congenital abnormality of the upper extremities, with a prevalence of 1:30,000. 70% of RRDs are syndromic or accompanied by additional malformations, whereas 30% are in isolated form. Definitive diagnosis is critical for follow-up and provides an opportunity for prenatal diagnosis. The aim of this study was to provide a guide for the differential diagnosis of patients with RRD via contributing to their molecular diagnosis by constructing a next-generation sequencing (NGS) gene-panel test.

Materials and Methods: 48 probands from 37 families, referred for genetic consultation due to RRD, between the years of 2004–2014, were evaluated by cytogenetic and molecular tools following clinical examinations. 31 probands, with normal karyotype, were screened for 43 RRD associated genes of 14 syndromes by using in-house-designed targeted NGS gene-panel.

Results: Chromosomal abnormalities [a trisomy 18 and a familial reciprocal translocation t(2;12)(q31;q24.3)] in two families and mutations in related genes (*SF3B4*, *SALL4*, *TBX5*, *FANCA*) in four families were known before the initiation of this study. In remaining 31 probands, five families identified to have six different mutations in four different genes (*FANCA*, *NIPBL*, *ESCO2*, *BRIP1*).

Conclusion: Chromosomal abnormalities in two of the 37 families (5.4%) and gene mutations in nine of the 37 families (24.3%) were identified. Our study demonstrated that an in-house-designed targeted NGS containing 43 genes made considerable contribution to the diagnosis of RRD. Moreover, chromosomal abnormalities must always be considered in the differential diagnosis and excluded before gene-panel screening.

Keywords: Fanconi anemia, next-generation sequencing, radial ray defects

İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: avci-sahin@hotmail.com

Geliş tarihi/Received Date: 25.05.2018 • **Kabul tarihi/Accepted Date:** 05.11.2018

©Copyright 2018 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

©Telif Hakkı 2018 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

GİRİŞ

Yenidoğanların %1-2'sinde gözlenen konjenital anomalilerin %10'unu üst ekstremite anomalileri oluşturur (1). Farklı bir deyişle, konjenital üst ekstremite anomalilerinin sıklığı yaklaşık 600 yenidoğanda 1'dir ve konjenital kalp anomalilerinden sonra ikinci sırada yer alır (1, 2). Konjenital ekstremite anomalilerinin etiyojisinde monogenik sendromlar (Fanconi anemisi, TAR sendromu, Holt-Oram sendromu vd.), kromozom anomalileri (trizomi 18), teratojen maruziyetleri (talidomid, mizoprostol), ile 9. gebelik haftasından önce uygulanan koryon villus örnekleme yer almaktadır (3).

Swanson sınıflamasına göre üst ekstremitenin farklılaşma bozuklukları arasında yer alan RID, radius, el bileğinde yer alan skafoid ve trapezium kemiği, birinci metakarpal kemik ve el başparmağının hipo- veya aplazisine neden olan gelişimsel defekt ile karakterizedir ve 1/30.000 prevalansı ile üst ekstremitenin en sık gözlenen konjenital anomalisidir (1, 4). RID, izole (%30), sendromik veya ek anomaliler ile birlikte (%70) gözlenebilir (4, 5). Sıklıkla RID gözlenen sendromlar arasında trombositopeni-radius yokluğu (TAR) sendromu [OMIM #274000], VACTERL birlikteliği, (vertebral anomaliler, anal atrezi, kardiyak anomaliler, trakeoözofageal fistül, renal anomaliler ve ekstremite anomalileri) [OMIM #192350], Holt-Oram sendromu [OMIM #142900] ve Fanconi anemisi [OMIM #227650] yer alır (6). Bunlar dışında radyal ışın defektleri ile seyreden 200 civarında sendrom tanımlanmıştır. Bu sendromlar arasında, Gershoni-Baruch sendromu (OMIM 609545), X'e bağlı radyal ışın defektleri (OMIM #300378), radyal-renal sendrom (OMIM 179280), hemifasiyal mikrozomi-radyal ışın defektleri (OMIM #141400) gibi RID ile ilişkisi bilinen, ancak ilişkili geni/genleri henüz tanımlanmamış birçok nadir sendrom da bilinmektedir. Bu nedenle, RID saptanan olguda olası ek anomalilerin araştırılması için tüm sistemlerin gözden geçirilmesi, özellikle kardiyovasküler sistem, ürogenital sistem ve hematopoetik sistemin taranması son derece önemlidir. Ayrıca, prenatal dönemde RID saptanan bir fetusun, doğru klinik ve moleküler tanı alması çiftlere verilecek genetik danışma açısından çok önemlidir.

Bu çalışmada, 2004-2014 yılları arasında kliniğimizde RID bulgusu ile değerlendirilen 37 aileden 48 etkilenmiş olgunun klinik olarak sınıflandırılması ve genetik etyopatogenezlerinin araştırılması amaçlandı. Klinik değerlendirme sonrasında olgular sitogenetik analiz, yeni nesil ve Sanger dizileme yöntemleri ile incelendi. Sonuçlar, klinik bulgular eşliğinde yorumlandı. Mutasyon saptanan ailelere özgün genetik danışma verildi. Çalışma ile ülkemizde RID ile giden sendromların ve ilişkili mutasyonlarının sıklığının belirlenmesi, tanıda kullanılmak üzere hazırladığımız özgün gen panelinin moleküler genetik tanıya olan katkısının değerlendirilmesi amaçlandı. Bu çalışmada etyo-

patogenezi belirlenemeyen olgular, ileride RID ile ilişkili yeni genlerin araştırılmasını amaçlayan yeni projeler için önemli bir kaynak oluşturmaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Grubu

Çalışma grubumuzu, 2004-2014 yılları arasında İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı polikliniğine genetik konsültasyon amacıyla çeşitli Pedyatri ve Tıbbi Genetik kliniklerinden yönlendirilen, unilaterale ya da bilaterale RID bulgusu olan 37 aileden 48 etkilenmiş olgu oluşturdu. Bu gruptaki 6 aile daha önce moleküler veya sitogenetik bir tanı almıştı.

Çalışmanın etik açıdan uygunluğu, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı (25.12.2014 tarih ve 1939 sayı). Çalışmaya katılan ailelerden aydınlatılmış onam alındı.

Olguların her biri tıbbi genetik uzmanı tarafından değerlendirilerek öykü ve fizik muayene bulguları kaydedildi. Aile öykülerine göre aile ağaçları hazırlandı. Etkilenmiş bireylerin fotoğrafları ve ekstremite grafileri arşivlendi. Bilinen bir sendromla uyumlu bulunan olgulara gerekli ek tetkikler (EKO, batin ultrasonografi vd.) ile laboratuvar testleri (hematolojik, sitogenetik, moleküler genetik vd.) yapıldı. Bilinen bir sendromla uyumlu bulunmayan olgular, RID'a eşlik eden ek bulgular açısından detaylı olarak değerlendirildi.

Kromozom analizi

Psikososyal motor gerilik (PSMG), mental retardasyon ya da ek anomalilerin eşlik ettiği olgularda, moleküler çalışmalardan önce ayırıcı tanıda yer alan kromozom anomalilerinin dışlanması amacıyla Na-heparinli enjektörlere alınan 2-3 cc periferik kanda yüksek çözünürlüklü bant tekniği (HRBT) ile 550-600 bant düzeyinde kromozom analizi yapıldı.

Yeni Nesil Dizileme (YND)

Çalışma grubumuzda yer alan, klinik bulgular ışığında daha önce kromozom analizi (n:2) veya moleküler analizlerle (n:4) tanı alan olgular dışında kalan 31 olgu, RID ile giden sendromlar için Ion Torrent PGM platformunda tasarladığımız YND gen paneli (tablo 1) ile araştırıldı. RID ile giden sendromlar, LMD (London Medical Database) ve OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)'den tarandı. İlişkili geni/genleri bilinen 14 fenotip seçildi. Bu fenotiplerle ilişkilendirilmiş genler, HGMD (Biobase Professional) veri tabanından tarandı. Her bir genin HGMD transkripti referans alınarak Ion AmpliSeq Designer (<http://www.ampliseq.com>) ile tablo 1'de gösterilen fenotiplerle ilişkili genlerin kodlayan bölgelerini, ekzon-intron sınır bölgelerini ve varsa mutasyon tanımlanmış diğer bölgelerini (derin intron, UTR vs.) içine alan, 765 ampikondan ve iki primer havuzundan oluşan özgün yeni nesil dizileme paneli oluşturuldu.

Tablo 1. RID ile giden sendromlar için oluşturulan YND panelinde yer alan genler ve ilişkili fenotipler

Fenotip	Gen
Cornelia de Lange sendromu 1 (OMIM #122470)	NIPBL (NM_133433.3)
Cornelia de Lange sendromu 2 (OMIM #300590)	SMC1A (NM_006306.3)
Cornelia de Lange sendromu 3 (OMIM #610759)	SMC3 (NM_005445.3)
Cornelia de Lange sendromu 4 (OMIM #614701)	RAD21 (NM_006265.2)
Cornelia de Lange sendromu 5 (OMIM #300882)	HDAC8 (NM_001166419.1)
Roberts sendromu (OMIM #268300)	ESCO2 (NM_001017420.2)
Thrombositopeni-radius yokluğu sendromu (TAR) (OMIM #274000)	RBM8A (NM_001031743.2)
Duane-radyal ışın sendromu (OMIM #607323)	SALL4 (NM_020436.3)
Akrofasiyal Dizostoz 1, Nager tip (OMIM #154400)	SF3B4 (NM_005850.4)
Holt-Oram sendromu (OMIM #142900)	TBX5 (NM_000192.3)
	FANCA (NM_000135.2)
	FANCC (NM_000136.2)
	FANCG (NM_004629.1)
	FANCD2 (NM_033084.3)
	FANCB (NM_001018113.1)
	FANCM (NM_020937.2)
	BRCA2 (NM_000059.3)
	FANCL (NM_018062.3)
Fanconi anemisi (OMIM #227650)	BRIP1 (NM_032043.2)
	PALB2 (NM_024675.3)
	FANCE (NM_021922.2)
	FANCF (NM_022725.3)
	FANCI (NM_001113378.1)
	RAD51C (NM_058216.2)
	SLX4 (NM_032444.2)
	XRCC2 (NM_005431.1)
	ERCC4 (NM_005236.2)
	EFTUD2 (NM_004247.3)
	RECQL4 (NM_004260.3)
Mandibulofasiyal dizostoz, Guion-Almeida tip (OMIM #610536)	
Baller-Gerold sendromu (OMIM #218600)	
Rapadilino sendromu (OMIM #266280)	
Rothmund-Thomson sendromu (OMIM #268400)	
Townes-Brocks sendromu (OMIM #107480)	SALL1 (NM_002968.2)
	RPS19 (NM_001022.3)
	RPL15 (NM_002948.3)
	RPS10 (NM_001014.4)
	RPL11 (NM_000975.3)
	RPL35A (NM_000996.2)
	RPS17 (NM_001021.4)
	RPS24 (NM_033022.3)
	RPL26 (NM_000987.3)
	RPS7 (NM_001011.3)
	GATA1 (NM_002049.3)
	RPL15 (NM_002948.3)
	RPS29 (NM_001032.4)
İskelet Defektleri-genital hipoplazi-MR (OMIM #612447)	PLZF (ZBTB16) (NM_006006.4)

Kütüphane hazırlanması, Ion Ampliseq Library Kit 2.0 (Life Technologies) kullanılarak, firma protokollerine uygun şekilde yapıldı. Kütüphane ürünleri, Ion Xpress Barcode Adapters Kit (Life Technologies) ile barkodlandı. Barkodlanan kütüphane ürünleri Agentcourt AMPure XP reagent ve %70'lik etanol kullanılarak firma protokollerine uygun olarak saflaştırıldı. Normalizasyon için miktar tayini, Ion Library Quantitation Kit kullanılarak qPCR ile yapıldı. Dizileme için Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing Kit kullanıldı.

Firma protokollerine uygun olarak; Ion PGM™ dizileme cihazının klorid tablet ve 18 MΩ su ile yıkamaları, pH kalibrasyonları yapıldı ve zenginleştirilmiş ürünler çipe (Ion 318™ Chip v2) yüklenerek dizileme işlemi yapıldı. Dizileme sonrasında Torrent server yazılımına aktarılan verilere ait BAM dosyaları, analiz için Ion Reporter yazılımına aktarıldı. Hedef bölgelere ve hotspot bölgelere ait BED dosyası eklenerek ve gerekli parametreler önerilen aralıklarda tutularak, Ion Reporterda analiz akış şeması oluşturuldu. Her bir hasta, bu akış şeması ile analiz edildi. Her hastada bulunan değişimler, filtreleme tabii tutularak birkaç aşamada değerlendirildi. İlk aşama filtreleme işleminde, çerçeve kaymasına, dur kodunu oluşumuna veya aminoasit değişimine yol açan değişimler listelendi. Fenotip ile uyumlu bulgu elde edilemeyen olgularda ikinci aşama filtreleme ile kodlayan bölgeler, kırılma bölgeleri ve UTR (untranslated regions) bölgelerindeki sıklığı bilinmeyen veya nadir (MAF<0.01) değişimler listelenerek incelendi. Daha önce tanımlanmamış değişimlerin in silico olarak

patolojik olup olmadığı, Mutation Taster, <http://www.mutationtaster.org/>), Prediction of functional effects of human nsSNPs (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) ve Scale-invariant feature transform (<http://sift.jcvi.org/>) veritabanları kullanılarak değerlendirildi.

Sanger Dizileme

YND ile saptanan mutasyonların veya nadir / tanımlanmamış varyantların konfirmasyonu ve aile içi segregasyonu Sanger dizileme ile yapıldı. Sanger dizileme için mutasyonların analiz edilmesine olanak sağlayacak bölgeleri kapsayan özgün ileri ve geri primerler tasarlandı. Oligonükleotid sentezi ticari firmaya (Sentromer, İstanbul/Türkiye) yaptırıldı. Özgün ileri ve geri primerler ile PZR reaksiyonu termal döngü cihazında (MJ Research PTC-200 ve DNA Engine-BIORAD-T100) gerçekleştirildi. PZR ürünlerinin saflaştırma işlemi *Exonuclease-I* (Lot:00173016-Thermo Scientific) enzimi ve *Rapid Alkaline Fosfataz* (04898133001-Roche) enzimleri ile firma protokollerine uygun olarak yapıldı. PZR yöntemi ile çoğaltılan ve ardından saflaştırılan ampikonların dizi analizi, ABI3500 otomatik sekiz kapillerli elektroforezinde (*Applied Biosystem*) gerçekleştirildi. Dizi reaksiyonu, *bigdye® terminator v3.1 cycle sequencing kit* kullanılarak firma protokollerine uygun şekilde yapıldı.

