

Fare primer neonatal kardiyomyoblast hücreleri (IM, 20x ve 10x). Orijinal fotoğraflar, Dr. Öğr. Üyesi Bilge Özsaat Selçuk'un izni ile yayınlamıştır.

## ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

### Frequency of HLA-Class I Allel in Patients with Spondyloarthropathy

*Spondiloartropatili Hastalarda HLA Sınıf I Allel Sıklığı*

### Kardiyomyoblast Hücre Regülasyonunda Taube Nuss Geninin Fonksiyonel Analizi

*Functional Analysis of Taube Nuss Gene in the Regulation of Cardiomyoblast Cells*

## DERLEME MAKALESİ / REVIEW ARTICLE

### Nargile Kullanımında Riskler, Tehditler ve Önleyici Yaklaşımlar

*The Risks, Threats and Preventive Approaches in the Use of Water Pipes*

### Kardiyovasküler Hastalıklarda Uzun Kodlamayan RNA'lar ve Sirküler RNA'ların Önemi

*The Importance of Long Noncoding RNAs in Cardiovascular Diseases*

### Nadir Faktör Eksikliklerinde Ayırıcı Tanı

*Differential Diagnosis in Rare Coagulation Disorders*





# SABIAD

SAĞLIK BİLİMLERİNDE İLERİ ARAŞTIRMALAR DERGİSİ

e-ISSN:2651-4060

JOURNAL OF ADVANCED RESEARCH IN HEALTH SCIENCES

Ekim / October 2019  
Cilt / Volume 2  
Sayı / Issue 3



# SABIAD

SAĞLIK BİLİMLERİNDE İLERİ ARAŞTIRMALAR DERGİSİ  
JOURNAL OF ADVANCED RESEARCH IN HEALTH SCIENCES

Ekim/October 2019, Cilt/Volume 2, Sayı/Issue 3

e-ISSN:2651-4060

## Sahibi / Sorumlu Müdür

### Ownership / Director

Zeynep Karakaş  
İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü  
Director of Istanbul University Institute of Health Sciences

## Baş Editör / Editor in Chief

Zeynep Karakaş

## Editör Yardımcıları / Associate Editors

Ümmühan İšoğlu Alkaç  
Volkan Arısan  
Ayşe Evrim Bayrak  
Meryem Sedef Erdal  
İlhan İlkılıç  
Kıvanç Bektaş Kayhan  
Müge Sayitoğlu

## Bilimsel Sekreteryası / Scientific Secretariat

Yasin Yılmaz  
Aslı Gürbüz

## İstatistik Danışmanı / Statistics Editor

Eray Yurtseven

## Dil Editörleri / Language Editors

Alan James Newson, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Türkiye  
Elizabeth Mary Earl, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Türkiye

## Editöryal Ofis / Editorial Office

Birgül Taştemir  
Safiye Özkan Sarılı

## Yazışma Adresi / Correspondence Address

İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Bozdoğan Kemerli Cad. No:8 Vezneciler Hamamı Sk.  
Vezneciler, Fatih 34126 İSTANBUL  
Telefon / Phone: +90 (212) 440 00 00 (11280)  
Faks / Fax: +90 (212) 414 30 16  
E-mail: sabiad@istanbul.edu.tr  
https://dergipark.org.tr/sabiad

## Yayıncı Kuruluş / Publishing Company

İstanbul Üniversitesi Yayınevi / Istanbul University Press İstanbul  
Üniversitesi Merkez Kampüsü, 34452 Beyazıt,  
Fatih / İstanbul, Türkiye  
Telefon / Phone: +90 (212) 440 00 00

## Editör Kurulu/Editorial Board

Rengin Acaroğlu (İstanbul/Türkiye)  
Ahmet Araman (İstanbul/Türkiye)  
Gamze Aren (İstanbul/Türkiye)  
Ahmet Ataş (İstanbul/Türkiye)  
Arzu Funda Bağcıgil (İstanbul/Türkiye)  
Alper Baran (İstanbul/Türkiye)  
Sevim Buzlu (İstanbul/Türkiye)  
Erdal Cevher (İstanbul/Türkiye)  
Tülin Çağatay (İstanbul/Türkiye)  
Mustafa Demir (İstanbul/Türkiye)  
Tamer Demiralp (İstanbul/Türkiye)  
Mübeccel Demirkol (İstanbul/Türkiye)  
Günnur Deniz (İstanbul/Türkiye)  
Birsal Sönmez Uydeş Doğan (İstanbul/Türkiye)  
Sait Mesut Doğan (İstanbul/Türkiye)  
Bilge Donuk (İstanbul/Türkiye)  
Burak Erman (İstanbul/Türkiye)  
Melek Nihal Esin (İstanbul/Türkiye)  
Hakan Ertin (İstanbul/Türkiye)  
Sönmez Fıratlı (İstanbul/Türkiye)  
Godoberto Guevara-Rojas (Viyana/ Avusturya)  
Ahmet Gül (İstanbul/Türkiye)  
Amid Ismail Dean (Philadelphia/Abd)  
Christine Hauskeller (Exeter/ İngiltere)  
Alev Akdoğan Kaymaz (İstanbul/Türkiye)  
Nevin Kanan (İstanbul/Türkiye)  
Ahmet Kizir (İstanbul/Türkiye)  
Dildar Konukoğlu (İstanbul/Türkiye)  
Afife Mat (İstanbul/Türkiye)  
Eitan Mijiritsky (İstanbul/Türkiye)  
Hans-Martin Sass (Bochum/ Almanya)  
Fuat Oduncu (Münih/ Almanya)  
Vedat Onar (İstanbul/Türkiye)  
İlhan Onaran (İstanbul/Türkiye)  
Özen Doğan Onur (İstanbul/Türkiye)  
Semra Özdemir (İstanbul/Türkiye)  
İlgin Özden (İstanbul/Türkiye)  
Emine Akalin Uruşak (İstanbul/Türkiye)  
Yağız Üresin (İstanbul/Türkiye)  
Erdem Tüzün (İstanbul/Türkiye)  
Funda Yalçın (İstanbul/Türkiye)  
T. Mesud Yelbuz (Riyad/S. Arabistan)  
Onur Geçkili (İstanbul/Türkiye)  
Eray Yurtseven (İstanbul/Türkiye)  
Eda Yılmaz Alarçin (İstanbul/Türkiye)  
Fatemah Bahadori (İstanbul/Türkiye)

Dergide yer alan yazılardan ve aktarılan görüşlerden yazarlar sorumludur.  
*Papers and the opinions in the Journal are the responsibility of the authors.*

Şubat, Haziran ve Ekim aylarında, yılda üç sayı olarak yayınlanan hakemli, açık erişimli ve bilimsel bir dergidir.  
*This is a scholarly, peer-reviewed, open-access journal published three times a year in February, June and October.*

**Yayın Türü / Publication Type:** Yerel Süreli yayın, yılda üç kez yayınlanır. / *Periodical publication, published three times a year.*

## **Editörden**

İstanbul Üniversitesi yayınlarından biri olan Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi (SABİAD), Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün süreli yayını olarak yeni bir ekiple yayın hayatına devam ediyor. Bilgi paylaşıldıkça çoğalan, yazıldıkça yayılan bir zenginliğimizdir. Hocalarımızın dediği gibi; Hatırda kalmaz, satırda kalır. Sağlık Bilimleri Enstitüsü İstanbul Üniversitesi'nin Sağlık Bilimlerindeki Lisansüstü Eğitiminden sorumludur. Enstitümüzün amacı yaratıcı bilimsel düşünceye sahip alanında yetkin bilim insanları yetiştirmektir. 1982 yılında kurulan Enstitümüzde İstanbul Tıp, Eczacılık ve Diş Hekimliği Fakülteleri ile Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma, Onkoloji ve Çocuk Sağlığı Enstitülerine bağlı 47 anabilim dalında 52'si doktora olmak üzere 120 yüksek lisans programında lisansüstü eğitim verilmektedir. Bugüne kadar enstitümüzden 6153 yüksek lisans ve doktora öğrencisi mezun olmuştur. Yüksek Lisans ve doktora tezlerinden yayın yapmak eğitimin de bir parçasıdır. Çünkü tezi makaleye dönüştürmek, öğrenci için en öğretici aşamalardan biridir ve bir araştırma ancak yayımlandıktan sonra tam olarak bitmiş sayılır. SABİAD, lisansüstü öğrenim gören tüm öğrenciler için yayın yapabilecekleri iyi bir alternatif oluşturmayı hedefliyor. Sevgili gençler derginiz SABİAD yayınlarınızı bekliyor! Geleceğin bilim insanlarına sevgi ve saygılarımızla!

Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi Editörü

**Prof Dr Zeynep Karakaş**



## İÇİNDEKİLER / CONTENTS

---

<b>Frequency of HLA-Class I Allel in Patients with Spondyloarthropathy.....</b>	<b>93</b>
<i>Spondiloartropatili Hastalarda HLA Sınıf I Allel Sıklığı</i>	
Çiğdem Kekik Çınar, Sonay Temurhan, Sebahat Akgül Usta, Filiz Aydın	
<b>Kardiyomiyoplast Hücre Regülasyonunda Taube Nuss Geninin</b>	
<b>Fonksiyonel Analizi .....</b>	<b>98</b>
<i>Functional Analysis of Taube Nuss Gene in the Regulation of</i>	
<i>Cardiomyoplast Cells</i>	
Ayşe Berna Yüzbaşıoğulları, Bilge Özsait Selçuk, Evrim Kömürcü Bayrak, Nihal Erginel Ünaltuna	
<b>Nargile Kullanımında Riskler, Tehditler ve Önleyici Yaklaşımlar .....</b>	<b>105</b>
<i>The Risks, Threats and Preventive Approaches in the Use of Water Pipes</i>	
Safiye Özkan Sarılı	
<b>Kardiyovasküler Hastalıklarda Uzun Kodlamayan RNA'lar ve</b>	
<b>Sirküler RNA'ların Önemi .....</b>	<b>115</b>
<i>The Importance of Long Noncoding RNAs in Cardiovascular Diseases</i>	
Hilal Şentürk, Evrim Kömürcü Bayrak	
<b>Nadir Faktör Eksikliklerinde Ayırıcı Tanı .....</b>	<b>126</b>
<i>Differential Diagnosis in Rare Coagulation Disorders</i>	
Mustafa Bilici, Serap Karaman	

## Frequency of HLA-Class I Allel in Patients with Spondyloarthropathy

### Spondiloartropatili Hastalarda HLA Sınıf I Allel Sıklığı

Çiğdem Kekik Çınar<sup>1</sup> , Sonay Temurhan<sup>2</sup> , Sebahat Akgül Usta<sup>3</sup> , Filiz Aydın<sup>4</sup> 

#### ABSTRACT

Spondyloarthropathy (SpA) is a group of multi-systemic diseases, whose pathogenesis is not known, characterized by spinal inflammation, peripheral arthritis, and with a lower frequency by extra-articular involvement. Brevverton and Schlosstein introduced the relationship between HLA-B27 and the disease. Along with HLA-B27, the relationship of the disease with other HLA molecules was also shown in studies. Taking this information as a starting point and knowing that the disease is related to ethnic differences, we aimed to investigate the role of the HLA-A and -B alleles in Turkish patients with SpA. Typing of the patients (n=784) was performed by the complement-dependent lymphotoxicity method. The HLA-A and -B tissue groups of the control group (n: 1060) were determined by using serological or molecular methods. The frequency of HLA-B27 in patients was determined as 27%. When B27-negative patients were compared with B27-negative controls, HLA-A29 was found significantly higher in the patients (p: 0.0003, pc: 0.004). Although HLA-B60 was found significantly higher in the patients (p: 0.02), a statistical significance could not be obtained after performing the Bonferroni correction method (pc>0.05). When B27-positive patients and controls were compared, HLA-A3 (p:0.0005, pc:0.008), HLA-B35 (P<0.0001, pc<0.003), HLA-B51 (P<0.0001, pc<0.003), and HLA-B52 (P<0.0001, pc:0.03) were found significantly higher in the control group, while HLA-B27 allele is related with the development of the disease. It has been shown in other studies that other HLA molecules together with ethnic differences may have an effect in liability to and protectiveness from the disease.

**Keywords:** HLA, Spondyloarthropaty, HLA-B27

#### Öz

Spondiloartropati (SpA), spinal inflamasyon ve periferik artrit ile daha az oranda da eklem dışı tutulumla karakterize, patogenezi henüz tam olarak bilinmeyen multisistemik bir grup hastalıktır. Genetik faktörlerin hastalığın gelişiminde önemli rolü vardır. 1973 yılında Brevverton ve Schlosstein, HLA-B27 ile hastalık ilişkisini ortaya çıkarmıştır. HLA-B27 ile birlikte diğer HLA moleküllerinin (DR1, DR4, DR8, DR15, A24, B39 ve B60) hastalıkla ilişkisi yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu bilgilerden yola çıkarak ve etnik farklılığın da hastalıkla ilişkili olduğunu düşünerek SpA'lı Türk hastalarda HLA-A ve -B allellerinin rolünü araştırmayı amaçladık. Hastalardan (n=784) heparinli kan örneği alındı. Lenfosit izolasyonunu takiben komplemana bağımlı lenfositotoksosite yöntemi ile ticari kitler (Biotest-HLA-ABC tiplene plağı, 144X2, USA) kullanılarak tiplene yapıldı. Kontrol grubunun (n:1060) HLA-A ve -B doku grupları, serolojik veya moleküler yöntemler kullanılarak tespit edildi. Hastalarda HLA-B27 sıklığı %27 olarak saptandı. B27 negatif hastalar ile B27 negatif kontroller karşılaştırıldığında, hastalarda HLA-A29 anlamlı olarak yüksek bulundu (p:0.0003, pc:0.004, OR:2.6, CI:1.5-4.4). HLA-B60 hastalarda anlamlı olarak yüksek (p:0.02, OR:0.5, CI:0.2-0.9) bulunmasına rağmen Bonferroni doğrulama testi sonrası istatistiksel anlamlılık elde edilemedi (pc>0.05). B27 pozitif hastalarla kontrolleri karşılaştırdığımızda HLA-A3 (p:0.0005, pc:0.008, OR:0.4, CI:0.3-0.7), HLA-B35 (p<0.0001, pc<0.003, OR:0.3, CI:0.2-0.4), HLA-B51 (P<0.0001, pc<0.003, OR:0.3, CI:0.2-0.6) ve HLA-B52 (p:0.001, pc:0.03, OR:0.04, CI:0.002-0.7) kontrol grubunda, HLA-B27 (p<0.0001, pc<0.003, OR:52, CI:36.2-74.7) ise hasta grubunda anlamlı olarak yüksek bulundu. Patogenezi tam olarak bilinmeyen SpA'ların gelişiminde genetik faktörlerin rolü büyüktür. HLA-B27 allelinin hastalığın gelişimi ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Etnik farklılıklarla birlikte diğer HLA moleküllerinin de hastalığa karşı yatkınlık ve koruyuculukta etkili olabileceği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** HLA, Spondiloartropati, HLA-B27

<sup>1</sup> Ph.D, 2PhD, 3PhD, 4 Prof., Istanbul University, Istanbul Medical Faculty, Department of Medical Biology Istanbul, Turkey

ORCID: Ç.K.Ç. 0000-0003-2098-381X;  
S.T. 0000-0001-9889-9330;  
S.A.U. 0000-0003-0176-3344;  
E.A. 0000-0001-5984-7538

#### Sorumlu yazar/Corresponding author:

Çiğdem Kekik Çınar,  
Istanbul University, Istanbul Medical Faculty,  
Department of Medical Biology Istanbul, Turkey  
E-posta: citcim@gmail.com

**Başvuru/Submitted:** 29.11.2019

**Revizyon Talebi/Revision Requested:** 12.12.2019

**Son Revizyon/Last Revision Received:** 12.12.2019

**Kabul/Accepted:** 16.12.2019

**Atıf/Citation:** Kekik Çınar C, Temurhan S, Akgül Usta S, Aydın F. (2019): Frequency of HLA-Class I Allel in Patients with Spondyloarthropathy, *Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi*, 2(3): 93-97. <https://doi.org/10.26650/JARHS2019-652926>

## INTRODUCTION

Spondyloarthritis (SpA) is a heterogeneous multisystemic disease which is characterized by spinal inflammation, peripheral arthritis and extra-articular involvement which include ankylosing spondylitis (AS) and reactive arthritis (ReA). Its pathogenesis has not yet fully known, however, genetics is an important factor in this disease group. Gender, onset of age and ethnic differences affect the clinical presentation of the disease (1-5).

An association between HLA-B27 and AS was first reported in 1973 (6,7). There is a strong association between HLA-B27 and SpA. Studies showed that HLA-B\*2705 is the most common subgroup (1,8-11). The frequency of HLA-B27 is 70-90% in patients with AS (12).

HLA-B27 positive individual's chance of having these diseases is 30 to 100 times higher than HLA-B27 negative (8). Studies showed that not only B27, but other HLA molecules (DR1, DR4, DR8, DR15, A24, B7, B39 and B60) are associated with SpA (13-20). The HLA-B27 molecule is related with uveitis, familial Mediterranean fever (FMF) and Behcet' disease (22-24).

In this study, we aimed to investigate the association of HLA class I in Turkish patients with SpA.

## MATERIAL AND METHOD

### Patient and control group:

5248 patients (F/M: 2646/2602, mean age: 37±14 years) with spondyloarthritis preliminary diagnosis and 1060 healthy controls (F/M: 441/619, mean age: 36±14 years) who are unrelated were included for HLA Class I typing between 2000 and 2018 in this study. All tests of the patient and control groups were carried out by XXX, accredited by the European Federation of Immunogenetics (EFI-European Federation for Immunogenetics).

### HLA-B27 typing:

We used two different methods for HLA typing:

#### 1. Molecular method:

DNA (n=4464) was extracted from the whole peripheral blood with EDTA (25). HLA genotyping

was performed by PCR-SSP (26) with Olerup HLA B27 typing kit. The results were evaluated as negative or positive.

#### 2. Serologic method:

Lymphocytes (n=784) were isolated from the whole peripheral blood with heparine. HLA typing was performed by complement dependent cytotoxicity (CDC) with Biotest,144X2, USA HLA-ABC typing plate (27).

HLA-A and -B tissue type of the control group was detected by serologic or molecular method.

#### Statistical Analysis

Statistical analyses were performed by SPSS 12.0 software. Frequencies and percentage (%) ratios of HLA were calculated. Chi-square and Fisher's exact test were applied to compare the number of cases and controls who were positive for a specific antigen. *p* values less than 0.05 were considered as significant. Corrected *p* value (*p<sub>c</sub>*) was obtained by multiplying the *p* value by the number of antigens tested for each locus (16 for HLA-A, 32 for HLA-B) according to Bonferroni's correction.

## RESULTS

Demographic characteristics of the patients (n:5248; mean age: 37±14 [range:2-87] years; F/M: 2646/2602) and controls (n:1060; mean age: 35±14 [range:1-86] years; F/M: 441/619) are shown in Table 1.

HLA-B27 positive individual was detected in 4% of the control group while 27% of patients (n=5248) were positive. Frequency of HLA-B27 in the patient group was more than seven times that of the control group, and this difference was highly statistically significant (*p*<0.0001, OR:0.11, CI:0.08-0.15) (Table 1). 27% of HLA-B27 negative patients were male while 62% of HLA-B27 positive patients, and this difference was highly statistically significant (*p*<0.0001, OR:1.95, CI:1.7-2.2). Diagnosed patients with spondyloarthritis were 84% and 16% of patients who have similar clinical findings (FMF %1, uveitis %7 and Behcet's disease %8).

We performed HLA Class I typing by CDC in 15% of patients (n:784; mean age: 34±14 [range:4-77]



years; F/M: 390/394) and HLA B27 was found positive in 27% (n:211) of this patients.

We divided the patients into two groups (Group I: ReA ve AS, Group II: Behcet'disease, FMF, Uveitis). We detected 27% HLA-B27 in both groups. When we compared B27 negative patients and controls, A29 was found significantly high in patients ( $p:0.0003$ ,  $pc:0.004$ ,  $OR:2.6$ ,  $CI:1.5-4.4$ ). Although HLA-B60 was found significantly high ( $p:0.02$ ,  $OR:0.5$ ,  $CI:0.2-0.9$ ) in patients, the difference remained significant after Bonferroni correction ( $p_c>0.05$ ).

When we compared B27 positive group I patients and controls, HLA-A3 ( $p:0.0005$ ,  $pc:0.008$ ,  $OR:0.4$ ,  $CI:0.3-0.7$ ), HLA-B35 ( $p<0.0001$ ,  $pc<0.003$ ,  $OR:0.3$ ,  $CI:0.2-0.4$ ), HLA-B51 ( $P<0.0001$ ,  $pc<0.003$ ,  $OR:0.3$ ,  $CI:0.2-0.6$ ) and HLA-B52 ( $p:0.001$ ,  $pc:0.03$ ,  $OR:0.04$ ,  $CI:0.002-0.7$ ) was found significantly high in controls and HLA-B27 ( $p<0.0001$ ,  $pc<0.003$ ,  $OR:52$ ,  $CI:36.2-74.7$ ) in the patients group.

When we compared B27 negative group II patients and controls, HLA-B55 ( $p:0.0002$ ,  $pc:0.006$ ,  $OR:6.5$ ,  $CI:2.4-17.5$ ) was found significantly high in patients with FMF. When we compared B27 positive group II patients and controls, HLA-B27 ( $p<0.0001$ ,  $pc<0.003$ ) was found significantly high in patients with FMF, Behcet' disease and uveitis.

The most frequent HLA antigens distribution was like that:

- HLA-A locus: HLA-A2 (n:484, %23), HLA-A24 (n:379, %18) and HLA-A3 (n:277, %13);
- HLA-B locus: HLA-B35 (n:422, %20), HLA-B51 (n:317, %15) and HLA-B44 (n:155, %7)

## DISCUSSION

Spondyloarthropathies are characterised by inflammation of the vertebrae, peripheral joints and periarticular tissues. Diseases in this group present with similar clinical features. Ankylosing spondylitis and reactive arthritis are located in this group. Uveitis, FMF and Behcet' disease are called the non-classified spondyloarthropathies. Since the 1970s, it has been shown that HLA-B27 is remarkably associated with the disease (6,7,28-30). In our study, we found statistically significant HLA-B27 in both group. HLA

frequency of the healthy group was concordant with Turkish population's HLA frequency (31,32).

In studies, an association was shown between SpA and non-classified SpA and HLA alleles. HLA-B60 and -B61 were found associated in HLA-B27 negative patients with SpA of the Taiwan population, HLA-B15 was found associated in the Mexico population with SpA and non-classified SpA in HLA-B27 of negative patients (29,33). In contrast, Deveraj et al. showed the frequency of HLA-B40 was significantly decreased (21). In our study, HLA-A29 was detected significantly high in B27 negative patients with SpA. We think that this allele may be associated with susceptibility to the disease. B60 was found significantly high in HLA-B27 negative patients with SpA, in spite of the significance that remained with the Bonferroni test.

In studies, A3 was found high in HLA-B27 positive patients with SpA of the Tunis population (34). In the India population, HLA-A1 was detected low in patients (30). Pimentel-Santos et al. detected that A36, A69, B42, B52 and B78 were only identified in controls. Furthermore, frequencies of A31 and B8 were increased in AS patients (35). In our study, we showed the frequency of HLA-A3, -B35, -B51 and -B52 as significantly low in patients. HLA-A3, -B35 and -B51 were seen at high frequency, while the frequency of B52 was low in the Turkish population. We think that B52 may be protective against the disease, nonetheless, we should not ignore that B52 and B51 were the cross reactive antigens in serological method.

Genetic factors are important in the development of the non-classified SpAs such as FMF, uveitis and Behcet's disease. In this study, B55 was found significantly high in B27 negative patients with FMF. But our number of FMF patients is too low, so we think that the number of patients should be increased.

Studies showed that gender differences are important in clinical findings (29,34). Consistent with the literature in this study, there are many more men than women in the B27 positive patients.

In conclusion, the role of genetic factors is important in the development of SpA whose pathogenesis is not exactly known. The HLA-B27

allele is known to be associated with the development of the disease. Other HLA molecules with ethnic differences have been shown in studies to be effective in susceptibility and protection against the disease.

**Yazar Katkıları:** Çalışma Konsepti/Tasarım- Ç.K.Ç., F.A.; Veri Toplama- S.T, S.A.U.; Veri Analizi/ Yorumlama- Ç.K.Ç., S.T., S.A.U., F.A.; Yazı Taslağı- Ç.K.Ç., S.T., S.A.U.; İçeriğin Eleştirilme İncelemesi- Ç.K.Ç., F.A.; Son Onay ve Sorumluluk- Ç.K.Ç., S.T., S.A.U., F.A.

