

EXPERIMED

Volume/Cilt 9 Issue/Sayı 2 August/Ağustos 2019

- » Evaluation of *Strongyloides stercoralis* Cases Reported from Turkey by Pool Analysis Method
Serhat Sirekbasan, Tuğba Gürkök Tan
- » Investigation Between MTHFR A1298C Polymorphism and Oral Squamous Cell Carcinoma Risk in Turkish Population
Özlem Küçük hüseyin, Kıvanç Bektaş Kayhan, Meral Ünür, Hülya Yılmaz Aydoğan
- » The Effect of Various Carbon Nanotubes on Barley Germination
Hülya Akdemir, Merve Seven, Şaban Kalay, Mustafa Çulha, Andrew J. Harvey
- » Association Between Antibiotic Resistance and Biofilm Formation of *Escherichia coli* Strains Isolated from Blood Culture
Hatice Nur Halipçi Topsakal, Okan Aydoğan, Sinem Özdemir, Fatma Köksal Çakırlar
- » Association of Neopterin and Wound Healing Process
Ceylan Hepokur, Sema Mısır, Ali İhsan Hepokur, İlhan Yaylım
- » Cell Free DNA and Genometastasis
Cemal Çaşıl Koçana, Selin Fulya Toprak, Büşra Yaşa, Hilal Hekimoğlu, Selçuk Sözer Tokdemir
- » Treatment of a Non-healing Wound Formed After a Faulty Injection with the Larvae of *Lucilia sericata*
Erdal Polat, Hülya Ağgez, Kenan Binnetoğlu



EXPERIMED

HONORARY ADVISORY BOARD/ ONURSAL DANIŞMA KURULU

Aziz Sancar

Department of Biochemistry and Biophysic, North Carolina University School of Medicine, Chapel Hill, NC, USA

North Carolina Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ve Biofizik Bölümü, Chapel Hill, NC, ABD

EDITOR IN CHIEF/BAŞ EDITÖR

Bedia Çakmakoğlu

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

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

EDITORS/EDITÖRLER

Gül Bakırcı Öztürk

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

İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Laboratuvar Hayvanlar Bilimi Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Metin Yusuf Gelmez

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

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

Yuslat Yılmaz

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

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

Mehveş Poda

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

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

Umut Can Küçüksezer

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

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

EDITORIAL BOARD/ YAYIN KURULU

Abid Hussaini

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

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

Batu Erman

Department of Molecular Biology, Genetics and Bioengineering, İstanbul, Turkey

Sabancı Üniversitesi, Moleküler Biyoloji, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, İstanbul, Türkiye

Elif Apohan

Department of Biotechnology, İnönü University School of Science, Malatya, Turkey

İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Malatya, Türkiye

Ahmet Gül

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

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Çağla Eroğlu

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

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

Erdem Tüzün

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

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

Ali Önder Yıldırım

Department of Lung Biology and Diseases, Helmholtz Zentrum München, München, Germany

Helmholtz Zentrum München, Akciğer Biyolojisi ve Hastalıkları Bölümü, Münih, Almanya

Ebba Lohmann

Department of Neurodegenerative Diseases, Tübingen University, Tübingen, Germany

Tübingen Üniversitesi, Nörodegeneratif Hastalıkları Anabilim Dalı, Tübingen, Almanya

Gökçe Toruner

Department of Hematology, MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA

MD Anderson Kanser Merkezi, Hematoloji Anabilim Dalı, Houston, Teksas, ABD



Publisher
İbrahim KARA

Publication Director
Ali ŞAHİN

Editorial Development
Gizem KAYAN

Finance and Administration
Zeynep YAKIŞIRER ÜREN

Deputy Publication Director
Gökhan ÇİMEN

Publication Coordinators
Betül ÇİMEN
Özlem ÇAKMAK
Okan AYDOĞAN
İrem DELİÇAY
Arzu YILDIRIM

Project Coordinators
Sinem KOZ
Doğan ORUÇ

Graphics Department
Ünal ÖZER
Deniz DURAN
Beyzanur KARABULUT

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

EXPERIMED

Günnur Deniz

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

İstanbul Üniversitesi, Aziz Sançar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Gürol Tunçman

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

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

Hannes Stockinger

Molecular Immunology Unit, Vienna School of Medicine, Pathophysiology Center, Vienna, Austria
Viyana Tıp Fakültesi, Patofizyoloji Merkezi, Moleküler İmmünoloji Ünitesi, Viyana, Avusturya

Hülya Yılmaz

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

İstanbul Üniversitesi, Aziz Sançar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

İhsan Gürsel

Department of Molecular Biology and Genetics, Bilkent University, Ankara, Turkey

Bilkent Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Ankara, Türkiye

Melih Acar

Texas University Pediatric Research Institute, Dallas, Texas, USA

Teksa Üniversitesi Çocuk Araştırmaları Enstitüsü, Dallas, Teksas, ABD

Numan Özgen

Department of Pathology and Immunology, Baylor University School of Medicine, Texas, USA

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

Serhat Pabuççuoğlu

Department of Reproduction & Artificial Insemination, İstanbul University-Cerrahpaşa School of Veterinary, İstanbul, Turkey

İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Sühendan Ekmekçioğlu

Texas University, MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA

Teksa Üniversitesi, MD Anderson Kanser Merkezi, Houston, Texas, ABD

Yusuf Baran

Department of Molecular Biology and Genetics, İzmir Institute of Technology, İzmir, Turkey

İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Ve Genetik Bölümü, İzmir, Türkiye

LANGUAGE EDITORS/ DİL EDITÖRLERİ

Alan James Newson

İstanbul Üniversitesi

Dorian Gordon Bates

İstanbul Üniversitesi

STATISTICS EDITOR/ İSTATİSTİK EDITÖRÜ

Sevda ÖZEL YILDIZ

İstanbul Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

PAST EDITORS/ ÖNCEKİ EDITÖRLER

Erdem Tüzün

Uğur Özbek

EXPERIMED

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

- 39** Evaluation of *Strongyloides stercoralis* Cases Reported from Turkey by Pool Analysis Method
Serhat Sirekbasan, Tuğba Gürkök Tan
- 44** Investigation Between MTHFR A1298C Polymorphism and Oral Squamous Cell Carcinoma Risk in Turkish Population
Özlem Küçüküseyin, Kıvanç Bektaş Kayhan, Meral Ünür, Hülya Yılmaz Aydoğan
- 53** The Effect of Various Carbon Nanotubes on Barley Germination
Hülya Akdemir, Merve Seven, Şaban Kalay, Mustafa Çulha, Andrew J. Harvey
- 60** Association Between Antibiotic Resistance and Biofilm Formation of *Escherichia coli* Strains Isolated from Blood Culture
Hatice Nur Halipçi Topsakal, Okan Aydoğan, Sinem Özdemir, Fatma Köksal Çakırlar

REVIEWS

- 65** Association of Neopterin and Wound Healing Process
Ceylan Hepokur, Sema Mısır, Ali İhsan Hepokur, İlhan Yaylım
- 69** Cell Free DNA and Genometastasis
Cemal Çağıl Koçana, Selin Fulya Toprak, Büşra Yasa, Hilal Hekimoğlu, Selçuk Sözer Tokdemir

CASE REPORT

- 75** Treatment of a Non-healing Wound Formed After a Faulty Injection with the Larvae of *Lucilia sericata*
Erdal Polat, Hülya Ağgez, Kenan Binnetoğlu

EXPERIMED

İÇİNDEKİLER

ORJİNAL ARAŞTIRMALAR

- 39** Türkiye'den Bildirilen *Strongyloides stercoralis* Kaynaklı Olguların Havuz Analizi Yöntemi ile Değerlendirilmesi
Serhat Sirekbasan, Tuğba Gürkök Tan
- 44** Türk Toplumunda MTHFR A1298C Polimorfizmi ile Oral Sküamoz Hücre Karsinom Gelişim Riski Arasındaki İlişkinin Araştırılması
Özlem Küçüküseyin, Kıvanç Bektaş Kayhan, Meral Ünür, Hülya Yılmaz Aydoğan
- 53** Farklı Karbon Nanotüplerin Arpa Çimlenmesi Üzerindeki Etkileri
Hülya Akdemir, Merve Seven, Şaban Kalay, Mustafa Çulha, Andrew J. Harvey
- 60** Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Escherichia coli* İzolatlarının Biyofilm Oluşumu ve Antibiyotik Direnci Üzerine Etkisi
Hatice Nur Halipçi Topsakal, Okan Aydoğan, Sinem Özdemir, Fatma Köksal Çakırlar

DERLEMELER

- 65** Neopterin ve Yara İyileşme Süreci İlişkisi
Ceylan Hepokur, Sema Mısır, Ali İhsan Hepokur, İlhan Yaylım
- 69** Hücre Dışı DNA ve Genometastaz
Cemal Çağıl Koçana, Selin Fulya Toprak, Büşra Yasa, Hilal Hekimoğlu, Selçuk Sözer Tokdemir

OLGU SUNUMU

- 75** Hatalı Enjeksiyon Sonucu Oluşan ve İyileşmeyen Yaranın *Lucilia sericata*'nın Larvaları ile Tedavisi
Erdal Polat, Hülya Ağgez, Kenan Binnetoğlu

Türkiye'den Bildirilen *Strongyloides stercoralis* Kaynaklı Olguların Havuz Analizi Yöntemi ile Değerlendirilmesi

Evaluation of *Strongyloides stercoralis* Cases Reported From Turkey by Pool Analysis Method

Serhat Sirekbasan , Tuğba Gürkök Tan 

Çankırı Karatekin Üniversitesi Eldivan Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Çankırı, Türkiye

Cite this article as: Sirekbasan S, Gürkök Tan T. Evaluation of *Strongyloides stercoralis* Cases Reported From Turkey by Pool Analysis Method. Experimed 2019; 9(2): 39-43.

ÖZ

Amaç: Toprakla bulaşan bir helmint olan *Strongyloides stercoralis*, tüm dünyada on milyonlarca kişiyi etkilemekte ve hayatı tehlike oluşturabilecek kronik enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Bu çalışmada, Türkiye'den bildirilen strongiloidiyaz olgularının yaş, cinsiyet, klinik bulgular, altta yatan hastalıklar, tanı yöntemleri ve tedavi şekillerine ait verilerin havuz analizi yöntemi ile incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: *Strongyloides stercoralis* kaynaklı olgulara iki ulusal elektronik veri tabanı (ULAKBİM Tıp Veri Tabanı ve <http://www.turkmedline.net/>) ve üç uluslararası elektronik veri tabanı (PubMed, Web of Science Core Collection ve Google Akademik) taranarak ulaşıldı.

Bulgular: Yapılan taramada 12'si ulusal, 8'i uluslararası olmak üzere toplam 20 olgu sunumuna ulaşılmıştır. Bu olgu sunumlarında strongiloidiyaz tanısı olan 20 vaka tespit edilmiş ve bunların 6'sının kadın, 14'ünün erkek olduğu, yaş ortalamasının ise 43,6 (yaş aralığı: 8-82) olduğu belirlenmiştir. En sık görülen belirtilerin abdominal ağrı (n=12, %60), ishal (n=8, %40), bulantı/kusma (n=7, %35), kilo kaybı (n=5, %25), öksürük (n=5, %25) ve ateş (n=4, %20) olduğu gözlemlenmiştir. Strongiloidiyaz tanısı olguların 11'inde sadece dışkıının mikroskopik incelemesi ile 2'sinde ise sadece histopatolojik inceleme yöntemi ile konulmuştur. Tedavide genellikle albendazol ön plana çıkmaktadır.

Sonuç: *Strongyloides stercoralis* bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda hayatı tehdit eden enfeksiyonlara neden olabileceğinden immünsüpresif tedavi alan hastalar strongiloidiyaz varlığı açısından değerlendirilmelidir. Strongiloidiyaz tanılı 20 olgu sunumunun incelendiği bu analiz sonucunda elde edilen verilerin klinik farkındalığı arttıracağı öngörülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Havuz analizi, *Strongyloides stercoralis*, strongiloidiyaz, Türkiye

ABSTRACT

Objective: *Strongyloides stercoralis*, which is a soil-borne helminth, affects tens of millions of people in the whole world, and may cause life-threatening chronic infections. In this study, the purpose was to examine the data of the reported strongyloidiasis cases in Turkey on age, gender, clinical findings, underlying diseases, diagnostic methods and treatment modalities by using a pooling analysis method.

Material and Method: *Strongyloides stercoralis* cases were accessed by reviewing two national electronic databases (ULAKBİM Medical Database and <http://www.turkmedline.net/>), and three international electronic databases (PubMed, Web of Science Core Collection and Google Scholar).

Results: In the review a total of 20 cases, 12 of which were national and 8 of which were international, were determined. In this case report, 20 cases that had the strongyloidiasis diagnosis were identified. Six of these patients were female, and 14 were male. The average age was 43.6 (range: 8-82). The most common symptoms determined were: abdominal pain (n=12, 60%); diarrhea (n=8, 40%); nausea/vomiting (n=7, 35%); weight loss (n=5, 25%); cough n=5, 25%; and fever (n=4, 20%). Strongyloidiasis was diagnosed in 11 cases only with a microscopic examination of the stool; and in 2 cases with an histopathological examination. Albendazole stands out in the treatment, generally.

Conclusion: Since *Strongyloides stercoralis* may cause life-threatening infections in patients whose immune systems are suppressed, the patients who receive immunosuppressive treatment must be evaluated for the presence of strongyloidiasis. It is predicted that, the resulting data from the analysis of the 20 patients diagnosed with strongyloidiasis, will provide an increased awareness in the clinical setting.

Keywords: Pooled analysis, *Strongyloides stercoralis*, strongyloidiasis, Turkey

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Serhat Sirekbasan **E-mail:** serhatsirekbasan@gmail.com

Geliş Tarihi/Received Date: 28.05.2019 **Kabul Tarihi/Accepted Date:** 17.06.2019



Content of this journal is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

GİRİŞ

Strongiloidiyaz, toprakta bulunan intestinal bir nemotod olan *Strongyloides stercoralis*'in (nadiren *S.ülleborni*) neden olduğu bir enfeksiyondur (1). İhmal edilen tropikal hastalıkların etkenleri arasında en fazla göz ardı edileni olan bu parazit ile dünya genelinde 370 milyon kişinin enfekte olduğu tahmin edilmektedir. Üstelik bu tahmin, *S. stercoralis*'in rutin tanısında kullanılan dışkı incelemesinin duyarlılığının düşük olmasından dolayı hafife alınabilir (2). *S. stercoralis*'in yaşam döngüsü karmaşıktır ve insan konağının dışında sadece toprakta da evrimini tamamlayabilir. En sık görülen enfeksiyon mekanizması kontamine topraktaki filariform larvanın deriden girmesiyle başlamaktadır. Bunun dışında otoenfeksiyon veya sindirim yoluyla larvaların alınması sonucu da ortaya çıkabilmektedir. Sağlıklı insanlarda, vakaların çoğu asemptomatiktir fakat esas olarak bağırsağı, akciğerleri veya cildi etkileyerek kronik enfeksiyonlara yol açar (3).

Strongiloidiyazın kesin tanısı dışkı, duodenum sıvısı vb. gibi klinik örneklerde larvaların görülmesi ile konur. Bununla birlikte değişen duyarlılık ve özgüllüğe sahip ELISA, IFAT ve Western blot gibi çeşitli immünolojik testlerin yanı sıra Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) gibi moleküler test teknikleri de tanıda kullanılan yöntemler arasındadır (4).

Tablo 1. Strongiloidiyazlı 20 olguda en sık görülen klinik belirti ve bulgular ile altta yatan hastalıklar*

Klinik özellik	Sayı	(%)	Altta yatan hastalıklar	Sayı	(%)
Abdominal ağrı	12	(60)	Steroid kullanımı	5	(25)
Eozinofili	9	(45)	Diyabet	3	(15)
İshal	8	(40)	Parazit enfeksiyonu	3	(15)
Bulantı/kusma	7	(35)	Astım	2	(10)
Anemi	5	(25)	Alkolizm	2	(10)
Kilo kaybı	5	(25)	Artrit	2	(10)
Öksürük	5	(25)	Ankilozan spondilit	1	(5)
Ateş	4	(20)	Behçet hastalığı	1	(5)
Kaşıntı/döküntü	3	(15)	Psöriyazis	1	(5)
Halsizlik	3	(15)	Ülseratif kolit	1	(5)
B12 eksikliği	2	(10)	Çölyak hastalığı	1	(5)
Elektrolit bozukluğu	2	(10)	Beyin lezyonları	1	(5)
Göğüs ağrısı	2	(10)	Peritonit	1	(5)

*Hastalarda birden fazla semptom ve risk faktörü bulunmaktadır

Türkiye'de strongiloidiyaz ile ilgili veriler oldukça kısıtlıdır ve yayımlanmış makaleler genellikle olgu sunumu şeklindedir. Bu çalışmada, Türkiye'de yapılmış yerli ve yabancı dergilerde yayımlanmış strongiloidiyaz olgularının yaş, cinsiyet, klinik bulgular, altta yatan hastalıklar, tanı yöntemleri ve tedavi şekilleri havuz analizi yöntemi ile incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmanın verilerine kaynak teşkil eden yerli ve yabancı dergilerde yayımlanan strongiloidiyaz olguları iki ulusal elektronik veri tabanı (ULAKBİM Tıp Veri Tabanı ve <http://www.turkmedline.net/>) ve üç uluslararası elektronik veri tabanı (PubMed, Web of Science Core Collection ve Google Akademik) taranarak araştırıldı. Ulusal veri tabanları "strongiloidiyaz" ve "*Strongyloides stercoralis* enfeksiyonu" anahtar kelimeleriyle; uluslararası veri tabanları ise "strongyloidiasis" ve "*Strongyloides stercoralis* infection" kelimelerine "Turkey" eklenerek tarandı. Bu tarama sırasında bulunan yayınların kaynakları da, olası uygun başka bir çalışmanın olup olmadığı açısından gözden geçirildi. Türkiye'den bildirilen, tam metnine ulaşabildiğimiz olgu bazındaki tüm yayınlar belirli bir dönem kısıtlaması yapılmadan çalışmaya dahil edildi. Tam metinlerine ulaşılamayan ve bağırsak parazitlerinin dağılımının rutin dışkı incelemeleri ile araştırıldığı makaleler çalışmaya dahil edilmedi.

Strongiloidiyaz olgularında yaş, cinsiyet, klinik bulgular, altta yatan hastalıklar, tanı yöntemleri ve tedavileri hakkında toplanan veriler bir veri havuzunda biriktirilerek incelendi.

BULGULAR

Belirtilen anahtar kelimeler kullanılarak beş veri tabanında yapılan taramada, 12'si ulusal, 8'i uluslararası olmak üzere toplam 20 olgu sunumuna ulaşılmıştır. Bu olgu sunumlarında strongiloidiyaz tanısı olan 20 vaka tespit edilmiş ve bunların 6'sının kadın, 14'ünün erkek olduğu, yaş ortalamasının ise 43,6 (yaş aralığı: 8-82) olduğu belirlenmiştir.

Olgu sunumları ilk yazarların kliniklerine göre değerlendirildiğinde, 5'inin Tıbbi Mikrobiyoloji, 3'ünün İç Hastalıkları, 2'sinin Göğüs Hastalıkları, 2'sinin Tıbbi Patoloji, kalan her birinin ise Aile Hekimliği, Beyin Cerrahisi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları, Enfeksiyon Hastalıkları, Genel Cerrahi, Gastroenteroloji, Tıbbi Parazitoloji ve Tıbbi Biyokimya bölümünde görevli araştırmacılar tarafından yayımlandığı saptanmıştır.

Olguların başvuru şikayetleri sıklık sırasına göre; abdominal ağrı (%60), ishal (%40), bulantı/kusma (%35), kilo kaybı (%25), öksürük (%25) ve ateş (%20)'tir. Olguların %65'inde en az bir adet altta yatan hastalık bulunduğu görülmüştür (Tablo 1).

Strongiloidiyaz tanısı genellikle dışkının mikroskopik incelemesine dayanıyordu. On bir hastanın tanısı sadece nativ-lugol ve/veya formaldehit eter çöktürme yöntemi ile konulurken, iki hastanın tanısı ise sadece histopatolojik inceleme yöntemi ile konulmuştur. Ayrıca dört hastada histopatolojik incelemenin pozitif bulunmasının ardından dışkının mikroskopik inceleme-

Tablo 2. Strongiloidiyaz olgularının demografik bilgi, tanı yöntemi ve tedavileri açısından değerlendirilmesi

Araştırmacı/Yıl	Demografik bilgi	Tanı yöntemi	Tedavi	Görüldüğü yer
Oktar ve ark. ⁶ 2018	13y, Kadın	HP, ELISA	Albendazol	İzmir
Kadılar ve ark. ⁷ 2015	29y, Erkek	NL	Albendazol	Sakarya
Iraz ve ark. ⁸ 2014	59y, Kadın	NL, FEÇ	Albendazol	İstanbul
Dogan ve ark. ⁹ 2014	17y, Erkek	HP, NL	Albendazol	Erzurum
Yanık ve ark. ¹⁰ 2013	55y, Erkek	NL, FEÇ	Albendazol	Samsun
Yılmaz ve ark. ¹¹ 2013	65y, Kadın	NL	Albendazol	Ankara
Ekmekci ve ark. ¹² 2013	82y, Erkek	NL, FEÇ	Albendazol	İstanbul
Doğan ve İlhan (13) 2012	8y, Kadın	NL, FEÇ	Albendazol	Eskişehir
Korkmaz ve ark. ¹⁴ 2012	49y, Erkek	HP	Albendazol	Kocaeli
Öztürk ve ark. ¹⁵ 2011	37y, Kadın	HP, NL	Albendazol	Erzurum
Altıntop ve ark. ¹⁶ 2010	68y, Kadın	HP, NL, BDB	Albendazol, İvermektin	Samsun
Ersöz ve ark. ¹⁷ 2010	78y, Erkek	HP	Tedavi ret	Trabzon
Yaldız ve ark. ¹⁸ 2009	72y, Erkek	HP, NL	Mebendazol	Hatay
Sav ve ark. ¹⁹ 2009	67y, Erkek	DSDB, NL	Albendazol	Kayseri
Turhan ve ark. ²⁰ 2008	20y, Erkek	NL	Albendazol	Hatay
Sonmez Tamer ve Dunder (21) 2008	9y, Erkek	NL, FEÇ	Albendazol	Kocaeli
Çulha ve ark. ²² 2006	38y, Erkek	NL, FEÇ	Pirvinyum pamoat, Albendazol	Hatay
Dinleyici ve ark. ²³ 2003	12y, Erkek	NL	Albendazol, Metronidazol	Eskişehir
Hökelek ve ark. ²⁴ 1998	54y, Erkek	NL	Albendazol	Samsun
Akoğlu ve ark. ²⁵ 1984	40y, Erkek	HP, NL	Tiabendazol	Adana

HP: histopatolojik inceleme; FEÇ: formaldehit eter çöktürme; NL: nativ-lugol, BDB: balgam direkt bakı

sine gidilerek her iki yöntemle de tanı konulmuş olup, birinde ise bunlara ek olarak balgam örneğinde de parazit saptanmıştır. Geri kalan hastaların birinde santrifüj edilmiş diyalizat sedimentinin mikroskopik incelemesinde parazit görülerek dışkı incelemesine gidilerek tanı konulmuş olup, diğer bir olguda ise histopatolojik inceleme sonrası bir parazit varlığından şüphelenilerek parazitolojik konsültasyon ve ELISA testi ile tanıya gidilmiştir (Tablo 2).

Çalışmalarda olgulara uygulanan tedavi protokolleri incelendiğinde, 14 (%70) olguya sadece albendazol tedavisi başlanmış olup; bir olguya önce albendazol sonrasında ivermektin, bir olguya ise albendazol ile birlikte metronidazol başlanmıştır. Ayrıca bir hastada mebendazol, diğer bir hastada ise tiabendazol tercih edilmiştir. Pirvinyum pamoat tercih edilen bir olguda tedavi yanısızlığı nedeniyle albendazola geçilmiştir. Tedaviyi reddeden bir hasta dışında tüm olgularda şifa gözlenmiştir.

TARTIŞMA

S. stercoralis, akut ve kronik strongiloidiyaz oluşturmakla birlikte konağın immünitesine bağılı olarak hiperinfeksiyon ve geniş yayılım gösteren dissemine form olmak üzere geniş bir hastalık tablosuna yol açabilmektedir. Güneydoğu Asya, Sahra Altı Afrika ve Güney Amerika gibi tropikal bölgelerde endemiktir ve özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda önemli bir sağlık sorunudur (5). Türkiye’de ise genellikle bağışıklığı baskılanmış hastalarda sporadik olgular şeklinde görülmektedir (6-25).

S. stercoralis’in yaşam döngüsü diğer parazitik nematodlarla karşılaştırıldığında olağan dışıdır. Biri konakta diğeri ise toprakta olan ve mitotik partenogenezle çoğalan iki yetişkin nesli vardır. Deri yoluyla konağa giren larvalar kan dolaşımı ile akciğerlere, oradan da trakea ve farenkse ulaşarak gastrointestinal sisteme göç eder (26). Konakta takip edilen bu göç yolu göz önüne alındığında birincil belirti ve bulgular ciltte, akciğerler-

de ve sindirim sisteminde kendini gösterir. Semptomlar maruz kalınan parazit sayısına, konağın immün durumuna ve tutulum gösteren vücut kısmına bağlı olarak farklılık gösterebilir. Çalışmaya aldığımız olgularda en sık gastrointestinal sistem yakınmaları karşımıza çıkarken, pulmoner sistem ve deri belirtileri daha az oranda idi.

İnsanlarda strongiloidiyaz tanısı taze dışkı materyalinde bulunan parazitin rhabditoid larvalarının mikroskopta görülmesine dayanır. Ne yazık ki yaygın olarak kullanılan bu yöntem düşük hassasiyete sahiptir. Birden fazla örneğin özellikle konsantrasyon teknikleri ile incelenmesi mikroskop performansını arttırmaktadır. Strongiloidiyaz şpinesi varlığında Baermann tekniği, Harado-Mori filtre yöntemi ve Koga agar plak kültür yöntemi kullanılabilir. Tüm bunların dışında serolojiden moleküler biyolojik yöntemlere kadar birçok alternatif test mevcuttur (27). İncelediğimiz olgularda tanının sıklıkla nativ-lugol ve/veya formaldehit eter çöktürme yöntemi ile mikroskopik olarak konulduğu görülmektedir. Etkenin endoskopik biyopsilerden ve cerrahi örneklerden histopatolojik tanısı, parazitin azlığı ve genellikle patoloğların bu parazite aşına olmamaları nedeniyle zordur. Histopatolojik inceleme sonrası parazit varlığından şüphelenilmesi halinde patoloğ ve parazitoloğ arasındaki iletişim doğru tanıya hızlı bir şekilde gidilmesine olanak sağlayacaktır.

S. stercoralis infeksiyonunun tedavisinde geçmişte tiabendazol ilk seçenek olarak karşımıza çıkarken, yan etkileri sebebiyle yerini albendazol ve ivermektine bırakmıştır. Albendazol ise tedavideki etkinliği açısından ivermektin tedavisinden sonra kullanılabilir ikinci seçenek ilaç grubunda yer almaktadır. Strongiloidiyaz tedavisinde kullanılan diğer ajanlar; pirvinium pamoat, levamisol ve dietilkarbamazin'dir. Bununla birlikte pirvinium pamoat tedavisi ile görülen %23-30'luk düşük başarı oranı nedeniyle *S. stercoralis* infeksiyonunun tedavisine iyi bir alternatif değildir (25). Ülkemizde ivermektin olmadığı için olguların %75'ine albendazol tedavisi planlanmış olup, bir olguda albendazol tedavisinden iyi yanıt alınamadığı için ivermektin temin edilerek başlanmıştır. Eş zamanlı olarak *Entamoeba histolytica* ve *Giardia intestinalis* parazitlerinin saptandığı bir olguda albendazol ve metronidazol kombinasyonu uygulanmış, bir olguda mebendazol, diğer bir olguda ise tiabendazol başlanmıştır. Pirvinium pamoat tedavisi alan bir olguda literatür ile uyumlu olarak iyi bir klinik yanıt alınamamış ve albendazol tedavisi ile devam edilmiştir. Strongiloidiyaz tedavisi, en az üç kez tekrarlanan dışkının parazitolojik incelemesi negatifleşinceye ve klinik olarak tam iyileşme sağlanıncaya kadar devam edilmelidir.

Strongiloidiyaz, her ne kadar ülkemizde endemik bir hastalık olmasa da zaman zaman sporadik olgular şeklinde kendisini göstermektedir. Üstelik tanıda kullanılan yöntemlerin duyarlılığının düşük olması ve mikroskopta bakan çoğu gzn bu parazite aşına olmaması nedeniyle olgu sayısının gerçekte var olandan daha fazla olduğu söylenebilir. Diğer bir yandan bağışlıklık sistemini baskılayan steroid gibi ilaçların romatoloji, göz, kulak-burun-boğaz, göğüs hastalıkları, hematoloji, cildiye vb. birçok klinikte yaygın şekilde kullanıldığı göz önüne alındığın-

da *S. stercoralis* açısından değerlendirilmesi gereken olgu sayısının çok daha fazla olduğu düşünülebilir.

Sonuç olarak; ülkemizde sporadik olgular şeklinde zaman zaman bildirilen strongiloidiyaz olgularının sağlıklı kişilerde çoğunlukla asemptomatik seyretmesi ve immünsüpresif kişilerde ölümcül olabilmesi nedeniyle oldukça iyi değerlendirilmesi gerekmektedir. Özellikle immnspreseler olmak üzere hastalarda açıklanamayan anemi, eozinofili, gastrointestinal semptomlar (abdominal ağrı, bulantı, kusma, ishal), solunum semptomları (ksrk, hırıltı, nefes darlığı, hemoptizi) ve cilt semptomları (kaşıntı, döküntü) varsa olgunun *S. stercoralis* açısından akla getirilmesi, uygun yöntemle tetkik edilerek tanının konulması ve zaman kaybetmeksizin etkin bir tedavinin başlatılması gerektiği kanaatindeyiz.