BULGULAR

Otuzyedi ailenin 48 etkilenmiş olgusundan oluşan serumizde erkek/dişi oranı 1.3 (erkek:27, dişi:21), ilk klinik



Şekil 1. Olgulara ait yüz ve ekstremiteler fotoğrafları. RID-1, RID-2, RID-5, RID-6.1 ve 6.2, Fanconi anemisi, radyal ışın defektlerine eşlik eden benzer fasiyal dismorfik bulgular (dar palpebral fissürler, midfasiyal hipoplazi, ince üst dudak). RID-3, CdLS ile uyumlu fasiyal dismorfik bulgular (kavsi belirgin kaşlar, sinofiri, uzun ve düz filtrum, ince dudaklar). RID-4, Roberts sendromu ile uyumlu yüz görünümü (sığ orbitalar, belirgin gözler, hipoplastik ala naziler). RID-7, Nager sendromu, tipik dismorfik bulgular (aşağı çekik palpebral fissürler, alt göz kapak kenarlarında düzensizlik ve kıpık yokluğu, düşük ve displastik kulaklar, mikroretrognati) ve hipoplastik başparmaklar. RID-8, Okihiro sendromu, radyal ışın defektlerine eşlik eden Duane anomalisi. RID-9, Holt-Oram sendromu, fasiyal dismorfizm yok, fasiyal hemanjiyomlar ve radyal ışın defektleri izleniyor. RID-11, trizomi 18, fasiyal dismorfik bulgular (sığ orbitalar, kısa ve dar palpebral fissürler, tübüler burun, mikroretrognati, düşük kulaklar) ve ellerde sindaktili, hipoplastik başparmaklar, bilateral PEV nedeniyle alt ekstremiteler alçıda.

Tablo 2. Mutasyon saptanan olgulara ait klinik bulgular, moleküler ve sitogenetik sonuçlar

	RID-1	RID-2	RID-3	RID-4	RID-5	RID-6.1 ve RID-6.2
Klinik Tanı	Fanconi anemisi	Fanconi anemisi	Cornelia de Lange sendromu	Roberts sendromu	Fanconi anemisi	Fanconi anemisi
Akrabalık	1.5° kuzen evliliği	1° kuzen evliliği	(-)	1° kuzen evliliği	(-)	1° kuzen evliliği
Kalıtım	OR	OR	OD	OR	OR	OR
Cinsiyet	Erkek	Erkek	Dişi	Dişi	Dişi	Erkek, erkek
Yaş	19/12 yaş	8.5 ay	33/12 yaş	14 ay	33/12 yaş	196/12yaş, 138/12 yaş
Ekstremitte bulgular	Sağ el başparmağında hipoplazi ve fleksiyon kısıtlılığı, proksimal yerleşimli sol el başparmağı, 2-3. ayak parmaklarında parsiyel sindaktili	Bilateral radyal agenezi, sağ elde başparmak agenezisi, sol elde hipoplastik başparmak	Hipoplastik el başparmakları El 5. parmak klinodaktili (bilateral) Ayaklarda 2-3 arası total sindaktili	Hafif hipoplastik el başparmakları, Sağ başparmakta fleksiyon kısıtlılığı, Bilateral humeroradyal sinostoz	Bilateral radyal hipoplazi, el başparmaklarında agenezi	RID-6.1: Bilateral opere preaksiyel polidaktili, sağ el başparmağında hipoplazi ve fleksiyon kısıtlılığı RID-6.2: Sol elde opere preaksiyel polidaktili
Ek bulgular	Mikrosefali, büyüme geriliği, multipl sütlü kahverengi lekeler, fasiyal dismorfizm, trombositopeni	Mikrosefali, büyüme geriliği, fasiyal dismorfizm	Mikrosefali, Büyüme geriliği, PSMG, sırtta hirsutizm, hipoplastik dış genitalya, fasiyal dismorfik bulgular	Mikrosefali, Seyrek saçlar, Fasiyal dismorfizm	Mikrosefali, büyüme geriliği, hidrosefali, multipl sütlü kahverengi lekeler, anal atrezi, at nalı böbrek, biküspit aorta	RID-6.1: Büyüme geriliği, strabismus, nistagmus, bilateral ptozis, mikropenis, mikroorşidi, sağ lomber bölgede 2x3 cm sütlü kahverengi leke, trombositopeni, hafif anemi RID-6.2: Multipl sütlü kahverengi lekeler, trombositopeni
Karyotip	46,XY	46,XY	46,XX	46,XY,PCD+	46,XX	46,XY
Moleküler sonuç	FANCA: c.894-2A>G homozigot1	FANCA: c.894-2A>G homozigot2	NIPBL: c.6893G>A, (p.Arg2298His) heterozigot1	ES-CO2:c.1104_1105 insA, (Thr371 Asnfs*32) homozigot1	BRIP1:c.205+5G>Ta+c.761_764delAGCbA, (p.Lys254Argfs*19) birleşik heterozigot1	FANCA: c.4261-2A>C homozigot1
Referans	Bilinen mutasyon (7, 8)	Bilinen mutasyon (7, 8)	Bilinen mutasyon (9)	Bilinen mutasyon (10)	a: bilinen mutasyon (8, 11) b: yeni mutasyon	Bilinen mutasyon (12)

Tablo 2. Mutasyon saptanan olgulara ait klinik bulgular, moleküler ve sitogenetik sonuçlar (devamı)

	RID-7	RID-8	RID-9	RID-10	RID-11
Klinik Tanı	Nager sendromu	Okihiro sendromu	Holt-Oram sendromu	Holt-Oram sendromu	Trizomi 18
Akrabalık	1.5° kuzen evliliği	(-)	(-)	(-)	(-)
Kalıtım	OD	OD	OD	OD	(-)
Cinsiyet	Dişi	Erkek	Dişi	Dişi	Erkek
Yaş	2.5 ay	7 ay	47 günlük	30 yaş	1 ay
Ekstremitte bulgular	El başparmaklarında hipoplazi ve fleksiyon kısıtlılığı, bilateral PEV	Sağ elde başparmak agenezisi, sol elde 1-2 arası total kutanöz sindaktili	Sağ elde trifalangeal başparmak, sol el başparmak ve radius-ta hipoplazi	Her iki elde tenar hipoplazi ve hafif supinasyon kısıtlılığı	Her iki elde 3-4 arası total, 1-2 ve 4-5 arası parsiyel sindaktili, başparmaklarda hipoplazi, bilateral PEV, ayaklarda 3-4 arası total sindaktili
Ek bulgular	Mikrosefali, büyüme geriliği, Pierre-Robin sekansı, dış kulak yollarında atrezi, fasyal dismorfik bulgular	Dış kulak yollarında darlık, Duane anomalisi, anal stenoz ve anokutanöz fistül (opere) +Benzer etkilenmiş anne	Müsküler VSD Sekundum ASD PDA	Opere VSD Benzer etkilenmiş aile bireyleri (Babasinda bilateral başparmak agenezisi, amcasında başparmak hipoplazisi, babasının amcasında bilateral radyal agenezi)	Hipotoni, Skafosefali Pektus karinatus Korpus kallozum agenezisi, fasyal dismorfik bulgular
Karyotip	46,XX	(-)	46,XX	46,XX,t(2;12)(q31;q24.3)	47,XY,+18
Moleküler sonuç	SF3B4: c.1147delC (p.His383Metfs*75) heterozigot3	SALL4: c.2484 delG (p.Phe829 Leufs*27) heterozigot4	TBX5: c.481A>C (p.Thr160Pro) heterozigot5	(-)	(-)
Referans	Bilinen mutasyon (13, 14)	Yeni mutasyon	Yeni mutasyon		

PSMG: psikososyal motor gerilik, OR: otozomal resesif, OD: otozomal dominant, PEV: pes ekinovarus, VSD: ventriküler septal defekt, ASD: atriyal septal defekt, PDA: patent duktus arteriozus.

1:RID yeni nesil dizileme ile saptanan mutasyon, Sanger dizileme ile konfirme edildi.

2:Fanconi anemisi yeni nesil dizileme paneli Almanya'da (Centogene AG, Schillingallee 68, 18057, Rostock) yapıldı.

3:Sanger dizilemesi Almanya'da (Institut für Humangenetik, University Duisburg, Essen) yapıldı.

4:Sanger dizilemesi Fransa'da (Laboratoire de Biochimie, Biologie Moléculaire, Hormonologie, Metabolisme-Nutrition, Oncologie, Centre de Biologie et Pathologie-CHRU 59037 Lille Cedex) yapıldı.

5:Hedefe yönelik (TBX5 geni) Sanger dizileme merkezimizde yapıldı.

değerlendirmede ortalama yaş 4.2 (aralık 3 gün-51 yaş) idi. Olgu grubunda bir indekste sitogenetik analizde trizomi 18 ve bir ailede t(2;12)(q31;q24.3) saptanmıştı. Dört ailede ise ilişkili genlerdeki (SF3B4, SALL4, TBX5, FANCA) mutasyonlar çalışma öncesinde moleküler analizlerle belirlenmişti. YND incelemesi ile 31 ailenin indeks olgularının beşinde, 4 farklı gende (FANCA, NIPBL, ESCO2, BRIP1) 6 farklı mutasyon saptandı. Sonuç olarak, RID nedeniyle değerlendirilen 37 ailenin 2'sinde (%5.4) kromozom anomalisi ve 9'unda (%24.3) 7 farklı gende (FANCA, NIPBL, ESCO2, BRIP1, SF3B4,

SALL4, TBX5) 9 farklı mutasyon saptandığı gösterildi (Tablo 2). Mutasyonlardan ikisi yanlış anlamlı, üçü kırılma hatasına yol açması beklenen intronik bölge ve dördü çerçeve kayması mutasyonu idi. Bu mutasyonlardan altısı daha önce tanımlanmış bilinen mutasyonlar iken üçü ilk kez bu çalışmada tanımlanan yeni (novel) mutasyonlardı. Mutasyon saptanan olgulara ait klinik bulgular, moleküler ve sitogenetik sonuçlar tablo 2'de, olgulara ait fotoğraflar şekil 1'de gösterilmektedir.

Klinik bulgular ve DEB testi ile Fanconi anemisi tanısı alan RID-1 ailesinin indeks olgusunda FANCA geninde daha

önce tanımlanmış homozigot c.894-2A>G saptandı (7, 8). Bu mutasyon Sanger dizileme ile doğrulandı ve aynı değişimi anne ve babanın heterozigot olarak taşıdıkları gösterildi. Benzer şekilde, Fanconi anemisi tanımlı RID-2 ailesinin indeks olgusunda dış merkezde hedefe yönelik yeni nesil dizileme ile incelemede (Fanconi anemisi paneli, Centogene/Almanya) FANCA geninde homozigot c.894-2A>G mutasyonu, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda Sanger dizileme yöntemiyle doğrulandı. Anne ve babanın aynı mutasyonu heterozigot olarak taşıdığı gösterildi.

CdLS klinik tanısı alan RID-3 ailesinin indeks olgusunda NIPBL geninde daha önce CdLS ile ilişkisi gösterilmiş c.6893G>A (p.Arg2298His) mutasyonu heterozigot olarak saptandı (9) ve Sanger dizileme ile doğrulandı, sağlıklı anne ile babanın bu mutasyonu taşımadıkları gösterilerek gonadal mozaikizm dışlanamamakla birlikte *de novo* oluştuğu belirlendi.

Aile RID-4'den klinik ve sitogenetik bulgular (kromozomlarda erken sentromer ayrışması) ile Roberts sendromu kesin tanısı alan indeks olguda ESCO2 geninde daha önce bildirilmiş c.1104_1105insA (p.T371Nfs*32) mutasyonu homozigot olarak saptandı (10). Sanger dizileme ile doğrulanan mutasyonu anne ve babanın heterozigot olarak taşıdıkları gösterildi.

Fanconi anemisi tanımlı RID-5 ailesinin indeksinde, BRIP1 geninde daha önce tanımlanmış c.205+5G>T mutasyonu heterozigot ve ayrıca c.761_764delAGCA (p.K254Rfs*19) varyantı saptandı. (8, 11). İlk kez bu çalışmada gösterilen dört nükleotidlik delesyon sonucu ile çerçeve kaymasına yol açan c.761_764delAGCA varyantının patolojik olması beklenmektedir. Her iki mutasyon Sanger dizileme ile doğrulandı. Ebeveynlerde analiz ile c.205+5G>T mutasyonunun paternal, c.761_764delAGCA mutasyonunun maternal kaynaklı olduğu gösterilerek, olgunun birleşik heterozigot olduğu kesinlik kazandı.

RID-6 ailesinden, Fanconi anemisi tanımlı iki kardeşten biri olan RID-6.2'de, FANCA geninde homozigot c.4261-2A>C mutasyonu saptandı. Kırılma hatasına yol açması beklenen bu mutasyon, daha önce bildirilmişti (12). Sanger dizileme ile etkilenmiş kardeşin (olgu RID-6.1) aynı mutasyonu homozigot, anne ve babanın heterozigot olarak taşıdığı gösterildi.

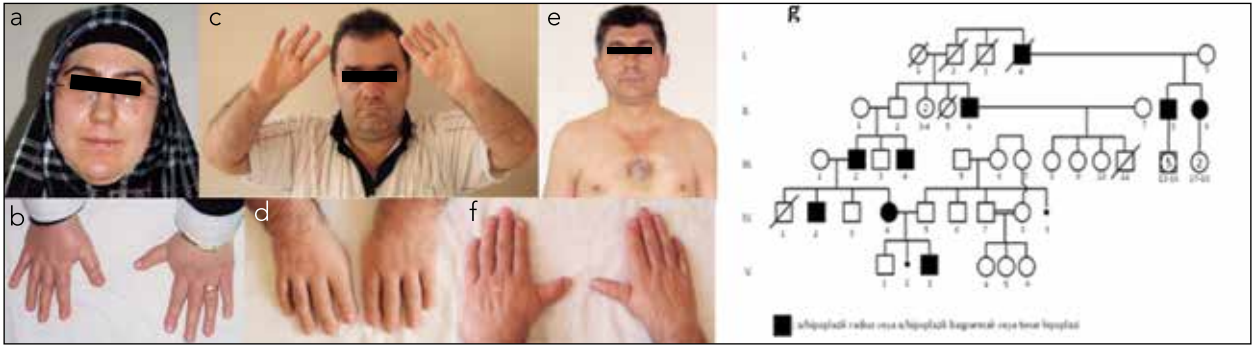
Aile RID-7'den Nager sendromu klinik tanımlı indeks olgu ve anne-babasına ait EDTA'lı kanlar, moleküler analiz için araştırma kapsamında yurtdışına (Dagmar Wieczorek, Institut für Humangenetik, University Duisburg, Essen, Germany) gönderilmiş ve indeks olguda, Nager sendromu ile ilişkili SF3B4 geninin 6. ekzonunda, daha önce bildirilmiş, çerçeve kaymasına yol açan c.1147delC (p.H383Mfs*75) mutasyonu heterozigot taşıdığı saptanmıştı (13, 14). Aynı mutasyonun anne ve babada olmadığı ve mutasyonun

gonadal mozaikizm dışlanamasa da *de novo* oluştuğu gösterildi.