**Author Contributions:** Conception/Design of Study- Ç.K.Ç., F.A.; Data Acquisition- S.T., S.A.U.; Data Analysis/Interpretation- Ç.K.Ç., S.T., S.A.U., F.A.; Drafting Manuscript- Ç.K.Ç., S.T., S.A.U.; Critical Revision of Manuscript- Ç.K.Ç., F.A.; Final Approval and Accountability- Ç.K.Ç., S.T., S.A.U., F.A.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir

**Conflict of Interest:** Authors declared no conflict of interest.

## REFERENCES

1. Kahn MA. HLA-B27 subtypes in world populations. *Curr Opin Rheumatol* 1995;7:263.
2. Chopra A, Raghunath D, Singh A. Spectrum of seronegative arthropathies (SSA) with special reference to HLA profiles. *J Assoc Phys India* 1990;38:351-5.
3. Lau CS, Burgos-Vargas R, Louthrenoo W, Mok MY, Wordsworth P, Zheng QY. Features of spondyloarthropathies around the world. *Rheum Dis Clin North Am* 1998;24:753-70.
4. Lopez de Castro JA. HLA-B27 and the pathogenesis of spondyloarthropathies. *Immunol Lett* 2006;15:27-33.
5. Reveille JD, Arnett FC. Spondyloarthritis: update on pathogenesis and management. *Am J Med* 2005;118:592-603.
6. Brewerton DA, Caffrey M, Hart FD et al. Ankylosing spondylitis and HLA-B27. *Lancet* 1973;1:904-7.
7. Schlostein L, Terasaki PI, Bluestone R, Pearson CM. High association of an HLA antigen, BW27, with ankylosing spondylitis. *N Engl J Med* 1973;288:704-6.
8. Gonzales-Roces S, Alvarez MV, Gonzales S et al. HLA-B27 polymorphism and worldwide susceptibility to ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens* 1997;49:116-2.
9. Nasution AR, Mardjuadi A, Kunmartini S, Suryadhana NG et al. HLA-B27 subtypes positively and negatively associated with spondyloarthropathy. *J Rheumatol* 1997;24:1111-4.
10. Oguz FS, Ocal L, Diler AS, Ozkul H, Asicioglu F, Kasapoglu E, Bozkurt G, Konice M, Carin M. HLA B-27 subtypes in Turkish patients with spondyloarthropathy and healthy controls. *Dis Markers*. 2004;20(6):309-12.
11. Abualrous ET, Fritzsche S, Hein Z, Al-Balushi MS, Reinink P, Boyle LH, Wellbrock U, Antoniou AN, Springer S. F pocket flexibility influences the tapasin dependence of two differentially disease-associated MHC Class I proteins. *Eur J Immunol*. 2015 Jan 23. doi: 10.1002/eji.201445307.
12. Gunal EK, Sarvan FO, Kamali S, Gul A, Inanc M, Carin M, Konice M, Aral O, Ocal L. Low frequency of HLA-B27 in ankylosing spondylitis patients from Turkey. *Joint Bone Spine*. 2008 May;75(3):299-302.
13. Toussiro E, Wendling D. Immunogenetic of ankylosing spondylitis. *Rev Med Interne* 2006;27:762-71.
14. Brown MA, Kennedy GL, Darke C, Gibson K, Pile KD, Shatford JL, et al. The effect of HLA-DR genes on susceptibility to and severity of ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 1998;41:460-5.
15. Miehle W, Schattenkirchner M, Albert D, Bunge M. HLA-DR4 in ankylosing spondylitis with different patterns of joint involvement. *Ann Rheum Dis* 1985;44:39-44.
16. Robinson WP, Van Der Linden SM, Khan MA, Rentsch HU, Cats A, Russell A, et al. HLA-Bw60 increases susceptibility to ankylosing spondylitis in HLA-B27 + patients. *Arthritis Rheum* 1989;32:1135-41.
17. De Juan MD, Reta A, Cancio J, Belzunegui J, Cuadrado E. HLA-A\*9, a probable secondary susceptibility marker to ankylosing spondylitis in Basque patients. *Tissue Antigens* 1999;53:161-6.
18. Islam SM, Numaga J, Fujino Y, Masuda K, Ohda H, Hirata R, et al. HLA-DR8 and acute anterior uveitis in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 1995;38:547-50.

19. Vargas-Alarcón G, García A, Bahena S, Melín-Aldana H, Andrade F, Ibañez-de-Kasep G, et al. HLA-B and complotypes in Mexican patients with seronegative spondyloarthropathies. *Ann Rheum Dis* 1994;53:755–8.
20. Maksymowych WP, Gorodezky C, Olivo A, Alaez C, Wong C, Burgos-Vargas R, et al. HLA-DRB1\*08 influences the development of disease in Mexican mestizo with spondyloarthropathy. *J Rheumatol* 1997;24:904–7.
21. Parasannanavar DJ, Rajadhyaksha A, Ghosh K. Role of HLA-B Alleles and Clinical Presentation of B27 Negative Spondyloarthritis Patients from Mumbai, Western India. *Autoimmune Dis.* 2014;2014:327315. doi: 10.1155/2014/327315.
22. Koehler L, Kuipers JG, Zeidler H. Managing seronegative spondyloarthritis. *Rheumatology* 2000;39:360-8.
23. Prete M, Guerriero S, Dammacco R, Fatone MC, Vacca A, Dammacco F, Racanelli V. Autoimmune uveitis: a retrospective analysis of 104 patients from a tertiary reference center. *J Ophthalmic Inflamm Infect.* 2014 Jul 24;4:17.
24. Radouane A, Oudghiri M, Chakib A, Naya A, Belhouari A, El Malki A, Bennani S. HLA-B\*27 allele associated to Behç, et's disease and to anterior uveitis in Moroccan patients. *Ann Biol Clin (Paris).* 2011 Jul-Aug;69(4):419-24.
25. Gustincich S, Manfiolett G, Del Sal G, Schneider C, Carninci P. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Bio Techniques* 1991;11:298-302.
26. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DRB1\*01 subtyping by allele-specific PCR amplification: A sensitive, specific and rapid technique. *Tissue Antigens* 1991;37:197-204.
27. Terasaki PI, McClelland JD. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 1964;204:998-1000.
28. Şendur ÖF, Aydeniz A. Spondiloartropatilerin temel özellikleri ve ayırıcı tanı ve tedavisinin genel kriterleri. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 2001;2(2);31-5.
29. Vargas-Alarcón G, Londono JD, Hernandez-Pacheco G, Pacheco-Tena C, Castillo E, Cardiel MH, Granados J, Burgos-Vargas R. Effect of HLA-B and HLA-DR genes on susceptibility to and severity of spondyloarthropathies in Mexican patients. *Ann Rheum Dis* 2002;61:714-7.
30. Madhavan R, Parthiban M, Panchapakesa Rajendran C, Chandrasekaran AN, Zake L, Sanjeevi B. HLA Class I and Class II association with Ankylosing spondylitis in a Southern Indian population. *Ann NY Acad Sci* 2002;958:403-7.
31. Arnais-Villena A, Carin M, Bendikuz N, Gomez-Casado E, Moscosa J, Oguz FS, Sarper Diler A, De Pacho A, Allende J, Guillen J, Martinez Laso J. HLA alleles and haplotypes in Turkish population: relatedness to Kurds, Armanians and other Mediterraneans. *Tissue Antigens* 2001;57(4);308-17.
32. Karahan GE, Seyhun Y, Oguz SF, Kekik C, Onal AE, Yazici H, Turkmen A, Aydın AE, Sever MS, Eldegez U, Carin MN. Impact of HLA on the underlying primary diseases in Turkish patients with end-stage renal disease. *Renal Failure* 2009;31:44-49.
33. Wei JCC, Tsai WC, Lin HS, Tsai CY, Chou CT. HLA-B60 and B61 are strongly associated with ankylosing spondylitis in HLA-B27 negative Taiwan Chinese patients. *Rheumatology* 2004;43:839-42.
34. Mahfoudh N, Siala M, Rihl M, Kammoun A, Frikha F, Fourati H, Younes M, Gdoura R, Gaddour L, Hakim F, Bahloul Z, Baklouti S, Bargaoui N, Sellami S, Hammami A, Makni H. Association and frequency of HLA-A, B and HLA-DR genes in south Tunisian patients with spondyloarthritis (SpA). *Clin Rheumatol* 2011; DOI 10.1007/s10067-011-1705-6
35. Pimentel-Santos FM, Matos M, Ligeiro D, Moura AF, Ribeiro C, Costa J, Santos H, Barcelos A, Pinto P, Cruz M, Sousa E, Santos RA, Fonseca JE, Trindade H, Guedes-Pinto H, Branco JC, CORPOREA Study Group. HLA alleles and HLA-B27 haplotypes associated with susceptibility and severity of ankylosing spondylitis in a Portuguese population. *Tissue Antigens*, 2013;82:374–379.

## Kardiyomiyoblast Hücre Regülasyonunda Taube Nuss Geninin Fonksiyonel Analizi

### Functional Analysis of Taube Nuss Gene in the Regulation of Cardiomyoblast Cells

Ayşe Berna Yüzbaşıoğulları<sup>1</sup> , Bilge Özsait Selçuk<sup>2</sup> , Evrim Kömürcü Bayrak<sup>3</sup> ,  
Nihal Erginel Ünaltuna<sup>4</sup> 

\* Bu çalışmanın sonuçları European Society of Human Genetics Conference 2013'de bildiri olarak sunulmuştur.

\* Bu çalışma "Subtractive cDNA Hibridizasyon Kütüphanesinden Seçilen Taube Nuss Geninin Fonksiyonel Analizi" adlı yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

<sup>1</sup> Uzm. Bio., <sup>2</sup>Doç. Dr., <sup>4</sup>Prof. Dr., İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup> Dr. Öğr. Üyesi., İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ORCID: A.B.Y.: 0000-0001-5235-997X;  
B.Ö.S.: 0000-0001-6808-6689  
E.K.B.: 0000-0003-1271-1208;  
N.E.Ü.: 0000-0003-0562-0455;

#### Sorumlu yazar/Corresponding author:

Bilge Özsait Selçuk,  
İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye  
E-posta: ozsaitb@istanbul.edu.tr

**Başvuru/Submitted:** 26.11.2019

**Revizyon Talebi/Revision Requested:** 29.11.2019

**Son Revizyon/Last Revision Received:** 04.12.2019

**Kabul/Accepted:** 04.12.2019

**Atıf/Citation:** Yuzbasiogullari AB, Ozsait-Selcuk B, Komurcu-Bayrak E, Unaltuna-Erginel N. Functional Analysis of Taube Nuss Gene in the Regulation of Cardiomyoblast Cells, *Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi*, 2(3): 98-104. <https://doi.org/10.26650/JARHS2019-651072>

#### Öz

Gelişim evrelerinin veya dokuya özgü fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde ve yürütülmesinde farklılaşmış gen ekspresyonu büyük önem taşımaktadır. "Subtractive" hibridizasyon yöntemi dokuya özgü ekspresyonu olan genlerin tespit edilmesi için oldukça etkin bir yöntemdir. Daha önceki çalışmalarda laboratuvarımızda BALB/c ırkı farelerde kalbe özgü ekspresyonu olan genleri içeren "Subtractive" hibridizasyon cDNA kütüphanesi oluşturulmuştur. Önemli bir transkripsiyon faktörü olan Taube Nuss (*Tbn*), bu kütüphaneden elde edilen genlerden birisidir. Bu çalışmadaki amacımız, *Tbn* geni ile ilişkili olduğu düşünülen diğer genlerin ekspresyonlarının araştırılması ve *Tbn* yolağının belirlenmesidir. Çalışma kapsamında BALB/c ırkı farelerden elde edilen kalp ve iskelet kası dokularına özgü *Tbn* geninin ekspresyonu Northern Blot analizi ile araştırılmıştır. Ardından, *Tbn* genine özgü siRNA'lar kullanılarak H9c2 rat kardiyomiyoblast hücre soyunda *Tbn* geni sessizleştirilmiştir. Yolak analizleri sonucunda *Tbn* ile ilişkili olabileceği tespit edilen *Pparg*, *Cebpa*, *Taf10* ve *Myocd* genlerinin sessizleştirilen hücrelerdeki ekspresyon değişimleri araştırılmıştır. Bu hücrelerde, *Myocd* gen ekspresyonunun azaldığı ve *Pparg* gen ekspresyonunun arttığı saptanmıştır. Bu sonuçlar, *Tbn* geninin kalp dokusunda düzenleyici bir rol oynadığını işaret etmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** siRNA, H9c2, *Tbn*, *Pparg*, *Taf10*

#### ABSTRACT

Differential gene expression is important in the regulation and maintenance of developmental stages and tissue specific physiological processes. The subtractive hybridization method is an efficient method for the detection of genes that have tissue specific expressions. In our previous work, our team had constructed a BALB/c mice heart tissue specific subtractive hybridization cDNA library. Taube Nuss (*Tbn*), which is a crucial transcription factor, is one of the genes that were isolated from this library. In this study, our aim was to analyze the expression of possible *Tbn* related genes and identify the *Tbn* pathway. In the scope of this study, the *Tbn* gene expression in BALB/c mice heart and skeletal tissue was analyzed with the Northern Blot technique. Then, the *Tbn* gene was silenced in H9c2 rat cardiomyoblast cell line using siRNA specific to the *TBN* gene. The gene expression levels of *Pparg*, *Cebpa*, *Taf10* and *Myocd* genes, which were possibly related to the *Tbn* pathway, were analyzed in silenced cells. We observed that the expression of the *Myocd* gene was decreased, whereas the expression of the *Pparg* gene was increased in these cells. These results suggest that the *Tbn* gene plays a regulatory role in cardiac tissue.

**Keywords:** siRNA, H9c2, *Tbn*, *Pparg*, *Taf10*

## GİRİŞ

Dokuya özgü farklılaşmış gen ekspresyonu, her dokunun kendisine özel işlevini gerçekleştirmesi ve organizmanın canlılığının sağlanması açısından kritik öneme sahiptir. Diğer yandan, dokuya özgü gen ekspresyonunda farklılıklar olması kardiyovasküler hastalıklar, kanser, diyabet gibi patolojik durumlara neden olabilmektedir.<sup>1,2</sup> Farklılaşmış gen ekspresyonunun belirlenmesi amacı ile çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden birisi olan “Subtractive” hibridizasyon yöntemi, dokular arasında farklı ekspresyonu olan genlerin tespit edilmesi için oldukça etkin bir yaklaşımdır.<sup>3,4</sup> Ekibimiz tarafından daha önce yürütülen çalışmalarda BALB/c ırkı fare kalbine özgü transkriptleri içeren “Subtractive” Hibridizasyon cDNA Kütüphanesi (SHK) oluşturulmuş ve takip eden çalışmalarda bu transkriptlerin kalp dokusundaki fonksiyonel rolleri araştırılmıştır.<sup>4-6</sup> Taube Nuss (*Tbn*) geni SHK'den elde edilen genlerden birisidir.

*Tbn* geni fare ve insanda korunmuş olan bir genidir ve embriyonik gelişimde önemli rolü bulunmaktadır.<sup>7,8</sup> In vitro çalışmalarda, *Tbn* geninin homozigot mutasyonunda embriyonik hücrelerin çoğalmasının engellendiği ve hücrelerin apoptoza girdiği gözlenmiştir.<sup>8,9</sup> Bu genin insan homoloğu olan *TAF8* geninin ürünü, transkripsiyon faktör II D'nin (TDFIID) bir bileşenidir.<sup>10,11</sup> TAF (TATA-binding protein (TBP) associated factors) proteinleri işlevleri tam olarak aydınlatılmamış transkripsiyon faktörleridir.<sup>11</sup> Hem embriyonik hem de yetişkin hücrelerinde TAF8-TAF10 heterodimerinin fonksiyonel bir TDFIID kompleksinin oluşumunda kilit rol oynadığı gösterilmiştir.<sup>7,8,11,12</sup> Ayrıca, farelerde TBN proteininin preadipositlerin adipositlere farklılaşması ile ilişkili olduğu ve PPAR $\gamma$  ligandı tarafından indüklenebildiği gösterilmiştir.<sup>7</sup>

Bu çalışmadaki amacımız, kalpteki fonksiyonu tam olarak bilinmeyen *Tbn* geni ile ilişkili olduğu düşünülen aday genlerin araştırılması ve hücre içi yolağının belirlenmesidir.

## YÖNTEM

### 1. Doku ve hücrelerin elde edilmesi

Yetişkin BALB/c ırkı erkek fareler ve Sprague-Dawley ırkı erkek sıçanlar İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir. Deney hayvanları servikal dislokasyon ile sakrifiye edilmiş kalp ve iskelet kası dokuları dissekte edilmiştir.

Dokular bekletilmeden buz soğukluğunda RNAz içermeyen PBS içerisinde iki kere yıkayıp sıvı azotta şok dondurulmuş ve RNA izolasyonu için kullanılabilecek kadar -70°C'de saklanmıştır. Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (27.07.2007 / No: 65).

Taube Nuss geninin sessizleştirilmesi amacı ile gerçekleştirilen hücre kültürü deneylerinde ticari olarak temin edilebilecek olan fare kardiyomyoblast hücre soyu bulunmadığı için H2C9 rat kardiyomyoblast hücreleri kullanılmıştır. Kardiyomyoblast hücreleri ATCC'den temin edilmiştir (ATCC hücre no: CRL-1446).

### 2. RNA izolasyonu ve cDNA Sentezi:

Yetişkin rat ve farelerden elde edilen kalp ve iskelet kası dokularından total RNA izolasyon kiti kullanılarak (RNeasy® Mini RNA izolasyon kiti, Ambion) izolasyon yapılmıştır. RNA kalitesi ve degradasyonu %1'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir. RNA miktarı ise nanodrop cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Total RNA örneklerinden cDNA sentezlenmesi Iscript cDNA Synthesis Kit (BioRad) ile gerçekleştirilmiştir. cDNA örneklerinin kalitesinin kontrolü amacı ile bir “house keeping gen” olan beta aktin (*Actb*) genine özgü primerler kullanılarak amplifikasyon gerçekleştirilmiştir.

### 3. Northern Blot Analizi:

#### Plazmid prob hazırlanması:

Northern blot hibridizasyonunda kullanılmak üzere fare *Tbn* ve *Actb* transkriptine özgü digoksinogenin işaretli DNA probları hazırlanmıştır. Bu amaçla öncelikle gene özgü primerler ile polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) amplifikasyonu gerçekleştirilmiş

ve ardından amplifikasyon ürünleri kit (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche) kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan ampikonlar, pGEM<sup>+</sup>-T Easy vektör sistemi (Promega) kullanılarak klonlanmıştır. Sanger dizileme ile plazmid DNA'ların doğru gen bölgesini içerdiği doğrulanmıştır. Plazmid DNA'larının kalıp olarak kullanıldığı PCR'da gene özgü primerler ve DIG-11-dUTP (DIG-UTP DNA Labelling Kit, Roche) aracılığı ile prob işaretlemesi yapılmıştır. Probların kantitasyonu, otoradyografik görüntülenme yolu ile gerçekleştirilmiştir.

#### **Northern Blot Hibridizasyonu:**

SHK'de yer alan *Tbn* transkriptinin kalp ve iskelet ekspresyonunu doğrulamak amacı ile yetişkin farelerin kalp ve iskelet kası dokularında *Tbn* transkriptinin Northern Blot analizi Northern Max Kiti (Ambion) kullanılarak yapılmıştır. Kit prosedürlerine uygun olarak, fare iskelet kası ve kalp dokusundan izole edilmiş total RNA'lar (1 µg) agaroz jelde yürütüldükten sonra nitrosellüloz membran üzerine gece boyu transferi yapılmıştır. Ardından ultra viole ışık ile membrana bağlanmıştır. *Tbn* ve *Actb* genlerine özgü DIG-11-dUTP işaretli problarla (25 ng/ml) gece boyu 50°C'de hibridizasyon gerçekleştirilmiştir. Hibridizasyondan sonra membranlar 0,1 SDS içeren 2X ve 0,5X SSC solusyonları ile yıkanıp CSPD içeren kit (DIG Nucleic Acid Detection Kit, Roche Applied Sciences) kullanılarak görüntüleme işlemi otoradyografi ile X-ray film üzerinde yapılmıştır.

#### **4. Taube Nuss geninin sessizleştirilmesi:**

H9c2 rat kardiyomiyoblast kücrelerinin kültürü DMEM (%10 FBS) mediumu içerisinde 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> basıncında yapılmıştır. 24-kuyulu kültür kaplarında yaklaşık %60 oranında hücre yayılımı olduktan sonra kit ile (RNAi Human/Mouse Starter Kit, Qiagen) *Tbn* geninin sessizleştirilmesi gerçekleştirilmiştir. siRNA transfeksiyonundan önce yürütülen hücre sitotoksitesinde testlerinde hücrelere zarar vermeyecek etkin siRNA konsantrasyonunun 100 nmol ve lipid transfeksiyon ajanı miktarının 1:4 oranında olduğu tespit edilmiştir. Transfeksiyondan sonra 24. ve 48. saatlerde deney sonlandırılarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Kontrol olarak siRNA

transfeksiyonu yapılmamış H9c2 hücreleri kullanılmıştır.

#### **5. Kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) ve data analizi**

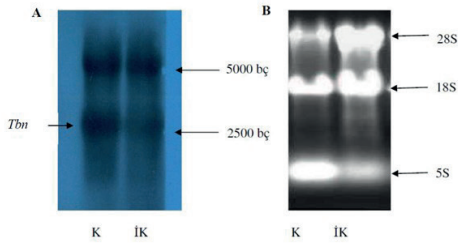
*Tbn* ve hedef genlerin yetişkin rat kalp ve iskelet dokularındaki ekspresyon seviyelerini araştırmak amacı ile bu dokulardan elde edilen total RNA örnekleri, genlere özgü tasarlanan primerler ve QuantiTect<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green (Qiagen) kiti kullanılarak Light Cycler 480 (Roche) cihazında qRT-PCR analizi yapılmıştır.

Diğer yandan, 24. ve 48. saatlere ait kardiyomiyoblast hücrelerinden izole edilen total RNA örneklerinin gen ekspresyon analizi qRT-PCR yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Biyoinformatik analizler sonucunda *Tbn* ile aynı hücresel yolda yer aldığı düşünülen Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma (*Pparg*), CCAAT Enhancer Binding Protein Alpha (*Cebpa*), TATA-Box Binding Protein Associated Factor 10 (*Taf10*) ve Myocardin (*Myocd*) genlerinin ekspresyon analizi yapılmıştır. Bu deneylerde rat genlerine özgü tasarlanmış primerler kullanılmıştır. Analizlerde kontrol olarak *Gapd* ve *Mapk* genlerinin ekspresyon seviyelerinin ortalamaları kullanılmıştır. Relatif kantitasyon (RQ) seviyeleri  $\Delta\Delta CT$  metodu ile hesaplanmıştır. Bu analizlerde transkriptlerin Ct ("treshhold cycle") değerleri kontrol genlerin Ct değerleri kullanılarak normalize edilmiş ve ardından kontrol grubu hücrelerin (siRNA transfeksiyonu yapılmamış hücre grubu) Ct değerleri ile kalibre edilmiştir.  $2^{-(\Delta\Delta CT)}$  değeri relatif kantitasyon (RQ) sayısını vermektedir.

#### **BULGULAR**

Yetişkin BALB/c farelerde kalp ve iskelet kası dokuları arasında *Tbn* gen ekspresyonunda farklılığın araştırılması amacı ile Northern Blot yöntemi kullanılmıştır. Northern Blot hibridizasyonu sonrasında fare kalp ve iskelet kaslarından elde edilen transkriptlerin boylarının aynı bant bölgesinde olduğu ve dokulara ait farklı izoform olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 1).