Etik Komite Onayı: Yazarlar alışmanın World Medical Association Declaration of Helsinki "Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects", (amended in October 2013) prensiplerine uygun olarak yapıldığını beyan etmişlerdir.

Hasta Onamı: Uygulanabilir değil.

Yazar Katkıları: Fikir - S.S., T.G.T.; Tasarım - S.S.; Denetleme - S.S., T.G.T.; Kaynaklar - S.S., T.G.T.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - S.S., T.G.T.; Analiz ve/veya Yorum - S.S., T.G.T.; Literatür Taraması - S.S., T.G.T.; Yazıyı Yazan - S.S.; Eleştirel İnceleme - T.G.T.

ıkar atışması: Yazarların beyan edecek ıkar atışması yoktur.

Finansal Destek: Yazarlar bu alışmada finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

Ethics Committee Approval: Authors declared that the research was conducted according to the principles of the World Medical Association Declaration of Helsinki "Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects", (amended in October 2013).

Informed Consent: N/A.

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

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

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

KAYNAKLAR

1. World Health Organization. Intestinal worms, Strongyloidiasis. Erişim Adresi: https://www.who.int/intestinal_worms/epidemiology/strongyloidiasis/en/
2. Gtaz L, Castro R, Zamora P, Kramer M, Gareca N, Torrico-Espinoza MDC, et al. Epidemiology of Strongyloides stercoralis infection in Bolivian patients at high risk of complications. PLoS Negl Trop Dis 2019; 13: e0007028. [CrossRef]

3. Jourdan PM, Lamberton PHL, Fenwick A, Addiss DG. Soil-transmitted helminth infections. Lancet 2018; 391: 252-65. [CrossRef]
4. Barroso M, Salvador F, Sánchez-Montalv A, Bosch-Nicolau P, Molina I. Strongyloides stercoralis infection: A systematic review of endemic cases in Spain. PLoS Negl Trop Dis 2019; 13: e0007230. [CrossRef]
5. Luvira V, Watthanakulpanich D, Pittisuttithum P. Management of Strongyloides stercoralis: a puzzling parasite. Int Health 2014; 6: 273-81. [CrossRef]
6. Oktar N, Ozer HM, Demirtas E. Central Nervous System Strongyloides Stercoralis. A Case Report. Turk Neurosurg 2018; 1-4. [CrossRef]
7. Kadılar , Bozkurt B, Karakee E, Kaya T, ifti İH, Tamer A. B12 Vitamin Eksikliği Olan Nadir Strongyloides stercoralis Vakası. Turkiye Parazitolojisi Dergisi 2015; 39: 238-40. [CrossRef]
8. Iraz M, Karaman U, Topuku B, Doymaz MZ. Psöriyazis ve Diyabetes Mellitus Tanılı Hastada Intestinal Strongyloidosis. Turkiye Parazitolojisi Dergisi 2014; 38: 127-30. [CrossRef]
9. Dogan C, Gayaf M, Ozsoz A, Sahin B, Aksel N, Karasu I. et al Strongyloides stercoralis infection. Respir Med Case Rep 2014; 11: 12-5. [CrossRef]
10. Yanık K, Karadağ A, Odabaşı H, Unal N, Altıntop L, Hökelek M. Ankilozan Spondilitli Bir Hastada Strongyloides stercoralis: Olgu Sunumu. Turkiye Parazitolojisi Dergisi 2013; 37: 143-6. [CrossRef]
11. Yılmaz I, Cağlar B, Akay BN, Alkız G, Boyvat A, Akyol A. Behçet Hastasında Strongyloides stercoralis Hiperenfeksiyon Sendromu. Turkiye Parazitolojisi Dergisi 2013; 37: 139-42. [CrossRef]
12. Ekmekci , Tahmaz M, Altıparmak S, Gülaçtı G, Ergen AK, Kumbasar AB, et al. Kronik Steroid Kullanan İmmünsuprese Hastada Strongyloidoza Bağlı Loeffler Sendromu. Turkiye Parazitolojisi Dergisi 2013; 37: 55-7. [CrossRef]
13. Doğan N, İlhan H. Akciğer Hidatik Kisti ve Strongyloides stercoralis Birlikteliği: Olgu Sunumu. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2012; 18: (Suppl-A): A231-A233.
14. Korkmaz U, Duman AE, Gurkan B, Sirin G, Topcu Y, Dindar G, et al. Nonresponsive celiac disease due to Strongyloides stercoralis infestation. Intern Med 2012; 51: 881-3. [CrossRef]
15. Oztürk G, Aydınlı B, Celebi F, Gürsan N. Gastric perforation caused by Strongyloides stercoralis: a case report. Ulus Travma Acil Cerrahi Dergisi 2011; 17: 90-2. [CrossRef]
16. Altıntop L, Cakar B, Hokelek M, Bektas A, Yildiz L, Karaoglanoglu M. Strongyloides stercoralis hyperinfection in a patient with rheumatoid arthritis and bronchial asthma: a case report. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2010; 9: 27. [CrossRef]
17. Ersz Ő, Turgutalp H, Akdoğan R, obanoğlu , Saygın İ, Mungan S, zgr O. Gastric Strongyloidiasis in a Diabetic Patient. Turk Patoloji Dergisi 2010; 26: 71-3. [CrossRef]
18. Yaldız M, Hakverdi S, Aslan A, Temiz M, ulha G. Gastric infection by Strongyloides stercoralis: A case report. Turk J Gastroenterol 2009; 20: 48-51.
19. Sav T, Yaman O, Gunal AI, Oymak O, Utas C. Peritonitis associated with Strongyloides stercoralis in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. NDT Plus 2009; 2: 390-1. [CrossRef]
20. Turhan V, oban M, ncl O, avuŐlu Ő. Kısa Süreli Steroid Kullanan Bir Hastada Saptanan Strongyloidoz ve Loeffler Sendrom Tablosu. Turkiye Parazitolojisi Dergisi 2008; 32: 48-50.
21. Sönmez Tamer G, Dündar D. Olgu Sunumu: Kronik Karın Ağrısıyla Seyreden Strongyloidosis. Turkiye Parazitolojisi Dergisi 2008; 32: 17-3.
22. ulha G, SavaŐ L, nlen Y. Kronik Diyare Yakınması Olan Bir Hastada Strongyloides stercoralis. Turkiye Parazitolojisi Dergisi 2006; 30: 293-5.
23. Dinleyici EC, Dogan N, Ucar B, İlhan H. Strongyloidiasis associated with amebiasis and giardiasis in an immunocompetent boy presented with acute abdomen. Korean J Parasitol 2003; 41: 239-42. [CrossRef]
24. Hökelek M, Sünbül M, Kaya N. Ülseratif Kolitli Bir Hastada Entamoeba histolytica ve Strongyloides stercoralis İnfeksiyonu. Flora 1998; 3: 263-6.
25. Akoğlu T, Tuncer İ, Erken E, Grcay A, Ozer FL, Ozcan K. Parasitic arthritis induced by Strongyloides stercoralis. Ann Rheum Dis 1984; 43: 523-5. [CrossRef]
26. Nutman TB. Human infection with Strongyloides stercoralis and other related Strongyloides species. Parasitology 2017; 144: 263-73. [CrossRef]
27. Buonfrate D, Formenti F, Perandin F, Bisoffi Z. Novel approaches to the diagnosis of Strongyloides stercoralis infection. Clin Microbiol Infect 2015; 21: 543-52. [CrossRef]

Investigation Between MTHFR A1298C polymorphism and Oral Squamous Cell Carcinoma Risk in Turkish Population

Türk Toplumunda MTHFR A1298C Polimorfizmi ile Oral Sküamoz Hücre Karsinom Gelişim Riski Arasındaki İlişkinin Araştırılması

Özlem Küçüküseyin¹ , Kıvanç Bektaş Kayhan² , Meral Ünür² , Hülya Yılmaz Aydoğan¹ 

¹Department of Molecular Medicine, İstanbul University, Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine, İstanbul, Turkey

²Department of Oral Surgery and Medicine, İstanbul University School of Dentistry, İstanbul, Turkey

Cite this article as: Küçüküseyin Ö, Kayhan KB, Ünür M, Yılmaz Aydoğan H. Investigation Between MTHFR A1298C polymorphism and Oral Squamous Cell Carcinoma Risk in Turkish Population. Experimed 2019; 9(2): 44-52.

ABSTRACT

Objective: Oral squamous cell carcinoma (OSCC) with its poor survival rates and rising number of incidences arises through several etiological factors including environmental, genetic and epigenetic alterations. Several studies have established an association between cancer susceptibility and polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), the key enzyme involved in folate metabolism and, therefore in DNA synthesis, methylation and repair. The aim of the present study was to establish any association between MTHFR A1298C variants and alcohol and/or tobacco consumption, gender or age in respect to clinical histopathological parameters, and the risk of OSCC development in the Turkish population.

Material and Method: MTHFR A1298C genotyping in 107 OSCC patients and 107 cancer-free healthy controls was performed using the PCR-RFLP method.

Results: The study groups were age-matched with higher frequencies in the male gender. In the patients group, the distribution of MTHFR A1298C variants was not significant. Smoking was not found to be a risk factor: in non-smokers the frequency of the MTHFR A1298 allele was higher than the 1298C allele, and the A1298 allele carriers possessed moderately or well differentiated tumors with a diameter of <4 cm. However, these associations were not detected in smokers.

Conclusion: The present study alone did not demonstrate any association between the MTHFR A1298C polymorphism and the risk of OSCC in the Turkish population, however the prognosis of OSCC may be influenced by MTHFR A1298C variants.

Keywords: OSCC, MTHFR, polymorphism, gene, oral cancer

INTRODUCTION

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is a common neoplasia of the oral cavity with a poor survival rate. The predom-

ÖZ

Amaç: Düşük yaşam süresi ile karakterize olan ve çevresel faktörlerin yanı sıra genetik ve epigenetik değişimlerin katkılarının bulunduğu oral sküamoz hücre karsinomu (OSHK) gün geçtikçe yükselen insidansı ile dikkati çekmektedir. Günümüze kadar, folat metabolizmasının önemli enzimlerinden biri olan ve dolayısıyla DNA sentezi, metilasyonu ve tamir mekanizmalarında rol oynayan metilen tetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimine ait genetik varyantlar ile kanser yatkınlığı arasındaki ilişkinin araştırıldığı birçok çalışma yapılmıştır. Çalışmamızda, Türk popülasyonundaki MTHFR A1298C varyantları ile alkol ve/veya sigara kullanımı, cinsiyet, yaş veya klinik parametreler esasında oral sküamoz hücre karsinomu gelişim riskinin araştırılması hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: MTHFR varyantları PCR-RFLP yöntemleri kullanılarak aynı yaş grubundaki 107 hasta ile 107 sağlıklı bireyde analiz edilmiştir.

Bulgular: Hasta ve kontrol grubu arasında MTHFR A1298C genotip ve allel dağılımı bakımından anlamlı bir fark elde edilmemiştir. Sigara-içmeyen hastalarda, A1298C allel frekansı mutant allele göre yüksek olup, bu alleli taşıyanlarda tümör çapının 4cm'den büyük olduğu ve bu tümörlerin orta veya iyi diferansiasyona sahip olduğu tespit edilmiştir. Ancak bu durum sigara içen hastalarda tespit edilmemiştir.

Sonuç: Çalışmamız sonucunda MTHFR A1298C polimorfizminin hastalık gelişiminde bir risk faktörü olmadığı, ancak hastalığın prognozunda özellikle mutant varyantın etkili olabileceği kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: OSHK, MTHFR, polimorfizm, gen, ağız kanseri

inant risk factors are alcohol and tobacco consumption, however gender, age, viral human papillomavirus (HPV) infections, chronic inflammation and dietary/lifestyle factors such as poor oral hygiene and low intake of cereals, vege-

Corresponding Author/Sorumlu Yazar: Özlem Küçüküseyin **E-mail:** ozlem.kh@gmail.com , ozlemkh@istanbul.edu.tr

Received Date/Geliş Tarihi: 24.05.2019 **Revision Date/Revizyon Tarihi:** 25.06.2019 **Accepted Date/Kabul Tarihi:** 02.07.2019



Content of this journal is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

tables and fruits have important contributory roles for OSCC carcinogenesis. Moreover, epidemiological studies have shown that genetic factors have the potential to affect individual susceptibility to OSCC (1, 2).

In a number of studies, folate metabolism and related genes - which particularly takes place in biotransformation pathways in particular - have been linked with cancer susceptibility by altered intracellular S-adenosyl-methionine (SAM, the universal methyl donor) levels that affect methylation processes, and a distorted availability of nucleotides for DNA synthesis and DNA repair (3-7).

It is well-known that one of the essential enzymes in folate metabolism is methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), the enzyme responsible for producing the circulating form of folate and the carbon donor for the re-methylation of homocysteine to methionine. MTHFR irreversibly catalyzes the reduction of 5,10-methylenetetrahydrofolate (5,10-MTHF) to 5-MTHF and provides a methyl group for SAM biosynthesis which are all crucial for DNA synthesis, methylation as well as DNA repair mechanisms (5, 8). Thus, polymorphisms of the MTHFR gene may cause the dysregulation of folate metabolism which results in abnormal cell proliferation and DNA hypo-methylation which may all lead to a predisposition towards carcinogenesis. Furthermore, while some studies have reported the association of MTHFR polymorphisms with several cancer types (9-12), others have indicated a reduced risk of cancer by folate intake (13, 14).

Two common polymorphisms that alter enzyme activity have been described for the MTHFR gene: MTHFR C677T (rs1801133) which causes alanine substitution to valine amino acid in exon 4, and MTHFR A1298C (rs1801131) in exon 7 that results in another amino acid residue change from glutamate to alanine. In our previous study, the individual effects of MTHFR C677T polymorphism on OSCC prognosis may not have been significant, however, it was found that possessing the wild type T allele in conjunction with smoking and/or alcohol consumption increased the risk of OSCC (15). The aim of the present study was to investigate the association between MTHFR A1298C variants and alcohol and/or tobacco consumption, gender or age in respect to clinical histopathological parameters, and the risk of OSCC development in the Turkish population.

MATERIAL AND METHOD

Patient Selection and Clinical Investigation

107 OSCC patients diagnosed and recruited by the School of Dentistry, Department of Oral Surgery and Medicine in Istanbul University and 107 healthy volunteers as controls participated in this study. The patient groups were all newly diagnosed with clinical-histological parameters (such as tumour classification, invasion, differentiation and nodal status) and were scored according to the tumour-node-metastasis (TNM) classification system and were confirmed by pathologic examination. All patients who had previously undergone chemotherapy, radiotherapy, and surgery were excluded from the study. The control group was made up of healthy subjects with no symptoms of cancer or any kind of cancer history in their families.

All participants in the study provided written consent prior to their inclusion in the study. This study protocol was approved by the Helsinki Declaration and blood samples were collected only when written informed consent had been obtained. The study protocol was approved by the Ethical Committee of the İstanbul School of Medicine and the Research Fund of İstanbul University and has therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments.

Polymerase Chain Reaction (PCR)-Based Detection of MTHFR A1298C Genotyping

Peripheral blood specimens from each participant were collected in tubes containing EDTA and genomic DNA samples were extracted from whole blood using the salting out procedure (16). The DNA samples were amplified by polymerase chain reaction with locus-specific primers as shown in Table 1. After amplification, MTHFR A1298C (rs1801131) polymorphism was detected by cutting the PCR product with the restriction endonuclease MbolI (New England BioLabs, U.K.) as previously reported (12, 17). The PCR product and restriction pattern of MTHFR rs1801131 locus are also shown in Table 1.

Statistical Analyses

Statistical analysis was performed using the Statistical Package for Social Sciences software package version 11.5 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The mean values of the clinical parameters between the patients and control groups were compared using the unpaired Student's t-test and expressed as mean±SD. Differences in the distribution of genotypes and alleles between patients and controls were tested using the Chi-square statistic. The Hardy-Weinberg equilibrium was tested for all polymorphisms. Allele frequencies were estimated using gene counting methods. A univariate analysis was performed to compare the distribution of age, sex and several independent factors with the frequencies of MTHFR A1298C alleles and genotypes. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

Clinical Investigation

The general characteristics of the study groups are summarised in Table 2. While the study groups were age-matched, the frequency of the male gender was higher both in the control and patients group. Lower levels of body mass index, BMI (24.53 ± 4.66 versus (vs) 26.43 ± 2.99 ; $p = 0.012$) and higher frequencies of first-degree family history (36.9% vs 9.8% ; $p = 0.001$) were detected in the patients group. The smoking status was not different between the study groups ($p > 0.05$). 35.0% of patients smoked more than 20 cigarettes per day, and the ratio of never smoked/consumed cases to at least one time smoked/consumed cases were 35.9% vs 64.1% in the patient group ($p = 0.063$) (Table 1). The demographic characteristics of the patients group are shown in Table 3. Moderately and well differentiated tumors were detected in higher ratios than poorly differentiated tumors ($88.3\% \rightarrow 11.7\%$). In addition, nodes were mostly smaller than 3 cm ($82.2\% \rightarrow 17.8\%$). Moreover, 35.0% pa-

Table 1. The locus-specific PCR primers and restriction pattern of MTHFR rs1801131

MTHFR rs1801131 primers	PCR product	Restriction pattern of MbolI	
5' – AAG GAG GAG CTG CTG AAG ATG – 3'	237 bp	A allele	182, 28, 27 bp
5' – CTT TGC CAT GTC CAC AGC ATG – 3'		C allele	210, 27 bp

bp: base pairs

Table 2. General characteristics of the study group

	Control group (n=107)	Patient group (n=107)	p
Age (years)	59.02±9.57	56.11±13.75	0.216
Gender (n)			
Female / Male	14/93	35/72	0.001
BMI	26.43±2.99	24.53±4.66	0.012
Smoking (%) (+/-)	26.8/73.2	63.1/36.9	p<0.001
Smoking Status (%)			
> 20 /day	-	35.0	0.302
Never / Consumpted + consuming	18.2/81.8	35.9/64.1	0.063
Family history (%)			
First degree (+/-)	9.8/90.2	36.9/63.1	0.001
Second degree (+/-)	5.9/94.1	20.0/80.0	0.151

BMI: body mass index; n: number of individuals; parametric results are shown as mean ± SD; % results were calculated by Chi-square test. p<0.05 denoted statistical significance

tients had mechanical trauma, 64.1% patients had a prosthesis and 12.6% patients had an occupational risk for the development of OSCC (Table 3).

Distribution of MTHFR A1298C Genotypes

The distributions of genotypes and alleles of MTHFR A1298C are shown in Table 4. No significant deviation from Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) was observed for the MTHFR A1298C polymorphism in the control group, while a significant deviation from HWE was observed for this polymorphism in the patient group. If only the genotype distribution of the patient group shows a deviation from HWE, this may provide additional support for an association of the marker locus with the disease in question. However, deviation from HWE can also be attributed to the small size of the sample group (18-20) (Table 4).

Association of the MTHFR A1298C Genotypes with Clinical/Demographic Parameters

In Table 5 the combined effect of MTHFR A1298C genotypes and smoking or family history are presented. Interestingly, it was found that significance was only detected in second degree family history (Table 4). As seen in Table 6, no statistical association was found between BMI and MTHFR A1298C variants in the study groups. The relation between tumor grade,

diameter, differentiation or nodal status and MTHFR A1298C polymorphism is shown in Table 7. There were no differences in tumor grade or nodal status. However, it was found that the frequency of moderately and well differentiated tumors were higher in A1298 allele carriers (AA+AC genotypes) than the CC genotype (p=0.008). Furthermore, the frequency of tumors possessing diameters smaller than 4 cm was higher in AA genotype than in 1298C allele (CC+AC genotypes) carriers, and the frequency of tumors possessing diameters greater than 4 cm was higher in 1298C allele (CC+AC genotypes) carriers than in AA genotype (p=0.054). In Table 8 the effects of both smoking and MTHFR variants on the clinical parameters of patients are shown, and it was detected that the frequency of moderately and well differentiated tumors were significantly higher in A1298 allele (AA+AC genotypes) carrier non-smoker patients than those with CC genotype carriers (90.9% vs. 9.1%; p=0.017).

DISCUSSION

Oral squamous cell carcinoma, the most common form of head and neck cancers, has unsatisfactory survival rates of five years - even when targeted with new treatment strategies. As previously described, there are many risk factors that affect development, prognosis, survival and even tendency of OSCC

Table 3. Demographic profile of the patients group

Tumor Grade (%)	
Early (Grade 1+2)	46.5
Late (Grade 3+4)	53.5
Differentiation Status (%)	
Moderately+Well	88.3
Poorly	11.7
Tumor diameter (%)	
< 4 cm	62.4
> 4 cm	37.6
Node metastasis (%)	
Presence	34.7
Absence	65.3
Node status (%)	
> 3 cm (n2 + n3)	17.8
< 3 cm (n0 + n1)	82.2
Mechanical trauma (%)	35.0
Occupational risk (%)	12.6
Prosthesis (%)	64.1
Chi-square test was used to compare the related variants in OSCC patients group. p<0.05 denoted statistical significance	

including genetic polymorphisms such as *MTHFR*A1298C and C677T. In our previous study, any individual effect of *MTHFR* C677T polymorphism was detected on OSCC prognosis, however with smoking and/or alcohol consumption the OSCC risk was increased by T allele (15). In addition, Cao et al. (8) reported that the interaction between the 677TT genotype and 1298AC

Table 4. The distribution of MTHFR A1298C polymorphism between the study groups

MTHFR A12987C	Control group (n=107)	Patient group (n=107)
Genotypes (n,%)		
AA genotype	44 (41.1)	51 (47.7)
AC genotype	45 (42.1)	38 (35.5)
CC genotype	18 (16.8)	18 (16.8)
Alleles (n,%)		
A allele	133 (62.15)	140 (65.42)
C allele	81 (37.85)	74 (34.58)
HWE p	0.2721	0.026
p	> 0.05 (Matches with HWE)	< 0.05 (Unmatches with HWE)
Chi-square test was used to compare genotypes in the whole study group. For determining allelic frequencies, gene count method was used. n: number of individuals. p<0.05 denoted statistical significance		

Table 5. The combined effect of MTHFR A1298C polymorphism and certain risk factors on the development of OSCC

	AA genotype	C allele (AC+CC genotype)	p	CC genotype	A allele (AA+AC genotype)	p
Smoking						
Absence	42.1	57.9		15.8	84.2	
Presence	50.8	49.2	0.396	16.9	83.1	0.881
Cigarette consumption						
< 20/ day	41.8	58.2		16.4	83.6	
> 20/ day	58.3	41.7	0.109	16.7	83.3	0.974
First degree family history						
Absence	53.8	46.2		18.5	81.5	
Presence	36.8	63.2	0.095	13.2	86.8	0.484
Second degree family history						
Absence	60.7	39.3		3.6	96.4	
Presence	14.3	85.7	0.041	42.9	57.1	0.019
Chi-square test was used to compare the related variants in OSCC patients group. p<0.05 denoted statistical significance						

Table 6. The effects of MTHFR A1298C variants on BMI in the study groups

	Patient Group				Control Group			
	AA genotype	C allele (CC+AC genotype)	A allele (AA+AC genotype)	p	AA genotype	C allele (AC+CC genotype)	A allele (AA+AC genotype)	p
BMI (X±SD)	24.18±5.00	24.83±4.40	24.70±4.63	0.571	23.81±4.95	26.50±3.06	26.26±2.97	0.232
BMI (%)								
≥ 27.5	20.0	80.0	50.0	50.0	40.0	60.0	8.00	92.0
< 27.5	16.7	83.3	33.3	66.7	57.1	42.9	7.1	92.9
				0.223				0.308
				0.539				0.873

BMI: body mass index; parametric results are shown as mean ± SD; % results were calculated by Chi-square test. p<0.05 denoted statistical significance

Table 7. The effects of MTHFR A1298C polymorphism on the clinical/demographic features of the patients group

(%)	AA genotype	C allele (AC+CC genotype)	p	CC genotype	A allele (AA+AC genotype)	p
Tumor Grade						
Early (Grade 1+2)	48.9	51.1	14.9	85.1	0.627	
Late (Grade 3+4)	44.4	55.6	18.5	81.5		
Differentiation Status						
Moderately+Well	48.2	51.8	13.3	86.7		
Poorly	34.4	63.6	45.5	54.5	0.008	
Tumor diameter						
< 4 cm	54.0	46.0	12.7	87.3		
> 4 cm	34.2	65.8	23.7	76.3	0.153	
Node metastasis						
Absence	47.0	53.0	18.2	81.8		
Presence	45.7	54.3	14.3	85.7	0.618	
Node status (%)						
< 3 cm (n0 + n1)	47.0	53.0	18.1	81.9		
> 3 cm (n2 + n3)	44.4	55.6	11.1	88.9	0.474	

Chi-square test was used to compare the related variants in OSCC patients group. p<0.05 denoted statistical significance

Table 8. The effect of smoking and genotypes of MTHFR A1298C polymorphism on the clinical/demographic features of the patients group

	Non-smokers				Consumed				
	AA genotype (%)	Callele (CC+AC genotype)	CC genotype (%)	A allele (AA+AC genotype) (%)	AA genotype (%)	Callele (AC+CC genotype) (%)	CC genotype (%)	A allele (AA+AC genotype) (%)	p
Tumor Grade									
Early (Grade 1+2)	52.6	47.4	10.5	89.5	46.4	53.6	17.9	82.1	
Late (Grade 3+4)	33.3	66.7	16.7	83.3	50.0	50.0	19.4	80.6	0.872
Differentiation Status									
Moderately+Well	45.5	54.5	9.1	90.9	50.0	50.0	16.0	84.0	
Poorly	-	100.0	100.0	-	44.4	55.6	33.3	66.7	0.347
Tumor diameter									
< 4 cm	54.5	45.5	9.1	90.9	53.7	46.3	14.6	85.4	
> 4 cm	26.7	73.3	20.0	80.0	39.1	60.9	26.1	73.9	0.260
Node metastasis									
Absence	44.4	55.6	14.8	85.2	48.7	51.3	20.5	79.5	
Presence	40.0	60.0	10.0	90.0	48.0	52.0	16.0	84.0	0.751
Node status (%)									
< 3 cm (n0 + n1)	45.5	54.5	15.2	84.8	48.0	52.0	20.0	80.0	
> 3 cm (n2 + n3)	25.0	75.0	-	100	50.0	50.0	14.3	85.7	1.000

Table 8. The effect of smoking and genotypes of MTHFR A1298C polymorphism on the clinical/demographic features of the patients group (continued)

(%)	20 years Smokers				>20 years Smokers			
	AA genotype (%)	C allele (CC+AC genotype) (%)	CC genotype (%)	A allele (AA+AC genotype) (%)	AA genotype (%)	C allele (AC+CC genotype) (%)	CC genotype (%)	A allele (AA+AC genotype) (%)
Tumor Grade								
Early (Grade 1+2)	46.7	53.3	26.7	73.3	64.3	35.7	14.3	85.7
Late (Grade 3+4)	43.3	56.7	23.3	76.7	52.4	47.6	0.486	19.0
			0.832	1.000			0.486	1.000
Differentiation Status								
Moderately+Well	45.5	54.5	24.2	75.8	61.5	38.5	11.5	88.5
Poorly	42.9	57.1	28.6	71.4	50.0	50.0	0.666	33.3
			1.000	0.810			0.666	0.228
Tumor diameter								
< 4 cm	52.2	47.8	21.7	78.3	68.4	31.6	10.5	89.5
> 4 cm	36.4	63.6	27.3	72.7	43.8	56.3	0.142	25.0
			0.286	0.666			0.142	0.258
Node metastasis								
Absence	48.0	52.0	28.0	72.0	60.9	39.1	17.4	82.6
Presence	40.0	60.0	20.0	80.0	50.0	50.0	0.537	16.7
			0.592	0.729			0.537	1.000
Node status (%)								
< 3 cm (n0 + n1)	47.1	52.9	26.5	73.5	60.7	39.3	17.9	82.1
> 3 cm (n2 + n3)	36.4	63.6	18.2	81.8	42.9	57.1	0.430	14.3
			0.729	0.578			0.430	1.000
Chi-square test was used to compare the related variants in OSCC patients group. p<0.05 denoted statistical significance								

or 1298CC genotypes and heavy smoking status increased the risk of nasopharyngeal carcinoma. In the present study, classic risk factors such as male gender and first-degree family history were individually found to be associated with OSCC. Interestingly, a smoking status of either mild or heavy smoker did not seem to be a risk factor in our study groups, like the study by Taghavi et al. (21), however, this situation can be caused by lacking dietary behaviour for example, having a lack of vitamin or folate which was also a limitation of our study. Nevertheless, it was found that people who never smoked or mild smokers were a little more protected from OSCC development.