Aile RID-8'den benzer etkilenmiş anne ve oğluna ait DNA örnekleri, TBX5 moleküler analizi için yurt dışına (Laboratoire de Biochimie, Biologie Moleculaire, Hormonologie, Metabolisme-Nutrition, Oncologie, Centre de Biologie et Pathologie-CHRU 59037 Lille Cedex, Fransa) gönderilmişti. TBX5 geninde dizi analizi ve MLPA ile mutasyon saptanmamıştı. Olgularda ayırıcı tanıda yer alan Okihiro sendromu için SALL4 dizi analizi ile heterozigot c.2484delG (p.Phe829Leufs*27) mutasyonu saptanmıştı. Mutasyon, daha önce literatürde bildirilmemişti, ancak çerçeve kaymasına yol açan bir değişim olması nedeniyle patolojik olarak değerlendirildi. Moleküler sonuçlar ışığında tekrar değerlendirilen olguların her ikisinde de Duane anomalisi saptandı. Her iki olguda Okihiro sendromu ile uyumlu dış kulak yolunda darlık ve etkilenmiş erkek çocukta anal stenoz saptanarak anne ve oğlunda Okihiro sendromu (Duane-radial ray syndrome- DRRS) tanısı kesinleşti. Olası renal anomaliler açısından yapılan renal ultrasonografi incelemesinde patoloji saptanmadı.

RID-9 ailesinden Holt-Oram sendromu klinik tanımlı indeks olguda TBX5 geninin kodlayan bölgeleri, intron ve ekzon sınır bölgeleri Sanger yöntemiyle dizilendi ve ekzon 5'te daha önce literatürde tanımlanmamış heterozigot c.481A>C değişimi saptandı. Bağımsız örnek tekrarında aynı değişim gözlemlendi ve olası taq polimeraz hatası dışlandı. Anne ve babanın bu değişimi taşımadıkları gösterildi. TBX5 geninde saptanan c.481A>C değişimi, protein zincirinde, 160. kodondan kodlanan "yüksüz polar hidroksil grubu" olan treonini, "nonpolar" proline dönüştürmektedir (p.Thr160Pro). Değişimin oluştuğu bölge, TBX5 geninin kodladığı T-box transkripsiyon faktörünün, transkripsiyonel düzenlenmesinde önemli olan ve DNA bağlanma özelliği gösteren T-box domaini'nde yer almaktadır. Yanlış anlamalı değişimlerin patolojik olup olmadığını değerlendiren interaktif web tabanlı Mutation Taster programı, bu değişimin >% 99,9 patolojik bir mutasyon olduğu tahminini verdi. Bu nedenle, olguda saptanan c.481A>C değişimi, Holt-Oram sendromu ile ilişkili bir mutasyon olarak değerlendirildi.

RID-10 ailesinde Holt-Oram sendromu klinik tanımlı indeks olgunun değerlendirilmesi sırasında annenin 28 haftalık gebeliği mevcuttu. Antenatal ultrasonda fetusta her iki ön kolda tek kemik, sağ elinde başparmak agenezisi, kalpte inlet tipi VSD ve tek umbilikal arter bulguları saptandı. Amniyosentez ile elde edilen fetal hücrelerin karyotip analizinde görünürde dengeli bir resiprokal translokasyon (46,XY,t(2;12)(q31;q24.3)) saptandı. Translokasyona katılan kromozomlardan 12. kromozomun kırık noktası, TBX5 geninin bulunduğu lokustan (12q24.21) geçmekteydi. Kırık noktasının, TBX5 geninin yapısını bozarak Holt-Oram sendromuna yol açabileceği düşünüldü. Etkilenmiş olgunun da fetustaki dengeli translokasyonu



Şekil 2. a-g. Aile RID-10. (a). İndeks olgu (IV-4), (b). etkilenmiş annede bilateral tenar hipoplazi ve proksimal yerleşimli başparmaklar, (c) ve (d). etkilenmiş annenin babası (III-2), bilateral başparmak agenezisi, (e) ve (f). etkilenmiş annenin amcası (III-4), pektus ekskavatus ve bilateral hipoplastik el başparmakları, (g). aile ağacı.

taşıdığı gösterildi. Gebeliğin terminasyonu seçeneğini aile kabul etmedi. Doğan erkek bebeğin postnatal 12. günde öldüğü öğrenildi. Ölü bebeğin postmortem muayenesi aile izin vermediğinden yapılamadı. Olgunun eşi ve sağlıklı oğlunun kromozom analizi normal sonuçlandı. Etkilenmiş olguda array-CGH analizinde herhangi bir kromozomal kopya sayısı değişikliği saptanmadı. Aile ağacı genişletildiğinde toplam 9 etkilenmiş birey olduğu belirlendi (Şekil-2). Bu olgulardan IV-4 ve V-3'te ek olarak kalp anomalileri mevcuttu.

RID-11 ailesinde indeks olguda dismorfik bulgulara eşlik eden hipotoni ve ekstremitte anomalileri nedeniyle ayırıcı tanıda kromozom anomalileri (özellikle trizomi 18) düşünüldü ve sitogenetik analizde trizomi 18 tanısı kesinlik kazandı.

TARTIŞMA

RID, üst ekstremitelerin preaksiyel kısımlarını (radius, skafoid ve trapezium kemiği, başparmağa ait metakarp ve falanks yapıları) tutan gelişimsel defektlerle karakterizedir ve başparmak hipoplazisinden, radius ve başparmağın yokluğuna kadar değişen ağırlıkta gözlenebilmektedir (15). Üst ekstremitenin en sık gözlenen konjenital anomalileri olan RID, izole ya da sendromik olabilir. İzole RID, olguların % 8-30'unu oluşturmaktadır (16, 17). RID, çoğunlukla eşlik eden bir ya da daha fazla major anomali ile birlikte gözlenmekte, özellikle bilateral RID olgularında perinatal ölüm oranı %35 gibi yüksek oranda olabilmektedir (4, 17).

RID'in yaklaşık üçte ikisinin sendromik olması ve sıklıkla kardiyolojik, hematolojik, ürogenital ve/veya sindirim sistemi anomalileri ile birlikte gözlenmesi (18) nedeniyle, bu olguların doğru klinik ve moleküler tanı alması, olguların izlemi açısından önemlidir. Ayrıca, RID ile ilişkili birçok sendromun ortak klinik bulgular göstermesi, özellikle antenatal dönemde saptanan RID'de hasta yönetimi açısından zorluklara yol açabilmektedir. Bu nedenle klinik tanının moleküler tanı ile doğrulanmasının önemi büyüktür.

RID ilişkili genlerin büyük ve çok sayıda olması, ayrıca mutasyonların heterojen dağılımı moleküler genetik analizleri zorlaştırmakta ve maliyeti arttırmaktaydı. Bu nedenle moleküler analizleri hızlandırmak ve ekonomik açıdan uygun hale getirmek amacıyla YND teknolojisi için "radyal ışın defekti sendromları" paneli oluşturuldu. Hazırlanan panelin, ülkemizde RID ve ilişkili sendromların tanısında etkinliğini, RID sendromları ile ilişkili gen/ler ve özgün mutasyon/ları araştırmak, ayrıca herhangi bir mutasyon saptanmayan olguların DNA örneklerinin bir sonraki aşamada tüm ekzom veya tüm genom dizileme çalışmaları için bankalanarak önemli bir kaynak oluşturması öngörüldü.

Serimizdeki 37 ailenin 2'sinde kromozom analizi (%5,4), 4'ünde ise özgün klinik tanının yönlendirmesi ile hedef genlerde yapılan moleküler analizlerle (%10,8) tanı konulabilmişti. Diğer 31 ailenin indeks olguları YND paneli ile incelendiğinde tanı oranı %16 (5 aileden 5 olgu) olarak gerçekleşti, böylece tüm serideki tanı oranı %29,7 ye ulaştı.

YND paneli ile tanı alan olguların üçünde, Fanconi anemisi ile ilişkili *FANCA* (n:2) ve *BRIP1* (n:1) genlerinde, bir olguda CdLS ile ilişkili *NIPBL* geninde ve bir olguda ise Roberts sendromu ile ilişkili *ESCO2* geninde mutasyon saptandı. Bu sendromların klinik olarak tanınabilen özgün sendromlar olması nedeniyle ilişkili genlerin Sanger tekniği ile incelenmesi düşünülebilirdi, ancak genlerin büyük olması ve CdLS ve Fanconi anemisi ile ilişkili birden fazla gen olması nedeniyle YND yöntemi bu olguların moleküler analizlerinde zaman ve maliyet açısından daha etkin olmaktadır. Ayrıca, ortak klinik bulgular gösteren RID ilişkili sendromların klinik ayırıcı tanısında güçlükler yaşanabilmesi, birçok sendrom ile ilişkili genlerin eş zamanlı moleküler analizine olanak tanınması nedeniyle YND tekniğini Sanger dizilemeye göre daha avantajlı bir yöntem haline getirmektedir.

Fanconi anemisi ile ilişkili 21 gen (OMIM #227650) tanımlanmıştır. Fanconi anemili olgularda en sık *FANCA* geninde (~% 60) mutasyon saptanırken, olguların yalnızca %2'inde *BRIP1* geni mutasyonları bildirilmekte-

dir (19). Bizim çalışmamızda ise Fanconi anemisi kesin tanıılı 4 ailenin 3'ünde (%75) *FANCA* geninde, 1 ailede (%25) *BRIP1* geninde mutasyon saptanmış olması ülkemizdeki Fanconi anemisi ile ilişkili genlerin sıklık sıralamasının yapılmasına olgu sayısının azlığı nedeniyle katkı sağlayamamaktadır. Ancak, *BRIP1* geninde mutasyon saptanan ailede (RID-5) ebeveynler arasında akraba evliliği olmaması ve etkilenmiş olguda birleşik heterozigot mutasyon saptanması, *BRIP1* mutasyon taşıyıcılığının ülkemizde Avrupa topluluklarına göre daha sık gözlenebileceğini ve moleküler tanılı Fanconi sendromlu olgu sayısının arttığı durumda ülkemizdeki Fanconi anemisi ile ilişkili genlerin sıklık sıralamasının farklı olabileceğini işaret etmektedir.

FANCA geninde mutasyon saptanan 3 farklı aileden (4 birey) ikisinde c.894-2A>G mutasyonu, diğerinde ise (iki kardeş) c.4261-2A>C homozigot mutasyonu saptandı. Her iki mutasyon da *FANCA* geninde kırılma hatasına yol açan ve daha önce Fanconi anemili olgularda bildirilmiş mutasyonlardı (7, 8, 12). Çalışmamızda, *FANCA* geninde saptanan c.4261-2A>C mutasyonunun *FANCA* geninde 42. intronun kırılmamasına yol açan patolojik bir değişim olduğu, cDNA düzeyinde yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (12). Aynı çalışmada, c.4261-2A>C mutasyonu saptanan aynı aileden etkilenmiş üç olgunun üçünde de hipoplastik el başparmakları, ikisinde mikrosefali, mental retardasyon ve işitme kaybı ve iki olguda da böbrek anomalisi (unilateral renal agenezi/pelvik ektopik böbrek) saptanmıştır. Ayrıca bu olgularda ortalama 8.5 yaşında kemik iliği yetmezliği ve iki olguda ise sırasıyla 26 ve 30 yaşlarında yassı hücreli deri kanseri gelişmiştir. Bizim çalışmamızda aynı mutasyonu taşıyan etkilenmiş iki kardeş (RID-6.1 ve RID-6.2) olguda ise klinik bulgular daha hafifti. Her iki olguda da başparmak anomalisi mevcuttu. Ancak böbrek anomalisi, mikrosefali, mental retardasyon ve işitme kaybı bulguları yoktu. En son 19 yaş 6 aylık (RID-6.1) ve 13 yaş 8 aylık (RID-6.2) değerlendirilen iki olguda belirgin bir transfüzyon gereksinimi oluşmamıştı, kemik iliği naklini gerektirecek düzeyde kemik iliği yetmezliği ve malignite gelişmemişti. Ancak olgularımıza malignite açısından izlem önerilmişti (12). *FANCA* geninde protein ürününün hiç oluşmamasına yol açan homozigot *null* mutasyonların, anormal protein ürünlerine yol açan mutasyonlara kıyasla daha erken yaşta anemi gelişmesine ve daha yüksek malignite insidansına neden olduğu gösterilmiştir (20). Olgularımızdaki *FANCA* c.4261-2A>C mutasyonunun, kırılma hatasına yol açarak anormal protein ürününün oluşmasına neden olduğu göz önünde bulundurulduğunda, daha hafif bir fenotipin gözlenmesi literatürle uyumlu bir bulgudur. Bu mutasyon, literatürde sadece bir Arap ailesinden etkilenmiş üç olguda bildirilmiştir (12) ve bu nedenle, mutasyon özelinde genotip-fenotip korelasyonu yapmak için olgu sayısının yetersiz olduğunu düşünmekteyiz. Fanconi anemisi moleküler etyopatogenezi ve genotip-fenotip korelasyonu çalışmaları ile bu

konu daha fazla aydınlatıldığında, hastaların prenatal ve postnatal yönetimlerinde daha etkin olunacaktır.

Fanconi anemisi ile ilişkili genlerden *BRIP1* (*FANCI*) (11, 21, 22) geninin önemli DNA tamir yollarından biri olan FA-yolunda yer aldığı ve monoubikuitine-FANCD2'nin BRCA1 ile etkileşimi için gerekli olan bir helikaz geni olduğu gösterilmiştir (23, 24). Biallelik mutasyonları Fanconi anemisi ile ilişkili olan *BRIP1*'in, monoallelik mutasyonlarının ise meme kanserine yakınlık ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (25).

BRIP1 mutasyonu taşıyan Fanconi anemili olgularda genellikle ağır fiziksel anomaliler gözlenmekte ve ortalama 4-5 yaşlarında kemik iliği yetmezliği gelişmektedir (21). Tüm olgularda büyüme geriliği ile RID ve bazı olgularda ek olarak ürogenital, kardiyovasküler, iskelet anomalileri, hidrosefali, yarık damak, mikroftalmi, psikomotor gerilik gibi ek bulgular gözlenmiştir (21). Çalışmamızda, *BRIP1* geninde birleşik heterozigot mutasyon saptadığımız olguda (RID-5), literatürdeki olgular ile uyumlu olarak ağır büyüme geriliği, mikrosefali, bilateral RID, anal atrezi, at nalı böbrek ve hidrosefali gibi majör anomaliler mevcuttu (21). *BRIP1* geninde saptanan iki farklı heterozigot değişimden c.205+5G>T mutasyonu daha önce Fanconi anemisi ile ilişkili bir mutasyon olarak tanımlanmıştır (8, 11). Bu mutasyonun, kırılma hatasına yol açarak, *BRIP1*'in helikaz motif I bölgesini kodlayan 3. ekzonunun delesyonuna yol açtığı, cDNA düzeyinde gösterilmiştir (11). Bu ailede saptanan c.761_764de-*LAGCA* değişimi ise daha önce literatürde bildirilmemiştir. Ancak bu değişimin, protein düzeyinde 254. kodonda lizin yerine arjinin gelmesine, çerçeve kaymasına ve ardışık 19. kodonda dur şifresi oluşturarak protein trunkasyonuna yol açması beklendiğinden (p.K254Rfs*19) patojenik bir değişim olarak değerlendirildi.