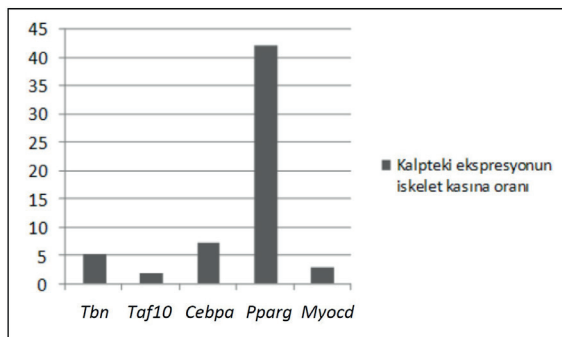
Fareye özgü SHK'deki transkriptlerden biri olan *Tbn*'nin gen sessizleştirme deneyinde H9c2 rat



**Şekil 1.** *Tbn* transkriptine özgü Northern Blot analizinin görüntüsü. A: Otoradyografi sonucunda kalp ve iskelet kaslarında farklı transkript izoformlarının olmadığı gözlenmiştir. B: Northern Blot hibridizasyonundan önce agaroz jelde yürütülen total RNA'lar kontrol olarak UV ile görüntülenmiştir. K, kalp kası; İK, iskelet kası; bç, baz çifti; 18S, 18S ribozomal RNA; 28S, 28S ribozomal RNA, 5S, 5S ribozomal RNA

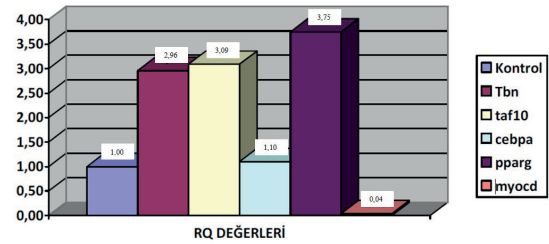
kardiyomiyoblast hücreleri kullanılmıştır. siRNA transfeksiyonundan önce rat Taube Nuss geninin (*Tbn*) ve hedef genlerin (*Pparg*, *Cebpa*, *Taf10* ve *Myocd*) yetişkin rat kalp ve iskelet hücrelerindeki gen ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. Rat kalp ve iskelet kası dokularındaki qRT-PCR analizlerinde, iskelet kasına göre *Tbn* geninin kalp kasında yaklaşık 5 kat daha yüksek ekspresyonunun olduğu gözlenmiştir. Bu şekilde BALB/c kalbine özgü SHK'deki transkriptlerden biri olan *Tbn* gen ekspresyonunun rat kalbinde de benzer şekilde iskelet kasına göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. *Pparγ*, *Cebpa*, *Taf10* ve *Myocd* hedef genlerinin ekspresyon seviyelerinin kalpte iskelet kasına göre daha fazla olduğu Şekil 2'de gösterilmiştir.

Rat kardiyomiyoblast hücrelerinin *Tbn* genine özgü siRNA ile transfeksiyonundan sonra 24. ve 48.



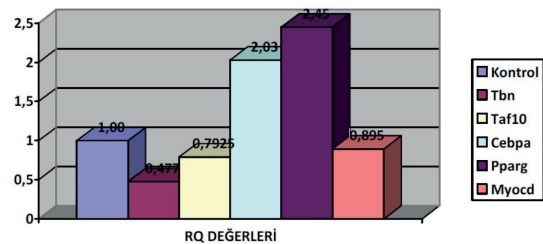
**Şekil 2.** Rat yetişkin kalp ve iskelet kası dokularında qRT-PCR yöntemi ile hedef genlerin ekspresyon analizi. Grafikteki değerler kalp ve iskelet kası arasındaki relatif kantitasyon (RQ) değerlerinin oranlarını göstermektedir.

saatlerde deney sonlandırılarak örneklerden total RNA izole edilmiştir. Kontrol hücre grubu ile karşılaştırılarak *Tbn* geni ile aynı hücresel yolda yer aldığı düşünülen genlerin qRT-PCR yöntemi ile ekspresyon analizi yapılmıştır. 24 saat sonunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *Tbn* geninin sessizleştirildiği hücrelerde *Myocd* gen ekspresyonunun belirgin şekilde azaldığı tespit edilmiştir (RQ: 0,038). Kontrol hücre ekspresyonu ile karşılaştırıldığında *Pparg*, *Cebpa* ve *Taf10* genlerinin ekspresyonunda ise sırasıyla 3,75, 1,1 ve 3,09 kat artış olduğu gözlenmiştir (Şekil 3).



**Şekil 3.** Transfeksiyondan 24 saat sonra kardiyomiyoblast hücrelerinde gen ekspresyon analizi.

Transfeksiyondan 48 saat sonra kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında *Tbn* gen ekspresyonunun yaklaşık 2 kat azaldığı ve *Taf10* ekspresyonunun da *Tbn*'ye eşlik ederek azaldığı gözlenmiştir. Diğer yandan, *Pparg* ekspresyonunda 48. saatte 24. saate göre %34,6 oranında azalma olsa da yüksek seviyesini koruduğu, buna karşılık *Cebpa* ekspresyonunun 24. saate kıyasla %84,5 oranında yükseldiği belirlenmiştir. 24. saatte yüksek oranda baskılanmış olan *Myocd* gen ekspresyonunun ise 48. saatte 22,37 kat artarak kontrol hücre seviyesine yaklaştığı tespit edilmiştir (Şekil 4).



**Şekil 4.** Transfeksiyondan 48 saat sonra kardiyomiyoblast hücrelerinde gen ekspresyon analizi.

## TARTIŞMA

Subtractive Hibridizasyon cDNA kütüphaneleri doku veya hücre dizilerinde farklı olarak eksprese edilen genlerin izolasyonu ve tanımlanmasında güçlü bir yaklaşım sağlamaktadır. Laboratuvarımızda daha önceki deneyler sonucunda oluşturulmuş olan Subtractive Hibridizasyon cDNA Kütüphanesi, BALB/c fare iskelet kası dokusuna kıyasla kalpte daha yüksek oranda ekspresyonu olan genleri içermektedir.<sup>4</sup> Taube Nuss geni de bu kütüphaneden izole edilmiş olan genlerden birisidir. *Tbn* geni fare transkriptom veritabanındaki bilgilere göre beyin, timus, plasenta ve embriyoda eksprese olan, fare ve insanda yüksek oranda korunmuş olan bir genidir.<sup>7,13</sup> Bu çalışmada, Northern Blot analizleri sonucunda kalbe özgü yeni bir transkript izoformu saptanmamıştır. Bununla beraber, qRT-PCR yöntemi ile ratlarda *Tbn* geninin yetişkin kalp dokusundaki ekspresyonunun iskelet kasına oranla 5 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

24. ve 48. saatlerde yapılan analizlerin sonuçları karşılaştırıldığında sessizleştirilen *Tbn* geninin 24. saatte kontrol hücrelerine göre yaklaşık 3 kat fazla ekspresyonunun olduğu, 48. saatte ise kontrol hücrelerdeki ekspresyonun yaklaşık yarısı kadar olduğu gözlenmiştir. Transfeksiyon sonucunda sessizleştirilen genlerin ekspresyonunun yaklaşık olarak %70'in altında olması beklenmektedir. 24. saatte kontrol hücrelerin yaklaşık 3 katı kadar yükselmesi ve TDFIID kompleksinde beraber yer aldığı *Taf10* ekspresyonunun da benzer bir seviyede olması transkripsiyon sürecinin devam ettirilebilmesi için hücrelerde erken evrede bir kompensasyon mekanizmasının devreye girdiğini düşündürmektedir. 48. saatte *Taf10* ekspresyonu kontrol hücreler ile karşılaştırıldığında %74,35 kat daha azalmış olduğu gözlenmektedir. *Tbn* geninin siRNA transfeksiyonundan sonra 24 saatten daha kısa sürede analiz edilerek baskılanma zamanının ve dinamik değişiminin takip edilmesi ve bu ekspresyon değişimlerinin protein seviyelerine yansımalarının nasıl olduğunu gösterecek ek deneylere ihtiyaç duyulmaktadır.

*Tbn* geni, insanda *TAF8* (TATA-Kutusu Bağlayıcı Protein İlişkili Faktör 8) veya *TAFII43* (Transkripsiyon Başlatma Faktörü TFIID 43 KDa Alt Birimi) olarak

da adlandırılmaktadır. *Tbn*'nin etkileşimde bulunduğu genler hakkında halen yeterli bilgi bulunmamaktadır. TFIID kompleksinde *TAF8* ve *TAF10* proteinleri heterodimer olarak bağlanarak etki göstermektedir.<sup>11</sup> Bizim çalışmamızda da kardiyomiyoblast hücrelerinde *Tbn* geninin sessizleştirilmesinden sonra kontroller ile karşılaştırıldığında *Tbn* ve *Taf10* genlerinin ekspresyonlarının 24. ve 48. saatlerde benzer seviyelerde ve yönde değişim gösterdikleri tespit edilmiştir.

Daha önce yapılan çalışmalarda, TBN proteinin 3T3-L1 fare embriyonik fibroblastlarında PPARG ligantı ile indüklenbildiği gösterilmiştir.<sup>7</sup> Özellikle PPARG'nın yoğun ekspresyonunun olduğu NIH-3T3 hücre soyunda yapılan çalışmalarda PPARG ligantı ile indüksiyon sonucunda trigliserid birikimi ile adiposit farklılaşmasının olduğu gösterilmiştir.<sup>14</sup> Bu mekanizma, adiposit farklılaşma sürecinde yine etkili olan CEBPA indüksiyonu ve de insüline duyarlı glukoz transportu sürecinden farklıdır.<sup>14</sup> TBN'nin NIH-3T3 soyunda da PPARG ligantı ile indüksiyonunun olması bu transkripsiyon proteinin insüline duyarlı transporttan ziyade trigliserid birikimi ile ilişkili olduğunu işaret etmektedir.<sup>7</sup> Bu bulgular, TBN proteininin adipogenezde rol alan genlerin düzenlenmesinden sorumlu bir transkripsiyon faktörü olduğunu göstermektedir.<sup>7</sup> Diğer yandan, C2C12 fare miyoblastlarında yürütülen çalışmalarda tam-uzunlukta *TAF8* ekspresyonu yapan retroviral vektörlerle transfeksiyon sonrasında, hücrelerin morfolojik farklılaşmasında ve araştırılan farklılaşma belirteci olan miyogenin ekspresyonunda bir değişim olmadığı gözlenmiştir.<sup>7</sup> Bu nedenle, *TAF8*'in adiposit farklılaşma sürecine özgü bir transkripsiyon faktörü olduğu önerilmiştir.<sup>7</sup> İlginç olarak aynı çalışmada, transfekte edildiği hücrelerde *TAF8* ile yarışmalı yapısından dolayı *TAF8* ile ters etki gösteren *TAF8* Histon Katlanma (*TAF8* HF) domaininin adiposit farklılaşmasını ve *Pparg* ve *Cebpa* ekspresyonlarını inhibe ettiği tespit edilmiştir.<sup>7</sup> Bizim çalışmamızda, rat kardiyomiyoblast hücrelerine *Tbn* siRNA transfeksiyonundan 24 saat sonra, *Pparg* ekspresyonunun kontrol hücrelere kıyasla yaklaşık 4 kat fazla olduğu, *Cebpa* ekspresyonunun ise yaklaşık olarak kontrol hücrelerindeki ile benzer oranda olduğu



belirlenmiştir. Ancak, *Tbn* sessizleştirilmesinden 48 saat sonra *Pparg* ekspresyonu kontrol hücrelerine göre hala yüksek olmakla beraber %34 oranında azalmıştır. Diğer yandan, transfeksiyondan 48 saat sonra *Cebpa* ekspresyonunda %84,5 oranında artış olmuştur. Bu bulgular, C2C12 fare miyoblastlarında yürütülen çalışmalara zıt yönde ancak, adiposit hücrelerinden elde edilen sonuçlara benzer olarak *Tbn* geninin kardiyomiyoblastlarda *Pparg* ve *Cebpa* genlerinin düzenlemesinde rol aldığını düşündürmektedir.

Nükleer bir protein olan MYOCD, kalp, aorta ve düz kas içeren dokularda kodlanmaktadır. Kardiyogenez ve düz kas hücrelerinin farklılaşmasında rol aldığı belirtilmiştir.<sup>15,16</sup> Miyoblast farklılaşmasında rolü olabileceği öne sürülen *Pparg*'nın kas farklılaşmasına etki mekanizmasının araştırılması amacı ile yapılan çalışmada, aşırı ekspresyonu sonucunda C2C12 fare miyoblastlarında miyogenik farklılaşmanın inhibe olduğu gözlenmiştir.<sup>17,18</sup> Bizim çalışmamızda, kardiyomiyoblast hücrelerinde *Tbn* sessizleştirilmesini takip eden 24. saatte, hücrelerde *Myocd* gen ekspresyonu yüksek oranda baskılanmış, 48. saatte ise ekspresyonu yaklaşık olarak kontrol hücrelerinin seviyesine ulaşmıştır. *Pparg* ekspresyonu ise kontrole kıyasla 24. ve 48. saatlerde sırasıyla yaklaşık 4 ve 3,5 kat yükselmiştir. *Pparg*'nın bu yüksek seviyeleri özellikle 24. saatte *Myocd* transkriptinin aşırı baskılanmasından sorumlu olabilir. Diğer yandan, bu tablonun *Tbn* baskılanması ile mi yoksa *Pparg* ekspresyon artışı ile mi ilişkili olduğunun tespit edebilmesi amacı ile farklı deneysel tasarımlarla transkript ekspresyon dinamiklerinin araştırılması gerekmektedir.

Bu çalışmada, hücre kültürü deneyleri sadece H9c2 rat kardiyomyoblast hücre soyunda gerçekleştirilmiştir. Deneylerin başka dokulara ait hücre soyları kullanılarak tekrarlanması ve kalbe özel ekspresyon özelliklerinin doğrulanması gerekmektedir. Diğer yandan, bu deneylerin bir ön çalışma niteliğinde olması ve grup sayılarının istatistiksel analizler için yeterli olmaması nedeni ile analiz sonuçları sadece değişim oranları (RQ) şeklinde verilmiş, istatistiksel anlamlılık seviyeleri verilememiştir.

## SONUÇ ve ÖNERİLER

Taube Nuss, nispeten yakın zamanda keşfedilmiş ve etki mekanizması halen tam olarak bilinmeyen bir proteindir. Daha önceki yayınlarda *Tbn* geninin embriyonik dönemde eksprese olduğu ve transkripsiyon faktörü olarak rol oynadığı belirtilmiştir. *Tbn* geninin yetişkin fare ve rat kalbinde de eksprese olduğuna dair bulgularımız bu genin yetişkin hayatta da önemli bir rol oynadığını vurgulamaktadır. Diğer yandan, bu ön çalışmada *Tbn* sessizleştirilmesinden sonra *Pparg*, *Cebpa*, *Taf10* ve *Myocd* gen ekspresyonlarında değişim olması *Tbn* geninin kardiyomiyoblastlarda da bu genler ile ilişkide olabileceğini göstermektedir. Çalışmamız bu yönü ile özgüldür ancak, bu çalışmanın genişletilerek protein ekspresyonlarının analiz edilmesi ve diğer hücre soylarında yapılan deneylerle desteklenmesi gerekmektedir.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

**Conflict of Interest:** Authors declared no conflict of interest.

**Yazar Katkıları:** Çalışma Konsepti/Tasarım- N.E.Ü., E.K.B., B.Ö.S.; Veri Toplama- E.K.B., B.Ö.S.; Veri Analizi/Yorumlama- A.B.Y, N.E.Ü, E.K.B., B.Ö.S.; Yazı Taslağı- A.B.Y.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- B.Ö.S. E.K.B.; Son Onay ve Sorumluluk- A.B.Y, N.E.Ü, E.K.B., B.Ö.S.; Malzeme ve Teknik Destek- N.E.Ü, B.Ö.S. E.K.B.; Süpervizyon- B.Ö.S. E.K.B.

**Author Contributions:** Conception/Design of Study- N.E.Ü., E.K.B., B.Ö.S.; Data Acquisition- A.B.Y, N.E.Ü, E.K.B., B.Ö.S.; Data Analysis/Interpretation- A.B.Y, N.E.Ü, E.K.B., B.Ö.S.; Drafting Manuscript- A.B.Y.; Critical Revision of Manuscript- B.Ö.S. E.K.B.; Final Approval and Accountability- A.B.Y, N.E.Ü, E.K.B., B.Ö.S.; Technical or Material Support- N.E.Ü, B.Ö.S. E.K.B.; Supervision- B.Ö.S., E.K.B.

**Finansal Destek:** Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Yüksek Lisans Tez Projesi, No: 2140 ve TYL-2019-34037).

**Financial Disclosure:** This study was supported by the Research Fund of Istanbul University (Master's Degree, Thesis Project, No: 2140 and TYL-2019-34037).

**KAYNAKLAR**

1. Calore M., De Windt L.J., Rampazzo A. (2015): Genetics meets epigenetics: genetic variants that modulate noncoding RNA in cardiovascular diseases, *J Mol Cell Cardiol*, 89: 27-34.
2. Elia L., Condorelli G. (2015): RNA (Epi)genetics in cardiovascular diseases, *J Mol Cell Cardiol*, 89: 11-16.
3. Diatchenko L., Lau Y.F., Campbell A.P., Chenchik A., Moqadam F., Huang B., Lukyanov S., Lukyanov K., Gurskaya N., Sverdlov E.D., Siebert P.D. (1996): Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(12): 6025-30.
4. Özsait B. (2003): "Subtractive" Hibridizasyon Kütüphanesinden izole edilen ve kalp gelişiminde rolü olduğu düşünülen genlerin analizi, *Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
5. Komurcu-Bayrak E., Ozsait B., Erginel-Unaltuna N. (2012): Isolation and analysis of genes mainly expressed in adult mouse heart using subtractive hybridization cDNA library, *Mol Biol Rep*, 39(8):8065-74.
6. Ozsait Selcuk B., Kömürcü Bayrak E., Erginal Ünaltuna N. (2016): Higher Expression level of Bat3 is associated with silencing of Midn gene in primary mouse cardiomyocytes, *Turk J Biol*, 40: 1295-1302.
7. Guermah M., Ge K., Chiang C.M., Roeder R.G. Guermah M., Ge K., Chiang C.M., Roeder R.G. (2003): The TBN protein, which is essential for early embryonic mouse development, is an inducible TAFII implicated in adipogenesis, *Mol Cell*, 12: 991-1001.
8. Voss A.K., Thomas T., Petrou P., Anastassiadis K., Schöler H., Gruss P. (2000): Taube Nuss is a Novel Gene Essential for the Survival of Pluripotent Cells of Early Mouse Embryos, *Development*, 127: 5449-61.
9. Brison D.R., Schultz R.M. (1997): Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha, *Biol Reprod*, 56: 1088-96.
10. Demény M.A., Soutoglou E., Nagy Z., Scheer E., Jánosházi A., Richardot M., Argentini M., Kessler P., Tora L. (2007): Identification of a small TAF complex and its role in the assembly of TAF-containing complexes, *PLoS One*, 2(3):e316.
11. Trowitzsch S., Viola C., Scheer E., Conic S., Chavant V., Fournier M., Papai G., Ebong I.O., Schaffitzel C., Zou J., Haffke M., Rappsilber J., Robinson C.V., Schultz P., Tora L., Berger I. (2015): Cytoplasmic TAF2-TAF8-TAF10 complex provides evidence for nuclear holo-TFIID assembly from preformed submodules, *Nat Commun*, 14(6): 6011.
12. Tatarakis A., Margaritis T., Martinez-Jimenez C.P., Kouskouti A., Mohan W.S. 2nd, Haroniti A., Kafetzopoulos D., Tora L., Talianidis I. (2008): Dominant and redundant functions of TFIID involved in the regulation of hepatic genes, *Mol Cell*, 31: 531-543.
13. Mouse ENCODE Consortium. (2014): A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome, *Nature*, 515(7527):355-64.
14. El-Jack A.K., Hamm J.K., Pilch P.F., Farmer S.R.. (1999): Reconstitution of Insulin-sensitive Glucose Transport in Fibroblasts Requires Expression of Both PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$ , *J Biol Chem*, 274: 7946-51.
15. Gordon J.W. (2018): Regulation of cardiac myocyte cell death and differentiation by myocardin, *Mol Cell Biochem*, 437(1-2): 119-131.
16. Raphael L., Talasila A., Cheung C., Sinha S. (2012): Myocardin overexpression is sufficient for promoting the development of a mature smooth muscle cell-like phenotype from human embryonic stem cells, *PLoS One*, 7(8): e44052.
17. Singh J., Verma N.K., Kansagra S.M., Kate B.N. Dey C.S. (2007): Altered PPAR $\gamma$  expression inhibits myogenic differentiation in C2C12 skeletal muscle cells, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 294: 163-171.
18. He K., Wu G., Li W.X., Guan D., Lv W., Gong M., Ye S., Lu A. (2017): A transcriptomic study of myogenic differentiation under the overexpression of PPAR $\gamma$  by RNA-Seq, *Sci Rep*, 7(1):15308.



## **Nargile Kullanımında Riskler, Tehditler ve Önleyici Yaklaşımlar**

### *The Risks, Threats and Preventive Approaches in the Use of Water Pipes*

Safiye Özkan Sarılı<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Araş. Gör., İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye

ORCID: S.Ö.S.: 0000-0001-8219-2103

**Sorumlu yazar/Corresponding author:**

Safiye Özkan Sarılı,  
İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,  
İstanbul, Türkiye  
E-posta: sozkan76@istanbul.edu.tr

**Başvuru/Submitted:** 29.07.2019

**Revizyon Talebi/Revision Requested:** 04.11.2019

**Son Revizyon/Last Revision Received:** 22.11.2019

**Kabul/Accepted:** 26.11.2019

**Atıf/Citation:** Ozkan-Sarili, S. The Risks, Threats and Preventive Approaches in the Use of Water Pipes, *Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi*, 2(3): 105-114. <https://doi.org/10.26650/JARHS2019-597841>

#### **Öz**

Tütün kullanımının tüm dünyada ve ülkemizde zararları kanıtlanmış olsa da, son yıllarda ülkemizde nargile kullanımı artış gösteren bir tütün ürünü olarak dikkat çekmektedir. Islak tütün olan nargile kullanımı Türkiye’de genellikle daha çok gençler tarafından tercih edilerek popülerliği artmaktadır. Yüksek yoğunlukta ağır metaller, karbon monoksit, katran ve nikotin, nargile dumanında bulunur. Tek bir nargile içimi süresince bir nargile içicisi ortalama 0.15 -1.0 litre arasında duman inhale eder ve bu çekilen duman miktarının bir sigara içimindeki yaklaşık 100 misline denk gelmektedir. Bununla birlikte yapılan son çalışmalar, nargile kullanımının çeşitli hastalıklar ile ilişkisi olduğu yönündedir. Nargile kullanımı kalp damar hastalıkları, enfeksiyon, solunum hastalıkları, akciğer kanseri ve nikotin bağımlılığı ile ilişkilidir. Nargile içiminin çoğalmasını gidermek için gençlere bununla ilgili bilgi verilmesi uygun olmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Nargile, Risk, Tehdit, Önlem

#### **ABSTRACT**

Although the damages of tobacco use have been proven all over the world and in our country, the use of water pipes in our country has increasingly attracted attention as a tobacco product in recent years. The liquid use of water pipe tobacco, which is growing fast Turkey, is generally more favored by young people, despite the high concentrations of heavy metals; carbon monoxide, tar and nicotine found in the water pipes. In one sip of water pipe, the smoker inhales an average of 0.15 to 1.0 liters of tobacco, which corresponds to about 100 times the amount of tobacco in cigarettes. Furthermore, recent studies suggest that the usage of water pipes is associated with various diseases, such as cardiovascular disease, infections, respiratory diseases, nicotine addiction and lung cancer. In order to eliminate the widespread use of water pipes, it would be appropriate to raise the awareness among young people.

**Keywords:** Water pipe, Risk, Threat, Prevention

## GİRİŞ

Nargile, geleneksel olarak Asya topraklarına özgü bir tütün içme aracıdır. Keşfedilme yeri Hindistan olup, buradan İranlılar ve Araplar arasında yayılmıştır. 16. yüzyılda Doğuya uzanan Osmanlı hanedanının doğu bölgesinden etkilendiği bir kültür mirası olmuştur. Afrika ve Asya yerlileri tarafından tütün, nargile ve diğer bazı maddelerin tüketimi ve kullanılmasına başlanması yaklaşık olarak 400 yıl öncesine dayanmaktadır. Tarihe dayalı bir bilgiye göre nargilenin ilk tüketimi bir hekimin buluşuyla tütün kullanımının daha az zararlı bir yöntemi olarak Hindistan'da geliştirilmiştir<sup>36</sup>. Yani, nargilenin tarihi kadar tütün kullanımı açısından sigaraya göre daha güvenli bir yöntem olduğuna dair inanç göreceli olarak eskilere dayanmaktadır<sup>7</sup>.

Tütün ve tütün ürünleri, beklenen yaşam süresini kısaltan ve ölümlerle sonuçlanan hastalıkların önlenemez nedenlerinin başında gelmektedir. Bugün tüm dünyada tütünün; çığneme, enfiye, pipo, puro, sigara ve nargile şeklinde kullanımı mevcuttur.