Skiloba et al. (12) reported a decreased risk of acute lymphocytic leukemia (ALL) in adults with 1298AC and 1298CC genotypes but no association with acute myeloid leukemia and suggested a link between folate inadequacy and the development of ALL. On the other hand, Blank et al. (9) investigated the prognostic significance of MTHFR gene polymorphisms in gastric cancer patients treated with neo-adjuvant chemotherapy in which it was formerly reported that the efficacy of these therapies, especially 5-fluorouracil treatment could be affected by folate metabolism and MTHFR function as well. However, they reported no effect of *MTHFR*A1298C and C677T polymorphisms on the prognostic impact of gastric cancer. A meta-analysis by Tan et al. (11) suggested an increased risk of esophageal cancer in Asian or Caucasian 1298CC genotype carriers. In addition, despite the findings of a rare distribution of 1298CC genotype in Chinese esophageal cancer patients and healthy controls, Song et al. (17), reported that possessing the 1298CC genotype increases esophageal cancer risk versus the AA1298 genotype. As for head and neck cancer (HNC) the results are still controversial. Galbiati et al. (5) reported an increased risk of HNC with 1298AC/CC genotypes in contrast with Neumann et al. (22) who showed a lower risk with the same genotypes. On the other hand, Suzuki et al. (23), Kruszyna et al. (24) and two meta-analyses by Boccia et al. (4) and Niu et al. (25) reported no association with the development of HNC. In line with all these previous studies, our results are somehow compatible with them. We also found no association between the distribution of MTHFR A1298C genotypes and the risk of OSCC development independently. However, and interestingly, it was found that while differentiation status was triggered by A1298 allele (AA+AC genotypes), >4 cm tumors were seen in 1298C allele (CC+AC genotypes) carriers. This result may be because of gene-nutrient interaction e.g. the level of folate intake. Unfortunately, our study lacks folate intake data which is one of the limitations in correlating such an association. Indeed, folate data may be a direct risk factor for evaluating the interaction of MTHFR variants and several cancers as a deficiency of folate causes several deleterious effects including an imbalance in DNA precursors and modified DNA, synthesis and repair which was re-improved by supplementation. On the other hand, it is well-known that the key enzyme in folate metabolism is MTHFR, the product of the MTHFR gene which has two common polymorphisms, C677T and A1298C, resulting in a looseness of enzyme activity, in different ratios. Independently from folate

data it was seen that reduced enzyme activity by the variant MTHFR genotype did not affect the development of OSCC, however as seen in the effects on differentiation status and tumor size, MTHFR polymorphism may contribute to OSCC prognosis via DNA hypo-methylation through the variant MTHFR allele.

In conclusion, while our study did not individually demonstrate any association between MTHFR A1298C polymorphism and the risk of OSCC in the Turkish population, the prognosis of OSCC may be influenced by MTHFR A1298C variants. The limitation of our study is the size of study groups, and the lack of dietary behaviours. Therefore, the results obtained here should be supported by further studies.

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

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

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - Ö.K., K.B.K., H.Y.A.; Supervision - Ö.K., K.B.K., M.U., H.Y.A.; Materials - Ö.K., H.Y.A.; Data Collection and/or Processing - K.B.K., M.U.; Analysis and/or Interpretation - Ö.K., H.Y.A.; Literature Search - Ö.K., K.B.K., M.U., H.Y.A.; Writing - Ö.K., H.Y.A.; Critical Reviews - Ö.K., K.B.K., M.U., H.Y.A.

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

Financial Disclosure: The present work was supported by a grant from the Scientific Research Projects Coordination Unit of Istanbul University (Project No: 12801).

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

Hasta Onamı: Yazılı hasta onamı çalışmaya katılan hastalardan alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - Ö.K., K.B.K., H.Y.A.; Denetleme - Ö.K., K.B.K., M.U., H.Y.A.; Gereçler - Ö.K., H.Y.A.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - K.B.K., M.U.; Analiz ve/veya Yorum - Ö.K., H.Y.A.; Literatür Taraması - Ö.K., K.B.K., M.U., H.Y.A.; Yazan - Ö.K., H.Y.A.; Eleştirel İnceleme - Ö.K., K.B.K., M.U., H.Y.A.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 12801).

REFERENCES

1. Johnson NW, Jayasekara P, Amarasinghe AA. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. *Periodontol* 2000 2011; 57: 19-37. [CrossRef]

2. Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol* 2000; 36: 256-63. [\[CrossRef\]](#)
3. Bezerra AM, Sant'Ana TA, Gomes AV, de Lacerda Vidal AK, Muniz MT. Tyms double (2R) and triple repeat (3R) confers risk for human oral squamous cell carcinoma. *Mol Biol Rep* 2014; 41: 7737-42. [\[CrossRef\]](#)
4. Boccia S, Boffetta P, Brennan P, Ricciardi G, Gianfagna F, Matsuo K, et al. Meta-analyses of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and risk of head and neck and lung cancer. *Cancer Lett* 2009; 273: 55-61. [\[CrossRef\]](#)
5. Galbiatti AL, Ruiz MT, Rodrigues JO, Raposo LS, Maniglia JV, Pavarino EC, et al. Polymorphisms and haplotypes in methylenetetrahydrofolate reductase gene and head and neck squamous cell carcinoma risk. *Mol Biol Rep* 2012; 39: 635-43. [\[CrossRef\]](#)
6. Moody M, Le O, Rickert M, Manuele J, Chang S, Robinson G, et al. Folic acid supplementation increases survival and modulates high risk HPV-induced phenotypes in oral squamous cell carcinoma cells and correlates with p53 mRNA transcriptional down-regulation. *Cancer Cell Int* 2012; 12: 10. [\[CrossRef\]](#)
7. Supic G, Jovic N, Kozomara R, Zeljic K, Magic Z. Interaction between the MTHFR C677T polymorphism and alcohol--impact on oral cancer risk and multiple DNA methylation of tumor-related genes. *J Dent Res* 2011; 90: 65-70. [\[CrossRef\]](#)
8. Cao Y, Miao XP, Huang MY, Deng L, Liang XM, Lin DX, et al. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase are associated with a high risk of nasopharyngeal carcinoma in a smoking population from Southern China. *Mol Carcinog* 2010; 49: 928-34. [\[CrossRef\]](#)
9. Blank S, Rachakonda S, Keller G, Weichert W, Lordick F, Langer R, et al. A retrospective comparative exploratory study on two methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms in esophagogastric cancer: the A1298C MTHFR polymorphism is an independent prognostic factor only in neoadjuvantly treated gastric cancer patients. *BMC Cancer* 2014; 14: 58. [\[CrossRef\]](#)
10. Nazki FH, Sameer AS, Ganaie BA. Folate: metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. *Gene* 2014; 533: 11-20. [\[CrossRef\]](#)
11. Tan X, Wang YY, Dai L, Liao XQ, Chen MW. Genetic polymorphism of MTHFR A1298C and esophageal cancer susceptibility: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14: 1951-5. [\[CrossRef\]](#)
12. Skibola CF, Smith MT, Kane E, Roman E, Rollinson S, Cartwright RA, et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 12810-5. [\[CrossRef\]](#)
13. Galeone C, Edefonti V, Parpinel M, Leoncini E, Matsuo K, Talamini R, et al. Folate intake and the risk of oral cavity and pharyngeal cancer: a pooled analysis within the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Int J Cancer* 2015; 136: 904-14. [\[CrossRef\]](#)
14. Kingsley K. Potential effects of dietary folate supplementation on oral carcinogenesis, development and progression. *J Diet Suppl* 2010; 7: 51-9. [\[CrossRef\]](#)
15. Bektas-Kayhan K, Kucukhuseyin O, Yilmaz-Aydogan H, Boy-Metin Z, Ünür M, Isbir T. The Effects of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Gene Polymorphism on Oral Squamous Cell Carcinoma. *MOJ* 2014; 1: 34-40.
16. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1998; 16: 1215. [\[CrossRef\]](#)
17. Song C, Xing D, Tan W, Wei Q, Lin D. Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms Increase Risk of Esophageal Squamous Cell Carcinoma in a Chinese Population. *Cancer Res* 2001; 61: 3272-5.
18. Györfy B, Kocsis I, Vásárhelyi B. Biallelic genotype distributions in papers published in Gut between 1998 and 2003: altered conclusions after recalculating the Hardy-Weinberg equilibrium. *Gut* 2004; 53: 614-6.
19. Esser C, Tomluk J. Reporting Hardy-Weinberg Tests in Case-Control Studies: Reasons for Caution but not for Panic Reactions. *J Invest Dermatol* 2005; 124: 1082-3. [\[CrossRef\]](#)
20. Levecque C, Elbaz A, Clavel J, Richard F, Vidal JS, Amouyel P, et al. Association between Parkinson's disease and polymorphisms in the nNOS and iNOS genes in a community-based case-control study. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 79-86. [\[CrossRef\]](#)
21. Taghavi N, Yazdi I. Prognostic factors of survival rate in oral squamous cell carcinoma: Clinical, histologic, genetic and molecular concepts. *Arch Iran Med* 2015; 18: 314-9.
22. Neumann AS, Lyons HJ, Shen H, Liu Z, Shi Q, Sturgis EM, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control analysis. *Int J Cancer* 2005; 115: 131-6. [\[CrossRef\]](#)
23. Suzuki T, Matsuo K, Hasegawa Y, Hiraki A, Wakai K, Hirose K, et al. One-carbon metabolism-related gene polymorphisms and risk of head and neck squamous cell carcinoma: case-control study. *Cancer Sci* 2007; 98: 1439-46. [\[CrossRef\]](#)
24. Kruszyna L, Lianeri M, Rydzanicz M, Gajecka M, Szyfter K, Jagodzinski PP. Polymorphic variants of folate metabolism genes and the risk of laryngeal cancer. *Mol Biol Rep* 2010; 37: 241-7. [\[CrossRef\]](#)
25. Niu YM, Shen M, Li H, Ni XB, Zhou J, Zeng XT, et al. No association between MTHFR A1298C gene polymorphism and head and neck cancer risk: a meta-analysis based on 9,952 subjects. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13: 3943-7. [\[CrossRef\]](#)

Farklı Karbon Nanotüplerin Arpa Çimlenmesi Üzerindeki Etkileri

The Effect of Various Carbon Nanotubes on Barley Germination

Hülya Akdemir¹ , Merve Seven² , Şaban Kalay² , Mustafa Çulha² , Andrew J. Harvey² 

¹Department of Molecular Biology and Genetics, Gebze Technical University School of Science, Kocaeli, Turkey

²Department of Genetic and Bioengineering, Yeditepe University School of Engineering, İstanbul, Turkey

Cite this article as: Akdemir H, Seven M, Kalay Ş, Çulha M, Harvey AJ. The Effect of Various Carbon Nanotubes on Barley Germination. Experimed 2019; 9(2): 53-9.

ÖZ

Amaç: Karbon tabanlı nanomalzemelerin en önemlilerinden biri olan karbon nanotüpler (CNT) özellikle biyoloji ve tıp alanında kullanılmaya başlanmıştır. İlaç salımı, kanser tedavisi, biyosensör, biyomedikal görüntüleme ve doku mühendisliğinde kompozit materyaller olarak kullanımları biyomedikal uygulamalarından bazılarıdır. Ancak, yaygın olarak kullanılmaları, bu yapıların çevreye salınması riskini doğurmuştur. Bu nedenle bu çalışmada, farklı özellikteki karbon nanotüplerin arpanın (*Hordeum vulgare* L. 'Zeynelağa') çimlenmesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Ticari tek tabakalı karbon nanotüp (SWCNT), çok tabakalı karbon nanotüplere (MWCNT) ek olarak, laboratuvar koşullarında karboksillenmiş çok tabakalı karbon nanotüpler (CCNT) sentezlenmiş ve FTIR spektrokopisi ile karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, farklı konsantrasyonlardaki (50 ve 100 mg/L) karbon nanotüplerin arpa tohumlarının çimlenmesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Bulgular: Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, 3 karbon nanotüpün kullanılan konsantrasyonlarda arpa bitkisinin çimlenmesi üzerinde bir etki yaratmamıştır.

Sonuç: Denenen farklı karbon nanotüplerin arpa çimlenmesi üzerinde doğrudan bir toksik etki yaratmadığı belirlenmiştir. Elde edilen bu verilere ek olarak, gen ekspresyonu düzeyinde bir farklılık olup olmadığının araştırılması da bu materyallerin gerçek etkisinin anlaşılması açısından önemlidir.

Anahtar Kelimeler: Tek ve çok tabakalı karbon nanotüpler, karboksillenmiş karbon nanotüpler, arpa, biyomedikal uygulama

GİRİŞ

Günümüzde nanobilim, modern bilimdeki en önemli araştırma ve geliştirme alanlarından birisi haline gelmiştir. Nano kelimesi, Yunancada bir milyarıncı anlamına gelmekte olup, en basit anlamda ise nanobilim küçük partiküllü malzemelerin bilimi olarak tanımlanmaktadır (1). Gerçekte nanomateryaller doğada insanların nano ölçek seviyesinde bu

ABSTRACT

Objective: Carbon nanotubes (CNT), one of the most important carbon-based nanomaterials, have started to be used in the fields of biology and medicine. Drug delivery, cancer treatment, biosensors, biomedical imaging and their use as composite materials in tissue engineering are some of the biomedical applications. However, their extensive applications may increase the risk of their being released into the environment. Thus, in this study, we investigated the effects of different carbon on barley (*Hordeum vulgare* L. 'Zeynelağa') germination.

Material and Method: In addition to usage of commercial single-walled carbon nanotubes (SWCNT) and multi-walled carbon nanotubes (MWCNT), carboxylated multi-walled carbon nanotubes (CCNT) have also synthesized carboxylated multi-walled carbon nanotubes and characterized them with FTIR spectroscopy. Later, we investigated the effect of different concentrations (50 and 100 mg/L) of carbon nanotubes on the germination of barley seeds.

Results: Compared to control groups, treatment of barley seeds with different concentrations of three carbon nanotubes had no effect on barley germination.

Conclusion: It was observed that tested carbon nanotubes have no toxic effect on barley germination. In addition to these data, it is also important to investigate whether there is a difference in the gene expression level in order to understand the actual effect of these materials.

Keywords: Single- and multi-walled carbon nanotubes, carboxylated carbon nanotubes, barley, biomedical applications

maddeleri tanımlayabilmelerinden çok önce var olmalarına karşın, sentetik kimyadaki ilerlemeler özellikle biyolojik nanoteknolojinin gelişmesinde itici güç olmuştur. Böylesine küçük partiküllerin günümüzde temel bilimin ilgisini çekmeyi başarısındaki en önemli neden, bir maddenin erime noktası, elektriksel ya da optik özelliklerinin bu maddenin boyutu nanoskobik olacak kadar küçüldüğünde değişmesinden kaynaklanmaktadır (1). Nanopartiküllerin yeni

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Hülya Akdemir **E-mail:** hakedemir@gtu.edu.tr

Geliş Tarihi/Received Date: 23.07.2019 **Revision Date/Revizyon Tarihi:** 06.08.2019 **Kabul Tarihi/Accepted Date:** 08.08.2019



Content of this journal is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

özelliklerinin belirlenmesi ile teknolojik / ticari gelişim ve uygulamalarında, mikroelektronikten kaplamaya, boyalardan biyoteknolojiye kadar birçok farklı alanda yeni fırsatlar açığa çıkmıştır (1). Ticari piyasadaki uygulamalarına örnek olarak, reçetesiz tıbbi tanı kitlerinde görünür bir belirteç olarak kullanılan altın nanopartiküller verilebilir (2). Bu uygulama, tek bir nanopartikülün eşsiz bir özelliğinin nasıl teknolojik imkana dönüşebileceğinin güzel bir örneğidir. Saf altının makroskobik numuneleri tek bir altın rengini yansıtırken, nanopartikülün büyüklüğü ve şekline bağlı olarak, altın nanopartikülleri gökkuşağının belli başlı tüm renklerini gösterebilir (3). Altın nanopartiküllerinin optik absorpsiyon yoğunlukları aşırı derecede güçlü olup, bir yüzeyde çöktürülürse ya da bir çözeltide süspanse edilirse, bu partiküllerin çok küçük bir miktarı bile çıplak gözle saptanabilir ve bu özellikleri ile altın nanopartikülleri görünür belirteç olarak kullanımda ideal hale gelir (1). Biyomedikal ve biyoteknolojide mikro ve nanopartiküllerin diğer uygulamalarına; enzim enkapsülasyonu, DNA transfeksiyonu, biyosensörler ve ilaç uygulamaları örnek verilebilir. Örneğin, ilaçlar biyobozunur polimerlerden oluşan nanosferler ile birleştirilip uygulanırsa, bu nanosferlerin ayrışması ile ilacın uygun zamanda ortama salınması sağlanır. Bu partikülün parçalanmasına neden olan durum, partikülün içinde bulunan kimyasal bağın doğasının değişmesiyle kontrol edilir. Örneğin, asitte bozunur bağlar kullanıldığında, bu partiküller tümör hücreleri ya da iltihap bölgesinin etrafında var olan asidik mikroçevrelerde parçalanırlar ve bu durum bölgeye özgü ilaç tedavisini mümkün kılar (4). Bir başka çalışmada ise dextran kaplı süperparamagnetik nanopartiküller ile kök hüce ve bağışıklık hücreleri gibi farklı hüce türleri spesifik olarak, yan etkiler olmadan hedeflenebilmiş ve MR görüntüleme ile görüntülenebilmişti (5). Aktif yüzeyli bu nanopartiküller aynı zamanda bir genetik materyalin başka bir hücreye aktarımını sağlayan transfeksiyon işleminde de kullanılabilirler. Örneğin, demir oksit magnetik nanopartiküller aracılığı ile insan metastatik süt bezi hücre hattına RNA aktarımı ve EGFP susturması sağlanmıştır (6).

İnce içecek pipetlerine benzeyen mikro ve nanotüp yapıları ise, küresel nanopartiküllere görece bazı ilginç üstünlükleri nedeniyle biyoteknolojik uygulamalarda, küresel olanlara alternatif olarak kullanılırlar (1). Örneğin, nanotüpün boyutuna göre değerlendirildiğinde nanotüpler büyük iç hacme sahip olup, bu özellikleri sayesinde bu tüplerin içine küçük moleküllerden proteinlere kadar değişen boyutlarda olmak üzere istenilen kimyasal ya da biyokimyasal gruplar doldurulabilir (7). Dahası, nanotüplerin iç ve dış yüzeyleri farklı olduğundan, bu iki kısım kimyasal ya da biyokimyasal olarak farklı şekillerde işlevsel hale getirilebilir. Bu da örneğin, nanotüpün içini belirli bir biyokimyasal ile doldururken, dış yüzeyin kimyasal özelliklerinin de biyo-uyumlu olacak şekilde düzenlenebilme ihtimalini ortaya çıkarır. Sonuçta, nanotüpler uçları açık yapılar olup, bu durum tüp içine ulaşımı ve tüp içine madde eklenmesini çok kolay hale getirir (1).

Bununla birlikte, farklı özellikteki bu nanomateryallerin yaygın kullanımı, bu materyallerin geri dönüşüm proseslerinde ya da atık olarak çevreye salınabilmesine neden olup, insan ve diğer

canlılar için tehdit oluşturabileceğine dair kaygıları arttırmıştır. Literatürde yer alan ilk çalışmalarda, bu nanomateryallerin çeşitli konsantrasyonlarda insan ve hayvanları nasıl etkileyebileceğini anlamak için farklı nanomateryallerin hücre morfolojisi, davranışı ve fonksiyonu ile seçici ölümü üzerindeki etkileri araştırılmıştır (8). Daha sonra yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalarda, bitki hücre ve dokularında bu nanomateryallerin olası pozitif ve yan etkileri araştırılmış ancak yapılan çalışmalarda kimi zaman çelişkili sonuçlar elde edilmiştir (9).

Karbon tabanlı nanomalzemeler, benzersiz özellikleri nedeniyle her geçen gün birçok uygulama alanlarında kullanılmaktadır (10). Bu malzemeler, fulleren, nano-onion, nano-cone, nano-horn, karbon dot, karbon nanotüpler, nano-bead, nano-fiber, nanodiamond ve grahpenleri içerir ve boyutlarının yanı sıra yapısal olarak da çok büyük farklılıklar gösterirler (10). Karbon nanotüp (CNT) temelli ilaç salımı, *in vitro* ve *in vivo* kanser terapileri gibi hastalık tedavisindeki uygulamalar için küçük ilaç moleküllerinin, DNA plazmitlerinin, siRNA ve proteinlerin hücre içi salınımı için umut vadetmektedir (11). CNT'lerin benzersiz optik ve elektriksel özellikleri onları çeşitli biyolojik molekülleri tespit etmek için dikkat çekici platformlar haline getirmektedir (12). Tek tabakalı karbon nanotüplerin, güçlü rezonans Raman saçılmasının yanı sıra yakın kızıl ötesi bölgede (NIR) optik absorpsiyon ve fotoluminesans gibi bir çok özgün optik özellik gösterip, bu özellikleriyle farklı biyolojik görüntüleme yöntemlerinde kullanılabilirler (13). Ayrıca, üstün mekanik özelliklere sahip CNT'ler, potansiyel doku mühendisliği iskele malzemeleri olarak da uygulama alanı bulmuşlardır (14). CNT-bazlı nanomalzemeler bu özellikleriyle ümit verici olup, gelecekte hastalık tanısı ve tedavisi için yeni fırsatlar getirebilecektir (11). Tıp alanındaki bu potansiyelinin yanı sıra yine karbon nanotüplerin pestisitler için de potansiyel taşıyıcı sistemler olarak ya da ürün verimini arttırmadaki etkileri ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmaktadır (15). Karbon nanotüplerin bitkiler üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada, tek tabakalı karbon nanotüplerin (SWCNT, single-walled carbon nanotubes), tütün hücre zarı ve duvarını aşarak, hücre içine alınabildiğini göstermiştir. Çok tabakalı karbon nanotüplerle (MWCNT, multi-walled carbon nanotubes) yapılan başka bir çalışmada ise, bunların bitki protoplastları tarafından boyutlarına bağlı olarak, nükleus ve plastitler de olmak üzere önemli hüresel yapılara translokasyonunu kanıtlamıştır (16). Yine MWCNT'lerin tohum kabuğuna nüfuz edebildiği ve bitkilerde su kanallarını düzenleyebildiği düşünülmektedir.

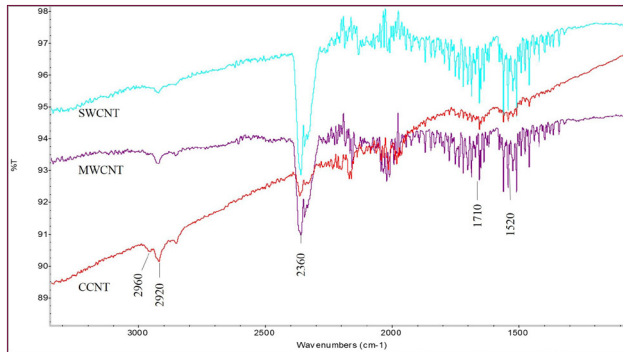
Bununla birlikte, hem SWCNT hem de MWCNT'lerin bitki gelişimsel biyolojisi ve bitki fizyolojisi üzerindeki etkileri tam olarak anlaşılammıştır. Karbon nanotüpler, *Sorghum bicolor* ve *Panicum virgatum* gibi iki önemli enerji bitkisi çimlenmesi ve biyokütlesi üzerinde olumlu etkiler yapmış (17), kabak biyokütlesi MWCNT'lerle muamele edildiğinde azalmış (18), pirinçte ise bitki büyümesi üzerinde toksik etki yaratmıştır (19). Karbon nanotüplerin farklı bitkilerin çimlenmesi üzerinde etkisi kısmen araştırılmış ve gerek olumlu gerekse toksik etkileri belirlenmiştir.

Bu çalışma kapsamında, hem dünya hem Türkiye ekonomisi açısından önemli bir yere sahip olan arpa bitkisi eksplant kaynağı olarak seçilmiştir. Arpa, hem Türkiye hem de dünyada yetiştirilen önemli bir bitkidir. Arpa üretiminin çoğu, hayvan yemi ve maltlık olarak ve nadiren de insan besini olarak tüketime sunulmaktadır. Bu çalışmada, Türk maltlık arpa çeşidinin (*Hordeum vulgare* L. 'Zeynelağa') çimlenmesi üzerinde 3 farklı karbon nanotüpün [SWCNT, MWCNT, karboksillenmiş çok duvarlı karbon nanotüp (CCNT)] etkileri araştırılmıştır.

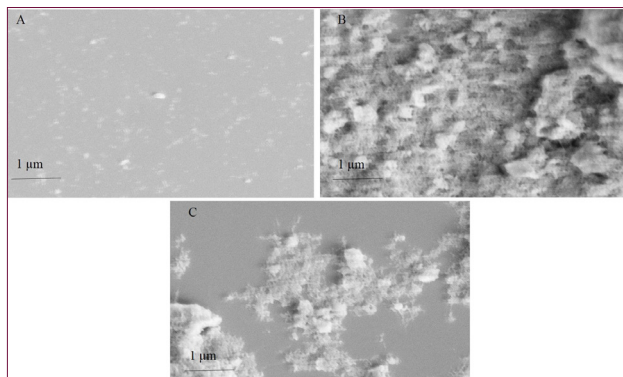
GEREÇ VE YÖNTEM

Bitki Materyali ve Hazırlanması

Çalışma kapsamında kullanılan 'Zeynelağa' çeşidine ait arpa tohumları, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden (Ankara) temin edilmiştir. Bu çalışmada, etik komite iznine gerek duyulacak bir materyal ya da deney hayvanı kullanılmamıştır. Bu nedenle, etik komite iznine gerek duyulmamıştır. Tohumların çimlendirilmeden önce, yaklaşık 24 saat çeşme suyu kullanılarak imbibisyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra arpa tohumları, yüzey sterilizasyonu için; %70'lik etil alkolde 1 dk çalkalanıp, steril distile su ile 3 kere 2'şer dk durulandıktan sonra, %2,5'lük ticari sodyum hipoklorit (Merck) çözeltisinde 15 dk inkübe edildikten sonra steril distile su ile en az 3 kere 5'er dk durulanmıştır.



Şekil 1. SWCNT, MWCNT ve CCNT'nin FTIR spektrumlarının karşılaştırılması



Şekil 2. a-c MWCNT (A), SWCNT (B) ve CCNT (C) SEM görüntüleri

Karbon Nanotüplerin Hazırlanması

Denemelerde, ticari karbon nanotüpler; SWCNT (Sigma 704148) ve MWCNT (Sigma 406074) kullanılmıştır. Karboksillenmiş çok duvarlı karbon nanotüpler (CCNT), ticari MWCNT'ler kullanılarak aşağıdaki şekilde sentezlenmiştir: 2 g MWCNT, 1 saat 100 mL H₂SO₄:HNO₃ (3:1) içerisinde ultrasonik su banyosunda (WiseClean) soniklenmiştir. Daha sonra, karboksillenme için 75°C'ta, 12 saat 300 rpm'de inkübe edilmiştir. İlgili çözelti, 24°C'ta, 5000 rpm'de 30 dk santrifüj ile çöktürüldükten sonra, pH nötrlenene kadar saf su ile yıkanmış ve gece boyu 55°C'de etüvde kurutulmuştur.

FTIR Spektroskopisi (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

Elde edilen CCNT'de karboksillenmenin gerçekleştiğinin kontrolü, FTIR (Nicolet™ iS™ 50 FT-IR Spectrometer, Thermo Scientific) ile karakterize edilmiştir. Ayrıca, hem SWCNT ve MWCNT'deki titreşim geçişleri de FTIR ile karakterize edilmiştir.

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizleri

Hem ticari karbon nanotüpler (SWCNT ve MWCNT) hem de sentezlenen CCNT'ye ait SEM görüntüleri alınmıştır. Analiz için alınan örnek karbon disk üzerine yerleştirilmiş ve vakum ortamında Ar (argon) atmosferinde altın tabakası ile kaplanmıştır (Baltec SDC 005 sputter-kaplayıcı). SEM görüntüleri yüksek vakum ve yüksek potansiyel altında Carl Zeiss Evo-40 cihazı kullanılarak alınmıştır. SEM potansiyel artırma voltajı 10kV, I prob 100-50 arası değiştirilerek ayarlanmıştır.

Çimlenme Ortamının Hazırlanması

Tohumların çimlendirilmesi için farklı konsantrasyonlarda karbon nanotüp içeren (50 mg/L veya 100 mg/L) ya da içermeyen (kontrol grubu) ortamlar hazırlandı. Bu amaçla, pH'ı 5.8'e ayarlanan distile su, %0.5 agar ve istenilen oranda karbon nanotüp ile karıştırılarak otoklav öncesinde, ultrasonik su banyosunda hidrofobik yapıdaki karbon nanotüplerin kümelenmesini önlemek için 30 dk sonike edildi ve daha sonra 121°C'ta 20 dk otoklav edildi. Hazırlanan ortamlar otoklav sonrası tekrar 30 dk sonike edildikten sonra, her birinde 50 mL olacak şekilde magenta kaplarına dağıtıldı.

Tohumların Çimlendirilmesi

İmbibisyonu ve yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilen tohumlar, çimlendirilmeleri için aseptik şartlar altında, karbon nanotüp içeren ya da içermeyen ortamlara aktarılarak, bitki büyüme kabiniinde 22°C'ta karanlıkta inkübe edilmiştir.

Verilerin Analizi

Her bir uygulama için en az 20 tohum kullanılmış ve 2 tekrar yapılmıştır. Çimlenmenin 3. ve 5. gününde her bir uygulamaya ait, çimlenme yüzdeleri, gövde uzunluğu ve kök sayısı alınmıştır. Elde edilen verilerin değerlendirilmesinde, tek yönlü ANOVA testi kullanılmış ve ortalamaları karşılaştırmak için anlamlı en az farklılık (LSD) testi (p≤0.05) kullanılmıştır (20).

BULGULAR

Hem ticari karbon nanotüpler hem de laboratuvar koşullarında sentezlenen karboksillenmiş nanotüplere ait FTIR spektroskopisi sonuçları Şekil 1'de sunulmuştur. Bu spektrumlarda 1710

cm^{-1} C=O, 2360 cm^{-1} CO_2 molekülü titreşimlerini, ayrıca 1520 cm^{-1} C=O bağı elastik vibrasyonunu göstermektedir (21). 2920 cm^{-1} ve 2960 cm^{-1} ise CH_3 gruplarının simetrik vibrasyonuna işaret etmektedir. Sonuç olarak, CCNT spektrumundaki 1710 cm^{-1} bandı karboksillenmenin gerçekleştiğine işaret etmektedir.