Cornelia de Lange sendromu klinik tanılı olgu RID-3'te saptanan *NIPBL* genindeki c. 6893G>A (p.Arg2298His) yanlış anlamlı mutasyonu, daha önce CdLS olgularında bildirilmiştir (9). Ayrıca, *NIPBL* geninde yanlış anlamlı mutasyon saptanan olgularda, diğer mutasyon tiplerine (çerçeve kayması, anlamsız veya kırılma hatasına yol açan mutasyonlar) göre fenotipin daha hafif olduğu, özellikle ekstremite anomalileri ve psikomotor gerilik bulgularında bu farkın daha belirgin olduğu bildirilmiştir (9). Bizim olgumuzda da literatürle uyumlu olarak ekstremite anomalileri daha hafif ve psikomotor gerilik orta düzeyde idi.

Klinik olarak Roberts sendromu tanısı alan ve sitogenetik analiz ile erken sentromer ayrışması gösterilerek, tanısı kesinleşen olguda (RID-4) YND ile *ESCO2* geninde homozigot c.1104_1105insA değişimi saptanmıştı. Peptid zincirinde 371. kodondaki treonin aminoasidinin yerine asparajinin gelmesine ve ardışık 32 kodon sonra çerçeve kayması (p. T371Nfs*32) ile dur kodonuna neden olan değişim, daha önce bildirilmiş Roberts sendromu ile ilişkili bir mutasyondur (10). Roberts sendromu'nda genotip-fenotip korelasyonu yapılamamaktadır. *ESCO2* genindeki

mutasyonların yeri ve/veya tipi ile klinik fenotip arasında bir bağlantı kurulamamakta, hatta aynı ailede aynı mutasyonu taşıyan bireyler arasında bile belirgin klinik farklılıklar gözlenebilmektedir (26, 27). Bizim olgumuzda da ESCO2 geninde homozigot çerçeve kaymasına yol açan bir mutasyon saptanmasına rağmen, klinik bulgular oldukça hafifti.

Nager sendromu klinik tanılu olgu RID-7'de, SF3B4 geninde saptanan c.1147delC mutasyonu, protein düzeyinde 383. pozisyonadaki histidin aminoasidinin yerine metiyoninin gelmesine ve sonraki 75 aminoasidin değişmesine neden olan çerçeve kaymasına yol açmaktadır (p.H383Mfs*75). Bu mutasyon, daha önceki çalışmalarda Nager sendromu ile ilişkili bir mutasyon olarak bildirilmiştir (13, 14). Literatürde olgumuz ile aynı mutasyonu taşıyan iki olgudan birinde ek olarak konjenital diafragma hernisi, mikrosefali ve SGA doğum öyküsü mevcuttu ve doğum sırasında kaybedilmişti (14). İki yaşındayken tanı alan diğer olguda ise, psikomotor gerilik saptanmıştı (13). Ayrıca, her iki olguda radius ve başparmak aplazilerini içeren ağır RID mevcuttu. Bizim olgumuzun ise doğum boy, tartı ve baş çevresi normaldi. Radyal ışın defektleri (hipoplastik ve ankiloze el başparmakları) daha hafifti. Ancak, iki buçuk aylık muayenesinde büyüme geriliği ve mikrosefali saptanan olgu 5 aylıkken solunum yetmezliği nedeniyle kaybedildi. Olgumuzda saptanan c.1147delC mutasyonunun daha ağır bir fenotiple ilişkili olabileceği düşünülebilir. Ancak olgu sayısının sınırlı sayıda olması nedeniyle, bu konuda kesin bir kanaate varmak güçtür, yeni olguların tanımlanması ile bu görüşün desteklenmesi gerekmektedir.

DRRS (*Duane-Radial Ray syndrome*, Okihiro sendromu), RID ve *Duane* anomalisi ile karakterizedir ve Holt-Oram sendromu'nun ayırıcı tanıları arasında yer alır. Her iki sendromda da radyal ışın defektlerine eşlik eden kalp anomalileri gözlenir. Ancak DRRS'de farklı olarak *Duane* anomalisi, ürogenital anomaliler ve nadiren gastrointestinal anomaliler (Hirschsprung hastalığı) de gözlenebilir. Holt-Oram sendromu klinik ön tanısı alan ve *TBX5* geninde mutasyon saptanmayan bazı olgularda *SALL4* geninde mutasyon saptanması, bu sonuç üzerine tekrar değerlendirilen olguların çoğunda *Duane* anomalisi veya renal anomalilerin varlığı ile tanının DRRS ile uyumluluğu moleküler analizlerin tanıdaki önemini göstermektedir (28, 29). RID- 8 ailesinden etkilenmiş her iki olgu ilk aşamada Holt-Oram sendromu klinik tanısı almış, *TBX5* geninde mutasyon saptanmayınca *SALL4* geninde heterozigot c. 2484delG (p.Phe829Leufs*27) mutasyonu gösterilmesiyle klinik tanı DRRS olarak kesinleşmiş oldu. Klinik açıdan her iki olgu yeniden değerlendirildiğinde, DRRS ile uyumlu bulguların varlığı gözlemlendi. Olgularımız ve literatürdeki benzer olgular, RID ve/veya kalp anomalileri varlığı ile değerlendirilen olguların ayırıcı tanısında Holt-Oram sendromu ile birlikte DRRS'nin de mutlaka yer alması, olguların *Duane* anomalisi ve ürogenital anomaliler açısından değerlendirilmesi gerektiğine işaret etmektedir.

RID ile ilişkili en sık gözlenen sendrom Holt-Oram sendromu'dur (30). Holt-Oram sendromu için kesin tanı kriterleri; olguda veya aile öyküsünde kardiyak septal defektler (ASD, VSD) ve/veya kardiyak ileti defektlerine eşlik eden RID olarak tanımlanmıştır ve bu tanı kriterlerini karşılayan olguların %74'ünde, *TBX5* geninde mutasyon saptandığı (31) bildirilmişse de bazı çalışmalar *TBX5* geninde mutasyon saptama oranını %22-35 arasında vermektedir (28, 32, 33). Bizim çalışmamızda da Holt-Oram sendromu kesin tanı kriterlerini karşılayan biri ailevi olmak üzere 7 olgunun sadece ikisinde (~%29) *TBX5* geni ile ilişkili mutasyon gösterilmesi literatür ile uyumlu idi. Bu durum, Holt-Oram sendromu'nun genetik heterojenitesini, sendrom ile ilişkili olası tanımlanmamış yeni gen/genlerin varlığını düşündürmektedir. Holt-Oram sendromlu iki aileden birinde (RID-9) *TBX5* geninde daha önce tanımlanmamış c.481A>C değişimi saptanırken, diğer olguda (ailevi, RID-10) *TBX5* lokusundan geçen (12q24) dengeli resiprokal bir translokasyon varlığı saptanmıştı. *TBX5* geninde saptanan c.481A>C değişimi, protein zincirinde, 160. kodondan kodlanan "yüksüz polar hidroksil grubu" olan treonini, "nonpolar" proline dönüştürmektedir (p.Thr160Pro). *TBX5* geninde saptanan mutasyonların büyük çoğunluğu 55-237. aminoasitler arasında yer alan, ileri derecede korunmuş bir bölge olan ve DNA bağlanma özelliği gösteren *T-box* domaininde gözlenmektedir (33). Olgumuzda saptanan c.481A>C değişimi de bu bölgede bulunmaktadır. Ayrıca, yanlış anlamlı değişimlerin patolojik olup olmadığını değerlendiren interaktif web tabanlı *Mutation Taster* programına göre, bu değişim >%99.9 patolojik bir mutasyon olarak değerlendirilmektedir. Bu nedenle, olguda saptanan c.481A>C değişimi, Holt-Oram sendromu ile ilişkili yeni bir mutasyon olarak değerlendirilmiştir. RID-10 ailesinde ise, etkilenmiş anne ve oğlunda, 2 ve 12. kromozomlar arasında kırık noktalarından biri *TBX5* lokusundan (12q24) geçen dengeli resiprokal bir translokasyon saptandı. Etkilenmiş diğer aile bireyleri kromozom analizinin yapılmasına izin vermediğinden aile içi segregasyon gösterilemedi. Holt-Oram sendromlu olgularda 12q24 lokusundan geçen kromozomal yeniden düzenlenmeler ender de olsa bildirilmiştir ve sendrom-*TBX5* geni ilişkisi ilk kez, benzer bir translokasyon taşıyan olguda tanımlanmıştır (34, 35). Otozomal dominant ya da X'e bağlı kalıtmı tek gen sendromlarında kromozomal yeniden düzenlenmeler ilişkili geni/leri henüz bilinmeyen sendromlarda, genlerin lokalizasyonlarının belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Benzeri kromozomal yeniden düzenlenmelerin, genlerde yıkıma (güdük protein kodlanması ile) yol açtığı kabul edilmektedir. Bu bulgu, otozomal dominant hastalıklarda, ilişkili gende mutasyon saptanmadığı durumda, kromozom anomalilerinin de etyopatogenezden sorumlu olabileceğini göstermesi açısından çok anlamlı bir örnek oluşturmaktadır.

RID ile giden 14 farklı fenotip ile ilişkili 43 genin YND yöntemi ile analiz edildiği çalışmamızda, 26 olguda mutasyon saptanmadı. Mutasyon saptanmayan olgular klinik bulgular açısından değerlendirildiğinde; 4 olgu VACTERL birlikteliği ile uyumlu bulundu. VACTERL birlikteliği, verteb-

ral anomaliler, anal atrezi, trakeo-özofageal fistül, renal anomaliler ve ekstremite anomalilerinin rastgele olmayan birliktelikleri ile karakterizedir. VACTERL klinik tanısı için beş bulgudan en az üçünün olması ve fenotipin başka sendromlarla uyumlu olmaması gerekir (36). *Hilger ve ark.* (2015), siliyopati ile ilişkili 25 aday genin hedefe yönelik YND ile yaptıkları çalışmada, 4 olguda *ZIC3* geninde, 1 olguda ise *FOXF1* geninde mutasyon saptamıştır. Gelişimin erken evrelerinde fare embriyolarındaki çalışmalar, VACTERL birlikteliğinde etkilenen organlarla uyumlu olarak presomitik mezoderm ve ekstremiteler, özofagus, trakea, vertebral, anal ve genital tüberkül dokularında *Zic3* ve *Foxf1*'in ifade edildiğini göstermiştir (37). Bu iki gen YND panelimizi tasarladığımız 2014 yılında henüz bilinmediğinden panelde yer almamaktadır. Bir sonraki aşamada, olgu serimizde yer alan VACTERL birlikteliği ile uyumlu 4 olguda *ZIC3* ve *FOXF1* genleri dizi analizi tamamlanabilir. Bu iki gendeki mutasyonların VACTERL ile ilişkisi protein düzeyinde yapılacak çalışmalarla kesinlik kazandığında ise RID ile giden sendromlar için tasarlanan gen panelimize *ZIC3* ve *FOXF1* genlerinin de eklenmesi, bu gruptaki olguların moleküler tanısına katkı sağlayabilir.

Serimizde yer alan olgulardan biri RID'a eşlik eden konjenital kalp anomalileri, vertebral anomaliler, fasyal asimetri ve preauriküler deri uzantısı bulguları ile klinik olarak ökulo-aurikulo-vertebral spektrum (hemifasyal mikrozomi, Goldenhar sendromu, OMIM %164210) fenotipi ile uyumlu bulundu. Goldenhar sendromu ile ilişkili bir gen henüz tanımlanmamıştır. Bu çalışma kapsamında incelenen genlerde olgumuzda da herhangi bir mutasyon saptanamadı.

RID'a eşlik eden ek malformasyonların gözlemlendiği 13 olgumuzda ise özgün klinik tanımımız yoktu ve YND panelinde mutasyon saptanmadı.

Özetle, çalışmamızda yer alan 37 aileden etkilenmiş 48 olgu klinik ve moleküler/sitogenetik bulgular eşliğinde değerlendirildiğinde; 37 aileden 11 ailede klinik tanı, laboratuvar bulguları (moleküler/sitogenetik) ile desteklendi (tablo-2). Bu 11 aileden 6 olgu Fanconi anemisi, 2 olgu Holt-Oram sendromu, 1 olgu Okihiro sendromu, 1 olgu Cornelia de Lange sendromu, 1 olgu Roberts sendromu, 1 olgu Nager sendromu ve 1 olgu trizomi 18 tanısı aldı. Bu olgular içerisinde, daha önce moleküler/sitogenetik tanı almamış olan 5 aileden 5 indeks olgu, RID ile giden sendromlar için tasarladığımız yeni nesil dizileme paneli ile moleküler tanı aldı. Mutasyon saptanmayan 26 indeks olgu klinik bulguları ile değerlendirildiğinde; 5 olgu Holt-Oram sendromu ile, 4 olgu VACTERL birlikteliği ile, 1 olgu Goldenhar sendromu ile, 1 olgu ise CdLS ile uyumluydu. İki olgu ise izole RID olarak değerlendirildi. Klinik olarak bilinen bir sendromla uyumlu bulunmayan 13 RID olgusunda moleküler analiz ile mutasyon saptanmadığı için bilinen gen mutasyonları ilişkili sendromlar dışlanmış oldu.

Olgu serimizde RID ile giden sendromlar içerisinde en sık Holt-Oram sendromu, Fanconi anemisi ve VACTERL bir-

likteliği gözlenmekteydi. Mutasyon saptanmayan olgular, RID ile giden sendromlarla ilişkili yeni genlerin araştırılacağı ileri moleküler araştırmalar için değerli bir kohort oluşturmaktadır.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı (25.12.2014 tarih ve 1939 sayı).

Hasta Onamı: Çalışmaya katılan hastalardan veya ailelerinden aydınlatılmış yazılı onam alındı.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - Ş.A., H.K., Z.O.U.; Tasarım - Ş.A., G.T., Z.O.U.; Denetleme - Ş.A., Z.O.U., S.B., G.T., H.K.; Kaynaklar - S.B., Z.O.U., G.T., G.B., B.K., U.A.; Malzemeler - Ş.A., G.T., G.B.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - Ş.A., G.B., G.T., Z.O.U., U.A., H.K.; Analiz ve/veya Yorum - Ş.A., Z.O.U., G.T., S.B., B.K.; Literatür Taraması - Ş.A., G.B., G.T.; Yazıyı Yazan - Ş.A., G.B., S.B., Z.O.U.; Eleştirel İnceleme - Ş.A., Z.O.U., S.B., B.K., H.K., G.B., G.T., U.A.