Son yıllarda kullanımı giderek artan nargile; bir köz ya da odun kömürü ile tütünün yerleştirildiği ve yakıldığı çukur bir hazne (lüle), genellikle kısmen su ile dolu bir sürahi ya da duman haznesi (şişe), boru şeklindeki bir hat üzerinden lüle ile hazneyi birbirine bağlayan suyu taşıyan uzun gövde (ser), dumanın haznedeki çıkmasını sağlayan uç kısmında bir ağızlığın (sipsi, imame) bulunduğu hortumdan (marpuç) oluşmaktadır. Temelde nargile dumanında 3 madde bulunmaktadır; katran, nikotin, ve ağır metaller (arsenik, krom, kurşun vb). 30 saniye aralıklarla nargile içimi sırasında çekilen her 100 nefes çekiminde, standart içme protokolüne göre 3 saniye uzunluğunda 242 mg katran, 2.25 mg nikotin ve çok daha fazla miktarda tek bir sigara içimine kıyasla krom, arsenik ve kurşun vücuda alınmaktadır. İdrar, tükürük, ve plazmada nikotin düzeyinin yüksek seviyelere ulaştığı tek bir nargile kullanımından sonra bile nargile kullanımının bu bağlamda inanılan aksine zararsız olmadığı ispatlanmıştır. Özellikle bronşiyolitler üzerine olumsuz etkileri olan ve sık kullanımında oksidatif stresi artırıcı yönleri bilinmektedir<sup>2</sup>.

Nargile şimdilerde taşıma kılıfları ve omuz askılıkları gibi aksesuarlarla taşınabilir şekilde satılmaktadır. Kimyasal içerikli camdan su koyma kapları, ağızlık, minik minik sudan baloncuklar çıkmasını sağlayan plastik maddeli sipsilere benzeyen aksesuarlar tütünün toksisitesini azalttığı düşünülerek satılmaktadır. Fakat bu iddiaların bilimsel kanıtlara dayanmadığı üzerinde durulması gereken önemli bir konudur<sup>22</sup>. Nargileden çıkan duman genel düşüncenin aksine esasen koroner arter hastalığı, akciğer kanseri gibi hastalıklara da neden olan birçok zarar verici maddeler içermektedir<sup>37</sup>. Tek bir nargile içiminde bir nargile tüketicisi 20 ile 80 dakika arasında 150 ile 1000 mililitre arası tütün içine çekmekte, bu oran da yaklaşık bir sigara tüketimindeki tütün miktarının aşağı yukarı 100 katına denk gelmektedir<sup>10</sup>. Genel olan farklı bir yanlış düşünce ise nargile tüketicileri arasında, günlük olarak içilmemesi şartıyla arada sırada nargile içtiklerinde muhtemel bir negatif durumu bir daha yaşamayacak olduklarına kendilerini inandırmalarıdır<sup>35</sup>. Fakat, nargile içen insanlar genelde 45 ile 60 dakika süresince içim yapma evresinde fazla sayıda zehirli maddeyi kapsayan nargile dumanını soluduklarında, belirli aralıklarla nargileyi içseler dahi zarar görebilirler<sup>1</sup>.

Dünya üzerinde günlük olarak 100 milyon insanın nargile yoluyla ıslatılmış tütün içtiği öngörülmektedir<sup>13</sup>. Yetişkinler ve gençler arasında nargile tüketimindeki artış Amerika'da çıkarılmış haberler ve medyanın bildirimine göre çok yakında megakentlerde ve gençleri hedef alan üniversite kampüsleri etrafında gittikçe çoğalan nargile kafeler bu durumu kanıtlar nitelikte olmaktadır<sup>14,17,21,31</sup>. Nargile tüketimi, sadece son yirmi yılda yaygın olarak Amerika'daki gençlerin hedef alındığı yeni bir ıslatılmış tütün içim şekli olarak kabul görmektedir<sup>14,21,31</sup>. Türkiye'de de nargile kafeler gibi gençleri hedef alan ortamlarda nargile tüketimi giderek yayılmaktadır. Genellikle arkadaş ortamlarında sosyalleşmek için kullanıldığı görülen nargile tüketiminin aslında birçok kişiyle paylaşıldığı bilinmektedir. '4207 sayılı "Tütün Ürünlerinin Zararlarının Önlenmesi ve Kontrolü Hakkında Kanun"un<sup>1</sup> yürürlüğe girmesinden sonra nargile

1 T.C. Sağlık Bakanlığı. (2010). Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Tütün Bağımlılığı İle Mücadele El Kitabı (Hekimler İçin). Ankara.

işletmesi sahipleri tütünü olmayan nargile satışına başlamıştır. Tütünü olmayan nargile içiminin sağlık için tehdit içermediği yönündeki inanç toplum tarafından yaygın olmakla birlikte, bu inancın doğru olmadığı tespit edilmiştir.

90'lardan önce genellikle Arap ülkelerindeki orta yaşlı erkeklerin nadiren içtiği görülen nargilenin, şimdilerde birçok değişik ülkelerde yaşayanlarda hem kadın hem de erkekler olmak üzere ama daha çok gençler arasında kullanımının arttığı görülmektedir. 90'lardan bugüne kadar tüm dünya üzerinde nargile kullanımının çok kişi tarafından tanınmasının temel sebepleri; içerisinde tatlandırılmış nargileye özel ıslatılmış tütünlerin satışa sunulması, nargile içilen kafelerin artması, ikna edici satış teknikleri ve bu yeni yönelim hakkındaki reklamların nargile tüketimini arttırmasıdır. Bununla ilgili yapılan araştırmalar da kullanım artışını destekler biçimdedir. Türkiye'de Küresel Yetişkin Tütün Araştırma (2012) bulgularına göre yetişkinler arasında nargile haricinde tütün tüketimi düşüktür. 2008 yılında ülkemizde her 100 bireyden 31'i tütün kullanmakta iken, 2012 yılında bu rakam 27'ye gerilemiştir. Son zamanlarda yürütülen tütün kontrol programları sigara kullanımını düşürme açısından yararlı olduysa da, nargile kullanımının son zamanlarda giderek moda haline gelmesi tütün bağımlılığının artışında önemli bir faktör halini almıştır<sup>2</sup>.

### **Nargile Kullanımının Zararları**

Nargile, özellikle hoş kokulu özel olarak satışa sunulan ıslatılmış tütünü tüketmek için kullanılan su borusu düzeneğine benzeyen bir düzenekten oluşur. Son yıllarda, dünya genelinde özellikle gençler ve üniversite öğrencileri arasında nargilenin kullanımında bir artış olmuştur. Nargile içmenin vücutta oluşturduğu tehlike, sigara kullananlarda sigaradan meydana gelen tehlike ile aynıdır. Nargile içildiğinde inhale edilen duman miktarı, sigara kullanırken inhale edilenden daha fazlasını içerebilmektedir. Nargile tüketicileri, onu sigara kullanımından ayrı gibi düşünse de pek çok yapılan çalışma nargile içiminin vücuda olan hasarlarının sigaradan oldukça

yüksek bulunduğunu göstermiştir. Zararlarından bazıları: kardiyovasküler hastalıklar, pulmoner yetmezlik, akciğer tümörleri, dış eti problemleri, mesane tümörleri, bronşitler, özofagus tümörü, ruhsal çöküntü, hipertansiyon, parkinson rahatsızlığı, mide ülseri, larenks tümörü, akciğer hastalıkları, inflamasyon ve infertilite gibi hastalıklardır. Nargilenin sigaraya benzer bağımlılık yapıcı özelliği vardır ve sağlığı olumsuz yönde etkiler. Ortak kullanıma sunulduğu zaman myobacterium tuberculozis, C tipi hepatit, herpes simpleks gibi bulaşıcılığı olan inflamasyonlara sebep olmaktadır. Bunların dışında HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) virüsünün bulaşmasıyla ortaya çıkan AIDS (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*) ve diğer larenks tümörlerinin de beraberinde olduğu birden fazla ağır hastalığa sebep olduğu bilimsel araştırmalarla ortaya çıkarılmıştır. Düşünülenlerin aksine nargile de başka tütün mamulleri kadar benzer tehlikeye sahiptir. Nargilenin insan sağlığına zararı sigaradan daha düşükmüş gibi algılanmasının bir sebebi de aromalı kokusunun yanında verdiği tattır. Ancak düşünülmelidir ki, sosyalleşmek için olmazsa olmaz olduğu görülse de gerçekte oldukça önemli bir halk sağlığı problemidir.

Nargile içimine aynı sigara gibi genel olarak toplumdan onay görme, ortama ayak uydurabilme isteği, arkadaş dominantlığı gibi toplumsal sebepler ile başlanılmakta, içmeseniz de nargile kahvelerine gittiğinizde pasif sigara dumanının zararlarına maruz kalınmaktadır. Nargile genellikle sigara içiminin fazla olduğu yerlerde bayanlar arasında da oldukça kullanılır. Nargile içiminin tütün kullanımından daha fazla zararlı olmadığı düşünülse de genç bireyler arasında daha çok tercih edilmesi erişiminin kolay olması, maliyet azlığı ve sosyalleşme aracı olmasından kaynaklanmıştır. Ülkemizde yaklaşık 18-24 yaşları arasında nargile içimi olmakta ve maalesef ki içinde tütün olduğu bilinmemektedir<sup>12,33</sup>.

Nargile içiminin sağlık üzerine etkileri sigarayla aynıdır. Bu etkilerden bazıları; kanser, solunum sistemi hastalıkları, kalp hızı ve kan basıncında yükselme, düşük doğum ağırlıklı bebekler ve fertilitede azalma olarak sıralanabilir<sup>27</sup>.

Nargile içimiyle alınan yabancı maddeler nikel, kobalt ve kurşun vb. gibi tütün kullanımı ile alınan miktarlara göre daha fazla seviyededir. Yapılan çalışmalarda tek bir nargile tüketimi ile içilen nikotin miktarı, 50 tane tütün içimiyle elde edilen nikotin düzeyi ile aynı olduğunu göstermiştir<sup>9</sup>.

Kanıtı dayalı çalışmalar nargile dumanının ileri düzeyde nikotin, katran ve ağır metaller bulunduğunu saptamıştır. Yukarıda söz edildiği gibi arsenik, krom gibi maddeler nargile dumanında da vardır. Sık aralıklarla nargileyi içine çekmek, derin inhalasyon ve nargile dumanı tüketimi süresinin uzunluğu aşırı miktarda yabancı maddelerin vücuda nüfuz etmesi demektir<sup>16</sup>.

Nargilenin içeriğindeki aromalar tütünde bulunan zehirli maddeleri meyve aroması ve hoş kokusu ile örtmektedir. Kötü olmaması ve aroma tadının zararsız olduğunun algılanmasına olanak sağlasa da aslında bunun aksi düşünülmelidir. Bitki özlü nargile de aynı işlem görmemiş sigara gibi kullanan bireyi parafin (katran) ve kanserojen etkenlerle karşı karşıya bırakmaktadır<sup>5,34</sup>.

### Nargilenin Özellikleri

Geleneksel bir ıslatılmış tütün içme şekli olan nargilenin kullanımı Ortadoğu ve Güney Asya'da yaygındır. Geçtiğimiz yüzyılda neredeyse kaybolmaya yüz tutmuş olan bu alışkanlık günümüzde özellikle gençler arasında yeniden gün yüzüne çıkmaya başlamıştır<sup>22,36</sup>.

Dünya üzerinde günlük yüz milyon bireyin nargile tükettiği öne sürülmektedir<sup>1,37</sup>. Ülkemizde de genellikle gençler tarafından ıslatılmış tütünün nargile olarak içilmesi son dönemlerde güçlü bir artışa sebep olmaktadır<sup>13</sup>. Dünyada son yıllarda görülen bu artışa karşı tütün kullanımını kontrol altında tutmak için farklı bir uğraşı alanına ihtiyaç duyulmaktadır<sup>28</sup>.

Nargile, kokulandırılmış tütünün bir şişeden geçirilerek kullanılma şeklidir. Doğu Akdeniz bölgesinde yaygın olarak kullanılır<sup>4</sup>. Yerkürede ve ülkemizde en çok tercih edilen tütün maddesi sigara olmakla birlikte, Türkiye'de nargile kullanımının günümüzde fazla tercih edilmesi dikkatleri bu yöne çekmektedir<sup>35</sup>.

Asya topraklarının ciddi bir uzantısı olan nargile adını Farsça'da 'Hindistan cevizi' anlamında kul-

lanılan "nargil" kelimesinden almaktadır. Arapların "Şisa", İranlıların ise "Kalyan" olarak isimlendirdiği nargilenin başlangıç şekillenmeleri Hindistan'da görülmeye başlanmıştır. Hindistan cevizinin ortası çıkarıldıktan sonra dışardan kabuk bölgesinin içine pipet benzeri bir malzeme kullanılarak içilen ilk nargile, esrar otu (hint keneviri) içimine farklı bir içerik katarken hindistan cevizinin yerine bu kez kabak tercih edilmiştir. Zamanla daha çok kullanılması sonrasında porselen ve bronz cisimli nargileler bulunmuş ve arkasından da, çini, gümüş ve cam cisimli nargileler kullanılmaya başlanmıştır. Başta İranlılar ardından da Araplar tarafından kullanımını giderek artmıştır<sup>11</sup>.

Nargile, farklı şekil, boyut, malzeme ve renklerden oluşabilmektedir. Tipik bir nargile aşağıdaki parçalardan oluşur<sup>28</sup>.

Tütünün konulduğu ve özellikle bir kor veya mangal kömürü ile alevlendirilen ortası boş bir alan (baş), çok az su ile kaplı içecek koymaya yarayan cam veya tütüsü deposu (şişe), tütüsü ve lüle ile depoyu arkaya tutturarak pipet biçimindeki bir araç vasıtasıyla suya götüren uzun alan (ser), son bitim bölümünde tütüsünün depodan çıkmasına yarayan bir huni (sipsi, imame) olan hortum (marpuç)<sup>11,28</sup>. Tam bir nargile yukarıda değinilen lüle, ser, şişe ve marpuç olarak isimlendirilen 4 temel bölümden oluşmaktadır<sup>3,17</sup>. Nargilenin en temel unsuru ıslatılmış tütündür. Tömbeği olarak adlandırılan tütün, parçalara ayrıldıktan sonra bir gün önceden ıslanmaya konulur. Üzerine çok az ıslak bez kapatılıp kısa bir zaman dinlenmeye bırakılır. Tömbeğin sıvı içinde uzun bir müddet bırakılması sonrası dikkatlice lüleyle kaplanır ve tüketime sunulmadan önce içindeki sıvı sıkıştırılarak lülelere, yani tömbeğin bırakıldığı kevgir tepsiye konulur ve tömbeği, çelik miller desteğiyle tamamen orta noktasından bir delikle açılır.

Lüleyle bırakılan tütün, tekrar ıslak fakat ortadan kesilmiş ve dolgun damarları çıkarılmış bir tömbeği yaprağı ile kaplanır. Bundan sonra sere konularak daha kısa uzunluktaki bir meşe ağacı cinsi olan nargile kömürü ile meydan gelmiş korla alevlendirilir. Bu yöntem bilinen tütün cinsidir. Bunun dışında şimdilerde Mısır bölgesinden alınan ve adına "deni-

ze ait (bahri)” ya da “Arap tütün” denilen bir tömbeki cinsi bulunmaktadır. Bunlar mayalandırılmış yemişlerden alınmakta ve genellikle 15-18 yaş grubundaki bireyler tarafından tercih edilmektedir.

Buna benzer tütünler; ananas, nane, kayısı, elma, muz, çilek, limon gibi ortalama 20 tür sert etkili koku olan meyve ya da bitkilerden elde edilmekte, cam kısmına eklenen su ise ara ara tüketilen tömbeki türüne göre farklılık göstermektedir<sup>11</sup>.

Doğal nargile kullanımı için tömbeki ürünü yapımında özellikle nargile tütününün elde edildiği geleneksel mamulü, güzel kokulu nargile için olan tömbeki ürünü yapımında ise % 20-30 tütün, % 70-80 miktarında güzel kokulu elementlerle başka kimyevlerin eklendiği mamulleri anlatmaktadır<sup>3</sup>.

### Nargilenin Tarihiçesi

Geleneksel olan nargile içimi Orta Doğu, Asya ve Afrika ülkelerinde başlıca bir kültürdür. Fakat son zamanlarda Avrupa ve Amerika kültürüne de sıçramıştır<sup>27</sup>. Tütün kullanımının özel bir şekli olan nargile, önceleri 40 ve daha üzeri yaş grubundaki bireylerin kullandığı bir madde iken günümüzde nargile genellikle adölesan ya da 18 yaş üstü bireyleri hedef almakta ve bu kişiler arasında da git gide daha fazla tercih edilir duruma gelmektedir<sup>22</sup>.

Nargile genellikle kafe ve restoranlar gibi sosyal ortamlarda içilmektedir. Normal içim aralıkları 45 ile 50 dakika arasında değişmekte, ancak birkaç saat boyunca da devam edebilmektedir<sup>18</sup>. Nargile içiminin görülme sıklığı net olarak tahmin edilmemekle beraber, nargile tüketiminin genellikle adölesan ya da 18 yaş üstü bireyler arasında giderek artış gösterdiği bilinmektedir<sup>7</sup>. Bir çalışmaya göre adölesan çağıdaki 635 Mısırlı bireyden %19 oranında nargile kullanımı olduğu bildirilmiştir. Diğer bir çalışmaya göre ise yaş olarak 12 ile 18 oranında farklılık gösteren eğitim dönemindeki 388 İsrail kökenli kişiler arasında %41 oranında nargile içiciliği olduğu ve bu kişilerin %22'si ise tüm hafta sonlarını nargile içimiyle geçirdikleri bulunmuştur<sup>28</sup>.

Başka bir çalışmada ise (2271 bireyde) tütün içme oranı %21.3 iken, nargile tüketme oranı ise % 4.8 olarak belirlenmiştir<sup>26</sup>. Naggar ve arkadaşlarının<sup>26</sup> yaptıkları çalışmada ise araştırmaya dâhil olanların

%27.9 oranında tütün içmediği, yalnızca nargile tükettiği bildirilmiştir. Akter'in yaptığı çalışmaya göre (3016 lise öğrencisi) nargile tükettiğini belirtenlerin oranı %19'dur<sup>3</sup>. Salameh, Salame, Waked, Barbour, Zeidan ve Baldi yaptıkları çalışmada (3384 üniversite öğrencisi) nargile içme sıklığını %23, sigara içme sıklığını ise % 19.2 olarak belirlemiştir<sup>31</sup>.

Poyrazoğlu, Şarlı, Gencer ve Günay yaptığı çalışmada Kayseri'deki 645 üniversite öğrencisinin %327'sinin nargile içtiğini rapor etmişlerdir<sup>29</sup>.

Yapılan bir çalışmada nargile içimi oranının cinsiyet, yaş ve yaşama biçimini etkilediği ortaya çıkarılmıştır<sup>8</sup>. Erciyes Üniversitesi öğrencileri üzerinde toplanan verilerle yapılmış bir araştırmada erkek öğrencilerin %41.6'sı, kız öğrencilerin %20.2'si nargile içimini gerçekleştirmektedir<sup>2</sup>. Süleyman Demirel Üniversitesi öğrencilerine uygulanan bir diğer çalışmada ise öğrencilerin %43.6'sı sigara içerken, ilave olarak %26.9'u nargile, %7.5'inin ise pipo-puro içtiği belirlenmiştir. Yine aynı çalışmada erkek öğrencilerin %37.5'i, kız öğrencilerin ise %17.2'sinin nargile tükettiği bulunmuştur<sup>20</sup>. İbrahimov, Şahin, Eminağa, Feyzioğlu, Metin ve Aslan<sup>17</sup>'in yaptığı çalışmada ise bu oran %60.7, Maziak, Ward, Soweid ve Eissenberg'in yaptığı çalışmada %63 olarak tespit edilmiştir<sup>22</sup>. Nargile kullanan her beş bireyden biri nargile tüketiminin toksik etkilerinin olmadığını bilmekte ve nargile tüketiminin görülme sıklığı açısından güncel araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır<sup>1</sup>.

Nargile (hookah, şiş veya water pipe tütün içimi olarak da bilinen) yeni bir ürün değildir ve asırlık bir kullanıma sahiptir<sup>22</sup>. Daha önce yaşlı erkeklerle sınırlı olan nargile kullanımı gençler arasında yayılmış ve küresel bir salgın haline gelmiştir,<sup>25</sup> çünkü nargile içimi ritüeli arkadaş ya da akraba gruplarında rahatlama ve sosyalleşme ile ilişkili olsa bile dünyanın bazı bölgelerinde Ortadoğu'da olduğu gibi nargile kullanımının yaygınlığı, gençler arasında sigara içme sıklığını bile aşmıştır<sup>25</sup>. Araştırmalar, nargile kullanıcılarının genellikle nargile içiminin sağlığa olumsuz etkilerinin farkında olmadıklarını göstermiştir<sup>15,21</sup>. Başlangıçta, su ile cihazın “dumandaki yabancı maddeleri filtreleyebileceği” fikrine dayanarak Hindistan'da üretilmiş ve sigara dumanından çok daha dü-

şük bir sıcaklıkta sigara içimi yaptığı için, sigaradan daha az zararlı olduğu kabul edilmiştir<sup>15</sup>. Bununla birlikte, son sistematik araştırmalar, nargile tütün içiminin solunum ve kalp damar hastalıkları, ağız ve akciğer kanseri ve diğer bazı hastalıklar<sup>18,38</sup> gibi çeşitli sağlık sorunları ve nikotin bağımlılığı riski ile ilişkili olduğunu göstermiştir.

### Nargile Dumanının İçeriği

Nargile tütsüsünde gerçek olarak üç etken vardır: nikotin, *arsenik, krom, kurşun vb.* gibi ağır metaller ve katran<sup>3,20</sup>. Tek bir nargile tüketimi alımında 3 gram nikotin (tütün) ve 5 gram kömür alevlendirilmekte, toplam olarak 2.25 mg tütün ve 242 mg küçük parçacıklı etkenler vücuda girmektedir. Tek bir nargile içimi ile vücuda giren nikotin oranının, 50 tane sigara içimiyle vücuda giren nikotin oranıyla aynı olduğu hakkında bilgiler mevcuttur<sup>5,13,17,19</sup>. Bir nargile kullanımında içeri çekilen duman sigaraya göre daha fazla toksik madde içermektedir<sup>8</sup>. Tek bir nargile içimi ile nargile kullanan biri tek bir nargile ile ortalama 20 ile 80 dk arası 0.15 -1 lt miktarında tütsü içine çekmekte, bu da yaklaşık tek bir sigara alımındaki tütsü oranının ortalama 100 katına denk gelmektedir<sup>7</sup>. Bir nargile içicisi yaklaşık otuz saniye süren aralıklarda her birisi üç saniyelik soluma eylemi gerçekleştirmekte, her defasında akciğerlerine üç yüz mililitre hava inhale etmektedirler<sup>19</sup>. Nargile kullanımı sırasında önemli miktarda duman inhale edilir. Bir nargile içimi süresince 30-60 dakika geçer ve yaklaşık olarak 100 inhalasyon yapılır, bunların her birinin hacmi 500 ml'dir. Tek bir sigara yaklaşık 500-600 ml duman üretirken, tek bir nargile içimi süresince 50.000 ml duman üretir. Nargile dumanı, sigara dumanı gibi benzer toksik maddeleri barındırır<sup>10</sup>. Ek olarak, nargile tütsüsündeki kurşun, kobalt, nikel, arsenik ve krom oranı, sigara tütsüsüne oranla daha fazladır<sup>19</sup>. Nargile içicilerinin aldığı karbon monoksit oranı son yıllarda bakılmış ve sigara içicilerine göre daha fazla olduğu belirtilmiştir. Nargile içimi esnasında alınan zehirli maddeler, tütün, kömür tütsüsü ve katkı maddelerinden oluşmaktadır<sup>8</sup>.

Nargile dumanında olan meyve aromaları ısılatılmış tütünde bulunan zarar verici zehirleri hoş kokusu ve aroma içermesi ile gizlemektedir. Mide bulan-

dırıcı olmaması ve güzel kokulu olması iyi zararsız gibi düşünülmesine neden olsa da gerçekte olan bunun tam aksidir. Meyve özlü nargile de aynı işlem görmemiş sigara gibi içenleri katrana ve kanser yapıcı etkenlere temas sağlamaktadır<sup>20</sup>. Tütünün nargile şeklinde içilmesi de sigara içilmesi gibi zararlıdır<sup>19</sup>. Nargiledeki suyun dumanı süzmesinin, sigaradaki filtreden daha üstün bir fonksiyonu yoktur<sup>17</sup>.