SWCNT, MWCNT ve CCNT'nin SEM görüntüleri Şekil 2'de sunulmuştur. Bu nano malzemeler oldukça küçük boyutlarda olduklarından görüntü çözünürlükleri oldukça azdır.

Bunun yanı sıra, hidrofobik karakterde olduklarından kümelenmiş ve birbirine yapışık olarak görüntülenmişlerdir. Denemeler süresince, kümelenmenin önlenmesi için çimlenme ortamları hem otoklav öncesi hem sonrası sonike edilerek, kümelenmenin minimuma indirilmesi sağlanmıştır.

Bu karbon nanotüplerin çimlenme üzerindeki etkileri incelendiğinde, kontrol grubunda 3.günün sonunda tohumların yarısından fazlası (%53,3), 5. günde ise %80'i çimlenmeye başlamıştır (Tablo 1). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında SWCNT'nin

Tablo 1. Farklı karbon nanotüp içeren çimlenme ortamlarında, arpa bitkisinin çimlenme yüzdeleri

Karbon nanotüpler	50 mg/L		100 mg/L	
	3. gün	5. gün	3. gün	5. gün
	%		%	
Kontrol*	53,3	80,0	53,3	80,0
SWCNT	50,0	53,3	46,6	46,6
MWCNT	66,6	90,0	46,6	75,0
CNNT	64,1	72,4	30,8	85,2

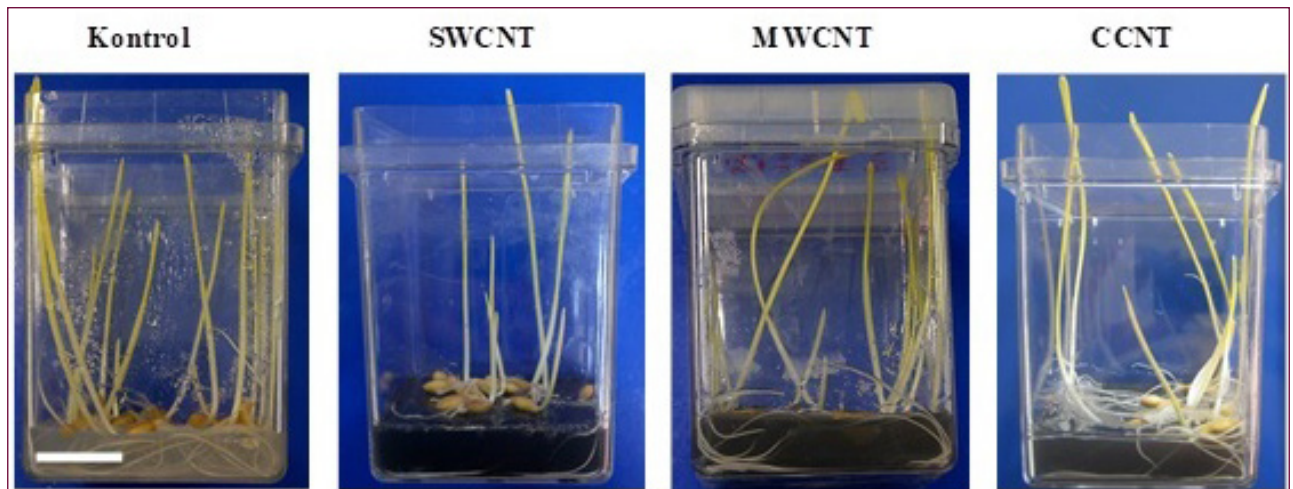
*Kontrol grubu, karbon nanotüp içermeyen ortamda çimlenmeye alınmıştır

çimlenme üzerinde çok düşük de olsa negatif bir etkisi olduğu görülmüştür. Düşük derişimlerde (50 mg/L) kullanıldığında MWCNT'nin arpa çimlenmesi üzerinde olumlu etki gösterdiği ve çimlenmeyi görece arttırdığı görülmüştür (Tablo 1). Bununla birlikte, MWCNT'nin artan konsantrasyonlarının kontrol grubuyla karşılaştırıldığında çimlenmeyi azalttığı belirlenmiştir.

Tablo 2. Farklı karbon nanotüplerin, kök sayısı ve gövde uzunluğu üzerindeki etkisi

	Kök sayısı*		Gövde uzunluğu*(mm)	
	3. gün	5. gün	3. gün	5. gün
Kontrol	4,94±0,95 ^a	5,08±0,19 ^a	29,1±4,29 ^a	82,9±4,64 ^b
50 mg/L SWCNT	5,14±0,21 ^a	5,50±0,37 ^a	33,0±4,31 ^a	99,3±7,97 ^a
100 mg/L SWCNT	5,14±0,27 ^a	5,18±0,46 ^a	26,2±3,47 ^a	73,0±11,9 ^{bc}
Kontrol	4,94±0,95 ^a	5,08±0,19 ^a	29,1±4,29 ^a	82,9±4,64 ^a
50 mg/L MWCNT	5,53±0,31 ^a	5,42±0,25 ^a	23,3±0,88 ^a	85,2±4,85 ^a
100 mg/L MWCNT	4,71±0,38 ^a	5,20±0,25 ^a	10,9±2,75 ^b	83,2±4,33 ^a
Kontrol	4,95±0,26 ^a	4,33±0,24 ^a	21,5±3,40 ^b	71,1±7,24 ^a
50 mg/L CNNT	5,13±0,18 ^a	4,78±0,24 ^a	33,0±3,36 ^a	76,3±8,50 ^a
100 mg/L CNNT	5,00±0,25 ^a	4,84±0,17 ^a	24,3±3,14 ^b	81,8±6,80 ^a

Her bir sütunda yer alan birbirinden farklı harfler (a, b, c) LSD testine göre kontrol grubu ve nanotüp uygulamaları arasında belirgin bir fark ($p \leq 0.05$) oluşturmaktadır. Farklılıklar dikey olarak değerlendirilmiştir



Şekil 3. Kontrol grubu ve 100 mg/L konsantrasyonda farklı nanotüpler içeren ortamlarda arpa bitkisinin 5.gün sonundaki çimlenmesi (bar: 2,22 cm)

CCNT düşük konsantrasyonda kullanıldığında, 3.günde çimlenmeyi hızlandırmışken, 5. günün sonunda bu oran kontrol grubunu geçememiştir. CCNT'nin yüksek konsantrasyonda kullanıldığında çimlenme üzerinde 3. gün hızlı bir düşüşe neden olurken, 5. günün sonunda bu oran diğer nanotüpler ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında en yüksek seviyeye ulaşmıştır (Tablo 1).

Çimlenme oranları farklı olsa da, diğer çimlenme verileri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında denemeler arasında istatistiksel olarak çok büyük farklılıklar gözlenmemiştir (Tablo 2, Şekil 3). Farklı konsantrasyonlarda SWCNT uygulandığında kök sayısında belirgin bir değişiklik meydana gelmezken, gövde uzunluğu çimlenmenin beşinci gününde 50 mg/L SWCNT varlığında kontrol grubuna görece artmıştır. Ancak SWCNT'nin artan konsantrasyonlarının kontrol grubundan görece daha kısa gövdeler oluşturduğu belirlenmiştir (Tablo 2). MWCNT'nin etkisi incelendiğinde, yine kök sayılarında bir değişiklik gözlenmezken, sadece gövde uzunluğu 100 mg/L MWCNT varlığında çimlenmenin 3.günü biraz düşmüş gibi görünse de, son verinin alındığı 5. günde bu oran istatistiksel olarak kontrol ile aynı uzunluğa ulaşmıştır. Son olarak, karboksillenmiş karbon nanotüp varlığında (CNNT), yine kök sayısında belirgin bir fark görünmezken, 50 mg/L CNNT varlığında çimlenmenin 3. günü biraz daha uzamış gövdeler elde edilse de bu oran yine 5. gün sonunda kontrol ile aynı seviyede kalmıştır (Tablo 3). Elde edilen bu veriler, kullanılan karbon nanotüplerin denenen konsantrasyonlarında arpa çimlenmesi üzerinde herhangi bir toksik etkisi olmadığını göstermektedir.

TARTIŞMA

Nanoteknoloji alanındaki son gelişmeler, tıptan uzaya, elektronik biliminden savunma sanayiine, birçok farklı alandaki uygulamaları ile bilim ve teknolojik platformlarda ilerleme sağlamıştır (22, 23). Son zamanlarda, tasarlanan nanomateryaller ile çeşitli biyolojik sistemler arasındaki etkileşimin anlaşılmasına duyulan ihtiyaç, tarım ve gıda alanlarında nanoteknoloji temelli yaklaşımların kullanımını için önemli bir araştırma alanı geliştirmiştir. Nano boyuttaki materyallerin, küçük hacimleri, yüksek biyokimyasal reaktiviteleri, hücrelere girebilme özellikleri ve organizma içinde hızlı dağılabilmeleri gibi özellikleri, bitkisel ürün üretim teknikleri açısından ilgi çekici bir araç haline getirmektedir (23). Bu bağlamda, nanopartiküllerin biyolojik moleküllerin bitki hücrelerine aktarımında ya da hastalıkların önlenmesinde herbisit uygulamalarında yararlı bulunabileceği gösterilmiştir (16). Tüm bu özelliklerine rağmen, ilgili materyallerin çevreye salınma riskinin bu yararlıdan daha ziyade zarar getireceği endişesi günden güne artmaktadır (10).

Bu nedenle ilgili çalışma kapsamında, artan nanomateryal kullanımına karşı karbon nanotüplerin (SWCNT, MWCNT ve CCNT) arpa çimlenmesi üzerinde olası etkileri araştırılmıştır. Çalışma kapsamında değerlendirilen karbon nanotüplerin fizikokimyasal özelliklerinin, bu yapıların buldukları ortamdaki hareketlerini etkilediği, ortam koşullarına verdikleri cevabı değiştirdiği yapılan çalışmalar ile gözlenmiştir (24). Literatürde karbon

nanotüplerin farklı fonksiyonel kimyasal gruplar ile (karboksilasyon, oksidasyon, amidasyon, polietilen glikol ile modifikasyon, fenil-SO₃H, fenil-(COOH)₂ grupları ile modifikasyon vb.) modifikasyonu bildirilmiştir. Bu eklenen fonksiyonel gruplar karbon nanotüplerin kimyasal özelliklerini değiştirmiş ve çoğu durumda suda çözünürlüklerini arttırmıştır. Karboksillenme modifikasyonu da karbon nanotüplerin suda çözünürlüğünü arttırmanın yanı sıra, farklı moleküller ile birleşmesini kolaylaştırabilmektedir (25). Memeli hücreleri ile yapılan çalışmalarda karboksillenmenin karbon nanotüplerin sitotoksitesini azalttığı, *in vivo* çalışmalar için daha güvenilir hale getirdiği gözlenmiştir (25).

Bununla birlikte, literatürde yapılan çalışmalarda karbon nanomateryallerin tipi, konsantrasyonu, bitki türü ve büyüme koşullarına bağlı olarak hem negatif hem de pozitif yönleri olduğu gösterilmiştir. *Lolium perenne* bitkisine 2000 mg/L MWCNT uygulandığında, yaklaşık %17 oranında kök uzunluğunda artış görülmüştür (26). Buğdayda, suda çözünür karbon nano-dotların (150 mg/L) 10 gün boyunca uygulanması kök büyümesini arttırmıştır (27). Suda çözünür nano-onionların, 10, 20 ve 30 mg/L konsantrasyonlarda nohut bitkisine uygulanması büyümeyi arttırmıştır (28). Tütün hücre kültürlerine karbon-nano hornların 25, 50 ve 100 mg/mL uygulanması, hücrelerin büyümesini %78 oranında arttırmıştır (29). MWCNT'lerin 50, 100 ve 200 mg/L oranında 10-11 gün boyunca arpa, soya fasülyesi ve mısır bitkisindeki etkileri incelendiğinde; arpa ve soyada %50 oranında, mısırdaki ise %90 oranında çimlenme artışı gerçekleşmiştir (9). Arpa bitkisinde elde edilen bu oran, ilgili nanotüpün jelimsi ortam da değil de hava püskürteci (airbrush) ile uygulanmasından kaynaklanabilir. Bu durumda, ilgili nanotüplerin doğrudan tohum kabuğuna yapıştıkları ve çimlenme üzerinde daha etkin rol oynadıkları düşünülmektedir. Kullanılan yöntemin farklılığın yanı sıra, farklı uygulamalar farklı bitki türleri ve hatta aynı türe ait çeşitlerde de farklılıklar gösterebilmektedir. Karbon nanomateryallerinin bitkiler üzerindeki bu olumlu etkilerinin yanı sıra, aynı zamanda negatif etkilerinin olduğu da kanıtlanmıştır. Giriş kısmında da belirtildiği üzere, 15 gün boyunca 1000 mg/L MWCNT uygulanan kabak bitkilerinin biyokütlesinde %60 oranında azalma meydana gelmiştir (18). Graphen oksit uygulaması (1600 mg/L), *Vicia faba* bitkisinde büyümenin azalması ve antioksidan enzim aktivitesinin düşmesiyle sonuçlanmıştır (30). Tüm bu olumlu ya da olumsuz etkilerinin yanı sıra, çalışmamızda kullanılan karbon nanotüplerin arpa çimlenmesi üzerinde değerlendirilen veriler açısından olumsuz bir etkisinin olmadığı anlaşılmıştır.

SONUÇ

Karbon nanomateryaller, benzersiz optik, elektriksel, mekanik ve termal özellikleri nedeniyle her geçen gün biyoloji ve tıp alanında daha fazla kullanılmaktadır. Bu nedenle, bu materyallerin insan sağlığı ve doğaya etkileri üzerinde ayrıntılı çalışmaların yapılması ve olası toksik etkilerine karşın önlem alınması gerekmektedir. Karbon nanomateryallerin etkileri farklı bitki türleri, çeşitleri ve ilgili nanomateryallerin uygulanmasına bağlı olarak değişmektedir. Bu çalışmada

elde edilen sonuçlar, farklı karbon nanotüplerin ülkemize ait 'Zeynelağa' arpa çeşidinin çimlenmesi üzerinde olumsuz bir etkisinin olmadığını göstermiştir. Elde edilen bu verilere ek olarak, çimlenme üzerinde belirgin bir farklılık olmasa da ilgili materyallerde gen ekspresyonu düzeyinde bir farklılık olup olmadığını araştırılması, bu materyallerin gerçek etkisinin anlaşılması açısından önemlidir.

Etik Komite Onayı: Bu çalışmada, etik komite iznine gerek duyulacak bir materyal ya da deney hayvanı kullanılmamıştır.

Hasta Onamı: Uygulanabilir değil.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - A.J.H., M.Ç.; Denetleme - A.J.H., M.Ç., H.A.; Gereçler - A.J.H.; M.Ç.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - H.A., M.S., Ş.K.; Analiz ve/veya Yorum - H.A., M.S., Ş.K.; Literatür Taraması - H.A.; Yazan - H.A., Eleştirel İnceleme - A.J.H., M.Ç.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

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

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval is not required because of no material or experimental animal that would require permission.

Informed Consent: N/A.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - A.J.H., M.Ç.; Supervision - A.J.H., M.Ç., H.A.; Materials - A.J.H., M.Ç.; Data Collection and/or Processing - H.A., M.S., Ş.K.; Analysis and/or Interpretation - H.A., M.S., Ş.K.; Literature Search - H.A.; Writing - H.A.; Critical Reviews - A.J.H., M.Ç.

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

- Kohli P, Martin CR. Smart nanotubes for biotechnology. *Curr Pharm Biotechnol* 2005; 6: 35-47. [CrossRef]
- Martin CR, Mitchell DT. Nanomaterials in analytical chemistry. *Anal Chem* 1998; 70: 322-7. [CrossRef]
- Martin CR. Nanomaterials - A membrane-based synthetic approach. *Science* 1994; 266: 1961-6. [CrossRef]
- Murthy N, Thng YX, Schuck S, Xu MC, Frechet JMJ. A novel strategy for encapsulation and release of proteins: hydrogels and microparticles with acid-labile acetal cross-linkers. *J Am Chem Soc* 2002; 124: 12398-9. [CrossRef]
- Kim SJ, Lewis B, Steiner MS, Bissa UV, Dose C, Frank JA. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for direct labeling of stem cells and in vivo MRI tracking. *Contrast Media Mol Imaging* 2016; 11: 55-64. [CrossRef]
- Cruz-Acuña M, Halman JR, Afonin KA, Dobson J, Rinaldi C. Magnetic nanoparticles loaded with functional RNA nanoparticles. *Nanoscale* 2018; 10: 17761-70. [CrossRef]
- Lee SB, Mitchell DT, Trofin L, Nevanen TK, Söderlund H, Martin CR. Antibody-based bio/nanotube membranes for enantiomeric drug separations. *Science* 2002; 296: 2198-200. [CrossRef]
- Martinelli V, Cellot G, Toma FM, Long CS, Caldwell JH, Zentilin L, et al. Carbon nanotubes promote growth and spontaneous electrical activity in cultured cardiac myocytes. *Nano Lett* 2012; 12: 1831-8. [CrossRef]
- Lahiani MH, Dervishi E, Chen J, Nima Z, Gaume A, Biris AS, et al. Impact of carbon nanotube exposure to seeds of valuable crops. *ACS Appl Mater Interfaces* 2013; 5: 7965-7973. [CrossRef]
- Mukherjee A, Majumdar S, Servin AD, Pagano L, Dhankher OP, White JC. Carbon Nanomaterials in Agriculture: A Critical Review. *Front Plant Sci* 2016; 7: 172. [CrossRef]
- Wang X, Liu Z. Carbon nanotubes in biology and medicine: An overview. *Chinese Sci Bull* 2012; 57: 167-80. [CrossRef]
- Daniel S, Rao T, Rao K, Rani SU, Naidu GRK, Lee HY, et al. A review of DNA functionalized/grafted carbon nanotubes and their characterization. *Sensor Actuat B-Chem* 2007; 122: 672-82. [CrossRef]
- Welscher K, Liu Z, Daranciang D, Dai H. Selective probing and imaging of cells with single walled carbon nanotubes as near-infrared fluorescent molecules. *Nano Lett* 2008; 8: 586-590. [CrossRef]
- Veetil JV, Ye K. Tailored carbon nanotubes for tissue engineering applications. *Biotechnol Prog* 2009; 25: 709-21. [CrossRef]
- De La Torre-Roche R, Hawthorne J, Deng Y, Xing B, Cai W, Newman LA, et al. Multiwalled carbon nanotubes and C60 fullerenes differentially impact the accumulation of weathered pesticides in four agricultural plants. *Environ Sci Technol* 2013; 47: 12539-47. [CrossRef]
- Serag MF, Kaji N, Gaillard C, Okamoto Y, Terasaka K, Jabasini M, et al. Trafficking and subcellular localization of multiwalled carbon nanotubes in plant cells. *ACS Nano* 2011; 5: 493-9. [CrossRef]
- Pandey K, Lahiani MH, Hicks VK, Hudson MK, Green MJ, Khodakovskaya M. Effects of carbon-based nanomaterials on seed germination, biomass accumulation and salt stress response of bioenergy crops. *PLoS One* 2018; 13: doi: 10.1371/journal.pone.0202274. [CrossRef]
- Stampoulis D, Sinha SK, White JC. Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. *Environ Sci Technol* 2009; 43: 9473-9. [CrossRef]
- Hao Y, Ma C, Zhang Z, Song Y, Weidong Cao W, Jing Guo J et al. Carbon nanomaterials alter plant physiology and soil bacterial community composition in a rice-soil-bacterial ecosystem. *Environ Pollut* 2018; 232: 123-36. [CrossRef]
- Marascuilo LA, McSweeney M. Post-Hoc Multiple Comparisons in sample preparations for test of homogeneity. In: McSweeney M, Marascuilo L A (Eds) *Non-Parametric and Distribution Free Methods the Social Science*, Books/Cole Publication, Belmont CA, 1977. p. 141-7.
- Liu P, Wang X, Li H. Preparation of carboxylated carbon nanotubes/polypyrrole composite hollow microspheres via chemical oxidative interfacial polymerization and their electrochemical performance. *Synthetic Metals* 2013; 181: 72-8. [CrossRef]
- Liu HK, Wang GX, Guo Z, Wang J, Konstantinov K. Nanomaterials for lithium-ion rechargeable batteries. *J Nanosci Nanotechnol* 2006; 6: 1-15. [CrossRef]

23. Khodakovskaya MV, de Silva K, Biris AS, Dervishi E, Villagarcia H. Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. *ACS Nano* 2012, 6: 2128-35. [\[CrossRef\]](#)
24. Wu Z, Mitra S. Fractionation of carboxylated carbon nanotubes and the corresponding variation in their colloidal behaviour. *Environ Sci Process Impacts* 2014; 16: 2295-300. [\[CrossRef\]](#)
25. Liu Z, Liu Y, Peng D. Carboxylation of multiwalled carbon nanotube attenuated the cytotoxicity by limiting the oxidative stress initiated cell membrane integrity damage, cell cycle arrestment, and death receptor mediated apoptotic pathway. *J Biomed Mater Res A* 2015; 103: 2770-7. [\[CrossRef\]](#)
26. Lin D, Xing B. Phytotoxicity of nano particles: inhibition of seed germination and root growth. *Environ Pollut* 2007; 150: 243-50. [\[CrossRef\]](#)
27. Tripathi S, Sarkar S. 2014. Influence of water soluble carbon dots on the growth of wheat plant. *Appl Nanosci* 2015; 5: 609-16. [\[CrossRef\]](#)
28. Sonkar SK, Roy M, Babar DG, Sarkar S. Water soluble carbon nano-onions from wood wool as growth promoters for gram plants. *Nanoscale* 2012, 4: 7670-5. [\[CrossRef\]](#)
29. Lahiani MH, Chen J, Irin F, Puzetzy AA, Green MJ, Khodakovskaya MV. Interaction of carbon nano horns with plants: uptake and biological effects. *Carbon* 2015; 81: 607-19. [\[CrossRef\]](#)
30. Anjum NA, Singh N, Singh MK, Sayeed I, Duarte AC, Pereira E, et al. Single-bilayer graphene oxide sheet impacts and underlying potential mechanism assessment in germinating faba bean (*Vicia faba* L.). *Sci Total Environ* 2014; 472: 834-41. [\[CrossRef\]](#)

Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Escherichia coli* İzolatlarının Biyofilm Oluşumu ve Antibiyotik Direnci Üzerine Etkisi

Association Between Antibiotic Resistance and Biofilm Formation of *Escherichia coli* Strains Isolated from Blood Culture

Hatice Nur Halipçi Topsakal¹ , Okan Aydoğan² , Sinem Özdemir² , Fatma Köksal Çakırlar² 

¹Department of Biology, Kahramanmaraş Sütçü İmam University, Kahramanmaraş, Turkey

²Department of Medical Microbiology, İstanbul Universtiy-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa School of Medicine, İstanbul, Turkey

Cite this article as: Halipçi Topsakal HN, Aydoğan O, Özdemir S, Köksal Çakırlar F. Association Between Antibiotic Resistance and Biofilm Formation of *Escherichia coli* Strains Isolated from Blood Culture. Experimed 2019; 9(2): 60-4.

ÖZ

Amaç: Kan dolaşımı enfeksiyonları (KDİ) morbidite ve mortalitenin önemli nedenlerindedir. *Escherichia coli* (*E. coli*), KDİ gibi çeşitli ve ciddi hastalıklara neden olmaktadır. *E. coli*'de çoklu ilaç direncinin ortaya çıkması küresel bir endişe haline gelmiştir. *E. coli*, farklı yüzeylere kolonize olma ve biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptir. Bu çalışmanın amacı kan kültürlerinden izole edilen *E. coli* izolatlarında biyofilm oluşumunun antibiyotik direnci ile ilişkisini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesinin yoğun bakım ve diğer servislerinde yatan bakteriyemili hastalardan laboratuvarımıza gönderilen kan kültürü örnekleri BACTEC 9120 kan kültür sistemi ile analiz edilmiştir. İzole edilen 62 *E. coli*'nin tanımlanması ve antimikrobiyal direnci, PHOENIX - Otomatik Bakteri İdentifikasyon ve Antibiyotik Duyarlılık Test Sistem ile belirlendi ve şüpheli dirençler E-Test ile doğrulanmıştır. Antibiyotik duyarlılıkları European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)'a ve Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI)'ye göre değerlendirilmiştir. Biyofilm oluşumu Congo red agar yöntemi ile tespit edilmiştir.

Bulgular: Altmış iki *E. coli* izolatının 42'sinde (%67,7) biyofilm oluşumu tespit edilmiştir. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üretiminin 38 (%61,2) ve karbapenemaz üretiminin 12 (%19,3) olduğu bulunmuştur. Biyofilm pozitif izolatların 28 (%66,6)'sı GSBL pozitif ve 10 (%23,8)'i karbapenemaz pozitif bulunmuştur. Dokuz izolat hem GSBL hem de karbapenemaz pozitif bulunmuştur. On izolat ise biyofilm, GSBL ve karbapenemaz üçü birlikte pozitif bulunmuştur.

Sonuç: Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesinde kan kültürlerinden izole edilen *E. coli* izolatlarında çeşitli antibiyotiklere karşı direnç oranları biyofilm pozitif suşlarda, negatif suşlara göre daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlarla biyofilm oluşturan izolatların antibiyotiklere karşı daha yüksek oranda direnç gösterdiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Escherichia coli*, biyofilm, GSBL, karbapenemaz, antibiyotik direnci, kan kültürü

ABSTRACT

Objective: Bloodstream infections (BSIs) appear to be important causes of morbidity and mortality. *Escherichia coli* (*E. coli*) causes various serious diseases such as BSIs. The emergence of multidrug resistance in *E. coli* has become a global concern. *E. coli* has the capability to colonize and survive on several surfaces in different time periods. This is achieved by adhering to inert and cellular substrates and forming a biofilm layer. The aim of this study is to investigate the relationship of biofilm formation to antibiotic resistance in *E. coli* isolates which are isolated from hemocultures.

Material and Method: *E. coli* strains were isolated from blood samples of patients with bacteremia who were hospitalized in intensive care units and in other departments of İstanbul University-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa School of Medicine Hospital. Blood cultures were analyzed with the Bactec 9120 system (Becton Dickinson, USA). The identification and antimicrobial resistance of 62 *E. coli* strains were determined by the Phoenix automated system (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD) according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and the Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Biofilm formation was determined by the Congo red agar method.

Results: Biofilm formation was detected in 42 (67.7%) of the sixty-two *E. coli* isolates. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) production was 38 (61.2%) and carbapenemase production was 12 (19.3%). 28 (66.6%) of the biofilm-positive isolates were ESBL-positives and 10 (23.8%) were carbapenemase-positives. Nine isolates were both ESBL and carbapenemase positives. Ten isolates were biofilm, ESBL and carbapenemase were positive at all.

Conclusion: Resistance rates against various antibiotics in *E. coli* strains isolated from blood cultures were found higher in biofilm positive strains than in negative strains at İstanbul University-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa School of Medicine Hospital.

Keywords: *Escherichia coli*, biofilm, ESBL, carbapenemase, antibiotic resistance, hemoculture

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Okan Aydoğan **E-mail:** okanaydogan4@gmail.com

Geliş Tarihi/Received Date: 03.06.2019 **Revision Date/Revizyon Tarihi:** 05.08.2019 **Kabul Tarihi/Accepted Date:** 16.08.2019



Content of this journal is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

GİRİŞ

Kan dolaşımı infeksiyonları tüm dünyada yüksek morbidite ve mortalite oranları ile önde gelen sağlık sorunlarından. *Escherichia coli* (*E. coli*), farklı çevrelere kolonize olma ve buralarda varlığını sürdürebilme yeteneğine sahiptir. Bunu biyofilm oluşturarak sağlamaktadır. Biyofilm üretimi ve biyofilm oluşumu patojenite faktörlerindedir. Biyofilm oluşumu mikroorganizmaları opsonofagositoz, antibakteriyellerden ve dezenfektanlardan koruyarak infeksiyon oluşumunu kolaylaştırır (1-6).

Escherichia coli normal barsak florasında yer alan bir bakteri türüdür. Çok sayıda suşunun zararsız olmasının yanı sıra bazı suşlarının ise ciddi zehirlenmelere ve ölümcül enfeksiyonlara yol açtığı bilinmektedir (3). Birçok *E. coli* serotipi bağırsaklarda kommensal bir yaşam sürer ve dışkıda 106-109 Kob/g düzeylerindedir. Diğer Enterobacteriaceae üyeleriyle birlikte bağırsaktaki zararlı mikroorganizmalara karşı bağırsağın ve vücudun immün sisteminin düzenlenmesinde rol oynar. *E. coli* suşlarının çoğu normal bağırsak florasında apatojen olmasına karşın, insan ve hayvanlardan çevreye yayılan *E. coli*'nin değişik vasıtalarla vücuda alınması halinde immün sistemi baskılanmış konaklarda veya bakterinin gastrointestinal bariyeri aşması halinde bu suşlar da infeksiyona neden olabilirler (4). Diğer gram-negatif bakterilerde olduğu gibi *E. coli*'de en sık saptanan direnç mekanizmaları; i) Antibiyotikleri parçalayan enzimlerin üretimi, ii) Antibiyotik bağlanma bölgelerinde mutasyon, iii) Antibiyotiğe geçirgenliğin azalması (dış membran proteinlerinde değişiklikler), iv) Eflüks pompasıdır (5). *E. coli*, farklı çevrelere kolonize olma ve buralarda varlığını sürdürebilme yeteneğine sahiptir. Bunu atıl ve hücresele substratlara yapışarak ve biyofilm oluşturarak sağlamaktadır. Biyofilm oluşumu patojenite faktörlerindedir. Mikroorganizmaları opsonofagositoz, antibakteriyellerden ve dezenfektanlardan koruyarak infeksiyon oluşumunu kolaylaştırır.

Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar (GSBL); sefalosporin grubundaki oksiminio-sefalosporinleri hidroliz edebilen ve genellikle klavulanik asit, sulbaktam veya tazobaktam gibi betalaktamaz inhibitörleri ile inhibe olan enzimlerdir. GSBL'ler *Klebsiella* spp. ve *E. coli* türlerinde daha sık olmakla birlikte, *Salmonella* spp. ve *Shigella flexneri*'nin de dahil olduğu enterik bakterilerde de bildirilmiştir (6).

E. coli ve *Klebsiella pneumoniae*'ya bağlı septisemi olgularında, GSBL ve karbapenemazların birlikte bulunmasının, hasta ölüm oranlarını daha da yükseltmesi bilinen bir gerçektir (7). Yoğun bir şekilde tercih edilen geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı ve sıklıkla önerilen karbapenem türevi antibiyotiklerin tüketimi karbapenem dirençli Enterobacteriaceae üyelerinin baskın hale gelmesine neden olmaktadır (7-14).

Yapılan çalışmalar, bu suşlarda yüksek oranda (%68-74) biyofilm oluşumuna da işaret etmektedir (15-17). Biyofilm tabaka; bakteriyel glikokaliks, Tamm-Horsfall proteini ve tuzlardan meydana gelen, ekstraselüler polimerlerden oluştuğu bilinen bir yapıdır. Bakterilerin yüzeye sıkıca tutunmalarına olanak

veren bu yapı aynı zamanda bakterilerin antiseptik ajanlardan ve vücudun savunma sisteminden korunmasını sağlar (18, 19). Biyofilmin büyük bir bölümünü oluşturan ekzopolisakkaritler (EPS) savunmada önemli rol oynayan moleküllerdir. Ekzopolisakkaritler bulunduğu bakteriyi enflamatuar hücrelerin fagositozundan ve antibiyotik etkisinden korurlar. Sistemin yapısına, mikroorganizmanın türüne ve çevresel faktörlere bağlı olarak olgun bir biyofilmin oluşması birkaç saat ile birkaç gün arasında değişmektedir (20).

Bu çalışmanın amacı kan kültürlerinden izole edilen *E. coli* izolatlarında biyofilm oluşumunun antibiyotik direnci ile ilişkisini araştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Kan Kültürü

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesinin yoğun bakım ve diğer servislerinde yatan bakteriyemili hastalardan laboratuvarımıza gönderilen kan kültürü BACTEC 9120 (Becton-Dickinson Diagnostic Instrument Systems, USA) otomasyon sistemi ile analiz edilmiştir. Takip edilen kan kültür şişelerinden "pozitif uyarı" verenlerden 62 *E. coli* izolatı Kanlı Agar, Çikolatamsı Agar ve Mac Conkey Agar besiyerlerine pasajları yapılmıştır. Bakteri morfolojisi yönünden Gram boyama ile değerlendirilmiştir. İzole edilen 62 *E. coli*'nin tanımlanması, PHOENIX - Otomatik Bakteri İdentifikasyon sistemi (BD Phoenix™ automated identification and susceptibility testing system) ile belirlenmiştir.

GSBL ve Karbapenemaz Oluşumu

Altmış iki *E. coli* izolatında genişlemiş spektrumlu beta laktamaz ve karbapenemaz üreten suşlar PHOENIX - Otomatik Bakteri İdentifikasyon ve Antibiyotik Duyarlılık Test Sistemi ile belirlenmiş ve şüpheli dirençler E-test® (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) ile doğrulanmıştır.

Biyofilm Oluşumu

Biyofilm oluşumu Kongo red agar yöntemiyle tespit edilmiştir (Şekil 1). Kongo red agar yönteminde; biyofilm oluşumu incelenecek bakterinin, içinde sukroz, beyin-kalp infüzyon buyyonu, kongo kırmızısı ve agar bulunan besiyerine tek koloni yöntemiyle ekimleri yapılır. 37°C'de 24 saat olacak şekilde uygulanan inkübasyon sonunda, kolonilerde oluşan renk değişimine göre değerlendirme yapılmaktadır. Siyah koyu kırmızı renkli koloni oluşumu görülen suşlar biyofilm üretimi açısından pozitif olarak, pembe-kırmızı renkli koloni oluşumu görülenler ise biyofilm üretimi açısından negatif suşlar olarak değerlendirilmektedir (21, 22).

E. coli'nin 24 saat ve 48 saat içerisindeki zon oluşturma durumlarına bakılmıştır. Zon oluşumu; pozitif ve negatif olarak değerlendirilmiştir.

Antimikrobiallere Karşı Dirençlerin Belirlenmesi

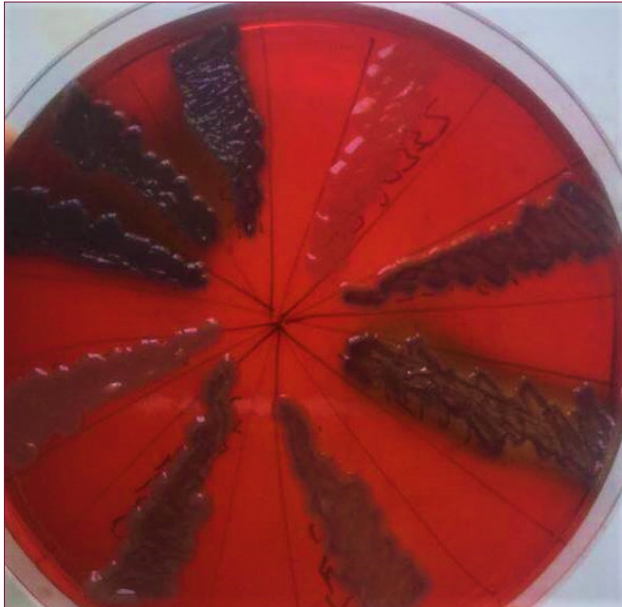
E. coli olarak identifiye edilen 62 suşun antimikrobiallere karşı dirençlerine bakılmıştır. Bu suşlarda Amikasin, Gentamisin, Netilmisin, İmipenem, Meropenem, Ertapenem, Sefepim, Sefotaksim, Seftazidim, Ampisilin, Piperasillin/Tazobaktam, Siprof-

loksasin, Trimetoprim-Sulfametoksazol duyarlılıkları PHOENIX - Otomatik Bakteri Identifikasyon ve Antibiyotik Duyarlılık Test Sistemi (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD) ile tespit edilmiştir. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)'a ve Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI)'ye göre değerlendirilmiştir (23, 24).

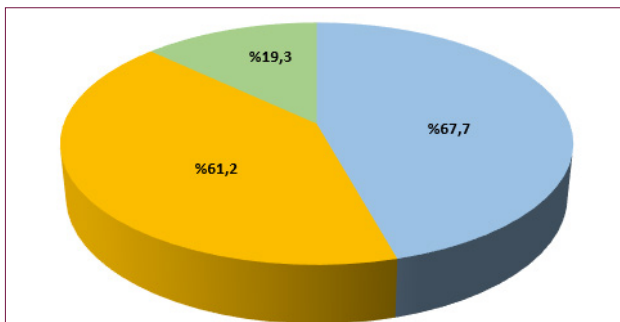
BULGULAR

Altmış iki *E. coli* izolatının 42'sinde (%67,7) biyofilm oluşumu tespit edilmiştir. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üretiminin 38 (%61,2) ve karbapenemaz üretiminin 12 (%19,3) olduğu bulunmuştur (Şekil 2). Biyofilm pozitif izolatların 28 (%66,6)'sı GSBL pozitif ve 10 (%23,8)'i karbapenemaz pozitif bulunmuştur. Dokuz izolat hem GSBL hem de karbapenemaz pozitif bulunmuştur. On izolat ise biyofilm, GSBL ve karbapenemaz üçü birlikte pozitif bulunmuştur.

Biyofilm oluşturan 42 izolatın antibiyotik direnç oranları sırasıyla amikasin için %25,2, gentamisin için %26, netilmisin



Şekil 1. Kongo red agarda biyofilm oluşumu



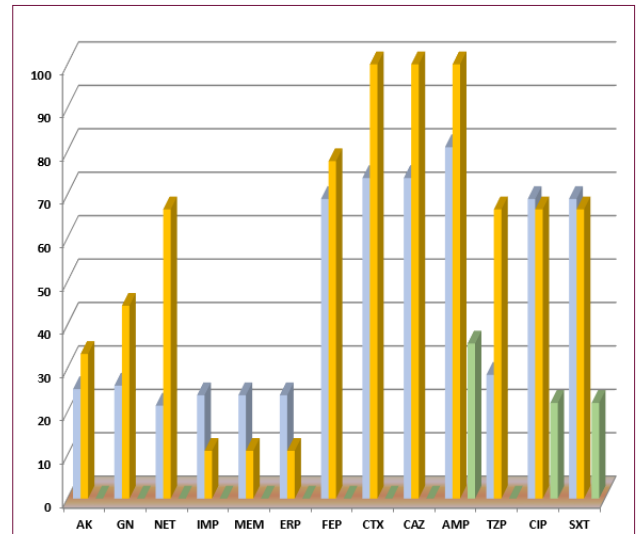
Şekil 2. *E. coli* izolatlarında biyofilm, GSBL ve karbapenemaz oluşumlarının dağılımı
Mavi: biyofilm oluşumu; Turuncu: GSBL oluşumu; Yeşil: karbapenemaz oluşumu

için %21,4, imipenem, meropenem, ertapenem için 23,8%, sefepim için %69, sefotaksim ve seftazidime için %73,8, ampisillin için %80,9, piperasillin/tazobaktam için %28,5, siprofloksasin için %69 ve trimetoprim+sulfametoksazol için %78,8 olarak belirlenmiştir. Tigesikline direnç tespit edilmemiştir.

Biyofilm, GSBL ve karbapenemaz negatif olan 9 izolat sadece %77,7 ampisilline, %22 siprofloksasine ve %22 trimetoprim+sulfametoksazole dirençli bulunmuştur (Şekil 3).

TARTIŞMA

Sepsis, şüpheli ya da doğrulanmış enfeksiyona karşı konağın sistemik inflamatuvar yanıtından kaynaklanan klinik tablodur. Sepsis klinik tanısının mikrobiyolojik doğrulamasında, kan kültürleri anahtar role sahiptir. Kültür sonrası pozitif sonuçlar elde edildiğinde, patojenin antimikrobiyal duyarlılığı belirlenir; rasyonel antibiyotik kullanımı sağlanır. Pozitif sonuçlar şüpheli sepsisin kanıta dayalı tanı ve tedavisini mümkün kılar (2). Sağlık hizmetleri ile ilişkili enfeksiyonlarda klinik önemi olan gram-negatif bakteriler; Enterobacteriaceae (özellikle *Klebsiella* türleri ve *Escherichia coli*), *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii*'dir. Bu bakterilerin yüksek düzeyde dirençli suşları dünyanın her yerinde dikkat çekici sıklıkta saptanmaktadır (4). Yapılan çalışmalar, *E. coli* ve *K. pneumoniae*'ya bağlı septisemi olgularında karbapenemaz varlığının, hastanın morbidite ve mortalitesini artıran sonuçlara neden olduğunu ve bu tip izolatlarda GSBL ve karbapenemazların birlikte bulunmasının, hasta ölüm oranlarını daha da yükselttiğini göstermektedir (7).



Şekil 3. *E. coli* izolatlarının antibakteriyel ajanlara direnç yüzdeliklerinin dağılımı

Mavi: biyofilm oluşumu; Turuncu: GSBL oluşumu; Yeşil: karbapenemaz oluşumu
AK (Amikasin), GN (Gentamisin), NET (Netilmisin), IMP (imipenem), MEM (Meropenem), ERP (Ertapenem), FEP (Sefepim), CTX (Sefotaksim), CAZ (Seftazidim), AMP (Ampisillin), TZP (Piperasillin/Tazobaktam), CIP (Siprofloksasin), SXT (Trimetoprim-Sulfametoksazol)

Gelecekte dünyada karbapenemaz üreten mikroorganizmalar ile iki büyük epidemi beklenmekte; bunlardan birinin toplum kaynaklı E. coli suşları, diğerinin ise hastane kaynaklı K. pneumoniae suşları ile gerçekleşmesi öngörülmektedir (9). Bu nedenle, karbapenemaz üreten mikroorganizmaların erken tanımlanması hastane salgınlarının önlenmesi açısından zorunludur. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde 2007-2009 yılları arasında SENTRY çalışması kapsamında 42 merkezden toplanan hastane infeksiyonu etkeni 2049 K. pneumoniae izolatında karbapenem direnci %6,1 olarak tespit edilmiştir (10). COMPACT çalışması kapsamında Türkiye'den dahil edilen 10 merkezden 2008 yılı içinde toplanan 240 Enterobacteriaceae izolatında doripenem, imipenem ve meropenem direnç oranları %1.3 olarak saptanırken, doripenem ve meropenem 0.12 µg/mL MİK90 değeri ile imipenemden (MİK90=0.5 µg/mL) dört kat daha aktif bulunmuştur (11, 12). Tüm bunlara dayanarak, yaygın olarak görülen ve çoklu ilaç direncine sahip Enterobacteriaceae ailesinin üyelerinin etkin bir nozokomiyal infeksiyon tedavi uygulaması için yapılan birçok yönteme karşı meydan okudukları bilinen bir gerçektir (13).

Artan direnç oranlarına kıyasla geliştirilen yeni bileşiklerin sayısı oldukça az ve kısıtlıdır. Planktonik bakterilerin antibiyotik direncinin yanı sıra hem konak immün sistemi hem de antimikrobiyal ajanlar açısından önemli bir bariyer olan biyofilm yapısının yol açtığı direnç, biyofilm enfeksiyonlarında tedaviyi daha da zor hale getirmektedir (25, 26). Yapılan çalışmalarla, biyofilmde yer alan mikroorganizmaların planktonik formlarına kıyasla antibiyotiklere 100 ila 1000 kat arasında daha dirençli olduğu gösterilmiştir. Öyle ki dezenfektanların etkinliği açısından bakıldığında da aynı şekilde biyofilm yapısı içerisinde bakterilerin dezenfektanlara karşı 10-100 kat daha dirençli olabildikleri saptanmıştır (27, 28).

GSBL aracılı direncin plazmidler aracılığıyla türler arasında aktarıldığı, hastanelerde salgınlar oluşturduğu ve mortalite oranlarını arttırdığı bilinmektedir. GSBL direncini bakteriler arasında taşıyan plazmidler, çoğunlukla diğer antibiyotiklere karşı direnci de taşımaktadır (14). GSBL'ler, özellikle Klebsiella türleri, E. coli ve Proteus mirabilis olmak üzere; Enterobacteriaceae ailesi gram-negatif basillerde saptanır. Ancak, Citrobacter freundii, Morganella morganii, Pseudomonas aeruginosa, Serratia marcescens ve Enterobacter spp. gibi diğer gram-negatif bakterilerde de saptanmıştır.

Biyofilm, canlı veya cansız bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri polisakkarid bir matriks içine gömülü halde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluktur. Değişik mikrobiyal türlerin, kendilerini çevresel etkenlerden korumak ve besin kaynağını daha verimli kullanmak için oluşturdukları mikro-ekosistem olarak da tanımlanırlar (15). Biyofilmler; kateterler, eklem ve kalp protezleri gibi kalıcı ya da kalıcı olmayan tıbbi araçları veya kistik fibrozis gibi bazı hastalıklarda solunum yollarını kolonize eden bakterilerin oluşturduğu bir mikroorganizma topluluğudur (20, 29). Tüm bu bilgilerle aynı doğrultuda; E. coli izolatlarında ortaya çıkarılan bulgular sonucunda, patojeniteyi arttıran biyofilm oluşumunun bakteride GSBL

üretme oranını arttırdığı ve direnç mekanizmasıyla birebir ilişkili olduğu saptanmıştır.

GSBL-pozitif mikroorganizmalarla meydana gelen infeksiyonların tedavisi günümüzde çok ciddi sağlık sorunlarından birini oluşturmaktadır. Etkili kabul edilen antibiyotiklerin koruyucu dozları bu mikroorganizmaları kontrol ettiği halde biyofilmi etkileyemez. Tıbbi cihazlar üzerinde gelişen kalıcı biyofilmler sürekli bir infeksiyon odağı oluşturarak infeksiyonun hematogen yolla yayılımı açısından da her zaman bir risk kaynağı oluşturabilmektedir.

Çalışmada kan kültürlerinden izole edilen GSBL oluşturan E. coli izolatların %73,6 (28/38)'sı biyofilm oluşturmaktadır. Biyofilm oluşturan E. coli izolatlarında antibiyotik direnç oranları biyofilm pozitif suşlarda, negatif suşlara oranla daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlarla biyofilm oluşturan izolatların değişen oranlarda GSBL ve karbapenemaz oluşturduğu ve antibiyotiklere daha yüksek oranda direnç gösterdiği tespit edilmiştir.

Etik Komite Onayı: Yazarlar çalışmanın World Medical Association Declaration of Helsinki "Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects", (amended in October 2013) ilkelerine uygun olarak yapıldığını beyan etmişlerdir.

Hasta Onamı: Yazılı hasta onamı çalışmaya katılan hastalardan alınmıştır.

Yazar Katkıları: Fikir - H.N.H.T., O.A., S.Ö., F.K.Ç.; Tasarım - H.N.H.T., O.A., S.Ö., F.K.Ç.; Denetleme - F.K.Ç.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - O.A., S.Ö.; Analiz ve/veya Yorum - O.A., S.Ö.; Literatür Taraması - H.N.H.T., F.K.Ç.; Yazıyı Yazan - H.N.H.T., O.A., F.K.Ç.; Eleştirel İnceleme - O.A., F.K.Ç.

Çıkar Çatışması: Yazarların beyan edecek çıkar çatışması yoktur.

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

Ethics Committee Approval: The authors declared that the research was conducted according to the principles of the World Medical Association Declaration of Helsinki "Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects", (amended in October 2013).

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

Author Contributions: Concept - H.N.H.T., O.A., S.Ö., F.K.Ç.; Design - H.N.H.T., O.A., S.Ö., F.K.Ç.; Supervision - F.K.Ç.; Data Collection and/or Processing - O.A., S.Ö.; Analysis and/or Interpretation - O.A., S.Ö.; Literature Search - H.N.H.T., F.K.Ç.; Writing Manuscript - H.N.H.T., O.A., F.K.Ç.; Critical Review - O.A., F.K.Ç.

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. Aygün, G. Sepsis tanısı. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Sempozyum Dizisi 2006; 51: 51-60.
2. Karakoç, AE. Güncel Rehberler Işığında Sepsis, Klasik ve Hızlı Tanı Yöntemleri Ulusal Hemokültür Rehberi, Ankem 2014; 28 (Ek 2): 46-51.
3. Erol İ. Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi. 1. Baskı, Ankara: Pozitif Matbaacılık 2007, p. 392-3.
4. Meng J, Schroeder CM. Escherichia coli in Foodborne Diseases. editors. Simjee, S. New Jersey Humana Press 2007, p.1-16. [CrossRef]
5. Beşirbellioğlu, B. Dirençli Gram-Negatif Bakteri Sorunu. Yoğun Bakım Dergisi (Online) 2010. Available from: http://www.yogunbakimdergisi.org/managete/fu_folder/2010-04/html/2010-9-4-173-181.htm
6. Gür D. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar. Ulusoy S. (Editör). Beta-laktamazlar ve Klinik Önemi. 1. Baskı. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi 2005, p. 70-88.
7. Gupta V, Bansal N, Singla N, Chander J. Occurrence and phenotypic detection of class A carbapenemases among Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae blood isolates at a tertiary care center. J Microbiol Immunol Infect 2013; 46: 104-8. [CrossRef]
8. DOH 420-097. Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. Reporting and Surveillance Guidelines. Washington State Department of Health. Last Revised: April 2015 10s.
9. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis 2011; 17: 1791-8. [CrossRef]
10. Kaiser DM, Castanheira M, Jones RN, Tenover F, Lynfield R. Trends in Klebsiella pneumoniae carbapenemase-positive K.pneumoniae in US hospitals: report from the 2007-2009 SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Diagn Microbiol Infect Dis 2013; 76: 356-60. [CrossRef]
11. Leblebicioğlu H, Cakir N, Celen M, Kurt H, Baris H, Laeuffer J; Turkish COMPACT Study Group. Comparative activity of carbapenem testing (the COMPACT study) in Turkey. BMC Infect Dis 2012; 12: 42-50. [CrossRef]
12. Esen Ş. GSBL ve IBL yapan enterik bakteriler; klinik önemi, tedavi. ANKEM Derg 2008; 22(Ek2): 28-35.
13. Tang HJ, Ku YH, Lee MF, Chuang YC, Yu WL. In Vitro Activity of Imipenem and Colistin against a Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae Isolate Coproducing SHV-31, CMY-2, and DHA-1. BioMed Res Int 2015; <http://dx.doi.org/10.1155/2015/568079>. [CrossRef]
14. Demir N. Gram negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üretimine katkıda bulunan çeşitli risk faktörlerinin araştırılması. Uzmanlık Tezi, Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği 2006.
15. Ives BR, Tohumoğlu E, Atike G, Koçak NC, Taş Ö, Bağcaz DS. Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Oluşturan Escherichia Coli Suşlarında İki Farklı Yöntemle Biyofilm Araştırılması 2011. Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Sempozyumu 2011; 13: 6-13.
16. Beloin C, Roux A, Ghigo JM. Escherichia coli biofilms. Curr Top Microbiol Immunol 2008; 322: 249-89. [CrossRef]
17. Sharma G, Sharma S, Sharma P, Chandola D, Dang S, Gupta S, et al. Escherichia coli biofilm: development and therapeutic strategies. J Appl Microbiol 2016; 121: 309-19. [CrossRef]
18. Darouiche RO. Device-associated infections; a macroproblem that starts with microadherence. Clin Infect Dis 2001; 33: 1567-72. [CrossRef]
19. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms; survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev 2002; 15: 167-93. [CrossRef]
20. Olson ME, Ceri H, Douglas WM, Buret AG, Read RR. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. Can J Vet Res 2002; 66: 86-92.
21. Atshan SS, Shamsudin MN, Lung LT, Sekawi Z, Ghaznavi-Rad E, Pei CP. Comparative characterisation of genotypically different clones of MRSA in the production of biofilms. J Biomed Biotechnol 2012; <https://doi.org/10.1155/2012/417247> [CrossRef]
22. Kart Yasar K, Aybar Bilir Y, Pehlivanoglu F, Sengoz G. Stafilokok suşlarında slaym faktör pozitifliği, metisilin ve antibiyotik direnci. ANKEM Derg 2011; 25: 89-93. [CrossRef]
23. Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 20th Informational Supplement. CLSI document M100-S20. CLSI, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute, 2011.
24. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.1, valid from 2018-05-15 [Internet]. Basel, Switzerland: EUCAST [erişim 1 Haziran 2018]. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_8.1_Breakpoint_Tables.pdf.
25. Römling U, Balsalobre C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. J Intern Med 2012; 272: 541-61. [CrossRef]
26. de la Fuente-Núñez C, Reffuveille F, Fernández L, Hancock REW. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: Antibiotic resistance and new therapeutic strategies. Curr Opin Microbiol 2013; 16: 580-9. [CrossRef]
27. Omar A, Wright J, Schultz G, Burrell R, Nadworny P. Microbial biofilms and chronic wounds. Microorganisms 2017; 5: 9. [CrossRef]
28. Russell AD. Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon. J Hosp Infect 2004; 57: 97-104. [CrossRef]
29. Dumaru R, Baral R, Shrestha BR. Study of biofilm formation and antibiotic resistance pattern of gram-negative Bacilli among the clinical isolates at BPKIHS, Dharan. BMC Res Notes 2019; 12: 38. [CrossRef]

Association of Neopterin and Wound Healing Process

Neopterin ve Yara İyileşme Süreci İlişkisi

Ceylan Hepokur¹ , Sema Mısır¹ , Ali İhsan Hepokur² , İlhan Yaylım³ 

¹Department of Basic Pharmaceutical Sciences, Division of Biochemistry, Sivas Cumhuriyet University School of Pharmacy, Sivas, Turkey

²Sivas Numune Hospital, Sivas, Turkey

³Department of Molecular Medicine, İstanbul University Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine, İstanbul, Turkey

Cite this article as: Hepokur C, Mısır S, Hepokur Aİ, Yaylım İ. Association of Neopterin and Wound Healing Process. Experimed 2019; 9(2): 65-8.

ABSTRACT

Human monocytes/macrophages produce neopterin when stimulated by the cytokine interferon- γ . The concentration of neopterin in body fluids such as serum, cerebrospinal fluid and urine can be measured and increased concentrations of neopterin provides information about infections states. Nowadays, neopterin is as a marker in neurological and cardiovascular diseases during cellular immune activation.

Keywords: Antioxidant, immune system activation, neopterin, wound healing

INTRODUCTION

Neopterin is a derivative of pyrazine-pyrimidine, 2-amino-4-hydroxy-6-(D-erythro-1',2',3'-trihydroxypropyl)-pteridine, and is synthesized from guanosine triphosphate (GTP) through the reaction catalyzed by GTP cyclohydrolase I (GTPCH, EC.3.5.4.16) enzyme (1-8). The biosynthesis of neopterin is shown in Figure 1. Monocyte-derived macrophages and dendritic cells produce neopterin, which is known as an indicator of immune activation (9-18).

Neopterin is also produced in cell types such as human endothelial cells and B-lymphocytes (19). Neopterin is a stable molecule, relatively polar, *molecular sizes* 253 Da, which is inert in human body and its half-life ($t_{1/2}$) is only affected by renal elimination (20).

Neopterin was first isolated in 1967 from human urine. In 1979, Wachter et al. have shown that neopterin found in the urine of cancer patients is one of the molecules responsible for fluorescence (19). Thus, it is possible to easily determine the concentration of neopterin at certain wavelengths. Neopterin can be detected in the majority of body fluids such as blood, urine, and cerebrospinal fluid (1). Increased neop-

ÖZ

İnsan monositleri/makrofajları, sitokin interferon- γ tarafından uyarıldığında neopterin üretir. Serum, beyin omurilik sıvısı ve idrar gibi vücut sıvılarında neopterin konsantrasyonu ölçülebilir ve artan neopterin konsantrasyonları enfeksiyon durumları hakkında bilgi sağlar. Günümüzde neopterin, hücrel immün aktivasyonu sırasındaki nörolojik ve kardiyovasküler hastalıklarda bir belirteç olarak kullanılır.

Anahtar Kelimeler: Neopterin, yara iyileşmesi, antioksidan, immün sistem aktivasyonu

terin concentration is related to different diseases including immune disorders, inflammation, and coronary artery diseases, and associated with strong monocyte macrophage activity (21). In different studies it has been observed that the neopterin level of were increased (22-26). Moreover, it was reported that the increase of neopterin level are related to endothelial damage, organ dysfunction, rheumatoid arthritis, and coronary artery disease (27-29).

It is suggested that using neopterin as the diagnostic and prognostic criteria for macrophage and immune activation because of neopterin is detected in blood, cerebrospinal fluid, and urine (30-33). Moreover, it was reported that increased level of neopterin serum was used as a biomarker in the diagnosis of acute atherothrombotic plaque inflammation and coronary artery disease (34). Neopterin excretion begins before the onset of clinical symptoms and the level is used as an indicator of the clinical severity of the disease (31). It was reported that neopterin levels may be useful in determining the grade of the disease, and in assessing therapeutic response (35).

It is thought that there is a relationship between the wound healing process and neopterin, because the high neopterin

Corresponding Author/Sorumlu Yazar: Ceylan Hepokur **E-mail:** cozsoya@gmail.com

Received Date/Geliş Tarihi: 20.07.2019 **Revision Date/Revizyon Tarihi:** 05.08.2019 **Accepted Date/Kabul Tarihi:** 15.08.2019



Content of this journal is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

level indicates the presence of inflammation. Wound healing is the repair process occurring after a trauma or surgical procedure. Wound healing consists of inflammation, proliferation, matrix deposition, and remodeling phases. Wound healing is the repair process occurring after a trauma or surgical procedure. Wound healing includes coagulation, inflammation, granulation tissue formation, epithelization, neovascularization collagen synthesis and remodeling phases. Vasoconstriction occurs in the early stages of injury, in the first twenty minutes, followed by the development of vasodilation via serotonin, histamine, and prostaglandins. The factors released from platelets, the products formed in the coagulation chain, and the factors inflicted as a result of necrosis resulting from tissue damage change the endothelial permeability in the vicinity of the wound. Alteration of endothelial permeability causes the passage of plasma into the extravascular space, which is manifested by generalized edema. Primary suture applied surgical incisions also fills the wound with the clot and creates endurance in the wound. When the clot is dehydrat-

ed, the wound turns into a scab, which protect the wound from infection and prevent secondary bleeding. The first cell of inflammation is neutrophils which come from leukocytes through blood circulation first in clotting (35-37). Neutrophils reach its peak intensity at 24 and 48 h (27,30), and work in the defense system to remove cell destruction products, bacteria and other foreign bodies entering the body (38). In addition, reactive oxygen species are released from neutrophils granules with proteases such as gelatinase, elastase, collagenase. If there is no infection in the wound, neutrophils decrease rapidly after the 3rd day of the wound. Neutrophils complete their tasks leave that area with macrophages (39). Macrophages that come to the wound area are involved in wound healing by proinflammatory peptides such as interleukin-1 (IL-1) and interleukin-8 (IL-8) and release of tumor necrosis factor (TNF). The major cytokines released by macrophages are TNF- α , PDGF, IGF-1, TGF- β and IL-1. These cytokines rapid the wound healing process. Wound repair is initiated by clotting and neutrophils and continued by macrophages (4).