Teşekkür: Bu çalışmaya maddi destek sağlayan İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne, çalışmaya katılan hastalara ve ailelerine teşekkür ederiz.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 2748/53123 ve 50170 proje numaraları ile desteklenmiştir.

Ethics Committee Approval: This study was approved by Ethical Committee of Istanbul University, Faculty of Medicine (Dec 25th, 2014 - 1939).

Informed Consent: All affected individuals or their legal guardians gave written informed consent to the study.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - Ş.A., H.K., Z.O.U.; Design - Ş.A., G.T., Z.O.U.; Supervision - Ş.A., Z.O.U., S.B., G.T., H.K.; Resources - S.B., Z.O.U., G.T., G.B., B.K., U.A.; Materials - Ş.A., G.T., G.B.; Data Collection and/or Processing - Ş.A., G.B., G.T., Z.O.U., U.A., H.K.; Analysis and/or Interpretation - Ş.A., Z.O.U., G.T., S.B., B.K.; Literature Search - Ş.A., G.B., G.T.; Writing Manuscript - Ş.A., G.B., S.B., Z.O.U.; Critical Review - Ş.A., Z.O.U., S.B., B.K., H.K., G.B., G.T., U.A.

Acknowledgements: We thank Istanbul University Scientific Research Projects Unit for funding this study. We also thank the patients and their families for participating in this study.

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

Financial Disclosure: This study was funded by Istanbul University Scientific Research Projects Unit (project numbers: 2748/53123 and 50170).

KAYNAKLAR

1. Ashhurst DE. The influence of mechanical conditions on the healing of experimental fractures in the rabbit: a microscopical study. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1986;313(1161):271 - 302. [CrossRef]
2. Bellaiche N. Imaging in oral implantology. In: Scortecchi GM, Misch CE, Benner KU (eds). *Implants and Restorative Dentistry*. London, England: Martin Dunitz Ltd, 2001;181.
3. Bouckennooghe T, Remacle C, Reusens B. Is taurine a functional nutrient? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006;9(6):728-33. [CrossRef]
4. Buckwalter JA. Musculoskeletal tissue healing. In: Weinstein SL, Buckwalter JA (eds). *Turek's Orthopaedics, Principles and Their Applications*, 6th ed. Philadelphia, Pennsylvania, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2005;57-63.
5. Cetinus E, Kilinc M, Uzel M, et al. Does long-term ischemia affect the oxidant status during fracture healing? *Arch Orthop Trauma Surg* 2005;125(6):376-80. [CrossRef]
6. Demers LM. Bone specific alkaline phosphatase. In: Eastell R, Baumann M, Hoyle NR, Wiczorek L (eds). *Bone Markers Biochemical and Clinical Perspectives*, London, England: Martin Dunitz Ltd, 2001;57-8.
7. Durak K, Sönmez G, Sarisozen B, Özkan S, Kaya M, Öztürk C. Histological assessment of the effect of alpha-tocopherol on fracture healing in rabbits. *J Int Med Res* 2003;31(1):26-30. [CrossRef]
8. Duygulu F, Yakan B, Karaoğlu S, Kutlubay R, Karahan OI, Öztürk A. The effect of zymosan and the protective effect of various antioxidants on fracture healing in rats. *Arch Orthop Trauma Surg* 2007;127(7):493-501. [CrossRef]
9. Frost HM. The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I. *Clin Orthop Relat Res* 1989;248:283-93.
10. Garrett IR, Boyce BF, Oreffo RO, Bonewald L, Poser J, Mundy GR. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 1990;85(3):632-9. [CrossRef]
11. Göktürk E, Turgut A, Baycu C, Günal I, Seber S, Gülbaş Z. Oxygen free radicals impair fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand* 1995;66(5):473-5. [CrossRef]
12. Goldberg VM, Powell A, Shaffer JW, Zika J, Bos GD, Heiple KG. Bone grafting: role of histocompatibility in transplantation. *J Orthop Res* 1985;3(4):389-404. [CrossRef]
13. Halıcı M, Öner M, Güney A, Canöz Ö, Narin F, Halıcı C. Melatonin promotes fracture healing in the rat model. *Eklemler Hastalıkları* 2010;21(3):172-7.
14. Huo MH, Troiano NW, Pelker RR, Gundberg CM, Friedlaender GE. The influence of ibuprofen on fracture repair: biomechanical, biochemical, histologic, and histomorphometric parameters in rats. *J Orthop Res* 1991;9(3):383-90. [CrossRef]
15. Huxtable RJ. Physiological actions of taurine. *Physiol Rev* 1992;72(1):101-63. [CrossRef]
16. Kim JW, Kim C. Inhibition of LPS-induced NO production by taurine chloramine in macrophages is mediated through Ras-ERK-NF-kappaB. *Biochem Pharmacol* 2005;70(9):1352-60. [CrossRef]
17. Lykkesfeldt J. Determination of malondialdehyde as dithio-barbituric acid adduct in biological samples by HPLC with fluorescence detection: comparison with ultraviolet-visible spectrophotometry. *Clin Chem* 2001;47(9):1725-7.
18. Mohamad S, Shuid AN, Mohamed N, et al. The effects of alpha-tocopherol supplementation on fracture healing in a postmenopausal osteoporotic rat model. *Clinics (Sao Paulo)* 2012;67(9):1077-85. [CrossRef]
19. Mohamadnia AR, Shahbazkia HR, Sharifi S, Shafaei I. Bone-specific alkaline phosphatase as a good indicator of bone formation in sheepdogs. *Comp Clin Pathol* 2007;16(4):265-70. [CrossRef]
20. Park E, Alberti J, Quinn MR, Schuller-Levis G. Taurine chloramine inhibits the production of superoxide anion, IL-6 and IL-8 in activated human polymorphonuclear leukocytes. *Adv Exp Med Biol* 1998;442:177-82. [CrossRef]
21. Park S, Kim H, Kim SJ. Stimulation of ERK2 by taurine with enhanced alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in osteoblast-like UMR-106 cells. *Biochem Pharmacol* 2001;62(8):1107-11. [CrossRef]
22. Petrovich YA, Podorozhnaya RP, Kichenko SM, Kozlova MV. Effects of selenium-containing compounds and their metabolism in intact rats and in animals with bone fractures. *Bull Exp Biol Med* 2004;137(1):74-7. [CrossRef]
23. Pincemail J. Free radicals and antioxidants in human diseases. In: Favier AE, Cadet J, Kalyanaraman B, Fontecave M, Pierre JL eds. *Analysis of free radicals in biological systems*, Basel, Switzerland: Birkhäuser; 1995: 83-98. [CrossRef]
24. Roysommuti S, Azuma J, Takahashi K, Schaffer S. Taurine cytoprotection: From cell to system. *Thai J Physiol Sci* 2003;16(2):17-27.
25. Rozen N, Lewinson D, Bick T, Meretyk S, Soudry M. Role of bone regeneration and turnover modulators in control of fracture. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2007;17(3):197-213. [CrossRef]
26. Sarisozen B, Durak K, Dincer G, Bilgen OF. The effects of vitamins E and C on fracture healing in rats. *J Int Med Res* 2002;30(3):309-13. [CrossRef]
27. Schuller-Levis GB, Park E. Taurine and its chloramine: modulators of immunity. *Neurochem Res* 2004;29(1):117-26. [CrossRef]
28. Shuid AN, Mohamad S, Muhammad N, et al. Effects of alpha-tocopherol on the early phase of osteoporotic fracture healing. *J Orthop Res* 2011;29(11):1732-8. [CrossRef]
29. Silverton SF, Mesaros S, Markham GD, Malinski T. Osteoclast radical interactions: NADPH causes pulsatile release of NO and stimulates superoxide production. *Endocrinology* 1995; 136(11):5244-7. [CrossRef]
30. Sontakke AN, Tare RS. A duality in the roles of reactive oxygen species with respect to bone metabolism. *Clin Chim Acta* 2002;318(1-2):145-8. [CrossRef]
31. Turgut A, Göktürk E, Köse N, Kaçmaz M, Öztürk HS, Seber S, et al. Oxidant status increased during fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand* 1999;70(5):487-90. [CrossRef]
32. Turk C, Halıcı M, Guney A, Akgun H, Sahin V, Muhtaroglu S. Promotion of fracture healing by vitamin E in rats. *J Int Med Res* 2004;32(5):507-12. [CrossRef]
33. Volkmer DL, Sears B, Lauing KL, Nauer RK, Roper PM, Yong S, et al. Antioxidant therapy attenuates deficient bone fracture repair associated with binge alcohol exposure. *J Orthop Trauma* 2011;25(8):516-21. [CrossRef]
34. Wojtecka-Lukasik E, Czuprynska K, Maslinska D, Gajewski M, Gujski M, Maslinski S. Taurine-chloramine is a potent anti-inflammatory substance. *Inflamm Res* 2006;55 Suppl 1:S17-S18. [CrossRef]
35. Yeler H, Tahtabas F, Candan F. Investigation of oxidative stress during fracture healing in the rats. *Cell Biochem Funct* 2005;23(2):137-9. [CrossRef]
36. Yilmaz C, Erdemli E, Selek H, Kinik H, Arıkan M, Erdemli B. The contribution of vitamin C to healing of experimental fractures. *Arch Orthop Trauma Surg* 2001;121(7):426-8. [CrossRef]
37. Yuan LQ, Liu W, Cui RR, Wang D, Meng JC, Xie H, et al. Taurine inhibits osteoclastogenesis through the taurine transporter. *Amino Acids* 2010;39(1):89-99. [CrossRef]
38. Yuan LQ, Xie H, Luo XH, Wu XP, Zhou HD, Lu Y, et al. Taurine transporter is expressed in osteoblasts. *Amino Acids* 2006;31(2):157-63. [CrossRef]
39. Zhou C, Zhang X, Xu L, Wu T, Cui L, Xu D. Taurine promotes human mesenchymal stem cells to differentiate into osteoblast through the ERK pathway. *Amino Acids* 2014;46(7):1673 - 80. [CrossRef]

INVESTIGATION OF THE FREQUENCY OF FC GAMMA RECEPTOR IIIA V/158/F GENE POLYMORPHISM AND COMPARISON OF CLINICAL AND LABORATORY FINDINGS IN RHEUMATOID ARTHRITIS (RA)

ROMATOİD ARTRİT'TE FC GAMA RESEPTÖR IIIA V/158/F GEN POLİMORFİZMİNİN SIKLIĞININ ARAŞTIRILMASI VE HASTA KLİNİK VE LABORATUAR BULGULARIYLA KARŞILAŞTIRILMASI

Ali Murat SEDEF*, Suzan DİNKÇİ**, Eren ERKEN**

*Şanlıurfa Training and Research Hospital, Şanlıurfa, Turkey

**Department of Rheumatology and Immunology, Çukurova University School of Medicine, Adana, Turkey

Cite this article as: Sedef AM, Dinkçi S, Erken E. Investigation of The Frequency of Fc Gamma Receptor Iiia V/158/F Gene Polymorphism and Comparison of Clinical and Laboratory Findings in Rheumatoid Arthritis (RA). J Ist Faculty Med 2018; 81(4): 139-144

ABSTRACT

Objective: Rheumatoid Arthritis (RA) is a chronic multisystem disease with unknown etiology that progressively affects peripheral joints. Receptors, which serve as links between humoral and cellular immune responses, recognize the Fc region of immunoglobulin G (FcR) and have become the focus of many research studies concerning the etiology and pathogenesis of autoimmune diseases. This region displays extensive genetic variation, which has been associated with susceptibility to various chronic inflammatory disorders including RA. This study aimed to investigate the frequency of the FcγRIIIA V158F genetic polymorphism and compare clinical and laboratory findings in RA.

Materials and Methods: Between April 2010 and June 2011, 105 patients, who had been diagnosed with RA according to the American Rheumatology Association (ARA) diagnostic criteria, were admitted to the Cukurova University Department of Rheumatology outpatient clinic and 110 healthy controls were included in this study. Patient groups were divided into stages using the ARA functional classification. The FcγRIIIA V158F gene polymorphism of patients was investigated from blood samples using the real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) method.

Results: There was no significant difference in the distribution of the FcγRIIIA polymorphism between patients and controls (p=.106). There were no significant differences between the distribution of age at diagnosis of patients with the gene polymorphism (p=.919) or in the gene polymorphism (p=.552). No association was found between the gene polymorphism and clinical signs of disease such as eye involvement and the presence of rheumatoid nodules. There was also no significant association

ÖZET

Amaç: Romatoid Artrit (RA), nedeni bilinmeyen, esas olarak periferik eklemleri progresif olarak tutan kronik multisistemik bir hastalıktır. Hümorale ve hücresele immün yanıtları arasında bir bağ olan, IgG' nin Fc reseptörleri otoimmün hastalıkların etyoloji ve patogenezinde oldukça ilgi çekmektedir. Geniş genetik varyasyon sergileyen bu bölge Romatoid artrit de dahil olmak üzere çeşitli kronik inflamatuvar hastalıklara yatkınlık ile ilişkilidir. Bu çalışmada Romatoid Artrit' te FcγRIIIA V158F gen polimorfizminin sıklığının araştırılması ve hasta klinik ve laboratuvar bulgularıyla karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Romatoloji Bilim Dalı polikliniğine Nisan 2010-Haziran 2011 tarihleri arasında başvuran ve Amerikan Romatizma Derneği' nin tanı kriterlerine göre RA tanısı almış 105 RA'lı hasta ve 110 sağlıklı kontrol çalışmaya dahil edildi. Hasta ve kontrollerden öyküsünde diyabet, tiroid fonksiyon bozuklukları, geçirilmiş veya mevcut kalp hastalıkları, malignite, nörolojik hastalıklar ile kronik inflamatuvar hastalıklardan bir ya da daha fazlası olanlar çalışma dışı bırakıldı. RA' lı hastaların hastalıkla ilgili semptomları, sistemik hastalık varlığı, ilaç kullanımı, hastalık süreleri ve aile öyküsü sorgulandı. Tüm olgulara genel fizik muayene ve romatolojik muayeneleri yapıldı ve rutin laboratuvar tetkikleri ile CRP, RF, ESR, ANA, Anti-DNA düzeyleri istendi. Hasta grubu ARA'nın fonksiyonel sınıflandırması kullanılarak evrelere ayrıldı. Alınan kan örneklerinde real time PCR yöntemi ile FcγRIIIA V158F gen polimorfizmleri araştırıldı.

Bulgular: Hasta ve kontrol grubunun Fc γ RIIIA gen polimorfizm dağılımları arasında anlamlı fark saptanmadı (p=0,106). Hastaların tanı aldıkları yaş dağılımları ile gen polimorfizmi arasında

İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: alimuratsedef@gmail.com

Geliş tarihi/Received Date: 22.05.2017 • **Kabul tarihi/Accepted Date:** 08.10.2018

©Copyright 2018 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

©Telif Hakkı 2018 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

between the gene polymorphism with rheumatoid factor, anti-cyclic citrullinated peptide, and antinuclear antibodies ($p=.625$, $p=.136$, $p=.716$, respectively).