### Sağlığa Etkileri

Tütün kullanımı önlenemez hastalıklar ve erken ölümlere neden olduğu bilinerek tekrar gündeme gelen önemli bir global sağlık sorunudur<sup>15</sup>. Nargile içimi masum olarak gösterilmektedir. Maalesef ki nargile bağımlı olma durumunu ortaya çıkarıcı etkilere sebep olabilir ve insan sağlığına negatif etkileri de yüksek oranda olabilir<sup>17</sup>. Epidemiyolojik olarak daha fazla çalışmalara ihtiyaç olmasına rağmen, nargile kullanımının maligniteler, kardiyovasküler sistem hastalıkları ve nikotin bağımlılığı gibi önemli sorunlarla ilişkili olduğu bilinmektedir<sup>10</sup>. Nargilenin insan sağlığına olan olumsuz yönleri, Hindistan, Çin ve Orta Doğu başta olmak üzere birçok araştırmacının saptama noktası olmuştur.

Bu olumsuz etkiler ise mesane, özofagus, ağız, mide ve akciğer kanseridir. Aynı zamanda, solunum yolu problemlerine ve kalp hastalıklarına da neden olmaktadır<sup>28</sup>. Nargile kullanımı kanser, kalp damar hastalıkları, bulaşıcı hastalıklar, akciğer rahatsızlığı ve nikotin bağımlılığı ile ilişkilidir<sup>9,33</sup>.

DSÖ Küresel Tütün Salgını Raporu'nda da nargile kullanımının akciğer hastalığı, kardiyovasküler hastalık ve kanser ile ilişkili olduğu bildirilmiştir<sup>4</sup>. Uzmanlar, nargilenin sağlığa zararlarına vurgu yapmakta ve araştırmalara göre akciğer fonksiyonlarını bozduğuna, soluk borusu, özofagus, diş eti ve ağız karsinomlarına sebep olduğuna dikkat çekmektedirler<sup>17</sup>. Nargile, genellikle bronşitler üzerinde görülen negatif etkilerinin yanı sıra sürekli kullanımında oksidatif stres düzeyini arttıran yönleri de bilinmektedir<sup>13</sup>. Ülkemizde yapılan bir araştırmada nargile tüketenlerin solunum fonksiyon testlerinde sigara içmeyenlere göre yüzde 30 oranında düşme olduğu ve nargile ile beraber sigara içenlerde bu rakamın yüzde 40 olduğu belirlenmiştir. Köseoğlu, Aydın, Uçan,



Ceylan, Eminoğlu, Durak ve ark.'nın yaptığı araştırmada, her şeyden önce akciğerlerin en gerekli başlıca savaşıma yöntemi olan mukosilyer klirens sisteminin nargile kullanıcılığı ile negatif bir ilişkide olduğu gösterilmiştir<sup>16</sup>. Nargile kullanımı, nikotin bağımlılığına götüren önemli bir geçiş kapısıdır<sup>1,36</sup>. Son yıllarda yapılan bir araştırma sonucuna göre, bir tömbeki (nargile tütünü) içimi sonrasında meydana gelen serum nikotin miktarının bir sigara içimi ardından meydana gelen nikotin konsantrasyonu ile aynı düzeyde olduğu, ancak tek bir nargile içimi sonrasında akciğerlere giren tütün oranının tek bir sigara kullanımıyla içeri alınan tütün oranından 48.6 defa daha çok olduğudur<sup>8</sup>. Diğer olası sağlık sorunlarından biride, nargile kullanımının sebep olduğu bulaşıcı hastalıkların yayılma riskidir<sup>10,13</sup>. Nargilenin tekrar kullanılabilme özelliği ve birçok ülkede benzer olan ortak ağızlık kullanımı nedeniyle; herpes simplex, myobacterium tuberculosis ve karaciğer iltihabı (hepatit) gibi enfeksiyöz hastalıklar taşıyabilmektedir<sup>28,30,38</sup>. Bir araştırmada, nargile içimi ile ağız kanserleri arasında ilişki olabileceği de ifade edilmiştir<sup>13</sup>. Nargile içicileri tarafından yanlış algılanan ve sık görülen bir durum ise, tütün kullananların çoğunluğunda görülen tablo, nargile tüketimini her gün değil de arada sırada yaptıkları zaman negatif herhangi bir durumla karşılaşmayacak olmalarına kendilerini inandırmalarıdır. Fakat, nargile tüketen bireyler yaygın olarak 45-60 dakika devam eden kullanım süresi ile fazla miktarda toksik madde içeren nargile tütsüsünü akciğerlerine aldıkları için ara sıra nargile alsalar bile etkilenebilmektedirler<sup>28</sup>. Ankara ilindeki kafe tarzı nargile sunulan yerlerde yapılan bir çalışmada yaklaşık yaşları 23 civarındaki 273 genç bireyin %53.5 oranında nargile kullanımına bağlı bağımlı olabileceklerini düşünmediklerini bildirilmiştir. Nargile, mekanizmasında bulunan su nedeniyle filtreleme yapabileceği düşünülerek zararlı olmadığı ve bağımlılık durumu yaratmadığı algısına rağmen, yapılan çalışmalar nargile tüketiminin önemli zararlar ile ilişkili olduğunu ve bağımlılık yaptığını göstermektedir<sup>24</sup>. Düşünülenin aksine nargile içindeki su, zararlı maddelerin çok az bir kısmını filtre eder. Nargile içicileri nemli dumanın daha az iritan etkisi ile daha fazla duman inhalasyo-

nu yaptıklarından dolayı, tütün kullanıcılarına göre daha fazla karbon monoksit absorbe ederler. İçim süresinin uzun olması bir sigara içimine göre 100 kat fazla toksik maruziyete neden olur<sup>28</sup>. Nargile içiminin gebeliğe bağlı komplikasyonlar ile de ilişkisi vardır. Gebelik sırasında nargile içen kadınların çocuklarında, daha az doğum kilosu ve daha düşük Apgar değerleri ile pulmoner bozukluk görülebilmektedir. Ayrıca evde içilen nargile sebebiyle duman almak zorunda olan bebeklerde pulmoner sorunlar çıkabilmektedir<sup>28</sup>. Nargile içiminin kalp damar hastalıkları ile de ilişkisi olduğu bilinmektedir. Nargile içenlerde kalp hızı ve kan basıncında yükselme görülmektedir<sup>27</sup>. Selim, Fouad ve Ezzat yaptıkları çalışmada, nargile içiminin ciddi koroner arter hastalığı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir<sup>32</sup>.

### Nargile ile İlgili Doğru Bilinen Yanlışlar

Nargilenin sağlığa olası zararları konusunda toplumun yeterli bilgiye sahip olmayışı, nargile içiminin güvenilecek olmasına karşı yanlış bir algının düşünülmesine ortam hazırlamaktadır<sup>28</sup>. Gençlerin büyük bir bölümü nargile kullanımını bir tütün ürünü olarak görmemekte ve nargile tüketiminin de sağlık için zararlı bir yanının bulunmadığına inanmaktadır<sup>11</sup>. 14-44 yaş aralığında %55'i 18-24 yaşlarda Ankara ilinde 273 kişinin dahil olduğu bir çalışmada, nargile kullanıcılarının %27.1'inin nargilenin zararları hakkında kesin bir bilgi sahibi olmadığı ve %18.3'ünün ise nargile içiminin zararlı bir toksik etkiye sahip olmadığını düşündüğü bulunmuştur<sup>2,17,22</sup>. Nargile kullananların önemli bir bölümü, nargilenin zararları konusunda bilgi sahibi değildir<sup>7</sup>. Başka bir çalışmada, çalışma grubunun ortalama üçte birlik kısmı nargile tüketiminin sağlık için toksik etkisinin tütün kullanımından daha fazla olmadığını ve ortalama dörtte birinin ise tütünün sudan geçirildiği için toksik maddelerinin engellendiğini düşünmektedir<sup>36</sup>. Son yıllarda gençler arasında nargile kullanımı popüler bir aktivite olarak kabul edilmeye başlanmıştır<sup>32</sup>. Adolesanlar nargileyi çoğunlukla sigara mamulü olduğunu fark etmeden içmekte; kısa süre sonrasında ise bağımlı olabilmektedirler<sup>19</sup>.

Ankara ilindeki kafelerde nargile içen yaş ortalaması 23 olan 273 gençten %53.5'i bağımlılık yapma-

dığını, %89'u ise nargileyi bırakmayı düşünmediğini belirtmiştir<sup>6</sup>.

Nargile içenlerin akciğer fonksiyonlarında, tütün kullanmayanlara göre %30 oranında azalma, nargileyle birlikte sigara kullananların akciğer fonksiyonlarında ise %40 azalma görülmüştür<sup>23</sup>.

## SONUÇ VE ÖNERİLER

20 yıldan bu yana kullanım oranı gittikçe yükselen nargilenin, sigara içiminin ardından ikinci derecede önemli olan global nikotin salgını olduğu tanımlanmaktadır. Bu durumun ileride halkın sağlığını tehdit eden bir konu haline gelmemesi için alınabilecek önlemlerden biri, DSÖ tavsiyesi ile de uyumlu olan aromalı tütün ürünlerinin geniş bir yelpazede yasaklanmasının önerilmesidir. Bu yolla aromalı tütün ürünleriyle tadında değişiklik oluşturulan nargile tütününün yerine, tütünün gerçekte olan acı ve sert tadıyla kullanımı gerçekleştirilirse nargile içim sıklığının daha da aşağılara çekilebileceği yönündedir. İkinci olarak nargilenin ticari sunumuna müdahale edilmesi önerilebilir ve gerekirse yasak altına alınabilir. Ancak böyle bir müdahalenin gerçekleşmesinde karşılaşılabilecek temel sorun; büyük yatırımların yapıldığı, binlerce çalışanın olduğu sektörün böylesi bir müdahaleye gücü oranında direnç göstermesi olacaktır. Alınabilecek önlemler kapsamında son olarak ta; 4207 sayılı 'Tütün Mamüllerinin Zararlarının Önlenmesine Dair Kanun' hükmünde yer alan maddelerin hayata geçirilmesi, bu bağlamda tütün ürünlerinin kullanılmasının istenmediği yerlerde nargile kullanımına özel tütün ürünü pazarlamasının da engellenmesi, kafe ve çay benzeri yerlerde nargile satışını cazip hale getiren afiş ve ilanların kullanılmaması, tütün ve tütün benzeri ürünlerin tüketimini arttırıcı her türlü satış amaçlı uygulamalar, atılması gereken adımlar arasındadır. Ayrıca, Türkiye'de belli başlı 2008 yılında uygulanmaya başlanan kanun ile sigara kullanımı denetiminde önemli gelişmelerin kaydedildiği politikaların benzerlerinin nargile tüketiminin azaltılması için de oluşturulması, nargile tüketiminin kontrol altına alınmasında önemli rol oynayacaktır.

Nargile dumanı, sigara dumanı gibi nikotin, karbon

monoksit ve çok sayıda karsinojen içerir. Nargilede kullanılan tütünün tipi ve miktarı, nargile içiminin süresi ve sıklığı, inhale edilen duman hacmi ve muhtemel sağlık riskleri üzerinde etkili olmaktadır<sup>21</sup>. Nargile içiminin kanser, kalp damar hastalıkları, bulaşıcı hastalıklar, akciğer rahatsızlığı, nikotin bağımlılığı ve gebeliğe bağlı komplikasyonlar ile ilişkisi vardır<sup>9,33,38</sup>.

Yapılacak olan tüm müdahalelerin amaçları, araçları ve yöntemleri doğrultusunda araştırılıp bu yönde en kısa zamanda adımlar atılması kaçınılmaz hale gelmiştir. Müdahaleler yerinde ve zamanında yapılmaz ise ülkemizde tütün tüketiminin birçok alanda olumsuz sonuçlar ortaya çıkaracağı aşikârdır.

Nargilenin tütün kullanımı oranında toksisite ve bağımlılığa neden olmadığı düşüncesinin yaygın olması, gençlerin nargile kullanımına olan eğilimini daha da arttıracaklarını düşündürmektedir<sup>8</sup>. Konu ile ilgili gerekli önlemler alınmalı başta gençler olmak üzere tüm toplum bilinçlendirilmelidir.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Peer Review:** Externally peer-reviewed.

**Yazar Katkıları:** Çalışma Konsepti/Tasarım- S.Ö.S.; Yazı Taslağı- S.Ö.S.; Son Onay ve Sorumluluk- S.Ö.S.; Malzeme ve Teknik Destek- S.Ö.S.

**Author Contributions:** Conception/Design of Study- S.Ö.S.; Drafting Manuscript- S.Ö.S.; Final Approval and Accountability- S.Ö.S.; Technical or Material Support- S.Ö.S.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

**Conflict of Interest:** Authors declared no conflict of interest.

**Finansal Destek:** Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

**Financial Disclosure:** Authors declared no financial support.

**Teşekkür:** Desteklerinden ötürü Prof.Dr. İlhan İlkılıç ve Enstitü Yönetim Kurulunda bulunan tüm hocalarıma teşekkür ederim.

**Acknowledgement:** I would like to thank to Prof. Dr. İlhan İlkılıç and Instute Board for their contribution to my study.

**KAYNAKLAR**

1. Aboaziza E., Eissenberg T. (2015). Waterpipe tobacco smoking: what is the evidence that it supports nicotine/tobacco dependence?. *Tob Control*. Mar; 24 Suppl 1:i44-i53.
2. Aktaş A., Hidiroğlu S., Karavuş M. (2018). Üniversite Öğrencilerinin Nargile İçme Konusundaki Bilgi, Tutum ve Davranışları. *Fırat Tıp Dergisi, Fırat Med J*; 23 (2): 68-72.
3. Akter E. (2011). Adana İli Merkezindeki Lise Öğrencilerinde Tütün ve Tütün Mamullerinin Kullanımı. ÇÜ Tıp Fakültesi Aile Hekimliği Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Adana.
4. Arziman I., Acar YA., Yildirim A.O., Cinar O., Cevik E., Eyi Y.E. et al. (2011). Five Cases of Carbon Monoxide Poisoning Due to Narghile (Shisha). *Hong Kong Journal of Emergency Medicine*; 18(4): 254-257.
5. Aslan D. (2012). Dünyada ve Türkiye’de Tütün Kullanımı: Riskler, Tehditler, Önleyici Yaklaşımlar. *Türkiye Klinikleri J Pulm Med-Special Topics*; 5(2):1-5.
6. Aşut Ö., Çalı Ş., Özcan A., DüNDAR F., Palaz Ç., Duran A., Vaizoğlu S. (2019). Lefkoşa’da Bir Üniversitenin Türkçe Tıp Öğrencilerinde Tütün Kullanımı Durumu, *Sted*, cilt volume 28, sayı issue 1; 1-16.
7. Chattopadhyay A., Ray J.G. (2016). Molecular Pathology of Malignant Transformation of Oral Submucous Fibrosis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*; 35(3):193-205.
8. Çevik Akyıl R., Kahraman A., Erdem N. (2018). Üniversite Öğrencilerinin Nargile Kullanımını Etkileyen Faktörlerin Belirlenmesi. *İzmir Göğüs Hastanesi Dergisi*, Cilt XXXII Sayı 3.
9. Dugas E., Tremblay M., Low N.C.P., Cournoyer D., O’Loughlin J. (2012). Water-Pipe smoking among north american youths. *Pediatrics*; 125(6) :1184-1189.
10. Elias W., Assy N., Elias İ., Toledo T., Yassin M., and Bowirrat A. (2012). The detrimental danger of water-pipe (Hookah) transcends the hazardous consequences of general health to the driving behavior. *J Transl Med.*; 10: 126.
11. Ergüder T. (2018). Küresel Tütün Kullanımı Salgını ve Kontrolü. *TJFMPC* www.tjfmpe.gen.tr; 12 (4).
12. Gelen M.E., Köksal N., Özer A., Atilla N., Cinkara M., Kahraman H., ve ark. (2011). Üniversitemiz öğrencileri ile akademik ve idari personel arasında 5727 sayılı yeni tütün yasasına ilişkin bilgi düzeyi değerlendirmesi. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi*; 59(2):132-139.
13. Grinberg A., Goodwin R.D. (2016). Prevalence and correlates of hookah use: a nationally representative sample of US adults ages 18-40 years old. *Am J Drug Alcohol Abuse*. Sep; 42(5):567-576.
14. Gruzieva T.S., Galienko L.I., Holovanova I.A., Zamkevich V.B., Antonyuk O.Y., Konovalova L.V., Dolynskiy R.G., Zshyvotovska A.I. (2019).Prevalence of bad habits among students of the institutions of higher medical education and ways of counteraction. *Wiad Lek*.72(3):384-390.
15. Hanewinkel, R., Morgenstern, M. (2019). Influence of advertising, movies and internet on smoking behavior and e-cigarette use of children and adolescents . *Atemwegs- und Lungenkrankheiten* 45(6): 277-285.
16. Haroon M., Munir A., Mahmud W., Hyder O. (2014). Knowledge, attitude, and practice of water-pipe smoking among medical students in rawal pindi, Pakistan. *Journal of Pakistan Medical Association*; (64):155-158.
17. İbrahimov F., Şahin İ., Eminağa F., Feyzioğlu K., Metin, B.C., Aslan D. (2012). Nargile içicilerinin bazı özellikleri ve ekspiryum havasında karbon monoksit (CO) düzeylerinin saptanması. *Gülhane Tıp Derg*; 54: 49-56.
18. Javed F., ALHarthi S.S., BinShabaib M.S., Gajendra S., Romanos G.E., Rahman I. (2017). Toxicological impact of waterpipe smoking and flavorings in the oral cavity and respiratory system. *Inhal Toxicol*. Aug;29(9):389-396.
19. Koç E., Aslan D. (2016). Tütün Kontrolünde “Yeni” Mücadele Alanları: Nikotin Salıveren Sistemler. HÜTF Halk Sağlığı AD Toplum İçin Bilgilendirme Serisi - Dizin 146;. [Internet] <http://www.halksagligi.hacettepe.edu.tr/>.
20. Korkmaz M., Ersoy S., Özkahraman Ş., Duran ET., Uslusoy E.Ç., Orak S., ve ark. (2013). Süleyman demirel üniversitesi öğrencilerinin tütün mamulleri-alkol kullanım durumları ve sigaraya yaklaşımları. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*; 20(2):34-42.

21. Krishnan-Sarin S., Jackson A., Morean M., Kong G., Bold K.W., Camenga D.R., Cavallo D.A., Simon P., Wu R. (2019). E-cigarette devices used by high-school youth. *Drug Alcohol Depend.* Jan 1;194:395-400.
22. Maziak W., Jawad M., Jawad S., Ward K.D., Eissenberg T., and Asfar T. (2015). Interventions for waterpipe smoking cessation. *Cochrane Database Syst Rev.* Jul 31;(7): 1-26.
23. Meo S.A., AlShehri K.A., AlHarbi B.B., Barayyan O.R., Bawazir A.S. (2014). Alanazi OA, Al-Zuhair AR. Effect of shisha (waterpipe) smoking on lung functions and fractional exhaled nitric oxide (FeNO) among Saudi young adult shisha smokers. *Int J Environ Res Public Health.* Sep 17;11(9):9638-48.
24. Morton J., Song Y., Fouad H., El Awa F., El Naga R.A., Zhao L., et al. (2013). Cross-Country comparison of waterpipe use: nationally representative data from 13 low and middle-income countries from the global adult tobacco survey (GATS). *Tobacco Control, 0:1-9* (doi:10.1136/tobaccocontrol-2012-05084).
25. Mzayek F., Khader Y., Eissenberg T., Ali R.A., Ward K.D., Maziak W. (2012). Patterns of water-pipe and cigarette smoking initiation in school children: irbid Çakmak ve Çınar, longitudinal smoking study. *Nicotine & Tobacco Research; 14(4):448-454.*
26. Naggar R.A., Saghir F.S.A. (2011). Water pipe (Shisha) smoking and associated factors among Malaysian university students. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention; 12:3041-3047.*
27. Okdemir S. (2013). Nargile içimine bağlı karboksijen hemoglobin seviyelerinin değerlendirilmesi. GÜ Tıp Fakültesi Acil Tıp Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Ankara: 22-37.
28. Örsel O. (2010). Tütün İçeriği, Farmako kinetiği ve Tütün Ürünleri. (Ed: Aytemur ZA, Akçay Ş, Elbek O.) Tütün ve Tütün Kontrolü, Toraks Kitapları. İstanbul: Aves Yayıncılık; 10:137.
29. Poyrazoglu S., Sarli S., Gencer Z., Gunay O. (2010). Waterpipe (narghile) smoking among medical and non-medical university students in Turkey. *Ups J Med Sci; 115: 210-6.*
30. Salameh P., Salame J., Waked M., Barbour B., Zeidan N., Baldi I. (2014). Waterpipe dependence in university students and effect of normative beliefs: A cross-sectional study. *BMJ Open: 1-9.*
31. Salameh P., Salame J., Waked M., Barbour B., Zeidan N., Baldi I. (2014). Waterpipe dependence in university students and effect of normative beliefs: A cross-sectional study. *BMJ Open: 1-9.*
32. Selim G.M., Fouad H., Ezzat S. (2013). Koroner anjiyografi önerilen hastalarda nargile içiminin koroner arter hastalığının yaygınlığına etkisi. *Anadolu Kardiyoloji Dergisi; 13: 647-654.*
33. Seydioğulları M. (2010). Dünyada ve Türkiye'de Tütünün Tarihi, Üretimi, Ticareti ve Temel Politikaları. (Ed: Aytemur ZA, Akçay Ş, Elbek O.) Tütün ve Tütün Kontrolü, Toraks Kitapları. İstanbul: Aves Yayıncılık; 10:8.
34. Sezer R.E., Pıçak Y.K. (2011). Tütün mücadelesi için yeni bir tehdit: aromatik nargile. *Cumhuriyet Tıp Dergisi; (33):133-143.*
35. Shihadeh A., Schubert J., Klaiany J., El Sabban M., Luch A., Saliba N.A. (2015). Toxicant content, physical properties and biological activity of waterpipe tobacco smoke and its tobacco-free alternatives. *Tob Control Mar;24 Suppl 1:i22-i30.*
36. T.C. Sağlık Bakanlığı. (2010). Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Tütün Bağımlılığı İle Mücadele El Kitabı (Hekimler İçin). Ankara.
37. WHO Study Group on Tobacco Product Regulation. (2015). Report On The Scientific Basis of Tobacco product Regulations: Fifth Report of A Who Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser. (989):1-234, back cover.*
38. Zabadi H.A., Musmar S., Hassouna A., Shtaiwi D. (2018). Cigarettes and Water Pipe Smoking Prevalence, Knowledge, and Attitudes Among the Palestinian Physicians in the West Bank. *Tobacco Use Insights. Dec 25; Vol 11: 1-11.*



# Kardiyovasküler Hastalıklarda Uzun Kodlamayan RNA'lar ve Sirküler RNA'ların Önemi

## *The Importance of Long Noncoding RNAs in Cardiovascular Diseases*

Hilal Şentürk<sup>1</sup> , Evrim Kömürcü Bayrak<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Uzm. Bio., <sup>2</sup>Doç. Dr., İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ORCID: H.Ş. 0000-0001-9743-5817;  
E.K.B. 0000-0003-1271-1208

### Sorumlu yazar/Corresponding author:

Evrim Kömürcü Bayrak,  
İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye  
E-posta: ebayrak@istanbul.edu.tr

**Başvuru/Submitted:** 25.10.2019

**Revizyon Talebi/Revision Requested:** 06.11.2019

**Son Revizyon/Last Revision Received:** 07.11.2019

**Kabul/Accepted:** 29.11.2019

**Atıf/Citation:** Senturk, H, Komurcu-Bayrak E. (2019): The Importance of Long Noncoding RNAs in Cardiovascular Diseases, *Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi*, 2(3): 115-125.  
<https://doi.org/10.26650/JARHS2019-638138>

### Öz

Kardiyovasküler hastalıklar (KVH'lar), mortalite ve morbiditenin en önemli nedeni olup çoğunlukla yetişkinlerde gözlenmektedir. KVH'ların altında yatan ana mekanizma, fibröz plakların oluşumu, düz kas hücrelerinin çoğalması ve enflamatuvar hücrelerin göçü ile meydana gelen karmaşık bir patoloji olan aterosklerozdur. Son çalışmalar, uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA) ve dairesel RNA'lar (circRNA) gibi protein kodlamayan RNA'ların, ateroskleroz dahil tüm KVH'ların epigenetiğinde önemli düzenleyici rollere sahip olduğunu göstermektedir. Bu derlemede, lncRNA'ların ve circRNA'ların fonksiyonel aktiviteleri ve bunların ateroskleroz ve KVH'larla olan ilişkileri özetlenmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Kardiyovasküler hastalıklar, uzun kodlamayan RNA, sirküler RNA

### ABSTRACT

Cardiovascular diseases (CVDs) are a leading cause of mortality and morbidity and mostly affect adults. The main underlying mechanism of CVDs is atherosclerosis and this complex pathology is caused by the formation of fibrous plaques, the proliferation of smooth muscle cells and the migration of inflammatory cells. Recent studies suggest that noncoding RNAs such as long noncoding RNAs (lncRNAs) and circular RNAs (circRNAs) have critical regulatory roles in the epigenetics of all CVDs including atherosclerosis. This review summarizes the functional roles of lncRNAs and circRNAs and their relationships with atherosclerosis and CVDs.