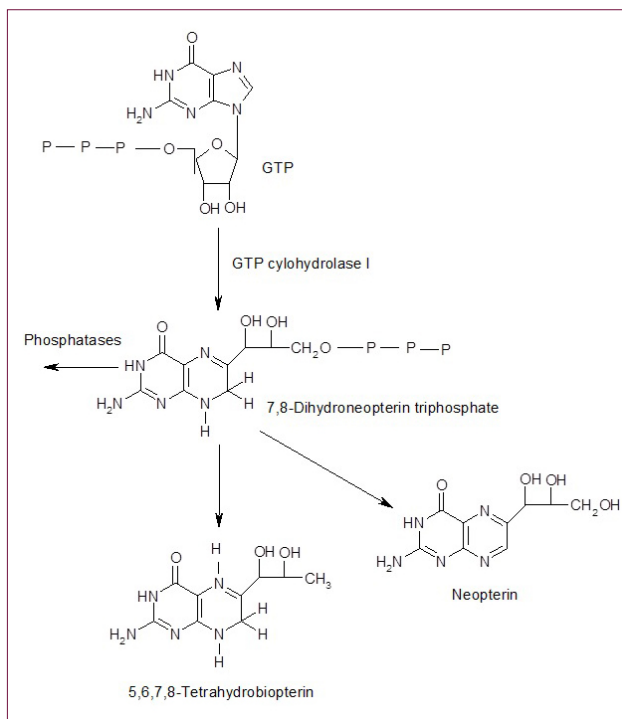


Figure 1. The biosynthesis of neopterin

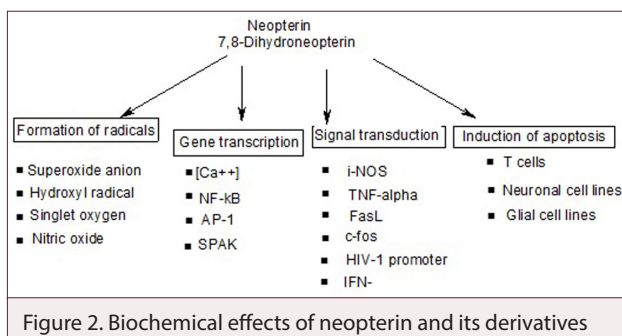


Figure 2. Biochemical effects of neopterin and its derivatives

Maximal stimulation of macrophages in infected wounds can cause scar tissue formation. Macrophages involved in wound healing cause an increase in neopterin level. Neopterin is important in immune dysfunction as well as oxidative stress. Oxidative stress is known to act an important role in the pathogenesis of autoimmune, chronic diseases and cancer (9). Neopterin oxidation shows accelerator (pro-oxidant) property and leads to an increase in reactive oxygen species (40). It was also found that neopterin inhibited the activity of xanthine oxidase and NADPH-oxidase. Therefore, neopterin is directly associated with oxidative stress (26). The biochemical effects of neopterin and their derivatives are shown in Figure 2

In order to prevent the formation of reactive oxygen species and their damage, many defense mechanisms, which is called antioxidant defense systems have been developed in the body.

Antioxidants protect cells against the unwanted effects of free radical reactions, both directly and indirectly. Increased oxidative stress caused by disruption of antioxidant and oxidant balance causes cell damage and this damage affects the healing process. As a result of inflammation that occurs in the wound area, endothelial cells create superoxide radical (O⁻) and H₂O₂. Free radicals and oxidants delay the wound healing process. The presence of high level of ROS indicates that there is a strong inflammation in the wound and the presence of oxidative stress. The maximum amount of ROS in wound healing is in the inflammatory phase. Therefore, ROS should be prevented in the wound area (41).

CONCLUSION

As a result, neopterin increases in viral and bacterial infections, transplantation complications, some malignant diseases, burns, wound sites and autoimmune diseases related to immune activation. Neopterin may be useful in determining the degree of these diseases. Although it is clear that neopterin is of interest to researchers in recent years, further studies are needed on neopterin and wound healing.

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

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

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

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

REFERENCES

1. Mahmoud RA, El-Gendi HI, Ahmed HH. Serum neopterin, tumor necrosis factor- α and soluble tumor necrosis factor receptor II (p75) levels and disease activity in Egyptian female patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Biochem* 2005; 38: 134-41. [CrossRef]
2. Shady MMA, Fathy HA, Ali A, Youness ER, Fathy GA. Association of neopterin as a marker of immune system activation and juvenile rheumatoid arthritis activity. *J Pediatr* 2015; 91: 352-7. [CrossRef]
3. Krcmova L, Solichova D, Melichar B, Kasparova M, Plisek J, Sobotka L, et al. Determination of neopterin, kynurenine, tryptophan and creatinine in human serum by high throughput HPLC. *Talanta* 2011; 85: 1466-71. [CrossRef]
4. Zhao Ars H, Yin S, Fan J. High plasma neopterin levels in Chinese children with autism spectrum disorders. *Int J Devl Neuroscience* 2015; 41: 92-7. [CrossRef]
5. Garcia-Gonzalez MJ, Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P. Light -Dark variations in neopterin serum levels in patients with st-segment elevation acute coronary syndrome undergoing primary angioplasty. *Rev Esp Cardiol* 2008; 61: 1280-6. [CrossRef]
6. Ursavaş A, Karadağ M, Oral AY, Demirdogen E, Oral HB, Ege E. Association between serum neopterin, obesity and daytime sleepiness in patients with obstructive sleep apnea. *Respir Med* 2008; 102: 1193-7. [CrossRef]
7. Arshadi D, Nikbin B, Shakiba Y, Kiani A, Jamshidi AR, Boroushaki MT. Plasma level of neopterin as a marker of disease activity in treated rheumatoid arthritis patients: Association with gender, disease activity and anti-CCP antibody. *Int Immunopharmacol* 2013; 17: 763-7. [CrossRef]
8. Ercan N, Tuzcu N, Başbuğ O, Gök K, Işdan H, Oğrak YZ. Evaluation of important biomarkers in healthy cattle. *Kafkas Univ Vet Fak Dergisi* 2014; 20: 749-55. [CrossRef]
9. Schroecksadel K, Frick B, Winkler C, Fuith Lothar C, Fuchs D. Relationship between homocysteine and neopterin concentrations in patients with gynecological cancer. *Cancer Lett* 2006; 240: 198-202. [CrossRef]
10. Sipahi H, Becker K, Gostner JM, Charehsaz M, Kirmızibekmez H, Schennach H, et al. Effects of globularifolin on cell survival, nuclear factor- κ B activity, neopterin production, tryptophan breakdown and free radicals in vitro. *Fitoterapia* 2014; 92: 85-92. [CrossRef]
11. Kaski JC, Consuegra-Sanchez L, Fernandez-Berges DJ, Cruz-Fernandez JM, Garcia-Moll X, Marrugat J, et al. Elevated serum neopterin levels and adverse cardiac events at 6 months follow-up in mediterranean patients with non-ST- segment elevation acute coronary syndrome. *Atherosclerosis* 2008; 201: 176-83. [CrossRef]
12. Frick B, Schroecksadel K, Neurauter G, Leblhuber F, Fuchs D. Increasing production of homocysteine and neopterin and degradation of tryptophan with older age. *Clin Biochem* 2004; 37: 684-7. [CrossRef]
13. Akbulut HH, Çelik I, Akbulut A, Yuce P, Kiliç SS. Serum neopterin levels in patients with brucellosis. *J Infect* 2005; 51: 281-6. [CrossRef]
14. Prat C, Dominguez J, Andreo F, Blanco S, Pallares A, Cuchillo F, et al. Procalcitonin and neopterin correlation with aetiology and severity of pneumonia. *J Infect* 2006; 52: 169-77. [CrossRef]
15. Pınar O, Özgür AE, Esragul A, Halil Y, Gulcan KY, Ayşe E, et al. High serum levels of neopterin in patients with Crimenga-Congo hemorrhagic fever and its relation with mortality. *J Infect* 2008; 56: 366-70. [CrossRef]
16. Stoeck K, Zerr I. Cellular immune activation markers neopterin and beta 2-microglobulin are elevated in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neuroimmunol* 2011; 233: 228-32. [CrossRef]
17. Volgger B, Aspırsirengil C, Genser-Krimbacher E, Ciresa-Koenig A, Daxenbichler G, Fuchs D, et al. Prognostic significance of TPA versus SCC-Ag, CEA and neopterin in carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Lett* 2008; 262: 183-9. [CrossRef]
18. Köse O, Arca E, Akgül O, Erbil K. The levels of serum neopterin in Behçet's disease-objective marker of disease activity. *J Dermatol Sci* 2006; 42: 128-30. [CrossRef]
19. Sucher R, Schroecksadel K, Weiss G, Margreiter R, Fuchs D, Brandacher G. Neopterin, a prognostic marker in human malignancies. *Cancer Lett* 2010; 287: 13-22. [CrossRef]
20. Ciprandi G, Amici M, Marseglia G, Fuchs D. Sublingual immunotherapy may affect serum neopterin: preliminary findings. *Int Immunopharmacol* 2010; 10: 1474-6. [CrossRef]
21. Cesur S, Aslan T, Hoca NT, Çimen F, Tarhan G, Çiftçi A, et al. Clinical importance of serum neopterin level in patients with pulmonary tuberculosis. *Int J Mycobacteriol* 2014; 3: 5-8. [CrossRef]
22. Castro M, Marco G, Arita D, Teixeira L, Pereira A, Casarini D. Urinary neopterin quantification by reverse-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Biochem Biophys Methods* 2004; 59: 275-83. [CrossRef]
23. Firth CA, Laing AD, Baird SK, Pearson J, Gieseg SP. Inflammatory sites as a source of plasma neopterin: Measurement of high levels of neopterin and markers of oxidative stress in pus drained from human abscesses. *Clin Biochem* 2008; 41: 1078-83. [CrossRef]
24. Cano O, Neurauter G, Fuchs D, Shearer G, Boasso A. Different effect of type I and II interferons on neopterin production and amino acid metabolism in human astrocyte-derived cells. *Neurosci Lett* 2008; 438: 22-5. [CrossRef]
25. Baydar T, Yüksel O, Sahin TT, Dikmen K, Girgin G, Sipahi H, et al. Neopterin as a prognostic biomarker in intensive care unit patients. *J Crit Care* 2009; 24: 318-21. [CrossRef]
26. Flavall E, Crone E, Moore G, Gieseg S. Dissociation of neopterin and 7,8-dihydroneopterin from plasma components before HPLC analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008; 863: 167-71. [CrossRef]
27. Mommsen P, Frink M, Pape HC, Van Griensven M, Probst C, Gaulke R, et al. Elevated systemic IL-18 and neopterin levels are associated with posttraumatic complications among patients with multiple injuries: a prospective cohort study. *Injury* 2009; 40: 528-34. [CrossRef]

28. Alber HF, Duftner C, Wanitschek M, Dörler J, Schirmer M, Suesenbacher A, et al. Neopterin, CD4+CD28- lymphocytes and the extent and severity of coronary artery disease. *Int J Cardiol* 2009; 135: 27-35. [\[CrossRef\]](#)
29. Lyu Y, Jiang X, Dai W. The roles of a novel inflammatory neopterin in subjects with coronary atherosclerotic heart disease. *Int Immunopharmacol* 2015; 24: 169-72. [\[CrossRef\]](#)
30. Kuehne LK, Reiber H, Bechter K, Hagberg L, Fuchs D. Cerebrospinal fluid neopterin is brain-derived and not associated with blood-CSF barrier dysfunction in non-inflammatory affective and schizophrenic spectrum disorders. *J Psychiatr Res* 2013; 47: 1417-22. [\[CrossRef\]](#)
31. Yaman H, Cakir E, Ozcan O, Yesilova Z, Ozcan A, Akgul EO, et al. Elevated urine neopterin levels in nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Biochem* 2005; 38: 187-90. [\[CrossRef\]](#)
32. Mehta P, Bruce A, Patrick B, Dalton AJ, Patel B, Mehta SP, et al. Increased serum neopterin levels in adults with Down syndrome. *J Neuroimmunol* 2005; 164: 129-33. [\[CrossRef\]](#)
33. Ishikawa T, Hamel M, Zhu B, Li D, Michiue D, Maeda H. Comparative evaluation of postmortem serum concentrations of neopterin and C-reactive protein. *Forensic Sci Int* 2008; 179: 135-43. [\[CrossRef\]](#)
34. Sun Y, He J, Tian J, Xie Z, Wang C, Yu B. Association of circulating levels of neopterin with non-culprit plaque vulnerability in CAD patients an angiogram, optical coherent tomography and intravascular ultrasound study. *Atherosclerosis* 2015; 241: 138-42. [\[CrossRef\]](#)
35. Frick B, Schroecksadel K, Neurauter G, Leblhuber F, Fuchs D. Increasing production of homocysteine and neopterin and degradation of tryptophan with older age. *Clin Biochem* 2004; 37: 684-7. [\[CrossRef\]](#)
36. Bayram M, Bayram O, Boyunağa H, Ozer G. A research on the level of urine neopterin to see if it may provide a vital clue for a provisional diagnosis of breast cancer in menopausal women. *Maturitas* 2004; 48: 432-7. [\[CrossRef\]](#)
37. Centi S, Tombelli S, Puntoni M, Domenici C, Franek M, Palchetti I. Detection of biomarkers for inflammatory diseases yan electrochemical immunoassay: The case of neopterin. *Talanta* 2015; 134: 48-53. [\[CrossRef\]](#)
38. Sugioka K, Naruko T, Hozumi T, Nakagawa M, Kitabayashi C, Ikura Y, et al. Elevated levels of neopterin are associated with carotid plaques with complex morphology in patients with stable angina pectoris. *Atherosclerosis* 2010; 208: 524-30. [\[CrossRef\]](#)
39. Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Avanzas P, Laynez-Cerdeña I, Carlos Kaski J. Neopterin predicts left ventricular remodeling in patients with ST-segment elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention. *Atherosclerosis* 2010; 211: 574-8. [\[CrossRef\]](#)
40. Razumovitch J, Fuchs D, Semenkova G, Cherenkevich S. Influence of neopterin on generation of reactive species by myeloperoxidase in human neutrophils. *Biochimica et Biophysica Acta* 2004; 1672: 46-50. [\[CrossRef\]](#)
41. Schulz KF, Altman DG, Moher D. Consort 2010 statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 2011; 136: e26 [\[CrossRef\]](#)

Hücre Dışı DNA ve Genometastaz

Cell Free DNA and Genometastasis

Cemal Çağıl Koçana* , Selin Fulya Toprak* , Büşra Yaşa , Hilal Hekimoğlu ,
Selçuk Sözer Tokdemir 

İstanbul Üniversitesi Aziz Sançar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Cite this article as: Koçana CÇ, Toprak SF, Yaşa B, Hekimoğlu H, Tokdemir SS. Cell Free DNA and Genometastasis. Experimed 2019; 9(2): 69-74.

ÖZ

1948 yılında, kan plazmasında Mandel ve Metais tarafından keşfedilen hücre dışı DNA'lar (hdDNA), tüm biyolojik sıvılar ve hücre kültür medyasında var olduğu bilinen kısa DNA parçalarıdır. Bu hdDNA'lar ağırlıklı olarak endojen kökenli olup lipid ve protein içeren komplekslerde veya membranlı partiküllerin içinde bulunabilirler. Sağlıklı bireylerde periferik dolaşımda, mono-nükleozomlar şeklinde az miktarda hdDNA bulunur. hdDNA, hücre yüzeylerindeki bağlayıcı proteinlere veya fosfolipitlere tutunabilir. Bu mekanizma hdDNA Emilimi veya salınımıyla ilişkilendirilebilir. Deoksiribonükleaz (DNaz) gibi enzimler aracılığıyla hücreye tutunmuş olan hdDNA'ların yüzeyden ayırıp sirkülasyona geri salınımı sağlanabilir.

Kanda serbest halde dolaşan hdDNA'nın keşfedilmesi ile farklı klinik alanlarda tanı amaçlı kullanımlarına ilişkin çalışmalar da başlamıştır. Özellikle prenatal tanı, anne dolaşımında bulunan fetüse ait hdDNA analizleri halihazırda uygulanmaktadır. Bunun yanında, kanser, organ nakli, otoimmün hastalıklar, travma, miyokardiyal infarktüs ve sepsis gibi diğer klinik alanlar için de kullanılabildiği bilinmektedir. hdDNA analizi, çeşitli patolojiler ve spesifik fizyolojik durumların araştırılması ve tanısında yararlı görülse de, fragman boyutları dahil olmak üzere, kökenleri ve doğası hakkında kesin bir bilgi yoktur.

Bu derlemede, muhtemel hdDNA orijini hakkında literatür bilgileri bir araya getirilerek bir sentez oluşturulmaya çalışılmış bunun yanında genomestastazdaki rolü de irdelenmiştir. Son yıllarda hızla artan tanı amaçlı kullanımına özellikle de prenatal tanıdaki avantajları ele alınmıştır.

Anahtar Kelimeler: Hücre dışı DNA, Genometastaz, Hücre dışı fetal DNA

GİRİŞ

1948 yılında, kan plazmasında Mandel ve Metais tarafından keşfedilen hücre dışı DNA'lar (hdDNA), tüm biyolojik sıvılarda ve hücre kültür medyasında var olduğu bilinen kısa DNA parçalarıdır (1). Bu hdDNA'lar ağırlıklı olarak endojen kökenli olup lipid ve protein içeren komplekslerde veya membranlı partiküllerin içinde bulunabilirler (2).

ABSTRACT

Cell free DNAs (cfDNA) are short DNA fragments which are present in all biological fluids and cell culture medium. They were first detected in blood plasma by Mandel and Metais in 1948. cfDNAs are mostly endogenous-derived fragments that are determined in lipid/protein rich complexes or particles with membranes. In healthy individuals, there are small amounts of mono-nucleosome forms of cfDNA in the peripheral circulation. cfDNA can bind to proteins and phospholipids on cell surfaces. This mechanism may related to absorbance and release of cfDNA. Different enzymes such as deoxyribonuclease (DNase) may facilitate the unbounding and recirculation of membrane bound cfDNAs.

The investigation of cfDNA that circulates freely in the blood initiated its application in clinical research including diagnosis. Especially, cfDNA in mother's blood, which originated in fetus, has been in widely used in prenatal diagnosis already. Moreover, cfDNA has been applied in much clinical research, including cancer, organ transplantation, auto-immune diseases, trauma, myocardial infarcts, and sepsis. Although it is extremely useful to analyze cfDNA for certain pathologies and physiological conditions, there is no definite information about their fragment dimensions, origins nor their character.

In this review, the possible origins of cfDNA are explored with an overview of the literature regarding cfDNA and also, its role in genometastasis has been investigated.

In addition, the rapidly increasing diagnostic use in recent years, especially its advantages in prenatal diagnosis are discussed.

Keywords: Cell free DNA, genometastasis, Cell free fetal DNA

Sağlıklı bireylerde periferik dolaşımda, mono-nükleozomlar şeklinde az miktarda hdDNA bulunur. hdDNA, hücre yüzeylerindeki bağlayıcı proteinlere veya fosfolipitlere tutunabilir. Bu mekanizma hdDNA Emilimi veya salınımıyla ilişkilendirilebilir. Deoksiribonükleaz (DNaz) gibi enzimler aracılığıyla hücreye tutunmuş olan hdDNA'ların yüzeyden ayırıp sirkülasyona geri salınımı sağlanabilir.

* Eşit oranda katkı sağlamışlardır.

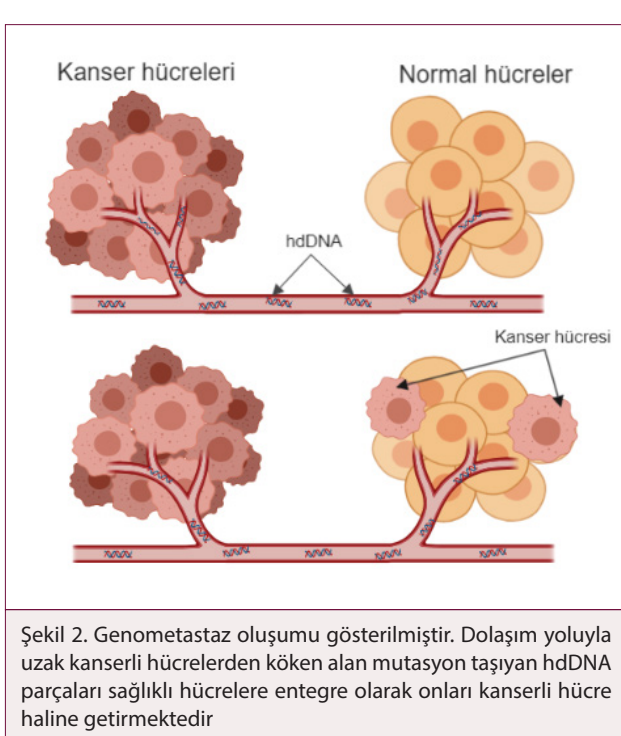
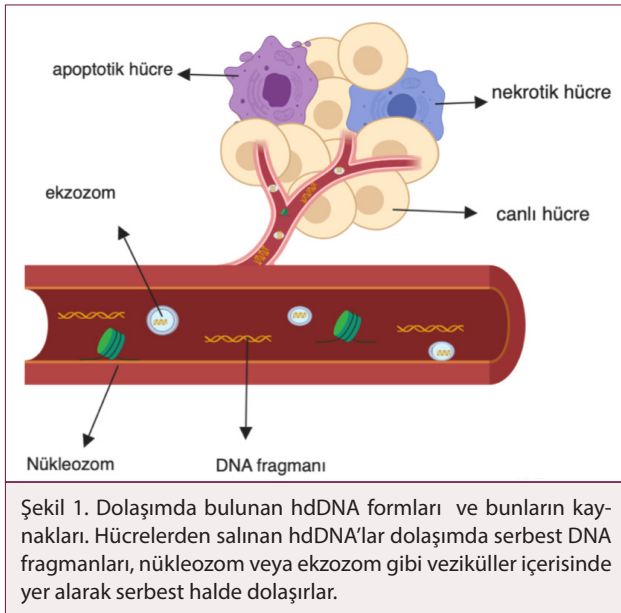
Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Selçuk Sözer Tokdemir **E-mail:** ssozer@istanbul.edu.tr

Geliş Tarihi/Received Date: 16.07.2019 **Revision Date/Revizyon Tarihi:** 08.08.2019 **Kabul Tarihi/Accepted Date:** 16.08.2019



Content of this journal is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

Kanda serbest halde dolaşan hdDNA'nın keşfedilmesi ile birlikte farklı klinik alanlarda tanı amaçlı kullanılmak üzere çalışmalar da başlamıştır. Özellikle prenatal tanıda, anne dolaşımında bulunan fetüse ait hdDNA analizleri halihazırda uygulanmaktadır (3). Bunun yanında, kanser, organ nakli, otoimmün hastalıklar, travma, miyokardial infarktüs ve sepsis gibi diğer klinik alanlar için de kullanılabilirliği bilinmektedir (4). hdDNA analizi, çeşitli patolojiler ve spesifik fizyolojik durumların araştırılması ve tanısında yararlı görülse de, fragman boyutları dahil olmak üzere, kökenleri ve doğası hakkında kesin bir bilgi yoktur. Ancak, yapılan çalışmalarda histonlarla aralarında bir bağlantı olduğu göz-



terilmiştir (5). hdDNA yapısı ve büyüklüğü, hücrelerdeki hdDNA salınım mekanizmalarına bağlıdır. hdDNA fragmanları ~10 kb ile 150 kb arasında değişen uzunluklara sahip oldukları gözlemlenmiştir (6). 150 kb'ı ve katları olan fragmanlar, inter-nükleozomal parçalara ayrılan kromatin DNA'nın endojen bölünmesinden kaynaklanır (7). Oluşan bu fragmanların, apoptoz sonucu ortaya çıktıkları düşünülmektedir (8). Bunun yanı sıra, 10 kb'lık fragmanlardan daha büyük olan parçaların da nekrotik işlemlerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

hdDNA Orijini

Biyolojik sınırlarda hdDNA belirgin bir şekilde bulunmasına rağmen nereden köken aldıkları hala tartışma konusudur. Dış kaynaklı DNA (örneğin, bakteriyel, viral ve parazitik) hariç, birkaç olası kaynak ve eş zamanlı mekanizma düşünülmüştür (9). İlk olarak, hdDNA'nın, tümör bölgesi ile dolaşım sınırında bulunan hücrelerin parçalanması sonucu kana karıştığı düşünülmüştür. Ancak, kanser hastasının dolaşımındaki hdDNA konsantrasyonunun, bu sınırdaki bulunan hücrelerden salınabilecek hdDNA miktarından daha fazla olduğu gösterildiği için bu fikirden vazgeçilmiştir (10). İkinci olarak, hdDNA'nın tümör mikrometastazı ve dolaşımdaki kanser hücre tahribatından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Ancak bu bilgilere dayanarak oluşturulan hipotezlerin hatalı olduğu da gösterilmiştir (11). Öyleyse, hdDNA oluşumunun apoptoz, nekroz ve aktif hücre salımlarından kaynaklandığı olasıdır (12).

DNA fragmanlarının boyutları önemli biyolojik bilgilere ulaşmayı sağlamaktadır. Bir hücre çekirdeğinde histonların çevresinin 146 kb'lık DNA ile sarılmasıyla nükleozomlar oluşur. Hücreler apoptoz veya nekroz geçirdiğinde, bu nükleozomlar kan dolaşımına salınır ve plazmada serbestçe dolaşır. Yapılan çalışmalarda, hdDNA'nın önemli bir kısmının ekzozomlar, apoptotik kabarcıklar, salınan veziküller, virtozomlar ve mikropartiküller gibi aktif hücre salımlarından elde edildiği gösterilmiştir (13).

Apoptoz sırasında DNA, ilk önce büyük parçalara (50-300 kb) ve daha sonra nükleozomal birimlerin katlarına (180-200 kb) parçalanır. Dolaşımdaki hdDNA büyüklüğünün sıklıkla düzgün biçimde kesilmiş fragmanlar olduğu ve bunların apoptotik veziküllerde de sıklıkla saptandığının gözlemlenmesi ile birlikte, hdDNA ana kaynağı olarak apoptoz gösterilebilir. Apoptoz sonucu oluşan hdDNA, jel görüntüsünde karakteristik merdiven (ladder) düzeni gösterir ve hdDNA'yı serbest bırakan aktif hücre salımları da benzer bir bantlama deseni gösterir (14). Diğer yandan, nekroz ise genomun daha rastgele bir şekilde bozunmasına neden olur ve önemli ölçüde daha büyük hdDNA fragmanlarının (~10 kb) oluşmasına yol açar (15). Kanserli hasta plazmasında gözlenen uzun hdDNA fragman varlığının başlangıçta nekroz, mitotik yıkım, otofaji veya mitokondriyal yıkım yoluyla malign hücrelerden kaynaklandığı düşünülmüştür (16).

In vivo çalışmaların çoğunda, hdDNA oluşumunun apoptoz veya nekroz ile ilişkili olduğunu bildirmiştir. Yapılan *in vitro* çalışmalarda ise, hdDNA salınımının apoptoz, nekroz veya bir DNA replikasyonu sonucu değil esas olarak aktif salınım sonucu

olduğu gösterilmiştir (17). Literatür, aktif salınan hdDNA'nın bir çeşit hücreler arası haberci olarak hareket ettiğini belirtmektedir. hdDNA hedef hücelere girerek, konakçının genomuna entegre olarak veya geçici biyolojik bir etki ortaya çıkararak bu olayı gerçekleştirir. Şimdiye kadar tanımlanan en belirgin etkileri, farklı hücreler arasında hdDNA transferinin zararlı maddelere, immünomodülasyona ve metastaz gelişimine karşı toleransın indüklenmesini sağlamasıdır. Ek olarak, Bergsmedh ve ark. (18) hdDNA lateral transferinin sadece metastaza aracılık etmediğini, aynı zamanda malignite için gerekli olan genetik kararsızlığı da üretebileceğini öne sürmüştür.

Normalde homeostas içerisinde genom ve kromozomlar stabil yapılar değildir. Teknolojinin gelişmesiyle birlikte genomun ve kromozomların yeniden düzenlenebildiği bulunmuş ve bunların oluşum mekanizmaları ile ilgili yeni yaklaşımlar ortaya atılmıştır. Buradaki mekanizmalar *kromoanagenez* terimi altında üç farklı yaklaşımdan oluşmaktadır: kromotripsis, kromoan-sentez ve kromopleksi (19).

Kromoan-sentez, replikasyon çatalı durması ve kalıp değiştirme (FoStES) veya mikrohomoloji aracılı kırık tetikli replikasyon (MMBIR) mekanizmalarını içeren replikasyon temelli karmaşık yeniden düzenlenme sürecidir (20). Endojen veya ekzojen ajanlar replikasyon stresi oluşturabilir. Bu durumda replikasyon çatalı durabilir ve replikasyon, alternatif DNA tamir mekanizmalarının devreye girmesine sebep olabilir. Bu mekanizmalar sonucu karmaşık yapısal değişiklikler ve kopya sayısında varyasyon oluşabilir. FoStES ve MMBIR modellerinde kolaylıkla kalıp zincir değişebilmektedir ve DNA başka bir aktif replikasyon çatalıyla kopyalanabilmektedir (21). Kromopleksi, çift zincir kırıkları (DSB) sonucu, çoklu kromozom içi ve kromozomlar arası translokasyonlar ve delesyonların birbirine bağımlı olarak gerçekleşmesiyle karakterize edilmiştir. Tek bir olay zinciri 7 kromozoma kadar etki gösterebilmektedir ve en az 3 olmak üzere 40'dan fazla değişimden oluşabilmektedir. Kromozomal düzenlenmeler, kopya sayısında artış oluşturmamaktadır veya çok az oluşturur (22). Kromoanagenez grubunda ilk olarak ortaya atılan yaklaşım olan kromotripsis, tek bir olay içinde gerçekleşen çoklu DSB sonucu oluşan DNA fragmanlarının rastgele düzende ve yönde tekrar birleşmesi şeklinde tanımlanmaktadır (23). Kümelenmiş kromozomal kırık noktalarının oluşumu, az miktarda DNA kopya sayısı değişimleri ve heterozigositenin yeniden düzenlenmiş bölgeler için korunması gibi kromotripsis için ortak olan farklı özellikler, kromotripsisin diğer kompleks kromozomal yeniden düzenlemelerden ayırt edilmesini sağlamaktadır (24-26).