Conclusion: In our study, no significant relationship was found between the FcγRIIIA V158F gene polymorphism and the pathogenesis of RA.

Keywords: FcγRIIIA V158F gene polymorphism, rheumatoid arthritis

anlamli fark saptanmadı ($p=0,919$). Hastaların cinsiyet dağılımlarına göre de gen polimorfizmi açısından anlamli fark saptanmadı ($p=0,552$). Hastalığın klinik bulgularından olan akciğer ve göz tutulumları, romatoid nodül varlığı ile gen polimorfizmi arasında ilişki saptanmadı. RF ve ANA sonuçları ile gen polimorfizmi arasında da anlamli fark saptanmadı ($p=0,625$, $p=0,716$). Hastaların anti-CCP sonuçları ile gen polimorfizmi arasında anlamli fark saptanmadı ($p=0,136$).

Sonuç: Çalışmamızda RA patogenezi ile Fc γ RIIIA 158 gen polimorfizmi arasında anlamli bir ilişki saptanmamıştır.

Anahtar Kelimeler: FcγRIIIA gen polimorfizmi, romatoid artrit

INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic multisystemic disease of unknown cause and mainly affecting peripheral joints progressively (1). It is relatively common in all adults in the world with a prevalence of about 0.5-1% (2, 3). RA causes malfunctions of various grades ranging from mild to severe and it can lead to significant social, psychological and economic problems due to its lifetime duration (1). The Fc receptors of IgG (a link between humoral and cellular immunological responses), are highly interested in the etiology and pathogenesis of autoimmune diseases and Fc gamma receptors are encoded in the long arm of chromosome 1 (4, 5). Fc receptors are proteins that contribute to the protective functions of the innate immune system located on the surface of NK, macrophages, neutrophils and mast cells (6). FcγRIIIA is involved in the pathogenesis of autoimmune diseases by acting in the clearing of circulating immune complexes. Fc gamma receptors have functions in phagocytosis, antibody-dependent cellular mediated cytotoxicity, arachidonic acid metabolism, release of histamine and other inflammatory mediators, regulation of lymphocyte production and secretion, and cell proliferation and differentiation. In particular, single nucleotide polymorphisms in FcγRIIA (R131H), FcγRIIB (I123T), FcγRIIIA (V158F) and FcγRIIIB (NA1 / NA2) have been reported in association with Systemic Lupus Erythematosus, Rheumatoid Arthritis and Idiopathic Thrombocytopenic Purpura (7, 8). Studies have shown that the results are the significant effects of Fc γ RIII A functional polymorphisms in RA.

In this study, we aimed to investigate the frequency of FcγRIIIA V158F gene polymorphism and comparison of clinical and laboratory findings in rheumatoid arthritis (RA).

MATERIAL AND METHODS

105 patients who were admitted to the Cukurova University Department of Rheumatology, between April 2010 and June 2011 who had been diagnosed with RA according to American Rheumatism Association diagnostic criteria (9) and 110 healthy controls were included in this study. Patients and controls who had had diabetes, thyroid dysfunction, past or present heart disease, ma-

lignancy, neurological disease, and one or more chronic inflammatory diseases were excluded from the study. Patients with RA were checked for disease-related symptoms, systemic disease presence, medication, duration of illness and family history. In all cases, general physical examination and rheumatological examinations were performed and full blood count, biochemical tests, thyroid hormone levels, CRP, RF, anti-CCP, ESR, ANA, and Anti-DNA levels were examined. The patient group was divided into stages using the functional classification of ARA (10). The extraarticular involvement of the patients was recorded. Blood samples were analyzed using RealTime PCR for DNA isolation and FcγRIIIA V158F gene polymorphism. At the beginning of the study, approval was obtained from the Ethics Committee of the Cukurova University for approval of the Ministry of Health.

Statistical Analysis

The Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) package program was used for statistical analysis of the data. Categorical measurements were summarized in terms of number and percentage, mean and standard deviation (continuous median and minimum-maximum where necessary) for continuous measurements. The Chi-square test statistic was used to compare categorical variables. The Mann Whitney U and Kruscal Wallis test were used to compare continuous measurements between groups. The correlation between the variables was tested using the Spearman Correlation test. Logistic regression analysis was performed by taking a dependent variable of patients and healthy groups. The statistical significance level was set as 0.05 across all tests.

RESULTS

Study Patients

Patient characteristics are summarized in table-1. The median age was 51 (20-76) for the patients and 49 (27-79) for the control group. 91 (86.7%) of the patients were female and 14 (13.3%) were male. Of the control group, 96 (87.3%) were female and 14 (12.7%) were male. Of the patients, 86 (81.9%) were non-smokers and 19 (18.1%) were smoking. Median disease duration of RA patients was 6 (1-31) years. According to the functional classification of ARA, 1 (1%) of patients with RA was stage 3, 4

Table 1. Patients characteristics

Characteristics	n (%) (Patients)	n (%) (Controls)
Median age (years old)	51 (20-76)	49 (27-79)
Gender		
Men	14 (13.3)	14 (12.7)
Women	91 (86.7)	96 (87.3)
ARA functional classification		
Stage 1	100 (95.2)	
Stage 2	4 (3.8)	
Stage 3	1 (1)	
Morning stiffness		
No	41 (39.1)	
0-30 minutes	44 (41.9)	
>30 minutes	20 (19)	
RF		
Negative	55 (52.4)	
Positive	50 (47.6)	
ANA		
1 positive	4 (3.8)	
2 positive	14 (13.3)	
3 positive	4 (3.8)	
4 positive	4 (3.8)	
Negative	79 (75.2)	
Anti-CCP		
Negative	22 (20.9)	
Positive	42 (40)	
CRP	Median 6,0 (2,0-62,0)	

RF: Rheumatoid factor; Anti-CCP: Anti-cyclic citrullinated peptide;
 ANA: Anti nuclear antibody

(3.8%) stage 2, and 100 (95.2%) stage 1. Thirty-nine per cent of the patients had no morning stiffness. 41.9% of them had less than 30 minutes and 19% had more than 30 minutes of morning stiffness. Pulmonary involvement of RA was present in 9 (8.6%) patients and eye involvement in 4 (3.8%) patients and only 1 patient had rheumatoid nodules. None of the patients had amyloidosis. When evaluated according to DAS28, 8.7% of patients with

Table 2. Fcγ R III A gene polymorphism distributions between patients and control groups

Group	Control	n	Fcγ R III A			p
			VF	FF	VV	
		55	40	15	0.106	
		%	50%	36.4	13.6	
	Patient	n	63	36	6	
		%	60	34.3	5.7	

VF: Fc gamma receptor IIIA 158 VF heterozygous form; FF: Fc gamma receptor IIIA 158 FF homozygous mutant form; VV: Fc gamma receptor IIIA 158 VV homozygous wild type

RA had low activity (n=9), 48.5% had moderate activity (n=50), 17.5% had high activity (n=18) and 25.2% (n=26) were in remission

Treatment and outcomes

All apart from 2 patients were using more than one medicine. 88 of the patients were using MTX, 17 of them were using leflunomide, 14 were using SSZ and 21 were using corticosteroids. Two patients were using only NSAIDs. Among the patients Fcγ RIII gene polymorphism distributions were found as, 36 (34.3%) homozygous mutant, 63 (60%) heterozygous and 6 (5.7%) homozygous wild type. Forty of the control group (36.4%) were homozygous mutant, 55 (50%) were heterozygous and 15 (13.6%) were homozygous wild type (Table 2).

The relationships between the patients' morning stiffness, functional stages, cigarette smoking, lung involvement, ocular involvement and rheumatoid nodule presence and Fcγ RIII gene polymorphism distributions were investigated. There was no statistically significant relationship between these parameters and the Fcγ RIII gene polymorphism distributions (table-3). There was no statistically significant correlation between the ANA, RF and anti-CCP and Fcγ RIII gene polymorphism distributions of the patients (Table 4).

DISCUSSION

Rheumatoid arthritis is a chronic systemic disease that primarily affects synovial joints, and is characterized by symmetrical, erosive synovitis, severe deformities and it is a disability that can be seen across all racial and ethnic groups (1). The relationship between the etiology and pathogenesis of RA and the association of antibodies, immunocomplexes, complement, and Fc receptors has become a growing focus of attention. Both active and inhibitory Fc receptor mediated signals play a central role in the inflammation associated with the immune complex (11).

Table 3. Polymorphism distributions according to clinical findings of patients

Variables	Fcγ R III A			p
	VV	VF	FF	
Gender				
Male	1(16,7)	10 (15.9)	3(8.3)	0.552
Female	5 (83.3)	53 (84.1)	33 (91.7)	
Morning stiffness				
Absent	3 (50)	23 (36.5)	15 (41.7)	0.779
0-30minutes	3 (50)	27 (42.9)	14 (38.9)	
>30 minutes	0 (0)	13 (20.6)	7 (19.4)	
ARA Functional Stage				
1	6 (100)	61 (96.8)	33 (91.7)	0.631
2	0 (0)	2 (3.2)	2 (5.6)	
3	0 (0)	0 (0)	1 (2.8)	
Smoking				
Yes	1 (16.7)	11 (17.5)	7 (19.4)	0.966
No	5 (83.3)	52 (82.5)	29 (80.6)	
Pulmonary involvement				
Yes	0 (0)	3 (4.8)	6 (16.7)	0.09
No	6 (100)	60 (95.2)	30 (83.3)	
Rheumatoid Nodule				
Yes	0 (0)	0 (0)	1 (2.8)	0.38
No	6 (100)	63 (100)	35 (97.2)	
Eye involvement				
Yes	1 (16.7)	2 (3.2)	1 (2.8)	0.237
No	5 (83.3)	61 (96.8)	35 (97.2)	

VF: Fc gamma receptor IIIA 158 VF heterozygous form; FF: Fc gamma receptor IIIA 158 FF homozygous mutant form; VV: Fc gamma receptor IIIA 158 VV homozygous wild type

With regard to the FcγRIII surface expression of monocytes and macrophages in circulation and synovium, it was found higher in RA patients than in healthy controls previously (12, 13). In addition, the FcγRIIIA expression in the monocytes of RA patients was found to be higher in synovial fluid than in peripheral blood (14). FcγRIIIA ligation is thought to cause TNF-a production in monocytes (15) and elevated FcγRIIIA in macrophages leads to an increase in the production of TNF-a and matrix metal-

Table 4. Polymorphism distributions according to laboratory findings of patients

Variables	Fcγ R III A			p
	VV	VF	FF	
ANA				
1 positive	0 (0)	4 (6.3)	0 (0)	
2 positive	0 (0)	8 (12.7)	6 (16.7)	
3 positive	0 (0)	2 (3.2)	2 (5.6)	
4 positive	0 (0)	3 (4.8)	1 (2.8)	0.716
RF				
Negative	4 (66.7)	34 (54.0)	17 (47.2)	
Positive	2 (33.3)	19 (52.8)	19 (52.8)	0.625
Anti-CCP				
Negative	2 (100)	13 (33.3)	7 (30.4)	
Positive	0 (0)	27 (66.7)	15 (69.6)	0.136

ANA: Anti nuclear antibody; RF: Rheumatoid factor; Anti-CCP: Anti-cyclic citrullinated peptide; VF: Fc gamma receptor IIIA 158 VF heterozygous form; FF: Fc gamma receptor IIIA 158 FF homozygous mutant form; VV: Fc gamma receptor IIIA 158 VV homozygous wild type

loproteinase I in the RA synovium (13). Together these results suggest that functional polymorphisms of FcγRIIIA are important in RA.

Kastbom et al. (16) 181 Swedish RA patients were included in the study conducted in 2005 and the association of FcγRIIIA 158V/F polymorphism with disease severity and disease susceptibility in early RA patients was examined. At the end of the study, it was observed that the FcγRIIIA 158 VV genotype in the male population had an increased risk of developing RA and that patients with early-stage RA having 158 V alleles had more severe disease course (16). Ann W. Morgan et al. In 2005, British patients and patients from Kuzhai India and Pakistan were included in the study. In this study, the FcγRIIIA-IIIIB 158 V haplotype is the haplotype that has been shown to have the strongest association with RA susceptibility (p=0.03). This relationship was found to be stronger in nodular RA (p=0.01). It has also been found that this haplotype is more common in the North Indian and Pakistani populations (17).

Nieto A. et al. (18) In 2002, 117 RA and 142 healthy controls were included in the study. The Fc γ RIII A 158 FF genotype was found to be significantly higher in patients than in non-FF patients (p=0.01). The FcγRIIIA 158 VF genotype was found to be elevated in the healthy control group (p=0.021). No association was found between

genotype and clinical findings. Analysis of the Fc γ R11A 158 FF genotype in combination with the common epitope revealed that the presence of both factors increased RA susceptibility ($p=0,0009$) (18). Morgan AW et al. (11) conducted in 2002 investigated the relationship between Fc γ R11A functional polymorphism and RA in two different ethnic groups. Fc γ R11A 158 V/F polymorphism was associated with RA in both ethnic groups ($p=0,028$ for the British population, $p=0,050$ for the North Indian and Pakistani populations, and $p=0,003$ when combined analysis). Individuals with the Fc γ R11A VF and VV genotypes were found to have an elevated risk of RA in both populations (19).

In a study conducted by Thabet MM and colleagues in 2008, they investigated the distribution of Fc γ R11A 158V/F polymorphism in patients with anti-CCP positive RA. The study included 945 RA patients and 388 healthy controls from the Dutch White race. It has been shown that gene polymorphism is not associated with disease in the whole RA group. However, the Fc γ R11A 158 VV genotype in the anti-CCP positive RA group was found to be more common than in the healthy controls ($p=0,05$) (20).

We aimed to investigate the frequency of Fc γ R11A 158 gene polymorphism in patients with chronic RA under follow-up and treatment, and the relation with the clinical and laboratory findings of the disease. In our study, there was no significant difference between Fc γ R11A gene polymorphism distributions of the patients and the control group ($p=0,106$). This is the first study in Turkish society investigating the relationship and importance of Fc γ R11A 158 gene polymorphism with RA pathogenesis. In our study, no significant relationship was found between RA pathogenesis and Fc γ R11A 158 gene polymorphism. No association was found between lung involvement, ocular involvement, and presence of rheumatoid nodules and gene polymorphism. In the study conducted by Nieto et al. (18), There was no relationship between clinical findings and the Fc γ R11A genotype. There was no statistically significant difference between the RF levels of our patients and Fc γ R11A 158 gene polymorphism ($p=0,076$). In contrast to the study of Thabet MM and colleagues, no statistically significant relationship was found between anti-CCP levels and Fc γ R11A 158 gene polymorphism in our study ($p=0,136$).

According to our results, Fc γ R11A 158 gene polymorphism in RA is not associated with disease pathogenesis and clinical and laboratory findings. We believe that further study with larger patient groups is necessary for a better understanding of this relationship.