**Keywords:** Cardiovascular diseases, long noncoding RNA, circular RNA

## GİRİŞ

Son yıllardaki tüm genom ve fonksiyonel analiz çalışmalarında insan genomunun, düzenleyici role sahip protein kodlamayan RNA transkribe eden binlerce gen içerdiği belirlenmiştir.<sup>1</sup> MikroRNA'lar (miRNA'lar) ve uzun kodlamayan RNA'lar (*ing.* "long noncoding RNA" - lncRNA) dahil olmak üzere önemli sayıda kodlamayan RNA (ncRNA'lar) keşfedilmiştir. Kodlamayan RNA'lar arasında yer alan Sirküler RNA'lar (*ing.* "Circular RNA"-circRNA), 3'- ve 5'-uçları kovalent olarak birleşerek dairesel yapı oluşturan bir RNA tipidir. Çeşitli biyolojik süreçlerde işlev gösteren circRNA'ların ifadelerindeki değişikliklerin, nörodejeneratif hastalıklar ve kanserler de dahil olmak üzere kompleks hastalıklarla ilişkili oldukları belirlenmiştir. Araştırmalar, ateroskleroz patogeneğinde circRNA'larında rol oynadığını belirtmektedir.<sup>2</sup> LncRNA'lar, proteine transkripsiyonu yapmayan 200 nükleotitten uzun moleküllerdir. LncRNA'ların hem gelişim hem de farklılaşma süreçlerinde ifade edildiği ve diğer hücrel süreçleri kontrol etmede önemli rollere sahip olduğu bulunmuştur.<sup>3</sup> Çeşitli patolojik durumlarda lncRNA ifade düzeylerinde meydana gelen değişimler, lncRNA'ları terapötik hedef ve biyobelirteç adayları haline getirmiştir.<sup>4</sup>

Kardiyovasküler hastalıklar (KVH), dünyada mortalite ve morbiditenin ilk sıradaki nedeni olarak gösterilmektedir. KVH'nin temelinde yer alan ateroskleroz, lipid birikimi ve fibroz plaklar ile karakterize edilen kronik bir patolojidir. Kodlamayan RNA molekülleri ile kardiyovasküler hastalıklar arasında bağlantıyı anlayabilmek ve yeni terapötik hedefler geliştirebilmek için kardiyovasküler hastalıkların başlangıcında, ilerlemesinde ve modülasyonunda rol alan lncRNA'lar<sup>5</sup> ve circRNA'lar<sup>6</sup> gibi kodlamayan RNA'ların tanımlanması önem taşımaktadır.

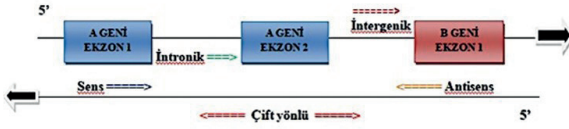
### 1. Uzun Kodlamayan RNA'ların Özellikleri

Uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA), 200 nükleotitten daha uzun RNA molekülleridir ve insan genomunda 10.000'den fazla lncRNA kodlayan gen olduğu ve tüm hücrelerde yaklaşık 60.000 lncRNA'nın transkribe edildiği tahmin edilmektedir.<sup>7</sup> LncRNA

genleri de protein kodlayan genler gibi RNA polimeraz II tarafından transkribe edilir ve lncRNA'lar mRNA'lar gibi açık okuma çerçevesine (*ing.* "open reading frame"-AOÇ, bazı istisnalar hariç), 3'-translasyona uğramayan bölgeye (*ing.* "untranslated region"-UTR) ve translasyon sonlanma bölgelerine sahip olmasalar da mRNA'lar gibi alternatif kırılma, 3'-poliadenilasyon ve 5'-şapka işlenmesi gibi modifikasyonları olmaktadır. Gen ifade düzeyi ise mRNA'lara göre lncRNA'ların daha azdır ve ayrıca lncRNA genleri protein kodlayan genlere göre türler arasında daha az korunmaktadır.<sup>7,8</sup>

LncRNA genlerinin genomik lokalizasyonları, intergenik, intronik, güçlendirici (*ing.* "enhancer"), çift yönlü, sens (kodlayan, 5'→3') veya antisens (kalıp, 3'→5') yönelimli olabilmektedir. İntergenik lncRNA'lar (*ing.* "long intergenic non-coding RNA"-lincRNA), protein kodlayan genlerin arasında yer alan genomik DNA segmentlerinden transkribe edilmektedir.<sup>5</sup> İlk tanımlamalarda lincRNA'ların işlevsel bir önemi olmadığı düşünülerek "junk" genler olarak adlandırılmıştır. Bununla birlikte son çalışmalarda lincRNA'ların, lokalize olduğu bölgelere yakın olan genlerin promotörlerini veya güçlendiricilerini modüle ederek gen ifadesini kontrol edebileceği belirlenmiştir. İntronik lncRNA'ların genleri, protein kodlayan genlerin intronlarında bulunmaktadır. Hem lincRNA'lar hem de intronik lncRNA'lar poli-(A) kuyruğuna sahiptir.<sup>5</sup> Sens lncRNA'lar, protein kodlayan genlerin kodlayan zincirlerinden transkribe edilmekte olup bunların ekzonik ve intronik bölgeleri ile çakışabilmektedir. Sens lncRNA'ların aksine antisens yönelimde olan lncRNA'lar ise protein kodlayan genlerin kalıp zincirlerinden transkribe olmaktadır. Çift yönlü lncRNA'lar, birbirlerine zıt yönde transkribe olmaktadır ve bunların protein kodlayanlara benzer işlevlere sahip oldukları gösterilmiştir.<sup>5</sup> "Enhancer" lncRNA'lar, genomda güçlendirici bölgelerden transkribe olmaktadır.<sup>5,9</sup> Şekil 1'de lncRNA'ların genomik lokalizasyonları ve yönelimleri şematik olarak gösterilmektedir.

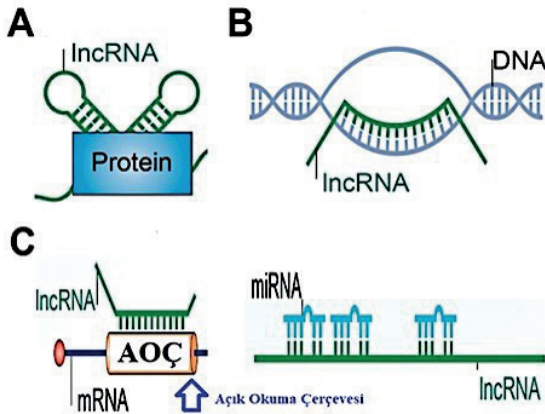
LncRNA'ların hücre içi fonksiyonel lokalizasyonu, nükleus veya sitoplazma iken bazı lncRNA'lar hem sitoplazma hem de nükleusda bulunabilmektedir.



Şekil 1. LncRNA sınıflandırılmasının şematik diyagramı<sup>5</sup>

LncRNA'ların genel olarak %85'inin nükleusda, kalan %15'inin de sitoplazmada yer aldığı belirlenmiştir.<sup>10,11</sup>

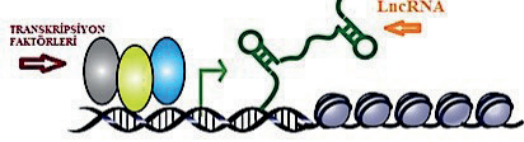
LncRNA'lar gen ifadesi, DNA'nın epigenetik modifikasyonu, alternatif kırılma, transkripsiyonel, post-transkripsiyonel gen düzenlemeleri, mRNA stabilitesi, RNA işlenmesi ve translasyonu gibi düzenleyici işlevlere sahiptir.<sup>9</sup> LncRNA'lar Şekil 2'de gösterildiği gibi DNA, RNA ve proteinlerle etkileşerek gen aktivasyonu ya da baskılamasını sağlamaktadır.<sup>5,12</sup> LncRNA'lar, transkripsiyon faktörleri veya kromatini modifiye edici komplekslerin bileşenleri gibi proteinlerle etkileşime girerek gen ifadesini düzenlemek için moleküler iskeleler olarak görev almaktadır (Şekil 2A). Ayrıca bazı LncRNA'lar, genomik DNA ile tamamlayıcı etkileşime (Şekil 2B) girerek promotör bölgeleri gibi spesifik genomik bölgelere proteinleri yönlendirebilmekte veya proteinlerin spesifik DNA bölgelerine bağlanmasını önleyebilmektedir. Diğer yandan hedef mRNA'ların açık okuma çerçevelerine komplementer olan lncRNA'larca mRNA'nın translasyonu regüle edilirken, bazı komplementer miRNA'lar için endojen tuzaklar olarak görev alarak miRNA'ların işlevini regüle etmektedir (Şekil 2C).<sup>5,12</sup>



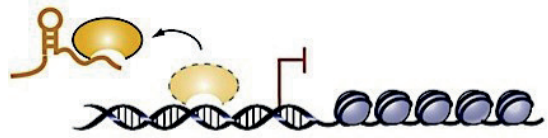
Şekil 2. LncRNA'ların etkileşim mekanizmaları<sup>5</sup>. AOC; Açık okuma çerçevesi

LncRNA'ların sinyal, tuzak, kılavuz ve iskele olmak üzere 4 farklı şekilde işlev gösterdiği belirlenmiştir.<sup>12</sup> Şekil 3'te lncRNA'ların moleküler fonksiyonları şematik olarak gösterilmektedir.

### SİNYAL



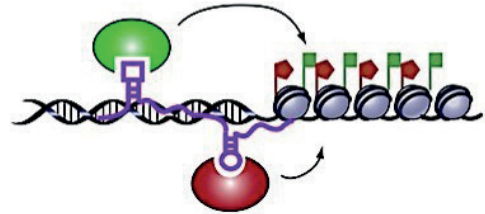
### TUZAK



### KILAVUZ



### İSKELE



Şekil 3. LncRNA'ların moleküler fonksiyonları.<sup>12</sup>

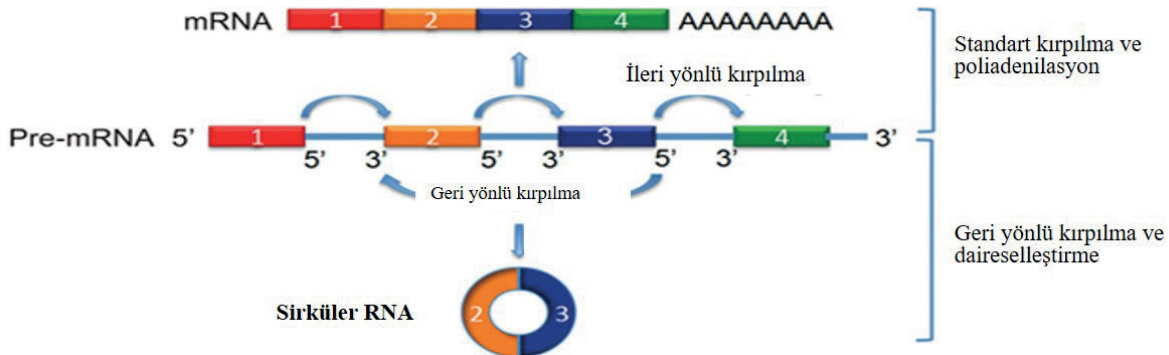
Sinyal lncRNA'lar, gen düzenlenmesinin zamanını ve lokalizasyonunu belirleyen moleküller olarak işlev göstermektedir. Bunlar, gen ve allele özgü ifadenin modülasyonunda görev almaktadır.<sup>13</sup> Bazı lncRNA'lar hedeflenen proteinlerin ifadelerini azaltarak regüle (ing. "downregulation") etmek için negatif düzenleyiciler olarak görev yapmaktadır.<sup>14</sup> Tuzak fonksiyonu gösteren bu lncRNA'lar, çeşitli transkripsiyon faktörlerinin genomik DNA'dan ayrılmasını sağlayan bir yem gibi hareket ederek hedef genleri dolaylı olarak düzenleyebilmektedir.<sup>15</sup> Kılavuz fonksiyonuna sahip lncRNA'lar, kromatin düzenlenmesinde rol alan enzimleri

hedef genlere yönlendirmektedir ve bu genlerin ifadesini yakınındaki komşu genler için "cis", uzaktaki genler için "trans" düzenleme ile değiştirebilmektedir.<sup>16</sup> Ek olarak bazı lncRNA'lar ise ribonükleoprotein kompleksleri oluşturmak için çoklu proteinleri bir araya getiren iskeleler olarak işlev görmektedir.<sup>12</sup>

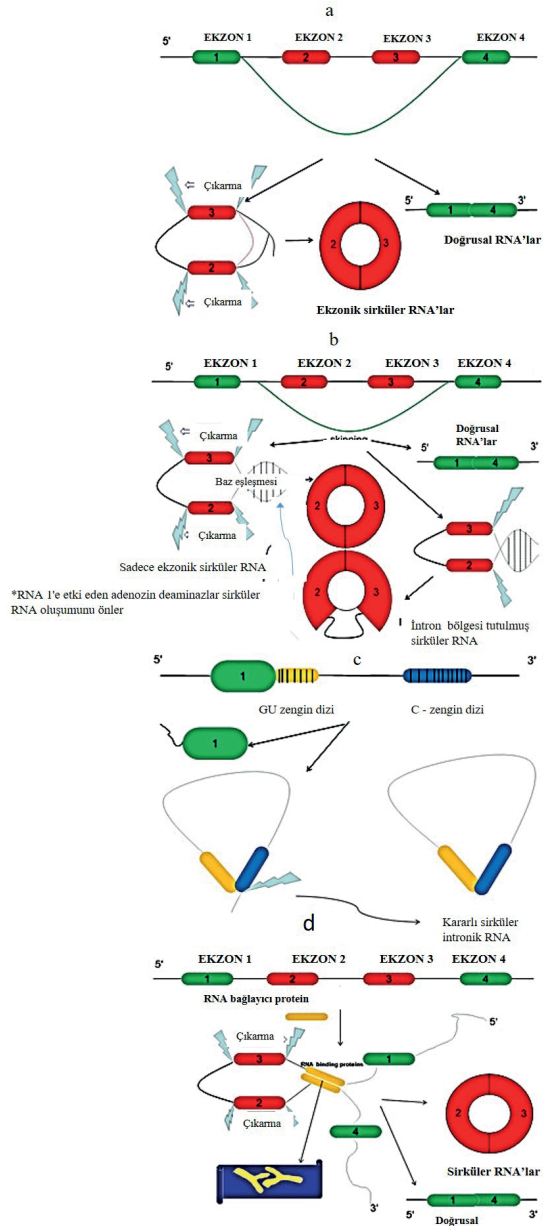
## 2. Sirküler RNA'ların Özellikleri

Sirküler RNA'lar (circRNA'lar), bir başka genetik düzenleyici olarak işlev gören kodlamayan RNA türüdür. Doğrusal RNA'ların aksine, poliadenilat kuyrukları olmayan kovalent olarak bağlı uçlara sahiptirler. CircRNA'lar, RNazR aktivitesine dirençli olan kovalent bağlarla kapalı sürekli bir döngü oluşturduğundan, doğrusal RNA'lara göre daha stabil bir kodlamayan RNA sınıfıdır. CircRNA'lar, RNA bağlayıcı proteinler, sekestrasyon ajanları, transkripsiyonel düzenleyiciler ve ayrıca miRNA bağlayıcıları olarak görev yapmaktadır. Ek olarak, seçilmiş bazı circRNA'ların fonksiyonel proteinlere dönüştürüldüğü bildirilmiştir. Genellikle miktarı fazladır ve stabildir ayrıca bazı dokularda (karaciğer, akciğer, mide), tükürükte, eksozomların içeriğinde ve kanda bulunabilmekte ve evrimsel olarak korunmaktadır. Genel olarak circRNA'lar sitoplazmada depolanmaktadır, çok küçük bir kısmı ise çekirdekte bulunmaktadır.<sup>6</sup>

Nükleusta sentezlenen pre-mRNA'dan kırılmalar ile mRNA ve dairesel yapıdaki circRNA oluşumu temel olarak Şekil 4'de şematik olarak gösterilmiştir. Küçük nükleer ribonükleoproteinler (snRNP'ler) tarafından pre-mRNA'nın intronları kesilir ve doğrusal mRNA'lardan farklı olarak kesilmiş segmentteki 5'-uç, 3'-uçla birleşerek dairesel hale gelerek circRNA'ları oluşturmaktadır.<sup>17</sup>



Şekil 4. Sirküler RNA'ların biyogenezini.<sup>17</sup>



Şekil 5. İleri sürülen circRNA oluşum modelleri.<sup>6</sup>



Ancak aslında daha karmaşık mekanizmalar ile circRNA'lar ekzonik, intronik, ve ekzon-intron circRNA'ları olmak üzere üç farklı tipte Şekil 5'de şematik olarak gösterildiği gibi meydana gelmektedir<sup>6</sup>. Buna göre; doğrudan kement odaklı daireselleştirme mekanizmasında, ekzon birleştirilmesi ile bir kement yapısı oluşturulur. Ekzon 1'in 3'-uç kırılma verici bölgesi ile ekzon 4'ün 5'-uç kırılma alıcısı kovalent olarak bağlanır. Sirküler ekzonik RNA, intron diziliminin çıkarılmasından sonra oluşur. Bu circRNA tipi, tüm circRNA'ların % 80'inden fazlasını oluşturmaktadır (Şekil 5A). İntron eşleştirme odaklı daireselleştirmede, ters tekrarlanan dizileri veya ALU elementlerini çevreleyen intronların doğrudan baz eşleşmesi ile sirküler bir yapı oluşur. İntronlar, ekzon-intron circRNA oluşturmak üzere tutulur veya ekzonik circRNA oluşturmak üzere çıkartılır (Şekil 5B). Sirküler intronik RNA'lar, kırılma işleminden kaçabilecek kement intronlarından üretilir; Ekzon 1 (sarı kutu) yakınındaki 7 nükleotid uzunluğundaki GU-zengin dizileri ve ekzon 2 (mavi kutu) yakınındaki 11 nükleotid uzunluğundaki C-zengin dizileri, kırılma işleminden kaçarak sirküler intronik RNA'lar oluşturur ve stabil circRNA haline gelir (Şekil 5C). RNA bağlayıcı protein (RBP) odaklı daireselleştirmede ise circRNA'lar, RBP'ler (Y-şekli) ile intronlar çıkarılarak oluşturulmaktadır (Şekil 5D).<sup>6</sup>

### 3. Kardiyovasküler Hastalıklar ve Kodlamayan RNA'lar

#### 3.1. Kardiyovasküler Hastalıklarda lncRNA'lar

Aterosklerotik lezyon progresyonu ve restenozundaki en temel olaylardan birinin, arter duvarındaki vasküler düz kas hücrelerinin (VSMC) proliferasyonu ve göçünün olduğu düşünülmektedir.<sup>18</sup> Motterle ve arkadaşları<sup>19</sup>, hücre siklusü düzenleyici proteinlerinden p16<sup>INK4a</sup> ve p15<sup>INK4b</sup> ifadelerindeki azalmanın VSMC proliferasyonunu arttırdığını belirlemiştir.<sup>19</sup> p16<sup>INK4a</sup> ve p15<sup>INK4b</sup> proteinlerini kodlayan *CDKN2A* (İng. "Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A") ve *CDKN2B* (İng. "Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2B") genlerinin kromozom 9p21 lokusunda bulunduğu ve bu bölgedeki tek nükleotid polimorfizme-

rinin (ing. "single nucleotide polymorphism"-SNP) VSMC proliferasyonunu etkilediği ve bu hücrelerde p16<sup>INK4a</sup> ve p15<sup>INK4b</sup> ifadelerinin azaldığı belirlenmiştir.<sup>19</sup> 9p21 lokusundaki SNP'lerin aynı zamanda ateroskleroz ve miyokard enfarktüsü riskini arttırdığı bildirilmiştir.<sup>20, 21</sup> *CDKN2A* geni ile ters yönelimli olarak bulunan *CDKN2B-AS* (*ANRIL*) geninden lncRNA molekülü transkribe olmaktadır<sup>19,22</sup> *ANRIL* ateroskleroz ciddiyeti ile yakından ilişkili kodlamayan RNA moleküllerindedir ve genindeki çeşitli SNP'lerin, hem aterom plak hem de periferik kanda *ANRIL* transkriptlerinin ifadesindeki değişimler ile ilişkili olduğu belirlenmiştir.<sup>23</sup> Son dönemdeki çalışmaların derlendiği bir makalede, ateroskleroz patogenezinde rolü olan lncRNA'ların farklı tipteki lezyonların oluşumuna katıldıkları, düz kas hücrelerinde proliferasyon, migrasyon ve matriks sentezini düzenleyebildiği belirtilmiştir.<sup>24</sup>

Aterosklerozun başlangıcında ve gelişiminde ilk aşama olan endotel hasarı (disfonksiyon), geçirmeliğin artmasına ve adezyon proteinlerinin birikimine neden olarak lökositlerin damar duvarlarına migrasyonunu uyarmaktadır.<sup>25</sup> Endotel hücre proliferasyonu, anjiyogenezde ve hücrel migrasyonda lncRNA'larında rol oynadığı gösterilmiştir.<sup>24</sup> *MALAT1* adlı lncRNA'nın endotel hücrelerde hipoksi ve hiperlipidemi gibi stresli durumlarda indüklendiğini göstermektedir.<sup>26</sup>

Aterosklerotik lezyon, arter duvarındaki lipoproteinlerin, makrofajlardan türetilen köpük hücrelerinin birikiminden oluşmaktadır. Makrofajlar aktive olup damar duvarına doğru harekete geçerek kolesterol köpük hücrelerini oluşturmakta ve daha sonra enflamatuvar faktörler salgılanarak makrofaj birikiminde daha fazla artışa neden olmaktadır.<sup>25</sup> Bu olayda, lipid metabolizması ve doğuştan gelen bağışıklık yanıtı arasında bir bağlantı olduğu öne sürülmektedir. Dolayısıyla, hücrel lipid taşınmasında ve bağışıklıkta yeni hedeflerin bulunması önem taşımaktadır. Sadece makrofaj ile ilişkili bir kaç lncRNA tanımlanmış olmasına rağmen, daha çok sayıda lncRNA'nın makrofajlarda ve enflamasyonda önemli düzenleyici rollere sahip olduğu belirlenmiştir.<sup>24</sup> Hu ve arkadaşları, lncRNA'ların kolesterol metabolizmasında ve

enflamasyonda düzenleyici rollerini belirleyebilmek için mikrodizin analizi ile, makrofaj ve makrofaj türevli köpük hücrelerinin gen ifade profillerini araştırmışlardır.<sup>27</sup> Bu çalışmada, lincRNA-DYNLRB2-2 (İng. "Dynein Light Chain Roadblock-Type 2-2") ve lincRNA RP5-833A20.1'nin (diğer adı, NFIA Antisens RNA1) büyük ölçüde hücrel kolesterol metabolizmasının ve enflamasyonun düzenleyicileri olduklarını belirlemişlerdir. LincRNA-DYNLRB2-2'nin hücrel enflamatuvar sitokinleri (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-6) azalttığı ve hiperlipidemik stres altında makrofajlarda kolesterol akışını tetiklediği bulunmuştur.<sup>27</sup> Bir başka lincRNA olan RP5-833A20.1 ise, enflamatuvar sitokinleri (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-6) arttırdığı ve NFIA yoluğ üzerinden miR-382 aracılığı ile kolesterol akışını azalttığı belirlenmiştir.<sup>28</sup> Ateroskleroz patogenezinde farklı hücrel yollarda rol alan lincRNA'lar ve bunların etki mekanizmaları ile ilgili araştırmalar halen yoğun olarak devam etmektedir.