Kanser durumunda ise yapılan çalışmalarda solid tümörlerin %70'inde, tüm kanserlerin ise %60-80'inde hücre bölünmesi sırasında meydana gelen hatalar sonucunda kromozom kararlılığının bozulduğu gösterilmiştir (27). Kromozomlarda meydana gelen kararsızlık genom bütünlüğünü negatif yönde etkileyerek agresif tümör oluşumunu desteklemektedir. Kromozom kararsızlığının kanser metastazı ile olan ilişkisi irdelendiğinde kanser hücrelerinden sitozole sızıntı yapan DNA'nın öncelikle mikro-çekirdek oluşturduğu, daha sonra bu yapıdan kurtula-

rak bağışıklık sistemi yolağı aracılığı ile uzak dokulara göç ettiği gösterilmiştir (28). Kronik sızıntı yapan DNA incelendiğinde çekirdekte bulunan genomik materyalin tamamının sitozolde bulunan DNA'da var olduğu tespit edilmiştir (28). Bu durum, kanserogenez sürecinde oluşan artmış hdDNA miktarını açıklamakta yardımcı olmaktadır. Ayrıca bu süreç, hdDNA kaynağını da açıklamaktadır.

Genomik kararsızlık ise, genomda yüksek mutasyon frekansı anlamına gelmektedir. Kanser hücreleri incelendiği zaman genetik mutasyonlar görülmektedir. Kanser oluşumu öncesinde küçük genetik mutasyonlar görülse de belli bir noktadan sonra bu hız artar. Oluşumda iki farklı mutasyon şekli vardır; bunlardan biri sürücü mutasyonlar olarak adlandırılır ve bu mutasyonlar kendi başlarına hücreye kanser özellikleri katabilir. Diğerleri ise yolcu mutasyonlardır; bu mutasyonlar hücreye kanser özelliklerini tek başlarına katamazlar ancak sürücü mutasyonlara eşlik ederek kanserin oluşumunu hızlandırır. Sürücü mutasyonlar iki tip genin mutasyonunu içerir: protoonkogenler ve tümör baskılayıcı genler. Protoonkogenler, hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında veya apoptozun baskılanmasında etkisi olan genlerdir. Mutasyonlar bu genlerin işlevlerinde artışa sebep olabilir ve böylece genler onkogenlere dönüşebilirler. Tümör baskılayıcı genler ise apoptozu indüklemeye ve hücre proliferasyonunu baskılama gibi olaylarda etkilidir. Mutasyonlar bu genleri susturabilir ve böylece kanser oluşumu başlayabilir. Genellikle, proto-onkogenler üzerinde monoallelik mutasyon yeteriyken tümör baskılayıcı genlerde iki allelin de mutasyonla işlevsiz hale gelmesi gerekir. Tümör baskılayıcı genlerdeki bu durum 1971 yılında Knudson tarafından ortaya atılan çift vuruş hipotezi (diğer adıyla Knudson hipotezi) ile açıklanmaktadır (29). Genetik mutasyonlar dışında translokasyonlar, insersiyonlar/delesyonlar ve amplifikasyonlar gibi kromozomal mutasyonlar da kanserde görülmektedir.

Genometastaz ve hdDNA

Yapılan çalışmalarda, metile olmayan hdDNA'nın 6 saatte ortadan kaybolduğu, metillenmiş hdDNA'nın 24 saatten daha uzun sürede bile tespit edilebildiği, tümörlü hayvanlarda ise hem metillenmiş hem de metillenmemiş hdDNA'nın 24 saatten daha uzun sürede tespit edilebildiği gösterilmiştir (30). Vücutta uzun süre kalabilen bu serbestçe dolaşan DNA parçalarının farklı hücreleri transfekte edip edemeyeceği ve metastazı kolaylaştırıp kolaylaştıramayacağı araştırılmaya başlanmıştır. 1999 yılında García-Olmo ve ark. (31) tarafından yayınlanan çalışma, kanser serbest dolaşan bir onkogenin uzak bir bölgedeki hücreyi transfekte ederek ona kanser özellikleri kazandıracağını öne sürdü ve buna genometastaz adı verildi. Literatürde farklı solid tümörler üzerine çalışmalar yapıldı (32-34). Bu çalışmalarda kanser hastalarından veya kanser modeli deney hayvanlarından serumlar alınarak *in vitro* ortamda onkogen taşımayan hücre hatlarına veya *in vivo* olarak kanser bulunmayan deney hayvanlarına uygulandı. Sonuç olarak serumlu ortamda inkübe edilen hücrelerde onkogen tespit edildi veya sağlıklı hayvanlarda tümör oluşumu gözlemlendi. Genometastaz çalışmalarından biri olarak Abdouh ve diğ. kanser hastalarının kanlarından serumlarını ve bu serumlardan eksozomları izole ettiler.

BRCA1 knock-out fibroblast hücrelerini elde edilen serum ve eksozomlarla *in vitro* ortamda muamele edip bu hücreleri NOD-SCID farelere enjekte ettiler. Sonuç olarak bu hücrelerin malign transformasyon geçirdiklerini ve farelerde tümör dokusu oluşturduğunu belirlediler (35).

Sonraki çalışmada Leon ve ark. (36) 1977 yılında, radyoimmüno-kimya kullanarak kanser hastalarının kanlarındaki hdDNA seviyesinin normal bireylerin kanlarındaki hdDNA seviyesinden daha yüksek olduğunu gösterdiler. Teknolojik sınırlamalar nedeniyle, ilk deneysel kanıtın bu durumu desteklemesi 12 yıl daha uzun sürdü. İnsan Genom Projesi'nin tamamlanmasıyla hdDNA'nın biyobelirteç olarak kullanımı gelişti ve kanser hastalarında tümör belirteçlerinin sorgulanmasına olanak sağladı. Ayrıca bazı kanser hastalarının hdDNA'larının tümörlerden kökenli oldukları gösterildi. 1994'te iki grup, hdDNA'nın tümöre özgü mutasyonları taşıdığını bildirdi. Her iki grup da, sırasıyla, pankreatik adenokarsinom ve akut miyeloid lösemi (AML) hastalarının plazma örneklerinde tümöre spesifik (N-RAS) mutasyonların tespiti için mutasyona özgü primerler kullandı (37, 38). hdDNA'da önceden bilinen belirli bir mutasyonun saptanmasına yönelik bu yaklaşım, tercih edilen bir yöntem haline gelmiştir. Bu öncü çalışmalarda, dolaşımdaki tümör DNA (ctDNA)'sının saptanmasının "tanı, tedavi yanıtını belirleme ve prognozu öngörmek" gibi klinik uygulamalar için heyecan verici etkileri olduğu kabul edilmiştir (37). Bu erken gözlemler, ctDNA'yı tümör genomlarını analiz etmek için invazif olmayan bir yaklaşım olarak kullanmanın birçok olasılığını vurgularken, bu potansiyeli tam olarak kullanmak için yeterince hassas ve spesifik laboratuvar tekniklerinin henüz geliştirilmediği belirtilmiştir.

ctDNA analizi farklı örneklerden alınarak ve farklı yöntemler kullanılarak yapılabilmektedir. Çalışma sırasında öncelikle hangi örnek kullanılacağı belirlenmelidir. Bu örnek için uygun tüp ve koşullar belirlenmelidir. hdDNA izolasyonu için ise fenol kloroform, alkol presipitasyonu veya tuzla çöktürme metotları kullanılabilir ya da ticari olarak satılan hdDNA izolasyon kitleleri kullanılabilir (39). Geleneksel yöntemler daha fazla miktarda hdDNA izolasyonunu sağlayabilmekle birlikte kirlilik oranı daha yüksek olabilir ve uzun sürmektedir. Ticari kitleler daha hızlı ve daha saf izolasyon sağlamakla birlikte ücretlerinin yüksek olması dezavantajdır.

Kanser tedavisindeki en büyük problemlerden biri olan heterojenlik, hastadan alınan biyopsi örneğinde fark edilememekte ve bu durum hastalığın tekrarına veya tedavinin yanıtsız kalmasına sebep olabilmektedir (40-46). hdDNA analizi ile farklı alt gruplar yakalanabilmektedir ve bu da tedavi sürecinin daha verimli geçmesini sağlayabilmektedir (41, 42, 46).

Tanı Amaçlı hdDNA Kullanımı

Kanser hastalarında hdDNA artışı olduğunun gözlemlenmesinin dışında plazma genotiplenmesinin yapılabilir hale gelmesi onkoloji için büyük önem taşımaktadır. Sıvı biyopsi sayesinde hastalardan invazif yaklaşıma gerek kalmadan veya invazif biyopsi yapılamayacak hastalardan tümörle ilişkilendirilebilecek DNA dizileri analiz edilebilir hale gelmiştir. Buna en iyi örnek 2016 yılında FDA onay

alan Roche firmasının üretmiş olduğu "Cobas Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü Mutasyon Testi"dir (47). Bu, doku biyopsisi alınmayan akciğer kanseri hastaları için nasıl bir tedavi uygulanması gerektiği konusunda rehberlik yapacak bir testtir. Ayrıca hdDNA'nın erken teşhis amaçlı kullanılması araştırılmaktadır. Phallen ve ark. (48) tarafından yapılan çalışmada farklı evrelerdeki farklı kanserlerde evrenin ilerlemesiyle hdDNA artışı olduğu ve ilk evre hastalarda da hdDNA tespit edildiğini gösterdi.

Tüm bunlara ek olarak hücre dışı fetal DNA (hdfDNA)'nın tanıda kullanımı ise gün geçtikçe artmaktadır. hdfDNA, maternal dolaşımda serbest halde bulunan fetüs kaynaklı kısa DNA parçalarıdır. 1997 yılında Lo ve diğ. hdfDNA'yı keşfetmesiyle hdfDNA'ya dayanan girişimsel olmayan prenatal tanı için çeşitli metotlar geliştirilmiştir (49). İlk klinik uygulamalarda konjenital adrenal hiperplazi ve X'e bağlı hastalıklarda fetal cinsiyet belirlenmesinde ve yenidoğan hemolitik hastalığı için Rh(-) kadınlarda fetal Rh'in belirlenmesinde kullanıldı (50). Sonraki çalışmalarda NIPT (girişimsel olmayan prenatal test) olarak nitelendirilmiş ve tek gen hastalıklarının tanımlanması için de kullanılmaya başlanmıştır (3). Bunların dışında, Duchenne musküler distrofi ve hemofili için sonuçların kullanışlı olabileceği düşünülmektedir. Tek gen bozukluklarının tespit edilmesinde kullanılan fetal DNA'lar akondroplazi, hemoglobinopatiler, konjenital adrenal hiperplazi, kistik fibroz, Huntington hastalığı, miyotonik distrofi gibi giderek artan çeşitlilikte kalıtsal hastalıkların test edilmesinde kullanılmaktadır (51). Gebeliğin en erken 32. gününde görülmeye başlayan hdfDNA gebelik sırasında maternal plazmanın %3-6'sını oluşturduğu gösterilmiştir (51). Gebeliğin ilerlemesiyle birlikte hdfDNA miktarında %21 oranında bir artış gözlemlenmektedir (52). hdfDNA fragmanları genellikle 300 bp'den daha kısadır, sadece %20'inin 300 bp'den daha uzun olduğu saptanmıştır (53). hdfDNA'nın doğumdan 2 saat sonra, abortustan ise 24 saat sonra maternal dolaşımdan kaybolduğu gösterilmiştir. Bu durum prenatal tanı için önceki gebelikten oluşabilecek kontaminasyonları engellediği görülmüştür (54). Fetal cinsiyetin belirlenmesinde gebeliğin 7. haftasında %70,9. haftasından sonra ise %100 başarı sağlanmıştır. Hücre dışı fetal DNA, gebeliğin değişen şartlarından etkilenebileceği için preeklampsi ve anöploidi düşünülen durumlarda hdfDNA'nın miktarının artması bu durumların tespitinde kullanılmıştır (55). Embriyonik gelişim sırasında dokunun yapısal durumu ve şeklinin sağlanması için apoptoz ve nekroz olaylarının gerçekleşmesi sonucu oluşan hdfDNA'nın plasentadan geçerek maternal dolaşıma katılabileceği gösterilmiştir (56). Ayrıca, son zamanlardaki çalışmalarda hdfDNA'nın eksozomlar yoluyla da maternal sirkülasyona katılabileceği ortaya konulmuştur (57).

Öte yandan, hdDNA'nın tedavide kullanım alanları da yavaş yavaş belirlenmektedir. Garcia-olmo ve diğ. yakın zamanda bölünmemiş sağlıklı hücrelerden elde edilen hdDNA'nın tümör büyümesini durdurabileceğini göstermiştir (58). Bu bulgular, hdDNA'nın fonksiyonel çeşitliliğini daha iyi göstermektedir. İşin ille strese maruz bırakılmış hücrelerde oluşan apoptotik ölümünün, okside olmuş hdDNA'ların dolaşıma salınmasına neden olduğu bulunmuştur. Bu, stres durumunun tespitinde hdDNA'nın biyobelirteç olarak kullanılmasını sağlayabilir. Ek olarak, okside

olmuş hddDNA molekülünün radyasyon terapisine karşı direncini arttırarak diğer malign hücelere hayatta kalma kabiliyeti sağlayabildiği gösterilmiştir (59).

Tüm bu çalışmalar yakın gelecekte günümüz tanı ve tedavi yaklaşımlarının temelden değişeceğini haber vermektedir.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - C.Ç.K, S.F.T.; Denetleme - S.S.T.; Gereçler - C.Ç.K, S.F.T., B.Y., H.H., S.S.T.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - C.Ç.K, S.F.T., B.Y., H.H., S.S.T.; Analiz ve/veya Yorum - S.S.T.; Literatür Taraması - C.Ç.K, S.F.T., B.Y., H.H.; Yazan - C.Ç.K, S.F.T., B.Y., H.H.; Eleştirel İnceleme - S.S.T.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: TYL-2019-33725).

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - C.Ç.K, S.F.T.; Supervision - S.S.T.; Materials - C.Ç.K, S.F.T., B.Y., H.H., S.S.T.; Data Collection and/or Processing - C.Ç.K, S.F.T., B.Y., H.H., S.S.T.; Analysis and/or Interpretation- S.S.T.; Literature Search - C.Ç.K, S.F.T., B.Y., H.H.; Writing - C.Ç.K, S.F.T., B.Y., H.H.; Critical Reviews- S.S.T.

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

Financial Disclosure: This work was supported by the Research Fund of the İstanbul University (Project number: TYL-2019-33725).

KAYNAKLAR

1. Volik S, Alcaide M, Morin RD, Collins C. Cell-free DNA (cfDNA): Clinical Significance and Utility in Cancer Shaped By Emerging Technologies. *Mol Cancer Res* 2016; 14: 898-908. [CrossRef]
2. Rykova EY, Morozkin ES, Ponomaryova AA, Loseva EM, Zaporozhchenko IA, Cherdyntseva NV, et al. Cell-free and cell-bound circulating nucleic acid complexes: mechanisms of generation, concentration and content. *Expert Opin Biol Ther* 2012; 12 Suppl 1: 141-53. [CrossRef]
3. Harraway J. Non-invasive prenatal testing. *Aust Fam Physician* 2017; 46: 735-9.
4. Duvvuri B, Lood C. Cell-Free DNA as a Biomarker in Autoimmune Rheumatic Diseases. *Front Immunol* 2019;10: 502. [CrossRef]
5. Sanchez C, Snyder MW, Tanos R, Shendure J, Thierry AR. New insights into structural features and optimal detection of circulating tumor DNA determined by single-strand DNA analysis. *NPJ Genom Med* 2018; 3: 31. [CrossRef]
6. Grunt M, Hillebrand T, Schwarzenbach H. Clinical relevance of size selection of circulating DNA. *Transl Cancer Res* 2018; 7(Suppl 2): 171-84. [CrossRef]
7. Heitzer E, Auer M, Hoffmann EM, Pichler M, Gasch C, Ulz P, et al. Establishment of tumor-specific copy number alterations from plasma DNA of patients with cancer. *Int J Cancer* 2013; 133: 346-56. [CrossRef]
8. Zhivotosky B, Orrenius S. Assessment of apoptosis and necrosis by DNA fragmentation and morphological criteria. *Curr Protoc Cell Biol* 2001; Chapter 18: Unit 18.3. [CrossRef]
9. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: Quantifications and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001; 61: 1659-65.
10. Bronkhorst AJ, Wentzel JF, Aucamp J, van Dyk E, du Plessis L, Pretorius PJ. Characterization of the cell-free DNA released by cultured cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1863: 157-65. [CrossRef]
11. Aucamp J, Bronkhorst AJ, Badenhorst CPS, Pretorius PJ. The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: a critical re-evaluation of the literature. *Biol Rev Camb Philos Soc* 2018; 93: 1649-83. [CrossRef]
12. Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA: Apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta* 2001; 313: 139-42. [CrossRef]
13. Nagata S. DNA degradation in development and programmed cell death. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 853-75. [CrossRef]
14. Nagata S, Nagase H, Kawane K, Mukae N, Fukuyama H. Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death Differ* 2003; 10: 108-16. [CrossRef]
15. Moulriere F, Robert B, Arnau Peyrotte E, Del Rio M, Ychou M, Molina F, et al. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PLoS One* 2011; 6: doi: 10.1371/journal.pone.0023418. [CrossRef]
16. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 426-37. [CrossRef]
17. Thakur BK, Zhang H, Becker A, Matei I, Huang Y, Costa-Silva B, et al. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res* 2014; 24: 766-9. [CrossRef]
18. Bergsmedh A, Szeles A, Henriksson M, Bratt A, Folkman MJ, Spetz AL, et al. Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98: 6407-11. [CrossRef]
19. Holland AJ, Cleveland DW. Chromoanagenesis and cancer: Mechanisms and consequences of localized, complex chromosomal rearrangements. *Nat Med* 2012; 18: 1630-8. [CrossRef]
20. Gu W, Zhang F, Lupski JR. Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics* 2008; 1: 4. [CrossRef]
21. Zhang F, Khajavi M, Connolly AM, Towne CF, Batish SD, Lupski JR. The DNA replication FoStEs/MMBIR mechanism can generate genomic, genic and exonic complex rearrangements in humans. *Nat Genet* 2009; 41: 849-53. [CrossRef]
22. Baca SC, Prandi D, Lawrence MS, Mosquera JM, Romanel A, Drier Y, et al. Punctuated evolution of prostate cancer genomes. *Cell* 2013; 153: 666-77. [CrossRef]
23. Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, Yang F, Bignell GR, Mudie LJ, et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell* 2011; 144: 27-40. [CrossRef]
24. Maher CA, Wilson RK. Chromothripsis and human disease: Piecing together the shattering process *Cell* 2012; 148: 29-32. [CrossRef]
25. Korbel JO, Campbell PJ. Criteria for inference of chromothripsis in cancer genomes. *Cell* 2013; doi:10.1016/j.cell.2013.02.023 [CrossRef]
26. L'Abbate A, Tolomeo D, Cifola I, Severgnini M, Turchiano A, Augello B, et al. MYC-containing amplicons in acute myeloid leukemia: genomic structures, evolution, and transcriptional consequences. *Leukemia* 2018; 32: 2152-66. [CrossRef]
27. Duijff PHG, Schultz N, Benezra R. Cancer cells preferentially lose small chromosomes. *Int J Cancer* 2013; https://doi.org/10.1002/ijc.27924 [CrossRef]
28. Bakhomou SF, Ngo B, Laughney AM, Cavallo JA, Murphy CJ, Ly P, et al. Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response. *Nature* 2018; 553: 467-72. [CrossRef]

29. Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 1971; 68: 820-3. [\[CrossRef\]](#)
30. Barták BK, Nagy ZB, Spisák S, Tulassay Z, Dank M, Igaz P, et al. In vivo analysis of circulating cell-free DNA release and degradation. *Orv Hetil* 2018; 159: 223-33. [\[CrossRef\]](#)
31. García-Olmo D, García-Olmo DC, Ontañón J, Martínez E, Vallejo M. Tumor DNA circulating in the plasma might play a role in metastasis. The hypothesis of the genometastasis. *Histol Histopathol* 1999; 14: 1159-64.
32. Abdouh M, Zhou S, Arena V, Arena M, Lazaris A, Onerheim R, et al. Transfer of malignant trait to immortalized human cells following exposure to human cancer serum. *J Exp Clin Cancer Res* 2014; 33: 1-12. [\[CrossRef\]](#)
33. Hamam D, Abdouh M, Gao ZH, Arena V, Arena M, Arena GO. Transfer of malignant trait to BRCA1 deficient human fibroblasts following exposure to serum of cancer patients. *J Exp Clin Cancer Res* 2016; doi:10.1186/s13046-016-0360-9. [\[CrossRef\]](#)
34. Arena GO, Arena V, Arena M, Abdouh M. Transfer of malignant traits as opposed to migration of cells: A novel concept to explain metastatic disease. *Med Hypotheses* 2017; 100: 82-6. [\[CrossRef\]](#)
35. Abdouh M, Hamam D, Gao ZH, Arena V, Arena M, Arena GO. Exosomes isolated from cancer patients' sera transfer malignant traits and confer the same phenotype of primary tumors to oncosuppressor-mutated cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2017; 36: doi: 10.1186/s13046-017-0587-0. [\[CrossRef\]](#)
36. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy. *Cancer Res* 1977; 37: 646-50.
37. Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, Yao SL. Soluble Normal and Mutated DNA Sequences from Single-Copy Genes in Human Blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; 3: 67-71.
38. Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 1994; 86: 774-9. [\[CrossRef\]](#)
39. X, Teare MD, Hoken I, Zhu YM, Woll PJ. Optimizing the yield and utility of circulating cell-free DNA from plasma and serum. *Clin Chim Acta* 2009; 404: 100-4. [\[CrossRef\]](#)
40. Diaz LA, Williams RT, Wu J, Kinde I, Hecht JR, Berlin J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 2012; 486: 537-540. [\[CrossRef\]](#)
41. Russo M, Siravegna G, Blaszkowsky LS, Corti G, Crisafulli G, Ahronian LG, et al. Tumor heterogeneity and Lesion-Specific response to targeted therapy in colorectal cancer. *Cancer Discov* 2016; doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-1283. [\[CrossRef\]](#)
42. Goyal L, Saha SK, Liu LY, Siravegna G, Leshchiner I, Ahronian LG, et al. Polyclonal secondary FGFR2 mutations drive acquired resistance to FGFR inhibition in patients with FGFR2 fusion-positive cholangiocarcinoma. *Cancer Discov* 2017; 7: 252-63. [\[CrossRef\]](#)
43. Hazar-Rethinam M, Kleyman M, Han GC, Liu D, Ahronian LG, Shahzade HA. Convergent therapeutic strategies to overcome the heterogeneity of acquired resistance in BRAFV600E colorectal cancer. *Cancer Discov* 2018; DOI: 10.1158/2159-8290.CD-17-1227. [\[CrossRef\]](#)
44. Bakhomou SF, Cantley LC. The Multifaceted Role of Chromosomal Instability in Cancer and Its Microenvironment. *Cell* 2018; 174: 1347-60. [\[CrossRef\]](#)
45. Piotrowska, Z, Niederst MJ, Karlovich CA, Wakelee HA, Neal JW, Mino-Kenudson M, et al. Heterogeneity underlies the emergence of EGFR T790M wild-type clones following treatment of T790M-positive cancers with a third-generation EGFR inhibitor. *Cancer Discov* 2015; doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-0399. [\[CrossRef\]](#)
46. Blakely CM, Watkins TBK, Wu W, Gini B, Chabon JJ, McCoach CE, et al. Evolution and clinical impact of co-occurring genetic alterations in advanced-stage EGFR-mutant lung cancers. *Nat Genet* 2017; 49: 1963-704. [\[CrossRef\]](#)
47. Malapelle U, Sirera R, Jantus-Lewintre E, Reclusa P, Calabuig-Fariñas S, Blasco A, et al. Profile of the Roche cobas® EGFR mutation test v2 for non-small cell lung cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 2017; 17: 209-15. [\[CrossRef\]](#)
48. Phallen J, Sausen M, Adleff V, Leal A, Hruban C, White J, et al. Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. *Sci Transl Med* 2017; 16: 403. [\[CrossRef\]](#)
49. Ramezanzadeh M, Khosravi S, Salehi R. Cell-free Fetal Nucleic Acid Identifier Markers in Maternal Circulation. *Adv Biomed Res* 2017; 6: 89. [\[CrossRef\]](#)
50. Yau M, Khattab A, New MI. Prenatal Diagnosis of Congenital Adrenal Hyperplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2016; 45: 267-81. [\[CrossRef\]](#)
51. Daley R, Hill M, Chitty LS. Non-invasive prenatal diagnosis: Progress and potential. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2014; 99: 426-30. [\[CrossRef\]](#)
52. Kenkhuis MJA, Bakker M, Bardi F, Fontanella F, Bakker MK, Fleurke-Rozema JH, et al. Effectiveness of 12-13-week scan for early diagnosis of fetal congenital anomalies in the cell-free DNA era. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2018; 51: 463-9. [\[CrossRef\]](#)
53. Yang Q, Du Z, Song Y, Gao S, Yu S, Zhu H, et al. Size-selective separation and overall-Amplification of cell-free fetal DNA fragments using PCR-based enrichment. *Sci Rep* 2017; doi:10.1038/srep40936. [\[CrossRef\]](#)
54. D'Aversa E, Breveglieri G, Pellegatti P, Guerra G, Gambari R, Borgatti M. Non-invasive fetal sex diagnosis in plasma of early weeks pregnant using droplet digital PCR. *Mol Med* 2018; doi:10.1186/s10020-018-0016-7 [\[CrossRef\]](#)
55. Contro E, Bernabini D, Farina A. Cell-Free Fetal DNA for the Prediction of Pre-Eclampsia at the First and Second Trimesters: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Mol Diagn Ther* 2017; 21: 125-35. [\[CrossRef\]](#)
56. Sherwood K, Weimer ET. Characteristics, properties, and potential applications of circulating cell-free dna in clinical diagnostics: a focus on transplantation. *J Immunol Methods* 2018; 463: 27-38. [\[CrossRef\]](#)
57. Fernando MR, Jiang C, Krzyzanowski GD, Ryan WL. New evidence that a large proportion of human blood plasma cell-free DNA is localized in exosomes. *PLoS One* 2017; doi:10.1371/journal.pone.0183915. [\[CrossRef\]](#)
58. Bronkhorst AJ, Ungerer V, Holdenrieder S The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomol Detect Quantif* 2019; doi:10.1016/j.bdq.2019.100087. [\[CrossRef\]](#)
59. Kostyuk SV, Ermakov AV, Alekseeva AY, Smirnova TD, Glebova KV, Efremova LV, et al. Role of extracellular DNA oxidative modification in radiation induced bystander effects in human endothelialocytes. *Mutat Res* 2012; 729: 52-60. [\[CrossRef\]](#)

Hatalı Enjeksiyon Sonucu Oluşan ve İyileşmeyen Yaranın *Lucilia sericata*'nın Larvaları ile Tedavisi

Treatment of a Non-healing Wound Formed After a Faulty Injection with the Larvae of *Lucilia sericata*

Erdal Polat¹ , Hülya Ağgez² , Kenan Binnetoğlu³ 

¹İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Yara Bakım Ünitesi, İstanbul, Türkiye

³Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Kars, Türkiye

Cite this article as: Polat E, Ağgez H, Binnetoğlu K. Treatment of a Non-healing Wound Formed After a Faulty Injection with the Larvae of *Lucilia sericata*. Experimed 2019; 9(2): 75-8.

ÖZ

İntramüsküler (İM) enjeksiyon riskli olduğundan, enjeksiyon sağlık eğitimi almış ve insan anatomisinin bilen sağlık personeli tarafından yapılmalıdır. Sıklıkla görülen İM enjeksiyon komplikasyonlarının birçoğu; sağlık personeli olmayan, eğitimsiz ve enjeksiyon tekniğini bilmeyen insanlar tarafından yapılmasından kaynaklanmaktadır.

A.Ö. 48 yaşında erkek hastaya, 5 ay önce gut hastalığı nedeni ile ağrısı olduğundan evde annesi tarafından diklofenak sodyum ampul enjeksiyonu yapılmış ve sonrasında bu bölgede yara oluşmuştur. Hastaya trimetoprim+sulfametoksazol ampul intravenöz (İV) 2*1 ve klasik yara tedavileri uygulanmasına rağmen yara gittikçe büyümüş ve derinleşmiştir.

Hasta 24.03.2017 tarihinde polikliniğimize başvurduğunda sağ kalça ¼ alt dış kadransında 8x5x2 cm ölçülerinde, enfekte ve pürülan bir yarası vardı. Yaradan materyal alınarak Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilmiştir. Yaranın büyüklüğüne ve derinliğine göre 500-600 adet *Lucilia sericata* sinek türüne ait I. evre larvalar yaranın üzerine konulmuştur. İlk yara kültüründe *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) üremiştir. 4. seanstan önce alınan materyalde ise Gram pozitif difteroid çomaklar üremiş, *P. aeruginosa* ürememiştir. Hastanın yarası 2 ayda 12 seans larva tedavisi ile iyileşmiştir.