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

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

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - E.E.; Design - E.E., A.M.S.; Supervision - E.E.; Resources - A.M.S.; Materials - A.M.S., S.D.; Data Collection and/or Processing - A.M.S., S.D.; Analysis and/or Interpretation - E.E., A.M.S.; Literature Search - A.M.S., S.D.; Writing Manuscript - A.M.S.; Critical Review - E.E.

Conflict of Interest: Authors have no conflict of interest to declare.

Financial Disclosure: This study has received financial support by Çukurova University Scientific Research Project.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden alınmıştır.

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

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - E.E.; Tasarım - E.E., A.M.S.; Denetleme - E.E.; Kaynaklar - A.M.S., Malzemeler - A.M.S., S.D.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - A.M.S., S.D.; Analiz ve/veya Yorum - E.E., A.M.S.; Literatür Taraması - A.M.S., S.D.; Yazıyı Yazan - A.M.S.; Eleştirel İnceleme - E.E.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma Çukurova Üniversitesi BAP projesi kapsamında yürütülmüştür.

REFERENCES

1. Rothschild BM, Turner KR, DeLuca MA. Symmetrical erosive peripheral polyarthritis in the Late Archaic Period of Alabama. *Science* 1988;241(4872):1498-501. [CrossRef]
2. Spector TD. Rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 1990;16(3):513.
3. Peschken CA, Esdaile JM. Rheumatic diseases in North America's indigenous peoples. *Semin Arthritis Rheum* 1999;28(6):368-91. [CrossRef]
4. Kleinau S. The impact of Fc receptors on the development of autoimmune diseases. *Curr Pharm Des* 2003;9(23):1861-70. [CrossRef]
5. Dijstelbloem HM, van de Winkel JG, Kallenberg CG. Inflammation in autoimmunity: receptors for IgG revisited. *Trends Immunology* 2001;22(9):510-6. [CrossRef]
6. Anderson R. Manipulation of cell surface macromolecules by flaviviruses. *Adv Virus Res* 2003; 59:229-74. [CrossRef]
7. Yuan H, Pan HF, Li LH, Feng JB, Li WX, Li XP, et al. Meta analysis on the association between Fc γ R11A-R/H131 polymorphisms and systemic lupus erythematosus. *Mol Biol Rep* 2009;36(5):1053-8. [CrossRef]
8. Carcao MD, Blanchette VS, Wakefield CD, Stephens D, Ellis J, Matheson K, et al. Fc gamma receptor IIa and IIIa polymorphisms in childhood immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2003;120(1):135-41. [CrossRef]

9. Schrohenloher RE, Bridges SL, Koopman WJ Jr. Rheumatoid Factor. In: Kopman WJ (ed). *Arthritis and Allied Conditions*. 13th ed, Pennsylvania, Williams and Wilkins, 1997; 1109-30.
10. Hochberg MC, Chang RW, Dwoosh I, Lindsey S, Pincus T, Wolfe F. The American College of Rheumatology 1991 revised criteria for the classification of global functional status in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1992;35(5):498-502. [\[CrossRef\]](#)
11. Morgan AW, Keyte VH, Babbage SJ, Robinson JI, Ponchel F, Barrett JH, et al. Fc_γRIIIA-158V and rheumatoid arthritis: a confirmation study. *Rheumatology* 2003;42(4):528-33. [\[CrossRef\]](#)
12. Hepburn AL, Mason JC, Davies KA. Expression of Fcγ receptors and complement receptors on peripheral blood monocytes in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2004;43(5):547-54. [\[CrossRef\]](#)
13. Blom AB, Radstake TR, Holthuysen AE, Slöetjes AW, Pesman GJ, Sweep FG et al. Increased expression of Fcγ receptors II and III on macrophages of rheumatoid arthritis patients results in higher production of tumor necrosis factor alpha and matrix metalloproteinase. *Arthritis Rheum* 2003;48(4):1002-14. [\[CrossRef\]](#)
14. Wijngaarden S, van Roon JA, Bijlsma JW, van de Winkel JG, Lafeber FP. Fc_γ receptor expression levels on monocytes are elevated in rheumatoid arthritis patients with high erythrocyte sedimentation rate who do not use anti-rheumatic drugs. *Rheumatology* 2003;42(5):681-8. [\[CrossRef\]](#)
15. Abrahams VM, Cambridge G, Lydyard PM, Edwards JC. Induction of tumor necrosis factor alpha production by adhered human monocytes: a key role for Fc_γ receptor type IIIa in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43(3):608-16. [\[CrossRef\]](#)
16. A. Kastbom, A. Ahmadi, P. Söderkvist, T. Skogh. The 158V polymorphism of Fc gamma receptor type IIIA in early rheumatoid arthritis: increased susceptibility and severity in male patients (the Swedish TIRA project). *Rheumatology* 2005;44:1294-8. [\[CrossRef\]](#)
17. Morgan AW, Barrett JH, Griffiths B, Subramanian D, Robinson JI, Keyte VH, et al. Analysis of Fc receptor haplotypes in rheumatoid arthritis: FCGR3A remains a major susceptibility gene at this locus, with an additional contribution from FCGR3B. *Arthritis Res Ther* 2006;8(1):R5. [\[CrossRef\]](#)
18. Nieto A, Cáliz R, Pascual M, Matarán L, García S, Martín J. Involvement of Fcγ receptor IIIA genotypes in susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46(2):556-9. [\[CrossRef\]](#)
19. Morgan AW, Griffiths B, Ponchel F, Montague BM, Ali M, Gardner PP et al. Fc gamma receptor type IIIA is associated with rheumatoid arthritis in two distinct ethnic groups. *Arthritis Rheum* 2002;46(2):556-9.
20. Thabet MM, Huizinga TWJ, Marques RB, Stoeken-Rijsbergen R, Bakker AM, Kurreeman FA, et al. The contribution of Fc gamma receptor IIIA gene 158V/F polymorphism and copy number variation to the risk of ACPA positive rheumatoid arthritis, *Ann Rheum Dis* 2008;10:1136.

ÇOCUK SAĞLIĞININ DÜZENLİ İZLEMİ VE PRİMER İMMÜN YETMEZLİK HASTALARININ ERKEN TANINABİLİRLİĞİ

REGULAR FOLLOW-UP IN CHILD HEALTH AND EARLY RECOGNITION OF PRIMARY IMMUNE DEFICIENCY DISORDERS

Gonca Keskindemirci* , Funda Çiçe** , Çiğdem Aydoğmuş** 

*Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği, İstanbul, Türkiye

**Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk İmmünoloji ve Allerji Kliniği, İstanbul, Türkiye

Cite this article as: Keskindemirci G, Çiçe F, Aydoğmuş Ç. Regular Follow-Up in Child Health and Early Recognition of Primary Immune Deficiency Disorders. J Ist Faculty Med 2018; 81(4): 145-148.

ÖZET

Amaç: Çocuk sağlığı izlemi temel ilkeleri arasında çocuklarda büyüme ve gelişmeyi değerlendirmek, riskli durumları belirlemek, riskli durumlarda çözüm planı oluşturmak yer almaktadır. Çalışmamızın amacı, çocuk sağlığı izleminde primer immün yetmezliklerin tanısının, bulgular ortaya çıkmadan konmasını sağlayabilmektir

Gereç ve Yöntem: Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk İmmünolojisi ve Allerji Kliniğinde Ocak 2011-Ekim 2016 tarihlerinde başvuran Ağır Kombine İmmün Yetersizlik (AKİY) tanılı 18 hastanın dosyaları geriye dönük incelendi. Oral kandidiyazis olup olmadığı, tekrarlayıp tekrarlamadığı, ilk tanı anında bakılan tam kan sayımında lenfosit değerleri ile birlikte kemik iliği nakli yapılan olgular ve komplikasyonlar kaydedildi.

Bulgular: Tanılı 18 AKİY hastalarının %55,5'i (n=10) hayatta olup %44,4'ü, (n=8) birincil hastalığı ve araya giren enfeksiyona bağlı olarak kaybedildi. Tekrarlayan oral kandidiazis öyküsü %83,3 (n=15) hastada mevcut olup %77,7'sinde (n=14) tanı için ilk bakılan tam kan sayımında lenfopeni olduğu görüldü. Hastaların %77,7'sinde tanı anında BCG aşısının yapılmış olduğu görüldü. Olguların 12'sine kemik iliği nakli uygulanmış, bunların 7'sinde BCG bağlı komplikasyon gelişmişti.

Sonuç: Çocuk sağlığı izleminde, en etkili koruyucu sağlık hizmetlerinden olan aşı uygulamaları öncesi aşı güvenliğini arttırmak için sorulan sorulara ilave olarak ilk canlı aşı uygulaması olan BCG aşısı uygulaması öncesi tekrarlayan veya düzelmeyen oral kandidiazis varlığını sorgulamanın AKİY'in en erken tanısınaışık tutacağını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Çocuk sağlığı izlemi, AKİY, oral kandidiazis

ABSTRACT

Objective: The primary goals of good child care are the assessment of growth and development, early detection of diseases in children at risk, and constructing an algorithm for these children. The aim of our study was to diagnose primary immunodeficiencies before the occurrence of symptoms through child health monitoring.

Materials and Methods: We reviewed the medical files of 18 children suffering from severe combined immune deficiency (SCID) who were diagnosed between January 2011 and September 2016 in Kanuni Sultan Süleyman Training and Research Hospital. The presence and recurrence of oral candidiasis and the blood lymphocyte counts at the time of diagnosis were recorded from the files. Cases with bone marrow transplantation and related complications were also recorded.

Results: Ten of the study subjects (55.5%) were alive, and 8 patients (44.4%) had died from infections. At the time of diagnosis, a history of recurrent oral candidiasis was present in 83.3% (n=15) and lymphopenia in complete blood cell counts was present in 77.7% (n=14) of the children with SCID. A total of 14 patients had received BCG vaccinations before the diagnosis of SCID, 12 patients had undergone bone marrow transplantations, and 7 patients had developed BCG-related complications.

Conclusion: Vaccination is one of the most important issues in the field of preventive pediatric health care. We believe that before the first live vaccine (the BCG vaccine), the presence or a history of recurrent or recalcitrant oral candidiasis must be evaluated to both increase the vaccine safety and potentially help the diagnosis of SCID.

Keywords: Child care follow-up, SCID, oral candidiasis

İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: keskindemirci@hotmail.com

Geliş tarihi/Received Date: 31.10.2017 • **Kabul tarihi/Accepted Date:** 08.10.2018

©Copyright 2018 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

©Telif Hakkı 2018 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

GİRİŞ

Çocuk sağlığı izlemi temel ilkeleri arasında çocuklarda büyüme ve gelişmeyi değerlendirmek, riskli durumları belirlemek, riskli durumlarda çözüm planı oluşturmak yer almaktadır (1). Ülkemizde, "hipotiroidi", "fenilketonüri", "biyotinidaz eksikliği" ve "kistik fibroz" açısından yenidoğan tarama programları uygulanmaktadır (2, 3). Bunun yanı sıra yenidoğanda "işitme" ve "gelişimsel kalça displazisi" açısından da taramalar yapılmaktadır (1). Primer immün yetmezlik (PİY), immün sistemin farklı aşamalarında işlev/olgunlaşma bozukluğuna neden olan genetik bozukluklar ile oluşmaktadır. B ve T hücre işlev/olgunlaşma bozukluğundan kaynaklanan PİY'lerin alt gruplarından biri Ağır Kombine İmmün Yetersizlik (AKİY) olup bu hastalıkta erken tanı hayat kurtarıcıdır. Çocuk sağlığı izleminde öykü ve muayene ile bulgular ortaya çıkmadan AKİY'den şüphelenmek mümkün olabilmektedir. Çalışmamızın amacı bebeklik döneminde özellikle ilk 2 ayda çocuk sağlığı rutin izleminde öykü, muayene ve gerekli durumda bakılacak tam kan sayımı ile primer immün yetmezlikleri yaşamı tehdit eden bulgular ortaya çıkmadan şüphelenme ve en erken zamanda müdahale edebilmeyi sağlamaya ışık tutmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk İmmünolojisi ve Allerji Kliniğinde takipli Ağır Kombine İmmün Yetmezlik (AKİY) tanılı 18 hastanın dosyaları geriye dönük incelendi. Hastaların ilk başvuru anında sorgulanan oral kandidiazis olup olmama durumu, olduğu başlangıç süresi, ne kadar sürdüğü, tekrarlayıp tekrarlamadığı, immün yetmezlik düşündürülen şikayetlerinin başlangıç yaşı, immün yetmezlik tanı yaşı, ilk canlı aşı uygulaması olan BCG aşısı sonrası vücutta döküntü, aşı bölgesinde akıntılı lezyon veya koltuk altında lenfadenit

olup olmadığı, ilk bakılan tam kan sayımında lökosit ve total lenfosit sayıları kaydedildi. Tam kan sayımında lökosit değeri $3000/\text{mm}^3$ 'ün altındaki değerler lenfopeni olarak kabul edildi (4), dosya taraması sırasında kemik iliği nakli (KİT) olup olmadığı, olduysa yaşanan sorunlar ve sağ olup olmadığı bilgileri kaydedildi.

Çalışmamız Helsinki Bildirgesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

İstatistiksel Analiz

Çalışmanın istatistiksel analizinde The Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 21.0 (IBM Corp.; Armonk, NY, USA) kullanılmıştır. Veriler tanımlayıcı ölçütler kullanılarak incelenmiştir.

BULGULAR

Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk İmmünolojisi ve Allerji Kliniğinde Ocak 2011-Ekim 2016 tarihleri arasında takipli 18 AKİY hastalarından %55,5'i (n=10) hayatta olup %44,4'ü (n=8) birincil hastalığı ve araya giren enfeksiyona bağlı olarak kaybedildi. Hastaların AKİY tanısı alma yaşı ortanca değeri 4 ay (min: 1 ay, max: 11ay) idi. Tekrarlayan oral kandidiazis öyküsü %83,3 (n=15) hastada mevcuttu, oral kandidiazis görülme yaşı ilk 1 ay içinde idi. Hastaların %77,7'sinde (n=14) tanı için ilk bakılan tam kan sayımında lenfopeni gözlemlendi. Olguların %77,7'sine (n=14) tanı anında BCG aşısının uygulanmış olduğu saptandı. KİT, %66,6 (n=12) hastaya uygulandı. KİT öncesi BCG aşısı yapılmış olan 7 hastada nakil sonrası BCG'ye bağlı aksiller lenfadenit, pnömoni, cilt absesi gibi komplikasyonlar geliştiği gözlemlendi. Bu hastalara rutin antitüberküloz tedavilerinden farklı olarak en az 1 yıl, 2. kuşak antitüberküloz ilaçları ile tedavi verilmesi gerektiği görüldü. Bir olgu sistemik BCGitis nedeniyle nakil sonrası kaybedildi.