Akut miyokard infarktüsü (MI), dünyada ve ülkemizde mortalite ve morbiditenin önemli sebeplerindedir. Bu hastalığın temel nedenini ateroskleroz oluşturmaktadır. Kan akışını bozacak kadar ciddi darlıklar koroner iskeminin nedeni olsa da MI genellikle çok önemli görülmeyen lezyonların rüptüre olması sonucu meydana gelmektedir.<sup>29</sup> Vausort ve arkadaşlarının çalışmasında, lincRNA'lar ile MI arasındaki ilişki araştırılmıştır.<sup>30</sup> Bunun için seçtikleri *ANRIL*, *KCNQ1OT1*, *MIAT*, *MALAT1* ve *aHIF* adlı 5 lincRNA ifade düzeyleri, MI geçiren hastalar ve kontrol hastalar ile karşılaştırılmıştır. Sonuçta *MIAT* için kontroller ve enfarktöslü hastalar arasında anlamlı bir fark bulunamazken, *ANRIL*'in ifade düzeyinin azaldığı, *KCNQ1OT1*, *MALAT1* ve *aHIF* adlı lincRNA'ların ifade düzeyinde arttığı belirlenmiştir.<sup>30</sup> Benzer şekilde Lu ve arkadaşları da, akut koroner sendromun iki farklı klinik alt-tipi olan MI ve kararsız anjina pektorisli (UAP) hasta grupları arasında 2.332 adet lincRNA'nın ifade düzeyi karşılaştırılmıştır.<sup>31</sup> Bu lincRNA'dan 18'inin artarak regüle (ing. "upregulation") edildiği ve 35 lincRNA'nın azaltarak regüle edildiği tespit edilmiştir. Daha düşük mortaliteye sahip UAP hastalarının, MI hastalarına göre farklı ifade düzeylerine sahip olduğu belirtilmiştir<sup>31</sup> ancak

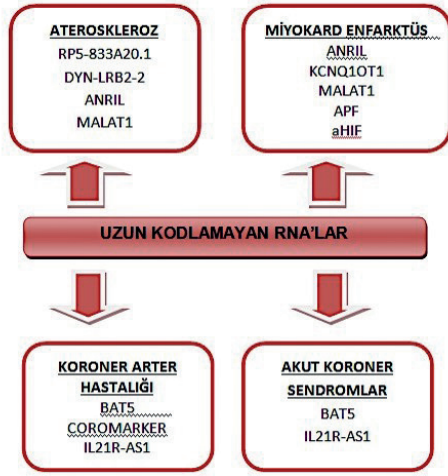
ilişkili bulunan bu lincRNA'ların ifade düzeylerinin daha geniş hasta gruplarında valide edilmesi önem taşımaktadır.

Wang K. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, APF adlı lincRNA'nın (İng. "Autophagy-Promoting Factor") miR-188-3p ile etkileşerek miyokardiyal enfarktüs (MI) hasarını arttırdığı belirlenmiştir. miR-188-3p, MI'da hücre ölümü ve sağkalımı düzenlemesinde çok önemli olduğu bilinen otofajinin kilit bir düzenleyicisi olan *ATG7*'nin ifadesini baskıladığı belirlenmiştir.<sup>32</sup> APF'nin miR-188-3p'nin inhibisyonu yoluyla MI hasarını modüle edildiği gösterilmiştir. Buna göre, miR-188-3p varlığında *ATG7* ifadesi belirgin olarak azalmakta ve miR-188-3p'nin deneysel olarak nakavt (ing. "knockout") edildiğinde ise *ATG7* ifade düzeyi artmaktadır. Bununla birlikte, kardiyomiyositlerde APF'nin deneysel olarak nakavt edilmesinin, *ATG7* ifadesini azalttığı gösterilmiştir. Bu bulgular, miR-188-3p'nin APF ile etkileşerek MI sırasında *ATG7* seviyelerinin modülasyonunda önemli rol oynadığını göstermektedir.<sup>32</sup>

Koroner arter hastalığı (KAH) olan bireyler hastaneye en sık akut koroner sendrom (AKS) bulguları ile başvurmaktadır. AKS klinik alt grupları, ST elevasyonu (yükselmesi) içermeyen miyokardiyal enfarktüs (NSTEMI), ST elevasyonu (yükselmesi) içeren miyokardiyal enfarktüs (STEMI), kararsız anjina pektoris (UAP) gibi tüm iskemik durumları kapsamaktadır.<sup>33</sup> KAH patogenezinde rol alan lincRNA'ları bulmaya yönelik yapılan bir araştırmada, 15 KAH ve 15 kontrole ait plazma ve periferik kan mononükleer hücrelerinde, 33.045 lincRNA ile 30.215 kodlayan transkripti içeren mikrodizin temelli transkriptom analizi yapılmış ve 86 lincRNA transkriptinin istatistiksel olarak anlamlı olarak farklı ifade edildiği bulunmuştur.<sup>34</sup> Farklı ifade edilen bu 86 lincRNA'nın 35'inin azaldığı, 51'inin arttığı tespit edilmiş ve ifadesi artanlar arasından 5 lincRNA'nın (*CoroMarker*, *IL21R-AS1*, *BAT5*, *AC107016.1* ve *RP11-203B9.4*) ifade düzeyleri, kantitatif RT-PZR (gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemiyle 20 KAH ve 20 kontrolü periferik kan mononükleer hücrelerinde valide edilmiştir. Sonuçta, *CoroMarker*, *IL21R-AS1* ve *BAT5* lincRNA'nın ifade

düzeylerinde artış gösterdiği tespit edilmiş ve KAH için anlamlı biyobelirteç adayları olabilecekleri ileri sürülmüştür<sup>34</sup>

Son yıllarda yeni lncRNA'ları tanımlamaya yönelik araştırma sayısı gittikçe artarken, aday lncRNA'ların valide edilebileceği daha geniş ve farklı popülasyonlarda araştırmaların devam etmesi ve bu lncRNA'ların hastalık patogenezine katkılarının belirlenmesi önem taşımaktadır. Şekil 6'da literatürde kardiyovasküler hastalıklarla ilişkilendirilmiş lncRNA'lar özet olarak verilmiştir.



Şekil 6. Kardiyovasküler Hastalıklarda lncRNA'lar

### 3.2. Kardiyovasküler Hastalıklarda circRNA'lar

Kodlamayan RNA'ların keşfi ile bu moleküllerin kalp ve damar fiziolojisi için gerekli olduğu ve kardiyovasküler hastalıklar için önemli rolleri olduğu ortaya çıkmıştır. miRNA'lar, lncRNA'lar ve circRNA'lar, kodlamayan RNA'ların ana grupları olarak yer almaktadır. Son zamanlarda, circRNA'lar kardiyovasküler hastalıklarda (KVH) araştırılmış ve kalp yetmezliği, koroner arter hastalığı ve miyokard enfarktüsünde önemli roller üstlendikleri bildirilmiştir.<sup>6</sup>

Sirküler RNA'lar (circRNA'lar) ökaryotik hücrelerde geniş bir spektrumda eksprese ediliyor olsa da çoğunun fiziolojik rolleri ve hastalıklardaki moleküler mekanizmaları halen tam olarak bilinmemektedir. Ancak bir kodlamayan sirküler antisens

RNA'nın, ribozomal RNA (rRNA) olgunlaşmasını kontrol ederek ve aterogenez yollarını modüle ederek ateroproteksiyon sağladığı bilinmektedir.<sup>35</sup> Bu molekülün, daha önce bahsedilen *CDKN2B-AS1* (*ANRIL*) geninden transkribe edilen doğrusal lncRNA'lardan değil, aynı zamanda geri yönlü kırılma (*ing.* "back-splicing") yoluyla meydana gelen bir sirküler RNA olduğu belirlenmiştir.<sup>36</sup> Bu sirküler RNA'lar, miRNA bağlayıcı, protein iskelesi ve kromatin düzenlemesi ile ilişkili moleküller olarak işlev göstermektedirler<sup>37</sup>

Şimdiye kadar, iki çalışma farklı ekzonlardan oluşan bir dizi sirküler *ANRIL* (*circANRIL*) izoformunun olduğunu göstermiştir (46). *circANRIL*, temel bir 60S-preribozomal montaj faktörü olan PES1'e bağlanmaktadır, böylece vasküler düz kas hücrelerinde ve makrofajlarda ekzonükleaz aracılıklı pre-rRNA işlenmesini ve ribozom biyogenezini bozduğu belirlenmiştir. Böylece, *circANRIL*'in nükleolar stres ve p53 aktivasyonunu indükleyerek ateroskleroz gelişiminin engellenmesinde anahtar hücresel işlev olan apoptozu başlatması ve proliferasyonun inhibisyonunu gerçekleştirmektedir. Bu bulgular, *circANRIL*'in ribozom biyogenezini düzenleyen ve ateroproteksiyon sağlayan bir *circRNA*'nın prototipi olduğunu ortaya koymaktadır.<sup>35</sup>

Kardiyomiyopati, hipertrofik ve dilate olarak klinik alt tipleri ile miyokarda etki eden kardiyak patolojik durumdur. Hipertrofik kardiyomiyopatide (HKM), sol ventriküler miyokardiyum normale göre kalınlaşır ve yeterli kan pompalayamaz hale gelir. Bunun sonucunda kalp yetmezliğine ve ölüme yol açar. Dilate kardiyomiyopati ise sol ventrikülün veya her iki ventrikülün genişlemesi ve bozulmuş kontraksiyonu ile karakterizedir. Wang ve ark. kalple ilişkili bir circRNA olan *HRCR*'nin miyokardiyal hipertrofi ve kalp yetmezliğine karşı koruyucu etki ettiğini belirlemişlerdir. Deneysel bir çalışmada, farelere izoprotenol enjekte edilerek aort daralmasına maruz kaldığında, *HRCR* ifadesinin azaltarak regüle edildiği gösterilmiştir. Biyoinformatik tahminler ve AGO2 immünopresipitasyon analizi, *HRCR*'nin miR-223 ile etkileşime girdiğini ve miR-223'ün pro-hipertrofik aktivitesini inhibe ettiğini göstermiştir.<sup>17</sup>

Pan ve ark. (2017), KAH hastalarında üç örnek ve üç kontrol plazma örneği arasındaki farklı ifade edilen circRNA'ları tespit etmek üzere yaptığı circRNA mikrodizin analizi sonucuna göre hsa\_circ\_0006323, hsa\_circ\_0032970, hsa\_circ\_0051172, hsa\_circ\_0054537, hsa\_circ\_0057576, hsa\_circ\_0068942, hsa\_circ\_0082824, hsa\_circ\_0083357 ve hsa\_circ\_0089378 isimli circRNA'ların en az 1.5 kattan fazla olarak ifade edildiğini göstermişlerdir. Bu dokuz circRNA'nın ve bunların hedef mRNA'larından olan "transient" reseptör potansiyel katyon kanalı alt ailesi melastatin üyesi 3'ü (*TRPM3*) etkilemek için bir hsa-miR-130a-3p bağlayıcısı olarak işlev gördüğü belirlenmiştir. Transient reseptör potansiyel katyon kanalı alt ailesi M üyesi 3, kolesterol ile bağlantılı olarak vasküler düz kas hücrelerinin kasılmasını ve proliferasyonunu düzenleyen bir protein olup KAH ile ilişkili bulunmuştur.<sup>6</sup>

Salgado-Somoza ve ark. (2017), MI hastalarındaki riski tahmin etmek için miyokard enfarktüsüyle ilişkili bir sirküler RNA olan *MICRA*'nın ifade düzeylerini araştırmıştır. Buna göre, 472 Akut MI hastasından elde edilen kan örneklerinde *MICRA* ifade düzeyinin ejeksiyon fraksiyonu (EF) % 41'den fazla olan grupta EF'si ≤% 40 olan gruba göre daha düşük olduğu gösterilmiştir. *MICRA* ifade düzeyi düşük olan hastalarda EF riskini azaldığı belirlenmiştir.<sup>38</sup> Meng ve arkadaşlarının yaptığı bir in vitro çalışmada (2019), yüksek ve normal D-glukoz seviyelerinde kültür edilen hipertrofik kalp hücrelerinde farklı şekilde ifade edilen circRNA'ları belirlemişlerdir. circRNA261, ciRNA26, circRNA1191, circRNA4251 ve circRNA6913 adında normale göre bu hücrelerde 2 kattan fazla ifade edilen beş circRNA tanımlanmıştır. Bu circRNA'ların kalp hipertrofinde önemli roller oynayabileceği ve potansiyel biyobelirteçler olarak değerlendirilebileceği ortaya konmuştur.<sup>6</sup> Son zamanlarda kardiyovasküler hastalıklar ile ilişkili circRNA'ları belirlemeye yönelik araştırmaların sayısı gittikçe artmaktadır. Tablo 1'de henüz işlevleri tam olarak ortaya konamamış ancak çeşitli kardiyovasküler hastalıklar ile ilişkilendirilmiş sirküler RNA'lar listelenmiştir.<sup>17</sup> Sirküler RNA'lar, ileride bu hastalıklar için hem potansiyel tedavi adayları ve hem de tanı

ve takipte kullanılacak biyobelirteçler olarak değerlendirilmektedir.

**Tablo 1.** Kardiyovasküler Hastalıklar ile İlişkili Kodlamayan Sirküler RNA'lar<sup>17</sup>

CircRNA	Kardiyovasküler İlişki	Regülasyon
CircSLC8a1	Kalp Gelişimi	Bilinmiyor
CDR1as	Miyokard Enfarktüs	↑
MICRA	Miyokard Enfarktüs	Bilinmiyor
HRCR	Hipertrofik Kardiyomiyopati	↓
CircTitin	Dilate Kardiyomiyopati	Bilinmiyor
CircRNA_000203	Kardiyak Fibrozis	↑
CZNF292	Anjiyogenez	↑
CircANRIL	Ateroskleroz	↓
Circ_0124644	Koroner Arter Hastalığı	Bilinmiyor

## SONUÇ

Kardiyovasküler hastalıklar (KVH), dünya çapında morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenlerindedir.<sup>34</sup> Bu hastalıkların tanı ve takibinde kullanılacak daha yüksek duyarlılık ve özgüllükte yeni biyobelirteçlere gereksinim duyulmaktadır.<sup>39</sup> Son yıllarda, kodlamayan küçük RNA molekülleri ile kardiyovasküler hastalıklar arasındaki ilişkinin belirlenmesi, hastalık patogenezindeki rollerinin tespiti ve yeni terapötik hedeflerin geliştirilebilmesi için çok sayıda çalışma yapılmış olsa da lncRNA ve circRNA'lar ile ilgili literatürde halen kısıtlı sayıda araştırma mevcuttur. Gün geçtikçe bu kodlamayan RNA'ların fonksiyonlarını anlamaya yönelik araştırma sayısı artmaktadır.

Özet olarak, circRNA'lar ve lncRNA'lar esas olarak gen ifadesinin regülasyonuna katkıda bulunan protein kodlamayan RNA'ların birer sınıfıdır. Yapılan çalışmalarda özellikle circRNA'ların tükürük, kan örneğinde serbest veya ekzozomların içeriğinde bol miktarda bulunduğu tespit edilmesiyle, bu moleküller hastalık teşhisi için umut verici biyobelirteç adayları olarak gösterilmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, bazı lncRNA'ların, hastaların vücut sıvılarında stabil bir şekilde tespit edilebileceğini göstermiştir. Standart biyobelirteçlere göre bu kodlamayan RNA'lar, daha stabil ve hassas olarak değerlendirilmektedirler. KVH'larda dolaşımdaki lncRNA'lar, miyokard enfarktüsü, kalp yetmezliği ve atriyal

fibrilasyon dahil olmak üzere çeşitli patolojiler için aday biyobelirteçler olarak değerlendirilmiştir.<sup>6</sup>

LncRNA'lar ve circRNA'lar ile ilgili araştırmalarda, vaka sayılarının istatistiksel analizler için yeterli olmaması veya cinsiyet, yaş ve kardiyovasküler risk faktörlerinin çeşitliliği gibi heterojenite yaratan durumların varlığı halen bu moleküllerin biyobelirteç olarak değerlendirilebilmesi için kısıtlılık yaratmaktadır. Bu nedenle, verileri yorumlamak ve sonuçlandırmak için büyük gruplar ve çok merkezli çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bununla birlikte KVH olan hastaların, kan toplanmadan önce aspirin ve klopidoğrel gibi antikoagulan ilaçları kullanmaları ve bunların dolaşımdaki kodlamayan RNA düzeylerini değiştirebilmesi ihtimali de mevcuttur. Bunlar dışında, lncRNA gen ürünleri olarak farklı birçok transkript varyantlarının olması ihtimali ve bunların farklı işlevlerde olması, çok hızlı yıkılmaları, ifade düzeyinin az olması da araştırmalarda sınırlılıklar arasında sayılmaktadır.<sup>9</sup> Ancak riskli durumların etkin sorgulamaları ve kayıtları ile aşılabilecek ve standardize edilebilecek kısıtlılık yaratan bu durumlara ve literatürde yeterli sayıda araştırma olmamasına rağmen, lncRNA'ların ve circRNA'ların özellikle ateroskleroz ile ilişkili hastalıkların ve miyokard enfaktüsünün tanı ve takibinde kullanılabilecek yeni biyobelirteç adayları arasında değerlendirilebileceği öngörülmektedir.

**Finansal Destek:** Bu derleme makale, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiş tez projesi (Proje No: TYL-2017-27636) kapsamında hazırlanmıştır.

**Grant information:** This review article was prepared within the scope of thesis project supported by the Research Fund of Istanbul University (Project No: TYL-2017-27636).

**Yazar Katkıları:** Çalışma Konsepti/Tasarım- H.Ş., E.K.B.; Veri Toplama- H.Ş., E.K.B.; Veri Analizi/Yorumlama- H.Ş., E.K.B.; Yazı Taslağı- H.Ş.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- E.K.B.; Son Onay ve Sorumluluk- H.Ş., E.K.B.; Malzeme ve Teknik Destek- E.K.B.; Süpervizyon- E.K.B.

**Author Contributions:** Conception/Design of Study- H.Ş., E.K.B.; Data Acquisition- H.Ş., E.K.B.; Data Analysis/Interpretation- H.Ş., E.K.B.; Drafting Manuscript- H.Ş.; Critical Revision of Manuscript- E.K.B.; Final Approval and Accountability- H.Ş., E.K.B.; Technical or Material Support- E.K.B.; Supervision-E.K.B.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir

**Conflict of Interest:** Authors declared no conflict of interest.

## KAYNAKLAR

1. Karaarslan Z.Ö., Serin M.S. (2016): Hastalıkların tanı ve tedavi stratejilerinde miRNA ve diğer non-protein-coding RNA'lar. Mersin Univ Sağlık Bilim Derg.(9)3.
2. Zhang F, Zhang R, Zhang X, Wu Y, Li X, Zhang S, Hou W, Ding Y, Tian J, Sun L, Kong X. (2018): Comprehensive analysis of circRNA expression pattern and circRNA-miRNA-mRNA network in the pathogenesis of atherosclerosis in rabbits. Aging (Albany NY), 10(9):2266-2283.
3. Klattenhoff CA, Scheuermann JC, Surface LE, Bradley RK, Fields PA, Steinhauser ML, ve ark. (2013): Braveheart, a long noncoding RNA required for cardiovascular lineage commitment. Cell, 152(3): 570-583.
4. Kumarswamy R, Bauters C, Volkman I, Maury F, Fetisch J, Holzmann A, ve ark. (2014): Circulating long noncoding RNA, LIPCAR, predicts survival in patients with heart failure. Circ Res, 114(10): 1569-1575.
5. Archer K, Broskova Z, Bayoumi AS, Teoh JP, Davila A, Tang Y, ve ark. (2015): Long Non-Coding RNAs as Master Regulators in Cardiovascular Diseases. Int J Mol Sci, 16(10): 23651-23667.
6. Wang W, Wang Y, Piao H, Li B, Huang M, Zhu Z, Li D, Wang T, Xu R, Liu K. (2019): Circular RNAs as potential biomarkers and therapeutics for cardiovascular disease. PeerJ, 7:e6831.
7. Iyer MK, Niknafs YS, Malik R, Singhal U, Sahu A, Hosono Y, Barrette TR, et al. (2015): The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome. Nat Genet., 47:199-208.

8. Scheuermann JC, Boyer LA. (2013): Getting to the heart of the matter: long non-coding RNAs in cardiac development and disease. *EMBO J*, 32(13): 1805-1816.
9. Bayoğlu B, Cengiz M. (2017): Kalp ve Damar Hastalıklarında Uzun Kodlanmayan RNA Transkriptlerinin Rollerini. *Bezmialem Science*, 5: 74-79.
10. Lee JT. (2012): Epigenetic regulation by long noncoding RNAs. *Science*, 338(6113): 1435-1439.
11. Kapranov P, Cheng J, Dike S, Nix DA, Duttagupta R, Willingham AT, ve ark. (2007): RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. *Science*, 316(5830): 1484-1488.
12. Sana J, Faltejskova P, Svoboda M, Slaby O. (2012) Novel classes of non-coding RNAs and cancer. *J Transl Med.*, 10: 103.
13. Tian D, Sun S, Lee JT. (2010): The long noncoding RNA, *Xpx*, is a molecular switch for X chromosome inactivation. *Cell*, 143(3): 390-403.
14. Hung T, Wang Y, Lin MF, Koegel AK, Kotake Y, Grant GD, ve ark. (2011): Extensive and coordinated transcription of noncoding RNAs within cell-cycle promoters. *Nat Genet*, 43(7): 621-629.
15. Tripathi V, Ellis JD, Shen Z, Song DY, Pan Q, Watt AT, ve ark. (2010): The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Mol Cell*, 39(6): 925-938.
16. Wang KC, Chang HY. (2011): Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol Cell*, 43(6): 904-914.
17. Bayoumi AS, Aonuma T, Teoh JP, Tang YL, Kim IM. (2018): Circular noncoding RNAs as potential therapies and circulating biomarkers for cardiovascular diseases. *Acta Pharmacol Sin.*, 39(7):1100-1109.
18. Schwartz SM. (1997): Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis. *J Clin Invest*, 100(11 Suppl): S87-89.
19. Motterle A, Pu X, Wood H, Xiao Q, Gor S, Ng FL, ve ark. (2012): Functional analyses of coronary artery disease associated variation on chromosome 9p21 in vascular smooth muscle cells. *Hum Mol Genet*, 21(18): 4021-4029.
20. Holdt LM, Teupser D. (2012): Recent studies of the human chromosome 9p21 locus, which is associated with atherosclerosis in human populations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32(2): 196-206.
21. Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, Hengstenberg C, Mangino M, Mayer B, ve ark. (2007): Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N Engl J Med*, 357(5): 443-453.
22. Holdt LM, Hoffmann S, Sass K, Langenberger D, Scholz M, Krohn K, ve ark. (2013): Alu elements in ANRIL non-coding RNA at chromosome 9p21 modulate atherogenic cell functions through trans-regulation of gene networks. *PLoS Genet*, 9(7): e1003588.
23. Holdt LM, Beutner F, Scholz M, Gielen S, Gabel G, Bergert H, ve ark. (2010): ANRIL expression is associated with atherosclerosis risk at chromosome 9p21. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30(3): 620-627.
24. Li H, Zhu H, Ge J. (2016): Long Noncoding RNA: Recent Updates in Atherosclerosis. *Int J Biol Sci*, 12(7): 898-910.
25. Nabel EG, Braunwald E. (2012): A tale of coronary artery disease and myocardial infarction. *N Engl J Med*, 366(1): 54-63.
26. Michalik KM, You X, Manavski Y, Doddaballapur A, Zornig M, Braun T, ve ark. (2014): Long noncoding RNA MALAT1 regulates endothelial cell function and vessel growth. *Circ Res*, 114(9): 1389-1397.
27. Hu YW, Yang JY, Ma X, Chen ZP, Hu YR, Zhao JY, ve ark. (2014): A lincRNA-DYNLRB2-2/GPR119/GLP-1R/ABCA1-dependent signal transduction pathway is essential for the regulation of cholesterol homeostasis. *J Lipid Res*, 55(4): 681-697.
28. Hu YW, Zhao JY, Li SF, Huang JL, Qiu YR, Ma X, ve ark. (2015): RP5-833A20.1/miR-382-5p/NFIA-dependent signal transduction pathway contributes to the regulation of cholesterol homeostasis and inflammatory reaction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 35(1): 87-101.
29. Şengül C. (2006): Genç Yaşta Miyokard Enfarktüsü Geçiren Hastalarda Klasik Ve Psikososyal Risk Faktörlerinin Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi. *Kardiyoloji Uzmanlık Tezi*, İstanbul.
30. Vausort M, Wagner DR, Devaux Y. (2014): Long noncoding RNAs in patients with acute myocardial infarction. *Circ Res*, 115(7): 668-677.
31. Lu Y, Meng X, Wang L, Wang X. (2018): Analysis of long non-coding RNA expression profiles identifies functional lincRNAs associated with the progression of acute coronary syndromes. *Exp Ther Med*, 15(2): 1376-1384.