Sonuç olarak; *L. sericata* larvaları ile yapılan Larva Debridman Tedavisi (LDT) antibiyotiklere dirençli bakteriler ile enfekte olan her türlü iyileşmeyen yaranın tedavisi için seçenek olabilir.

Anahtar Kelimeler: Enjeksiyon, *Lucilia sericata*, tedavi, yara

GİRİŞ

İlaç uygulama yöntemlerinden bir olan İntramüsküler (İM) enjeksiyon, ilacın kas içerisine verilmesi işlemidir. Ancak İM enjeksiyon uygulaması; uygun araç ile, hijyenik koşullarda, yeterli bilgi ve beceriye sahip sağlık personeli tarafından yapılmalıdır. İM enjeksiyon teknik kurallara uyulmadığında

ABSTRACT

Because of the risk of intramuscular (IM) injection, the healthcare staff who will be injecting should know the anatomy of the region to be treated well and should do well in choosing the region. Most of the common IM injection complications are due to the lack of information and the use of inappropriate technique.

A.Ö., who is 48-year old male with gout disease, had a pain so the injection of a diclofenac sodium bulb was done by his mother at his home 5 months ago and a wound was formed in this region afterwards. The patient was given a trimetoprim+sulfametoksazol intravenous vial (IV) 2*1, and the wound has grown and deepened although conventional wound treatments have been applied. When the patient applied to our policlinic on 24.03.2017, the patient had a 8x5x2 cm, infected, and purulent wound on his right hip ¼ in the lower outer quadrant. A sample was taken from the wound and sent to the medical microbiology laboratory. According to the wound size and depth, 500-600 first stage sterile larvae of *Lucilia sericata* were placed directly on the wound. *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) was proliferated in first wound culture. Gram positive difteroid rods were proliferated in the material taken before the 4th session, *P. aeruginosa* was not proliferated. The wound of the patient was healing with 12 sessions larvae treatment in 2 months.

As a result; Larval Debridement Therapy (LDT) with *L. sericata* larvae may be an option for the treatment of any non-healing wound that is infected with antibiotic-resistant bacteria.

Keywords: Injection, *Lucilia sericata*, treatment, wound

veya eğitilmiş sağlık personeli tarafından yapılmadığında beklenmedik bir çok komplikasyona yol açabilir. Eğer İM enjeksiyon, doğru ve sağlık personeli tarafından yapılmamış ise enjeksiyonun yapıldığı yerde; apse, nekroz, doku tahrişi, kontraktür, hematoma, kronik ağrı, periostit, enfeksiyon, kemik ve damar yaralanmaları olabilir. Yanlışlıkla

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Erdal Polat **E-mail:** erdalp@istanbul.edu.tr

Geliş Tarihi/Received Date: 31.05.2019 **Kabul Tarihi/Accepted Date:** 24.06.2019



Content of this journal is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

periferik sinire yakın yapılan ilaç enjeksiyonlarında sinirin devamlılığını bozabilen yaralanmalar olabilmektedir. Bu tür yaralanmalara en fazla siyatik sinirin bulunduğu kalçanın alt ve iç bölgelerinde rastlanmaktadır. Yanlışlıkla yapılan İM enjeksiyon sonucu oluşan kitlesel lezyon ve skarlar da sinir zedelenmesi ve sakatlık gibi komplikasyonlara yol açabilir (1-6).

İntramüsküler (İM) enjeksiyon sonucu oluşan lezyonların iyileşmesi de oldukça zor olup zaman almaktadır. Hastaya İM enjeksiyon yapıldıktan sonra, enjeksiyon bölgesinde açılan yaraya altı aydır bilinen klasik tedavilerin uygulanmasına rağmen yara iyileşmemiş, gittikçe büyümüş ve derinleşmiştir. Bunun üzerine polikliniğimize müracaat eden hastanın yarasını *Lucilia sericata* (*L. sericata*)'nın larvaları ile tedavi etmeyi planladık. Calliphoridae ailesinde yer alan *L. sericata* türü sinek larvaları sadece ölü dokular ile beslenirler (7-11). Bu özelliklerinden dolayı *L. sericata* sinek türüne ait larvalar 2007 yılından beri; antibiyotik, hiperbarik oksijen, vakum, klasik tedavi ve cerrahi debridman ile iyileşmeyen yaraların tedavisinde kullanılmaktadır (12). Larvalar salgılarından birtakım proteolitik enzimler ile; nekrotik dokuları, yarada kolonize olmuş veya enfeksiyon oluşturan mikroorganizmaları erittiğinden ve yediğinden dolayı yaraları kolayca iyileştirirler. Tamamen

doğal olan tedavi yönteminin çalışanlara ya da çevreye herhangi bir yan etkisi yoktur (13-16).

OLGU SUNUMU

A.Ö. 48 yaşında erkek hastaya 5 ay önce gut hastalığı nedeniyle ağrısı olduğundan evde annesi tarafından diklofenak sodyum ampul enjeksiyonu yapılmıştır. Enjeksiyon sonrasında hastanın sağ kalça ¼ alt dış kadranında yara oluşmuştur. Polikliniğimize başvurmadan önce hastaya trimetoprim+sulfametoksazol ampul IV 2*1 enjeksiyonu, cerrahi debridman ve ıslak pansuman gibi yöntemler uygulanarak yara tedavi edilmeye çalışılmış ancak yara gittikçe büyümüş ve derinleşmiştir.

Hasta 24.03.2017 tarihinde polikliniğimize başvurduğunda sağ kalça ¼ alt dış alanında 8x5x2 cm ölçülerinde, enfekte ve pürülan bir yarası vardı (Resim 1). Hastaya larva tedavisi hakkında bilgi verilmiş, tedaviyi kabul eden hastaya onam formu doldurulmuş ve imzalatılmıştır. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 2006 yılında onayı alınmış olan larva tedavisinin uygulanması planlanmıştır. Hastanın yarası steril serum fizyolojik ile



Resim 1. Hastanın yarasının tedavi başlamadan önceki durumu



Resim 2. Nekrotik dokunun derinliklerine giren larva



Resim 3. Nekrotik doku larvalar tarafından tamamen temizlenmiş



Resim 4. Larva tedavisi ile tamamen kapanmış

temizlenmiş; bakteriyolojik kültürü ve antibiyotik duyarlılığını belirlenmek için materyal alınarak Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilmiştir. Yaranın büyüklüğüne ve derinliğine göre 500 - 600 adet *L. sericata* sinek türüne ait I. evre larvalar yaranın üzerine konmuştur. Yara üzerine serbest olarak konan hareketli larvalar, nekrotik alanlara tutunur ve nekrotik dokunun derinliklerine girerek yaranın oksijenlenmesini sağlar. Yaranın durumunu görmemize yardımcı olurlar (Resim 2, 3).

Larva Debridman Tedavisi (LDT) yaradaki nekrotik doku ve *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)'dan dolayı başlangıçta haftada 2 kez uygulanmış ve larvalar yara üzerinde 72 saat tutulduktan sonra uzaklaştırılmıştır. Bu işleme yaradaki nekrotik doku ve *P. aeruginosa* tamamen temizlenene kadar devam edilmiştir. Nekrotik doku görsel olarak tamamen temizlendikten sonra hastanın takipleri yaranın durumuna ve iyileşme hızına göre iki haftada bir yapılmıştır. Kontrollerde yara kapanmamışsa larva tedavisine devam edilmiştir (13-15). İlk yara kültüründe *P. aeruginosa* üremiş 3 seans larva tedavisi uygulandıktan sonra 4. seans uygulanmadan önce alınan materyalde ise Gram pozitif difteroid çomakların üremiş, ancak *P. aeruginosa* ürememiştir. Hastanın yarası, 2 ayda toplamda 12 seans larva tedavisi ile tamamen iyileşmiştir (Resim 4).

TARTIŞMA

İntramüsküler enjeksiyonlarda görülen komplikasyonların nedenlerine bakıldığında; bilgi eksikliği, hijyen kurallarına uyulmaması, enjeksiyonun sağlık eğitimi almamış personeller tarafından yapılması ve buna bağlı olarak da kullanılan yanlış teknikten kaynaklandığı görülmektedir. Yanlış yapılan İM enjeksiyonlar dolayısıyla oluşan komplikasyonlar enjeksiyon ve teknikleri konusunda verilebilecek eğitim ile önlenebilir. Enjeksiyonun yanlış yapılmasından kaynaklanan milyonlarca vaka olup, bu vakalar maddi ve manevi kayıplara uğramaktadırlar (17).

Hastanın ev hanımı olan annesi, ilkokul mezunu olup enjeksiyon yapmayı ebe olan komşusundan öğrenmiştir. Hasta enjeksiyonun yapıldığı bölgede açılan yarayı beş aydır tedavi ettirmek için değişik hastanelere gitmiştir. Verilen antibiyotik tedavisine ve uygulanan klasik yara tedavi yöntemlerine rağmen yara iyileşmemiş gittikçe büyümüş ve derinleşmiştir. Hasta bu süre zarfında işini yapamadığı gibi, tedavi için gittiği hastanelerde harcadığı para dolayısıyla maddi ve manevi kayıplara uğramıştır.

Sherman in-vitro olarak yaptığı çalışmada; *L. sericata* larvaların *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), A ve B grubu streptokok gibi patojen bakteriler üzerine bakteriyostatik ve bakterisid etkisinin olduğunu belirlemiştir (15). Çalışmalarımızda larvaların ve salgısının *P. aeruginosa*, Metisiline dirençli *S. aureus*, Metisiline duyarlı *S. aureus*, Metisiline dirençli plazma koagülaz negatif stafilokoklar, *Streptococcus agalactiae*, β hemolitik streptokoklar ve Gram pozitif çomak gibi bakteriler üzerine 48 saat sonra bakteriyostatik ve bakterisid etki gösterdiği görülmüştür (18). Larvaların salgıladığı; proteolitik enzimler ve anti-bakteriyel aktiviteye sahip maddeler yaradaki bakterileri eriterek, öldürerek veya üremesini durdurarak yarayı dezenfekte ederler (19, 20).

Hastanın yarısından alınan ilk materyalde trimetoprim+sulfametoksazole dirençli *P. aeruginosa* üremiştir. Ancak bu antibiyotiğe devam edilmiş ve bittikten sonrada hastaya tekrar antibiyotik verilmemiştir. Hastanın yarasını tedavi etmek için sadece *L. sericata* sinek türüne ait I. evre larvalar kullanılmıştır. Yara üzerine serbest olarak konan hareketli larvalar, nekrotik alanlara tutunur ve nekrotik dokunun derinliklerine girerek yaranın oksijenlenmesini sağlar. Larvalar salgılarındaki birtakım proteolitik enzimler ile; nekrotik dokuları, yarada kolonize olmuş veya enfeksiyon oluşturan mikroorganizmaları erittiğinden ve yediğinden dolayı yarayı dezenfekte ederler. Üç seans larva tedavisi uygulandıktan sonra dördüncü seans uygulanmadan önce alınan materyalde ise normal deri florasında bulunabilen Gram pozitif difteroid çomakların üremiş, ancak *P. aeruginosa* ürememiştir.

SONUÇ

Hatalı enjeksiyon uygulaması birtakım hastalıkların ve sakatlıkların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Enjeksiyon doğru bir şekilde hemşire ve doktorlar gibi insan anatomisini bilen sağlık personeli tarafından uygun teknikle yapılmalıdır. Uzun süre uygulanan vakum tedavisi, cerrahi debridman ve klasik tedavi yöntemleri ile iyileşmeyen enjeksiyon yarası 12 seans uygulanan LDT'si ile iki ayda tamamen iyileşmiştir. LDT, klasik tedavilere ve cerrahi debridman ile iyileşmeyen yaraların tedavisinde kullanılabilecek etkili ve ucuz bir yöntemdir.

Hasta Onamı: Yazılı hasta onamı bu çalışmaya katılan hastanın ailesinden alınmıştır.

Yazar Katkıları: Fikir - E.P., H.A., K.B.; Tasarım - E.P.; Denetleme - E.P.; Kaynaklar - E.P., H.A.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - H.A., K.B.; Analiz ve/veya Yorum - E.P.; Literatür Taraması - E.P.; Yazıyı Yazan - E.P., H.A., K.B.; Eleştirel İnceleme - E.P.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

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

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

Author Contributions: Concept - E.P., H.A., K.B.; Design - E.P.; Supervision - E.P.; Resources - E.P., H.A.; Data Collection and/or Processing - H.A., K.B.; Analysis and/or Interpretation - E.P.; Literature Search - E.P.; Writing Manuscript - E.P., H.A., K.B.; Critical Review - E.P.

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. Kadioğlu HH. Sciatic nerve injury due to drug injection: is it a complication? Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Derg 2004; 36: 65-70.

2. Malkin B. Are techniques used for intramuscular injection based on research evidence? *Nursing Times* 2008; 104: 48-51.
3. Potter PA, Perry AG. *Fundamentals of Nursing*. Philadelphia: Mosby/Year Book; 2009.
4. Tosun H. Drug management. *Hemşirelik Esasları. Hemşirelik Bilim ve Sanatı*. Ed. Aştı TA, Karadağ A. İstanbul: Akademi Basın ve Yayıncılık; 2012. p. 731-2.
5. Bulut Y, Ülger Z, Bulut S, Egemen A. Low foot following gluteal intramuscular drug injection: a case report. *Cocuk Sagligi ve Hastalıkları Derg* 2007; 50: 193-8.
6. Çetinkaya Uslusoy E, Taşçı Duran E, Korkmaz M. Safe injection applications. *Hacettepe Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Derg* 2016; 3: 50-7.
7. Unat EK, Samastı M. *Medical Entomology. Unat'ın Tıp Parazitolojisi, İnsanın Ökaryonlu Parazitleri ve Bunlarla Oluşan Hastalıkları*. Ed. Unat EK, Yücel A, Altaş K, Samastı M. 5. Baskı. İstanbul: Cerrahpaşa Tıp Fak Vakfı; 1995. p. 140-57.
8. Daldal N, Atambay M. Myiasis (Miyaz). *Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları*. Ed. Özcel MA. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği; 2007. p. 867-81.
9. Merdivenci A. [Myiasis insect]. *Tıbbi Entomoloji*. 3. Baskı. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi; 1981. p. 154-89.
10. Ferrar P. A Guide to the Breeding Habits and Immature Stages of Diptera Cyclorrhapha. In: Lyneborg, L. (Ed.), *Entomonograph*, vol. 8. Scandinavian Science Press, Leiden, Copenhagen. 1987: Part 1-2.
11. White GB. Myiasis. *Manson's Tropical Disease*. Bahr M. (ed) 20 th ed WB. Saunders co. 1996; 1526-32.
12. Polat E, Çakan H, İpek T. Maggot debridman tedavy (MDT). *Türk Aile Hek Derg* 2010; 14: 188-91. [CrossRef]
13. Huberman L, Gollop N, Mumcuoglu KY, Block C, Galun R. Antibacterial properties of whole body extracts and haemolymph of *Lucilia sericata* maggots. *J Wound Care* 2007; 16: 123-7. [CrossRef]
14. Thomas S, Andrews A, Jones M. The use of larval therapy in wound management. *J Wound Care* 1998; 7: 521-4. [CrossRef]
15. Sherman RA. A new dressing for use with maggot therapy. *Plast Reconstr Surg* 1997; 100: 451-6. [CrossRef]
16. Mumcuoglu KY, Miller J, Mumcuoglu M, Friger M, Tarshis M. Destruction of bacteria in the digestive tract of the maggot of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *J Med Entomol* 2001; 38: 161-6. [CrossRef]
17. Sağkal T, Edeer G, Özdemir C, Özen M, Uyanık M. Hemşirelik öğrencilerinin intramüsküler enjeksiyon uygulamalarına yönelik bilgileri. *Anadolu Hemşirelik ve Sağlık Bilimleri Derg* 2014; 17: 80-9.
18. Polat E. Maggot debridman tedavy (MDT). *Güncel yönleriyle kronik yara*. Ed. Topalan M, Aktaş Ş. 1. Baskı. İstanbul: İstanbul Tıp Fakültesi Kronik Yara Konseyi; 2010. p. 181-93.
19. Vistnes LM, Lee R, Ksander G. Proteolytic activity of blowfly larvae secretions in experimental burns. *Surgery* 1981; 90: 835-41.
20. Huberman L, Gollop N, Mumcuoglu KY, Breuer E, Bhusare SR, Shai Y, et al. Antibacterial substances of low molecular weight isolated from the blowfly, *Lucilia sericata*. *Med Vet Entomol* 2007; 21: 127-31. [CrossRef]

EXPERIMED

AIMS AND SCOPE

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

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

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

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

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

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

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

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

Experimed is an open access publication and the journal's publication model is based on Budapest Open Access Initiative (BOAI) declaration. Journal's archive is available online, free of charge at <http://experimed.istanbul.edu.tr/en/>. Experimed's content is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

Editor in Chief: Prof. Bedia Çakmakoğlu

Address: İstanbul University, Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine, Vakıf Gureba Avenue, 34093, Çapa, Fatih, İstanbul, Turkey

Phone: 0212-4142000-33305

Fax: 0212-5324171

E-mail: bedia@istanbul.edu.tr

Publisher: AVES

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

Phone: +90 212 217 17 00

Fax: +90 212 217 22 92

E-mail: info@avesyayincilik.com

Web page: avesyayincilik.com

EXPERIMED

AMAÇ VE KAPSAM

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

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

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

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

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

Derginin tüm masrafları İstanbul Üniversitesi tarafından karşılanmaktadır.

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

Experimed açık erişimli bilimsel bir dergi olup Budapeşte Açık Erişim Girişimi (BOAI) deklarasyonuna dayalı yayın modelini benimsemiştir. Derginin arşivine ücretsiz ve açık erişimli olarak http://experimed.istanbul.edu.tr/_bağlantısından ulaşılabilir. Experimed'in içeriği Creative Commons Atıf-GayriTicari 4.0 lisansı ile lisanslanmaktadır.

Baş Editör: Prof. Dr. Bedia Çakmakoğlu

Address: İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Vakıf Gureba Caddesi, 34093, Çapa, Fatih, İstanbul, Türkiye

Phone: 0212-4142000-33305

Fax: 0212-5324171

E-mail: bedia@istanbul.edu.tr

Publisher: AVES

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

Phone: +90 212 217 17 00

Fax: +90 212 217 22 92

E-mail: info@avesyayincilik.com

Web page: avesyayincilik.com

EXPERIMED

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Context

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

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

Editorial Policy

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.

Peer-Review Policy

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

Ethical Principles

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.

Plagiarism

Experimed is extremely sensitive about plagiarism. All submissions are screened by a similarity detection software (iThenticate by CrossCheck) at any point during the peer-review or production process. Even if you are the author of the phrases or sentences, the text should not have unacceptable similarity with the previously published data.

When you are discussing others' (or your own) previous work, please make sure that you cite the material correctly in every instance.

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.

Authorship

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

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

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

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

EXPERIMED

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

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

Conflict of Interest

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

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

Copyright and Licensing

Experimed requires each submission to be accompanied by a Copyright License Agreement (available for download at <http://experimed.istanbul.edu.tr/en/>). When using previously published content, including figures, tables, or any other material in both print and electronic formats, authors must obtain permission from the copyright holder. Legal, financial and criminal liabilities in this regard belong to the author(s). By signing the Copyright License Agreement, authors agree that the article, if accepted for publication by the Experimed, will be licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC-BY-NC).

Disclaimer

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

MANUSCRIPT PREPARATION

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

Manuscripts can only be submitted through the journal's online manuscript submission and evaluation system, available at <http://experimed.istanbul.edu.tr/en/>. Manuscripts submitted via any other medium will not be evaluated.

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

Authors are required to submit the following:

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

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

Preparation of the Manuscript

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

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

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

Keywords: Each submission must be accompanied by a minimum of three to a maximum of six keywords for subject indexing at the

EXPERIMED

end of the abstract. The keywords should be listed in full without abbreviations. The keywords should be selected from the National Library of Medicine, Medical Subject Headings database (<https://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>).

Manuscript Types

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

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

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

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

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

Case Reports: There is limited space for case reports in the journal and reports on rare cases or conditions that constitute challenges in diagnosis and treatment, those offering new therapies or revealing knowledge not included in the literature, and interesting

and educative case reports are accepted for publication. The text should include Introduction, Case Presentation, Discussion, and Conclusion subheadings. Please check Table 1 for the limitations for Case Reports.

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

Table 1. Limitations for each manuscript type

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

EXPERIMED

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

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

Book Section: Suh KN, Keystone JS. Malaria and babesiosis. Gorbach SL, Barlett JG, Blacklow NR, editors. *Infectious Diseases*. Philadelphia: Lippincott Williams; 2004.p.290-308.

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

Scientific or Technical Report: Cusick M, Chew EY, Hoogwerf B, Agrón E, Wu L, Lindley A, et al. Early Treatment Diabetic Retinopathy

Study Research Group. Risk factors for renal replacement therapy in the Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS), Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Kidney Int: 2004. Report No: 26.

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

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

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

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

REVISIONS

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

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

Editor in Chief: Prof. Bedia Çakmakoğlu

Address: İstanbul University, Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine, Vakıf Gureba Avenue, 34093, Çapa, Fatih, İstanbul, Turkey
Phone: 0212-4142000-33305

Fax: 0212-5324171

E-mail: bedia@istanbul.edu.tr

Publisher: AVES

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

Phone: +90 212 217 17 00

Fax: +90 212 217 22 92

E-mail: info@avesyayincilik.com

avesyayincilik.com

EXPERIMED

YAZARLARA BİLGİ

İçerik

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

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

Yayın Politikası

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

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

Değerlendirme Süreci

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

Etik İlkeler

Klinik ve deneysel çalışmalar, ilaç araştırmaları ve bazı olgu sunumları için World Medical Association Declaration of Helsinki "Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects", (amended in October 2013, www.wma.net) çerçevesinde hazırlanmış Etik Komisyon raporu gerekmektedir. Gerekli görülmesi halinde Etik Komisyon raporu veya eşdeğeri olan resmi bir yazı yazarlardan talep edilebilir. İnsanlar üzerinde yapılmış deneysel çalışmaların sonuçlarını bildiren yazılarda, çalışmanın yapıldığı kişilere uygulanan prosedürlerin niteliği tümüyle açıklandıktan sonra, onaylarının alındığına ilişkin bir açıklamaya metin içinde yer verilmelidir. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda ise ağır, acı ve rahatsızlık verilmemesi için yapılmış olanlar açık olarak makalede belirtilmelidir. Hasta onamları, Etik Kurul raporun alındığı kurumun adı, onay belgesinin numara-

sı ve tarihi ana metin dosyasında yer alan Yöntemler başlığı altında yazılmalıdır. Hastaların kimliklerinin gizliliğini korumak yazarların sorumluluğundadır. Hastaların kimliğini açığa çıkarabilecek fotoğraflar için hastadan ya da yasal temsilcilerinden alınan imzalı izinlerin de gönderilmesi gereklidir.

Dergiye gönderilen makaleler, hakem değerlendirme sürecinde ya da yayına hazırlık aşamasında herhangi bir noktada bir benzerlik tespit yazılımı (CrossCheck, iThenticate) tarafından taranmaktadır. Cümleler ve ifadeler yazar olarak size ait olsa dahi, metnin daha önce yayınlanan verilerle kabul edilemez bir benzerliği olmalıdır.

Başkalarının önceki çalışmalarını (veya kendi çalışmalarınızı) tartışırken, lütfen materyali her durumda doğru bir şekilde alıntılarınızdan emin olunuz.

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

Yazarlık

Yazar olarak listelenen herkesin ICMJE (www.icmje.org) tarafından önerilen yazarlık kriterlerini karşılaması gerekmektedir. ICMJE, yazarların aşağıdaki 4 kriteri karşılamasını önermektedir:

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

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

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

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

EXPERIMED

değerlendirme süreçleri boyunca yazarlık ile ilgili tüm sorumluluğu kabul ettiğini bildiren kısa bir ön yazı göndermelidir.

Çıkar Çatışması

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

Bir çalışma için bir birey ya da kurumdan alınan her türlü finansal destek ya da diğer destekler Yayın Kurulu'na beyan edilmeli ve potansiyel çıkar çatışmalarını beyan etmek amacıyla ICMJE Potansiyel Çıkar Çatışmaları Formu katkı sağlayan tüm yazarlar tarafından ayrı ayrı doldurulmalıdır. Editörler, yazarlar ve hakemler ile ilgili 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. Yazarlar, itiraz ve şikayetleri için doğrudan Editöryel Ofis ile temasa geçebilirler. İhtiyaç duyulduğunda Yayın Kurulu'nun kendi içinde çözemediği konular için tarafsız bir temsilci atanmaktadır. İtiraz ve şikayetler için karar verme süreçlerinde nihai kararı Baş Editör verecektir.

Telif ve Lisans

Experimed, ilk gönderim sırasında http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/_adresinden indirilebilen Telif Hakkı Lisans Sözleşmesinin imzalanarak makale ile birlikte derginin çevrimiçi değerlendirme sistemine yüklenmesini zorunlu tutar. Yazarlar, Telif Hakkı Lisans Sözleşmesini imzalayarak, makalenin Experimed tarafından yayınlanmak üzere kabul edilmesi durumunda Creative Commons Atıf-GayriTicari 4.0 Uluslararası Lisansı (CC BY-NC) kapsamında lisanslanacağını kabul ederler.

Yazarlar, basılı ya da elektronik formatta yer alan resimler, tablolar ya da diğer her türlü içerik dahil daha önce yayınlanmış içeriği kullanırken telif hakkı sahibinden izin almalıdırlar. Bu konudaki yasal, mali ve cezai sorumluluk yazarlara aittir.

Sorumluluk Reddi

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

MAKALE HAZIRLAMA

Makaleler, ICMJE-Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals (updated in December 2015 - <http://www.icmje.org/icmje-recommendations.pdf>) ile uyumlu olarak hazırlanmalıdır. Randomize çalışmalar CONSORT, gözlemsel çalışmalar STROBE, 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 http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/_ adresinde yer alan derginin online makale yükleme ve değerlendirme sistemi üzerinden gönderilebilir. Diğer mecralardan gönderilen makaleler değerlendirilmeye alınmayacaktır.

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

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

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

- Makalenin başlığını ve 50 karakteri geçmeyen kısa başlığını,
- Yazarların isimlerini, kurumlarını, ORCID numaralarını ve eğitim derecelerini,
- Finansal destek bilgisi ve diğer destek kaynakları hakkında detaylı bilgiyi,
- Sorumlu yazarın ismi, adresi, telefonu (cep telefonu dahil ve e-posta adresini),
- Makale hazırlama sürecine katkıda bulunan ama yazarlık kriterlerini karşılamayan bireylerle ilgili bilgileri içermelidir.

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

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

Makale Türleri

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

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

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

Editöryel Yorum: Dergide yayınlanan bir araştırmanın, o konunun uzmanı olan veya üst düzeyde değerlendirme yapan bir hakemi ta-

EXPERIMED

rafından 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 yansımış uzmanlar tarafından hazırlanmış yazılar değerlendirmeye alınır. Yazarları dergi tarafından da davet edilebilir. Bir bilgi ya da konunun klinikte kullanılması için vardığı son düzeyi anlatan, tartışan, değerlendiren ve gelecekte yapılacak olan çalışmalara yön veren bir formatta hazırlanmalıdır. Ana metin "Giriş", "Klinik ve Araştırma Etkileri" ve "Sonuç" bölümlerini içermelidir. Derleme türündeki yazılarla ilgili kısıtlamalar için lütfen Tablo 1'i inceleyiniz.

Olgü Sunumu: Olgü 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", "Olgü Sunumu", "Tartışma" ve "Sonuç" alt başlıklarını içermelidir. Olgü Sunumlarıyla ilgili kısıtlamalar için lütfen Tablo 1'i inceleyiniz.

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

Tablolar

Tablolar ana dosyaya eklenmeli, kaynak listesi sonrasında sunulmalı, ana metin içerisindeki geçiş sıralarına uygun olarak numaralandırılmadadır. 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 300DPI olmalıdır. Değerlendirme sürecindeki aksaklıkları önlemek için gönderilen bütün görsellerin çözünürlüğü net ve boyutu büyük (minimum boyutlar 100x100 mm) olmalıdır. Resim altyazıları ana metnin sonunda yer almalıdır.

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

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

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

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

Kaynaklar

Atıf yapılırken en son ve en güncel yayınlar tercih edilmelidir. Kaynakların doğruluğundan yazarlar sorumludur. Kaynaklar Vancouver referans stiline uygun olarak hazırlanmalıdır. Atıf yapılan erken çevrimiçi makalelerin DOI numaraları mutlaka sağlanmalıdır. 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 Arapik numaralar kullanılmalıdır. Farklı yayın türleri için kaynak stilleri aşağıdaki örneklerde sunulmuştur:

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

Tablo 1. Makale türleri için kısıtlamalar

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

EXPERIMED

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

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

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

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

Bilimsel veya teknik rapor: Smith P. Golladay K. Payment for durable medical equipment billed during skilled nursing facility stays. Final report. Dallas (TX) Dept. of Health and Human Services (US). Office of Evaluation and Inspections: 1994 Oct. Report No: HHSI-GOE 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 atrial thrombus. Anadolu Kardiyol Derg 2012 Dec 26. doi: 10.5152/akd.2013.062. [Epub ahead of print]

Elektronik formatta yayınlanan yazı: Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. Emerg Infect Dis (serial online) 1995

Jan-Mar (cited 1996 June 5): 1(1): (24 screens). Available from: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/cid.htm>.

REVİZYONLAR

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

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

Baş Editör: Prof. Dr. Bedia Çakmakçoğlu

Address: İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Vakıf Gureba Caddesi, 34093, Çapa, Fatih, İstanbul, Türkiye
Phone: 0212-4142000-33305
Fax: 0212-5324171
E-mail: bedia@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