Tablo 1. İmmün Yetmezlik Düşündürülen 10 Uyarıcı Bulgu (8)

1. Bir yılda 8'den fazla üst solunum yolu enfeksiyon
2. Bir yılda 2'den fazla ciddi sinüs enfeksiyonu
3. İki aydan uzun süren etkisiz antibiyotik kullanımı
4. Bir yılda 2'den fazla pnömoni
5. Büyüme gelişme geriliği
6. Yineleyen cilt, derin doku veya organ apseleri
7. Ağızda veya ciltte süregen mantar enfeksiyonu
8. Enfeksiyonu iyileştirmek için damar içi antibiyotik kullanımı gereksinimi
9. İki'den fazla derin doku yerleşimli enfeksiyon,
10. Ailede primer immün yetersizlik öyküsü varlığı

Tablo 2. Aşı uygulaması öncesi aşıya bağlı yan etkilerin minimum olması için olan tarama soruları (13, 14)

- 1.Çocuğun bugün rahatsızlığı var mı?
2. Çocuğun herhangi bir ilaca, besine ya da aşıya karşı allerjisi var mı?
3. Çocuğun geçmişte herhangi bir aşıya karşı ciddi reaksiyonu oldu mu?
4. Çocuğun havale geçirdi mi, beyin ya da sinir hastalığı var mı?
5. Çocuğun astım,kalp hastalığı, böbrek hastalığı, şeker hastalığı ya da kan hastalığı gibi bir sorunu var mı?
6. Çocuğun kanser, lösemi, AIDS ya da başka bir bağışıklık sistemi sorunu var mı?
7. Çocuk son 3 ayda kortizon, kanser ilacı aldı mı ya da radyoterapi gördü mü?
8. Çocuğa son 3 ayda kan ve kan ürünü ya da immunglobülin isimli bir ilaç verildi mi?
9. Son 4 haftada aşı oldu mu?
10. Ev halkı içinde kanser tedavisi gören, bağışıklık sistemi sorunu olan ya da immun yetersizliği olan birey var mı?

TARTIŞMA

PİY, 300'ü aşan genetik bozukluktan oluşmakta ve 1/10000-1/100000 oranında rastlanılan, nadir görülen hastalıklar sınıfında yer almaktadır (5). PİY'ler içinde AKİY'de tanı konmaz ise ilk 2 yaşta hastalar kaybedilmektedirler (6). Ülkemizde akraba evlilikleri görüldüğünden AKİY 'in de daha sık olacağı düşünülmektedir. (7). PİY için bir tarama testi olmadığından tanısı oldukça zordur. Klinikte hastalarda PİY düşündürülen uyarıcı bulgular vardır. Bunlar 10 maddede toplanmıştır (Tablo 1) (8). Bu 10 maddeden ikisinin varlığında ileri tetkik yapılması düşünülmelidir. On uyarıcı bulgu dışında bazı bulgular varlığında da PİY düşünülmelidir. Bunlar; nedeni bilinmeyen egzema, telenjiektaziler, canlı aşıya bağlı komplikasyonlar olarak sayılabilir (9, 10, 11). Tam kan sayımı, immunglobülinler, lenfosit alt grupları, izohemaglutininler, spesifik antikor yanıtları bakılabilecek tetkikler arasındadır. Tam kan sayımında ilk 1 yaşta total lenfosit sayısının 3000/mm3'ün altında tespit edilmesi durumunda kombine immun yetmezlik açısından ileri tetkik gereklidir (4).

Çalışmamızda AKİY tanısı alan %83,3 hastada ilk 1 ay içinde oral kandidiazis yakınması başladığı, persistan seyrettiği ve %77,7'sinde tanı anında BCG aşısı uygulandığı belirlendi. İki aylıkken yapılan ilk canlı aşı uygulaması olan BCG aşısı için gelen hastalarda tekrarlayan veya geçmeyen oral kandidiazis varlığının sorgulanmasının bu hastalarda tanı açısından çok anlamlı olabileceğini ve AKİY olgularının erken tespit edilebileceği düşünmekteyiz. Böylece düzenli, çocuk sağlığı izlemlerinde ilk canlı aşı uygulaması öncesi bu durumun tespiti ile uzun dönem hem mortalite hem de nakil sonrası morbidite azaltılabilir.

Oral kandidiazis çocukluk çağında özellikle ilk 6 ayda pratikte sık görülen bir durumdur. Ancak bu durumun tekrarlaması veya persiste etmesi immune yetmezlikler açısından uyarıcı olmalıdır (12).

Aşı uygulamaları, hastalıkların önlenmesi için en etkili yöntemlerden olan koruyucu sağlık hizmetidir (13). Aşı uygulamalarında aşı güvenliğini artırmak amacıyla uygulama öncesi "aşı tarama soruları" sorulmaktadır (Tablo 2) (13, 14). Bu on soruya ilave olarak oral kandidiazis olup olmadığının da sorgulanması ve etkili tedaviye rağmen iyileşmeyen veya tekrarlayan oral kandidiazis şikayeti, bulgusunun saptanması şüphe ile karşılanmalı ve AKİY açısından ileri inceleme düşünülmelidir. Şüpheli durum varlığında canlı aşı ertelenmesi ve ilk tetkik olarak tam kan sayımı yapılarak lenfopeni açısından değerlendirme yararlı olacaktır.

Bulgularımızın daha geniş hasta serileri ile yapılacak çalışmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz. AKİY erken tanısı konusunda çok merkezli, geniş kapsamlı araştırmalara gereksinim vardır.

Etik Komite Onayı: Çalışmamız Helsinki Bildirgesi'ne uygun şekilde yürütülmüştür.

Hasta Onamı: Çalışmamızda retrospektif dosya taraması olduğundan hasta onamına gerek duyulmamıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - G.K., F.Ç., Ç.A.; Tasarım - G.K., F.Ç.; Denetleme - G.K., F.Ç.; Kaynaklar: G.K., F.Ç.; Veri Toplanması ve/veya İşlenmesi - G.K., F.Ç., Ç.A.; Analiz ve/veya Yorum - G.K., F.Ç., Ç.A.; Literatür Taraması - G.K., F.Ç.; Yazıyı Yazan - G.K., F.Ç., Ç.A.; Eleştirel İnceleme - G.K., F.Ç., Ç.A.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Yazarlar tarafından finansal destek almadıkları bildirilmiştir.

Ethics Committee Approval: Our study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

Informed Consent: Informed consent is not necessary due to the retrospective nature of this study.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - G.K., F.Ç., Ç.A.; Design - G.K., F.Ç.; Supervision - G.K., F.Ç.; Resources - G.K., F.Ç.; Data Collection and/or Processing - G.K., F.Ç., Ç.A.; Analysis and/or Interpretation - G.K., F.Ç., Ç.A.; Literature Search - G.K., F.Ç.; Writing Manuscript - G.K., F.Ç., Ç.A.; Critical Review - G.K., F.Ç., Ç.A.

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. Gökçay G, Tuğrul Aksakal M. Çocuk Sağlığı İzlem İlkeleri. Gökçay G, Beyazova U (Ed). İlk Beş Yaşta Çocuk Sağlığı İzlemi. Nobel Tıp Kitabevi. İstanbul, Türkiye, 1. Baskı, 2017; p:3-15.
2. Gür E. Yenidoğan Tarama Programları. Gökçay G, Beyazova U (Ed). İlk Beş Yaşta Çocuk Sağlığı İzlemi. Nobel Tıp Kitabevi. İstanbul, Türkiye, 1. Baskı, 2017; p:17-24.
3. Yenidoğan Tarama Programları. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. Çocuk ve Ergen Sağlığı Daire Başkanlığı. Erişim: cocukergençthsk.saglik.gov.tr
4. McWilliams LM, Railey Dell M, Buckley RH. Positive Family History, Infection, Low Absolute Lymphocyte Count (ALC) and Absent Thymic Shadow: Diagnostic Clues for all Molecular Forms of Severe Combined Immunodeficiency (SCID). J Allergy Clin Immunol Pract 2015;3(4):585-91. [CrossRef]
5. Kılıç M, Taşkın E, Selmanoğlu A. Primer immün yetmezlikli olgularımızın retrospektif değerlendirilmesi. Fırat Med J 2015;20:37-42.
6. Chinn IK, Shearer WT. Severe Combined Immunodeficiency Disorders. Immunol Allergy Clin North Am 2015;35(4):671-94. [CrossRef]
7. Turul T, Tezcan İ. Primer İmmün Yetmezlik Hastalarına Yaklaşım. Sted 2003;12:253-7.
8. Jeffrey Modell Foundation. Erişim: www.info4pi.org
9. Aydoğmuş Ç, Şiraneci R. İmmün Yetersizlikte Tanısal Yaklaşım. JOPP Derg 2010;2:52-4.
10. Camcıoğlu Y. Primer İmmün Yetersizliklere Güncel Yaklaşım. J Pediatr Sci 2005;1:1-6.
11. Türkiye Milli Pediatri Derneği Türk İmmünoloji Derneği Ortak Kılavuzu. Erişim: http://millipediatri.org.tr.
12. Darwazeh AMG, Darwazeh T. What Makes Oral Candidiasis Recurrent Infection? A Clinical View. Journal of Mycology 2014 DOI: 10.1155/2014/758394. [CrossRef]
13. Koç F, Gökçay G. Çocuklarda Aşı Uygulamaları. Gökçay G, Beyazova U (Ed). İlk Beş Yaşta Çocuk Sağlığı İzlemi. Nobel tıp Kitabevi. İstanbul, Türkiye, 1. Baskı, 2017; p451-6.
14. Gökçay G, Kılıç A, Devocioğlu E. Sosyal Pediatri. Devocioğlu Ö, Çıtak A (Ed). Pediyatri Rutinler. İstanbul Medikal Sağlık ve Yayıncılık Hiz. Tic. Ltd. Şti. İstanbul 3. Baskı, 2014; p:145.

HYPERTENSION, PESTICIDE EXPOSURE AND FUMIGATION WORKER

HİPERTANSİYON, PESTİSİT MARUZİYETİ VE FÜMİGASYON ÇALIŞANI

Sora YASRI* , Viroj WIWANITKIT** 

*KMT Primary Care Center, Bangkok, Thailand

**Honorary Professor, DY Patil University, Pune, India

Cite this article as: Yasri S, Wiwanitkit V. Hypertension, Pesticide Exposure and Fumigation Worker. J Ist Faculty Med 2018; 81(4): 149-150.

Dear Editor,

We read the publication on "Frequency of hypertension and associated factors in pesticide exposure of fumigation workers" with a great interest. Doğan Tiryaki et al. (1) concluded that "we found a higher prevalence of hypertension and obesity in the subject community". In fact, hypertension and obesity are common problems seen in any cities in the present day. In other occupations, the same problem can be expected. The interesting question is whether there is any clinical interrelationship between pesticide exposure and hypertension/obesity. Focusing on hypertension, there is no confirmation that pesticide exposure increase risk for hypertension and hypertension related complications. A study on the hypertensive disorder among the pregnant women exposed to pesticide also showed no interrelationship (2). For obesity, accumulation of pesticide in human fat is reported (3) and this might be a clinical implication of increased risk of accumulation among obese workers.

REFERENCES

1. Doğan Tiryaki H, Şeker N, Yazıcı Y, Duman A, Tarım E, Ceylan Demirel A, et al. Frequency of hypertension and associated factors in pesticide exposure of fumigation workers. J Ist Faculty Med 2018; 81(3): 84-90. [\[CrossRef\]](#)
2. Shaw GM, Yang W, Roberts EM, Aghaepour N, Mayo JA, Weber KA, et al. Residential agricultural pesticide exposures and risks of preeclampsia. Environ Res 2018;164:546-555. [\[CrossRef\]](#)
3. Barrett JR. DDT and Obesity in Humans: Exploring the Evidence in a New Way. Environ Health Perspect 2018;126(2):024003. [\[CrossRef\]](#)

Author's Reply

FREQUENCY OF HYPERTENSION AND ASSOCIATED FACTORS IN PESTICIDE EXPOSURE FUMIGATION WORKERS

PESTİSİT MARUZİYETİ OLAN İLAÇLAMA ÇALIŞANLARINDA HİPERTANSİYON SIKLIĞI VE İLİŞKİLİ FAKTÖRLER

Our study, which was designed as a cross-sectional study, was conducted in order to determine the frequency of hypertension in fumigation workers who had to use pesticides known to be related to various health problems and to determine other factors related to hypertension and to take necessary measures.

Occupational health and safety are systematic and scientific studies conducted in order to prevent the conditions that may cause health damage caused by various reasons during the execution of the work in the workplace. Increasing the health capacity of the employee and preventing and minimizing the damages in the working environment is the adaptation of the employee to the work.

In addition to occupational diseases arising from the workplace, diseases that do not originate directly from the workplace but are influenced by the factors in the workplace and change with the effect of factors in the work environment as well as other risk factors are work related diseases. Various physical, chemical, biological, ergonomic and psychosocial factors in the working environment change the course and frequency of work-related diseases (1).

Corresponding author/İletişim kurulacak yazar: sorayasri@outlook.co.th

Geliş tarihi/Received Date: 18.10.2018 • **Kabul tarihi/Accepted Date:** 16.11.2018

©Copyright 2018 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

©Telif Hakkı 2018 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

There are studies showing the effect of pesticides on cardiovascular system diseases (2-4). In our study group, hypertension was found to be higher than the normal population. It is mentioned in the article that the effect of high prevalence of obesity on the prevalence of hypertension.

Findings related to the investigation of work-related diseases and effective factors in different business lines, not only in occupational disease, are important in terms of worker health and protection of health in workplaces. Determining the incidence and affecting factors of hypertension, which is one of the work related diseases, is covered by occupational health and safety. The results of the research paper will encourage the occupational health and safety professionals working in this field, create awareness, encourage cohort and randomized controlled studies. Emphasizing the importance of primary and secondary prevention in the prevention of occupational diseases and work-related diseases, which is an important problem in our country, is also important in terms of maintaining the healthy status of the employee from the first moment of employment until the leaving time.

Hülya Doğan TIRYAKI, Nefise ŞEKER, Yılmaz YAZICI, Alparslan DUMAN, Evren TARIM, Ayşe CEYLAN DEMİREL, Şadiye Selin DURUŞ, Şeyma ARSLAN, Elif EZİRMİK, Halim İŞSEVER

Department of Public Health, İstanbul University, İstanbul School of Medicine, İstanbul, Turkey

REFERENCES

1. Akarsu H, Ayan B, Çakmak E, Doğan B, Boz Eravcı D, Karaman E ve ark (2013). Meslek Hastalıkları. Çağgem, Ankara: Özyurt Matbaacılık, 7-40.
2. Wahab A, Hod R, Ismail N, Omar N. The effect of pesticide exposure on cardiovascular system: a systematic review. Int J Community Med Public Health 2016;3(1):1-10. [CrossRef]
3. Sekhatha MM, Monyekei KD, Sibuyi ME. Exposure to agrochemicals and cardiovascular disease: a review. Int J Environ Res Public Health 2016;13(2):229. [CrossRef]
4. Taylor AE. Cardiovascular effects of environmental chemicals. Otolaryngol Head Neck Surg 1996;114(2):209-11. [CrossRef]

Corresponding author/İletişim kurulacak yazar:
sekernefise@gmail.com