32. Wang K., Liu C.Y., Zhou L.Y., Wang J.X., Wang M. ve ark. (2015): APF lncRNA regulates autophagy and myocardial infarction by targeting miR-188-3p. *Nat Commun*, 10;6:6779.
33. White HD, ed Unstable Angina: Ischemic Syndromes. 3 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. Topol EJ, ed. Textbook of cardiovascular medicine.
34. Cai Y, Yang Y, Chen X, Wu G, Zhang X, Liu Y, ve ark. (2016): Circulating 'lncRNA OTTHUMT00000387022' from monocytes as a novel biomarker for coronary artery disease. *Cardiovasc Res*, 112(3): 714-724.
35. Holdt LM, Stahring A, Sass K, Pichler G, Kulak NA, ve ark. (2016): Circular non-coding RNA ANRIL modulates ribosomal RNA maturation and atherosclerosis in humans. *Nat Commun.*, 7:12429.
36. Holdt LM, Teupser D. (2018): Long Noncoding RNA ANRIL: Lnc-ing Genetic Variation at the Chromosome 9p21 Locus to Molecular Mechanisms of Atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med.*, 6;5:145.
37. Rankin CR, Lokhandwala ZA, Huang R, Pekow J, Pothoulakis C, Padua D. (2019): Linear and circular CDKN2B-AS1 expression is associated with Inflammatory Bowel Disease and participates in intestinal barrier formation. *Life Sci.*, 231:116571.
38. Salgado-Somoza A, Zhang L, Vausort M, Devaux Y. (2017): The circular RNA MICRA for risk stratification after myocardial infarction. *International Journal of Cardiology, Heart and Vasculature* 17:33-36.
39. Yang Y, Cai Y, Wu G, Chen X, Liu Y, Wang X, ve ark. (2015): Plasma long non-coding RNA, CoroMarker, a novel biomarker for diagnosis of coronary artery disease. *Clin Sci (Lond)*, 129(8): 675-685.



## Nadir Faktör Eksikliklerinde Ayırıcı Tanı

### *Differential Diagnosis in Rare Coagulation Disorders*

Mustafa Bilici<sup>1</sup> , Serap Karaman<sup>2</sup> 

<sup>1</sup> Uzm. Dr., <sup>2</sup>Prof. Dr., İstanbul Üniversitesi,  
İstanbul Tıp Fakültesi, Çocuk Hematoloji  
Onkoloji Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ORCID: M.B. 0000-0002-2393-1532;  
S.K. 0000-0002-7428-3897

**Sorumlu yazar/Corresponding author:**

Mustafa Bilici,  
İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Çocuk  
Hematoloji Onkoloji Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye  
E-posta: mustafa.bilici.12@gmail.com

**Başvuru/Submitted:** 25.10.2019

**Revizyon Talebi/Revision Requested:** 06.11.2019

**Son Revizyon/Last Revision Received:** 07.11.2019

**Kabul/Accepted:** 09.11.2019

**Atıf/Citation:** Bilici M, Karaman S. (2019):  
Differential Diagnosis in Rare Coagulation  
Disorders, *Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar  
Dergisi*, 2(3): 126-129. [https://doi.org/10.26650/  
JARHS2019-650402](https://doi.org/10.26650/JARHS2019-650402)

#### Öz

Tüm kanama bozukluklarının %95-98'ini Von Willebrand Hastalığı (1/100.000), hemofili A (1/10000) ve hemofili B (1/30000) oluşturmakta, nadir rastlanan kanama bozuklukları ise trombosit hastalıkları ve “nadir faktör eksiklikleri (NFE)” olup, genel olarak 1/1.000.000 sıklıkta rastlanır. Vaka sayılarının azlığı nedeniyle NFE'nin epidemiyolojisi ve klinik sonuçları hakkındaki bilgiler sınırlıdır. Ayrıca yine aynı nedenle sınıflandırılması ve tedavisi için rehberler de geliştirilememiştir. Nadir faktör eksikliklerinin iyi bilinen ve sık görülen hemofililerle benzerlik ve farklılıkları mevcuttur. Bu yazıda epidemiyolojik veriler ışığında NFE'nin farklılıkları üzerinde durulmuş, tedaviye değinilmemiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Nadir faktör eksikliği, ayırıcı tanı

#### ABSTRACT

Von Willebrand Disease (1/100,000), Hemophilia A (1/10,000) and Hemophilia B (1/30,000) account for 95-98% of bleeding disorders. Examples of rare bleeding disorders are “Platelet Diseases” and “Rare Coagulation Disorders” (RCD) which generally have a frequency of occurrence of 1/1,000,000. Due to the small number of cases, information on the epidemiology and clinical outcomes of RCDs is limited. For the same reason, it has not been possible to develop guidelines for classification and treatment. Rare factor deficiencies have similarities and differences with more well-known and common haemophilia. In this article, the differences between RCDs in the light of epidemiological data are discussed while treatment is not mentioned.

**Keywords:** Rare coagulation disorders, differential diagnosis



## Giriş

Kanama bozukluklarından en sık görülenler, von Willebrand Hastalığı (1/100.000), hemofili A (1/10000) ve hemofili B (1/30000) hastalığıdır. Tüm kanama bozukluklarının %95-98'ini oluştururlar. En nadir rastlanan kanama bozuklukları ise, trombosit hastalıkları ve “nadir faktör eksiklikleri (NFE)” olup, genel olarak 1/1.000.000 sıklıkta rastlanır[1, 2]. Vaka sayılarının azlığı nedeniyle NFE'nin epidemiyolojisi ve klinik sonuçları hakkındaki bilgiler sınırlıdır. Ayrıca yine aynı nedenle sınıflandırılması ve tedavisi için rehberler de geliştirilememiştir[3]. 2004 ve 2007 yıllarında Dünya Hemofili Federasyonu (WFH) ve Avrupa Nadir hastalıklar grubu'nun (EN-RBD) NFE epidemiyoloji, klinik ve laboratuvar tanı, sınıflama ve tedavi seçeneklerini içeren verileri yayınlanmıştır. Nadir faktör eksikliklerinin iyi bilinen ve sık görülen hemofililerle benzerlik ve farklılıkları mevcuttur. Her iki grupta da ortak nokta, kanamanın görülmesidir. FXII eksikliği ise, nadir görülmesine rağmen, klinik olarak kanamaya yol açmaz. Tam tersi tromboza eğilim oluşturması nedeniyle diğer NFE'lerinden farklı bir klinik oluşturur[4]. Bu yazıda epidemiyolojik veriler ışığında farklılıklar üzerinde durulacak, tedaviye değinilmeyecektir. Nadir faktör eksikliklerini hemofiliden ayıran farklılıklar Tablo 1'de verilmiştir.

**Tablo 1.** Nadir Faktör Eksikliklerini Hemofiliden Ayıran Farklılıklar

<b>Farklı</b> görülme sıklığı
<b>Farklı</b> genetik geçiş ve cinsiyet
<b>Farklı</b> kanama bulguları ve klinik
<b>Farklı</b> «kanama dışı» klinik bulgular
Etkili hemostaz için <b>farklı</b> bazal değerler
<b>Farklı</b> laboratuvar bulguları ve inhibitör geliştirme riski
<b>Farklı</b> sıklıkta, <b>farklı</b> tedavi seçenekleri (TDP, kriyopresipitat, PCC, plazma/rekombinant ürünler)

## Sıklık

Tüm kalıtsal koagülasyon defektlerinin %3-5'ini NFE oluşturur. En sık Faktör VII (~ %39) ve F XI (~%26) eksikliği görülürken, en nadirler ise, F II (protrombin) ve FXIII eksikliğidir[5]. Tablo 2'de NFE ve görülme sıklıkları verilmiştir.

**Tablo 2.** NFE ve Görülme Sıklıkları

<b>Faktör eksikliği</b>	<b>Sıklık</b>
Fibrinojen (FI)	1/1.000.000
Protrombin (FII)	1/2.000.000
FV	1/1.000.000
FV+VIII	1/2.000.000
FVII	1/500.000
FX	1/1.000.000
FXI	1/1.000.000
FXII	1/1.000.000
FXIII	1/2.000.000
Vit K'ya bağımlı faktörler	1/2.000.000

## Genetik Geçiş

Sık görülen kanama bozuklukları, genellikle X'e bağlı resesif geçiş gösterirken (VWF eksiklikleri otozomal kalıtım gösterir), NFE'lerin tümü otozomal resesif geçiş gösterir. Bu nedenle akraba evliliği olan toplumlarda daha siktir Hem kızlarda hem de erkeklerde görülebilir. Missense, nonsense, insersiyon/delesyon tipi mutasyonlar görülür. Çoğu “missense” tipindedir[6, 7]. Tablo 3'te NFE'nin genetik geçişleri ve gen özellikleri verilmiştir.

**Tablo 3.** NFE ve Genetik Geçiş Özellikleri

<b>Eksik faktör</b>	<b>Genetik geçiş</b>	<b>Gen</b>
Fibrinojen (FI)	OR	FGA, FGB, FGG
Protrombin (FII)	OR	FII
FV	OR	FV
FV+VIII	OR	LMAN1, MCFD2
FVII	OR	FVII
FX	OR	FX
FXI	OR	FXI
FXII	OR, OD	FXII
FXIII	OR	FXIII A ve B
Vit K'ya bağımlı faktörler	OR	GGCX, VKORC1

OR: Otozomal resesif, OD: Otozomal dominant

## 1. Faktör Düzeyleri ve Klinik

Önceleri NFE'de faktör düzeylerine göre ağır-orta-hafif olarak sınıflama yapılırdı. Ancak aynı düşük faktör düzeyine sahip olan hastaların bir kısmı hiç kanamaz iken, bazılarında ciddi kanama problemleri oluyordu. Faktör düzeyleri ile kanama kliniğinin her zaman uyumlu olmadığı görülünce 2007'de EN-RBD grubu, “**faktör düzeyleri ile kanama ciddiyeti**” arasındaki ilişkiyi araştırdı (11 ülke, 13 merkez, 489 hastanın verisi). Buna göre klinik olarak kanama 4

kategoriye ayrıldı[8]. Kanamanın klinik sınıflaması tablo 4'te, faktör düzeylerinin klinik ile ilişkisi tablo 5'de verilmiştir[8].

**Tablo 4.** Kanamanın Klinik Sınıflaması

Klinik kanama derecesi	Tanım
Semptom yok	Hiç kanama atağı yok
Sınıf 1	Travma ya da ilaç ilişkili kanama
Sınıf 2	Kendiliğinden gelişen minör kanamalar; çürük, morarma, oral kavitede kanama, epistaksis ve menoraji
Sınıf 3	Kendiliğinden gelişen majör kanamalar; hematoma, hemartroz, SSS, GİS ve göbük kanaması

SSS: Santral sinir sistemi, GİS: Gastrointestinal sistem

**Tablo 5.** Faktör Düzeyleri ile Klinik İlişkisi

Eksik faktör	Klinik ile ilişki
Fibrinojen (FI)	Güçlü
Protrombin (FII)	Güçlü
FV	Zayıf
FV+VIII	Zayıf
FVII	Zayıf
FX	Güçlü
FXI	Çok zayıf
FXIII	Güçlü
Vit K'ya bağımlı faktörler	Zayıf

EN-RDB'ye göre "0" kanama için önerilen dip değerler, her bir faktör eksikliği için farklıydı (Tablo 6).

**Tablo 6.** Kanama Gözlenmemesi İçin Önerilen Eşik Faktör Düzeyi

Faktörün tipi	Önerilen eşik değer
Fibrinojen (FI)	1 g/L
Protrombin (FII)	> %10
FV	%10
FV+VIII	%40
FVII	>%20
FX	>%40
FXI	-
FXIII	%30
Vit K'ya bağımlı faktörler	Faktöre bağlı

## 2. Kanama Profili

Klinik oldukça değişik ve heterojendir. Kanamalar, kendiliğinden ya da cerrahi/travma sonrası gelişebilir, hafif ya da şiddetli olabilir. Mukokutanöz kanamalardan, hayatı tehdit eden SSS, GİS kanaması gibi ciddi kanamalara kadar geniş bir yelpazede

görülebilir. Bir hastalıktan diğerine değişiklik gösterebileceği gibi, bir hastadan diğerine göre de değişebilir. Aynı faktör düzeyine sahip iki hastadan biri sık kanıyorken, diğeri hiç kanamayabilir. Kanama, homozigot veya "double-heterozigot" olan hastalarda daha sık iken, heterozigot bireyler genellikle kanamamaktadır[9]. Eksik faktörün tipine göre sık rastlanan kanama yerleri, tablo 7'de gösterilmiştir.

Epistaksis, menoraji ve göbük kanaması, NFE'de daha sık gözlenirken, hematüri, hematoma ve hemartroz, SSS kanaması, cerrahi ve doğum sonu kanamaları ve oral kavitede kanamalar, sık rastlanan hemofilili bireylerde NFE'li bireylere göre daha sık görülmektedir.

**Tablo 7.** Nadir Faktör Eksiklikleri ve Klinik Semptomlar

Eksik faktör	Başlıca kanama yerleri ve klinik semptomlar
Fibrinojen (FI)	Göbük kordonu, eklem, mukozal kanamalar; tekrarlayan düşükler, nadiren tromboz
Protrombin (FII)	Göbük kordonu, eklem, mukozal kanamalar
FV	Mukozal kanamalar
FV+VIII	Mukozal kanamalar
FVII	Mukozal, eklem ve kas kanamaları
FX	Göbük kordonu, eklem ve kas kanamaları
FXI	Posttravmatik kanama
FXII	Kanama beklenmez
FXIII	Göbük kordonu, intrakranial, eklem kanaması; tekrarlayan düşükler, bozulmuş yara iyileşmesi
Vit K'ya bağımlı faktörler	Göbük kordonu ve intrakranial kanama

Kadınlarda, sık rastlanan kanama semptomlarına ek olarak, hamilelik, doğum ve sonrasında ciddi problemler yaşanabilir. Menoraji, spontan düşükler ve doğumda kanama, NFE'li kadınların %20'sinde görülür. Ayrıca hemorajik over kisti, endometriozis, endometrial hiperplazi, polip ve miyom riski normale göre daha fazladır. Bu nedenle hayat kalitesinde bozulma ve iş kaybı sorunları yaşanabilir[9].

## Kanama Dışı Klinik Bulgular

Faktör eksikliğinin tipine göre, kanama ile birlikte ya da tek olarak tromboz, tekrarlayan düşükler, yara iyileşmesinde gecikme, amiloidoz, kronik karaciğer

hastalığı, gecikmiş aşırı duyarlılık testine azalmış yanıt ve cilt nekrozları, değişen oranlarda eşlik edebilir[10].

### Laboratuvar Bulguları

Nadir faktör eksikliği şüphesi olan bir hastada öncelikle tarama testleri yapılmalı; PT, aPTT, trombin zamanı (TT) ve fibrinojen düzeyine bakılmalıdır. Sonuçlar anormal ise, öncelikle karışım testi ile inhibitör varlığı araştırılmalıdır. İnhibitör geliştirme riski, sık görülen kanama bozukluklarına göre daha nadirdir. Karışım testi ile sonuçlar düzeliyorsa, ilgili faktör düzeyleri ve aktivitesi istenmelidir. Tüm laboratuvar testleri normal olan kanamalı bir hastada FXIII eksikliği akla gelmelidir. Tablo 8'de NFE'de tanıda yol gösterici laboratuvar bulguları gösterilmiştir[9].

Sonuç olarak nadir faktör eksiklikleri, heterojen bir grup hastalık olmasına rağmen, faktör eksikliklerinin her biri ayrı ayrı ele alınmalıdır. Kanama dışında tekrarlayan tromboz atakları ve düşüklükler, menoraji, cerrahi ya da travma sonrası kanamanın olması, anamnezde uyarıcı bulgulardır. Tedavi, faktör eksikliğinin tipine göre seçilmelidir[8, 9, 11].

**Tablo 8.** Nadir Faktör Eksikliklerinde Laboratuvar Bulguları

Kanamama zamanı	Trombosit sayısı	PT	aPTT	Eksik Faktör
Normal / anormal	Normal	Anormal	Normal	FVII
Normal	Normal	Normal	Anormal	FVIII, FIX, FXI, FXII, VWF:Ag, Ricof
Normal / anormal	Normal	Anormal	Anormal	FI, FII, FV, FV+VIII, FX

**Yazar Katkıları:** Çalışma Konsepti/Tasarım: M.B., S.K.; Veri Toplama- M.B., S.K.; Veri Analizi/ Yorumlama- M.B., S.K.; Yazı Taslağı- M.B., S.K.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- M.B., S.K.; Son Onay ve Sorumluluk- M.B., S.K.; Malzeme ve Teknik Destek- M.B.; Süpervizyon- S.K.

**Author Contributions:** Conception/Design of Study: M.B., S.K.; Data Acquisition- M.B., S.K.; Data Analysis/Interpretation- M.B., S.K.; Drafting Manuscript- M.B., S.K.; Critical Revision of Manuscript- M.B., S.K.; Final Approval and

Accountability- M.B., S.K.; Technical or Material Support- M.B.; Supervision- S.K.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir

**Conflict of Interest:** Authors declared no conflict of interest.

### KAYNAKLAR

- Peyvandi, F., I. Garagiola, and E. Biguzzi, *Advances in the treatment of bleeding disorders*. J Thromb Haemost, 2016. **14**(11): p. 2095-2106.
- Bolton-Maggs, P.H., *The rare inherited coagulation disorders*. Pediatr Blood Cancer, 2013. **60 Suppl 1**: p. S37-40.
- Peyvandi, F., et al., *Introduction. Rare bleeding disorders: general aspects of clinical features, diagnosis, and management*. Semin Thromb Hemost, 2009. **35**(4): p. 349-55.
- Menegatti, M. and R. Palla, *Clinical and laboratory diagnosis of rare coagulation disorders (RCDs)*. Thromb Res, 2019.
- Mannucci, P.M., S. Duga, and F. Peyvandi, *Recessively inherited coagulation disorders*. Blood, 2004. **104**(5): p. 1243-52.
- Peyvandi, F., T. Kunicki, and D. Lillicrap, *Genetic sequence analysis of inherited bleeding diseases*. Blood, 2013. **122**(20): p. 3423-31.
- Goodeve, A.C., et al., *Genetics of haemostasis*. Haemophilia, 2012. **18 Suppl 4**: p. 73-80.
- Palla, R., F. Peyvandi, and A.D. Shapiro, *Rare bleeding disorders: diagnosis and treatment*. Blood, 2015. **125**(13): p. 2052-2061.
- Mumford, A.D., et al., *Guideline for the diagnosis and management of the rare coagulation disorders: a United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organization guideline on behalf of the British Committee for Standards in Haematology*. Br J Haematol, 2014. **167**(3): p. 304-26.
- Peyvandi, F., M. Menegatti, and R. Palla, *Rare bleeding disorders: worldwide efforts for classification, diagnosis, and management*. Semin Thromb Hemost, 2013. **39**(6): p. 579-84.
- Türk Hematoloji Derneği, Nadir faktör eksiklikleri, Tanı ve tedavi klavuzu*. Eylül 2013.

## 1. GENEL BİLGİLER

- Dergilerin, uluslararası standartları göz önüne alarak, bir makalenin hazırlanması sırasında uyulması gereken ilkeleri belirlemeleri ve değerlendirmeye alacakları makalelerde bu kurallara uygunluğu kontrol etmeleri, bilimsel yayıncılık standartlarımızın yükseltilmesi açısından önem taşımaktadır.
- Bilimsel dergilere gönderilecek bir makalenin hazırlığı sırasında uyulması gereken, uluslararası tıp dergilerinin de kabul ettiği ve uyguladığı en önemli standartlar şu şekildedir:
- Yayımlanmak için gönderilen çalışmaların daha önce başka bir yerde yayımlanmamış veya yayımlanmak üzere gönderilmemiş olması gerekir.
- Eğer makalede daha önce yayımlanmışsa; alıntı yazı, tablo, resim vs. mevcut ise makale yazarı, yayın hakkı sahibi ve yazarlarından yazılı izin alınması ve bunun makalede belirtilmesi gerekir. Bu konudaki hukuki sorumluluk yazarlara aittir.
- Bilimsel toplantılarda sunulan yazılar, dipnot olarak belirtilmesi koşuluyla, değerlendirmeye alınır.
- Türkçe makalelerin yazımında Türk Dil Kurumu'nun Türkçe sözlüğü veya <http://www.tdk.org.tr> adresi, ayrıca Türk tıp derneklerinin kendi branşlarına ait terimler sözlüğü esas alınmalıdır.

## 2. BİLİMSEL SORUMLULUK

- Gönderilen bilimsel yazıda, tüm yazarların akademik-bilimsel olarak doğrudan katkısı olmalıdır.
- Dergi ile iletişim görevini yapan yazar, tüm yazarlar adına yazının son halinin sorumluluğunu taşır.

## 3. ETİK SORUMLULUK

- “İnsan” ögesinin içinde bulunduğu tüm çalışmalarda “Hel-sinki Bildirgesi”, “İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu” ve “İyi Laboratuvar Uygulamaları Kılavuzu”nda belirtilen esaslara ve T.C. Sağlık Bakanlığı'nın ilgili kanun ve yönetmeliklerine uygunluk ilkesini kabul eder. Bu tıp çalışmalarda yazarlardan, makalenin YÖNTEM bölümünde bu prensiplere uygun olarak çalışmayı yaptıklarını, kurumlarının etik kurullarından ve çalışmaya katılmış insanlardan “bilgilendirilmiş onam” (informed consent) aldıklarını belirtmeleri gerekmektedir.
- Çalışmada “hayvan” ögesi kullanılmış ise yazarlardan, makalenin YÖNTEM bölümünde Guide for the Care and Use of Laboratory Animals prensipleri doğrultusunda çalışmalarında hayvan haklarını koruduklarını ve hayvan etik kurullarından onay aldıklarını belirtmelidirler.
- Olgu sunumlarında hastanın kimliğinin ortaya çıkmasına bakılmaksızın hastalardan “bilgilendirilmiş onam” (informed consent) alınmalıdır.
- Eğer makalede direkt-indirekt ticari bağlantı veya çalışma için maddi destek veren kurum mevcut ise yazarlar; kullanılan ticari ürün, ilaç, firma vs. ile ticari hiçbir ilişkisinin ol-

madığını ve varsa nasıl bir ilişkisinin olduğunu (konsültan, diğer anlaşmalar) editöre sunum sayfasında belirtmelidirler.

- Makalede “etik kurul onayı” alınması gerekli ise; yazarlar, yazılı etik kurul izni / onayı aldıklarını “Yöntem” bölümünde “Araştırmanın Etik Yönü” alt başlığı altında .....etik kurulundan .....tarih ve..... sayı ile etik kurul onayı alınmıştır” şeklinde beyan etmelidir. “Sözlü etik onay alınmıştır” ifadesi kullanılmamalıdır.

## 4. YAYIN/TELİF HAKKI

- Yayımlanmak üzere kabul edilen yazıların her türlü yayın/ telif hakları dergimize aittir. Yazılardaki düşünce ve öneriler tümüyle yazarların sorumluluğundadır.

## 5. YAZI TÜRLERİNE GÖRE YAZIM KURALLARI

- Derginin yayın dili Türkçedir.
- Her tür bilimsel yazı için, Word dosyası halinde ayrı ayrı “Editöre Sunum Sayfası” hazırlanmalı ve dergiye başvuru esnasında ayrı bir dosya halinde gönderilmelidir.
- Her makale için yazarlar “Yazarlık / Yayın Hakkı Onay Formu” ve “Yazarların Araştırmaya Katkı Formu” nu, bilimsel yazılarını dergiye başvuru esnasında doldurup imzalayarak, yazıları ile birlikte dergiye göndermelidirler. Bu formlar İnternet sayfamızdan indirilebilir. Yazı daha önce bilimsel bir toplantıda sunuldu ise yazının başlığında üst simge olarak rakamlarla belirtilmeli ve metnin ilk sayfasının sonunda toplantı adı, yer ve tarihi belirtilerek açıklama getirilmelidir. Araştırma bilim uzmanlığı ya da doktora tezinden oluşmuş ise başlıkta üst simge olarak rakamlarla belirtilmeli ve metnin ilk sayfası sonunda üst simge olarak rakamlarla belirtilmeli ve enstitü, yıl, yüksek lisans veya doktora tezi olduğu açıklanmalıdır.
- Dergilere yayımlanmak üzere gönderilecek yazıların türlerine göre yazım kuralları aşağıda tanımlanmıştır.

### 5.1. ORJİNAL ARAŞTIRMA MAKALESİ

- Yazılar Microsoft Word® belgesi olarak hazırlanmalı ve 1,5 aralıklı, 12 punto, iki yana yaslı ve “Times New Roman” karakteri kullanılarak yazılmalıdır. Sayfanın alt ve sağ yanında 3 cm'lik, üst ve sol yanından 4 cm'lik boşluk bırakılmalıdır. Sayfa sayısı en fazla 12 olmalı ve sayfa numaraları sayfanın sol alt köşesine yerleştirilmelidir.
- “Editöre sunum sayfası” ayrı bir dosya olarak yer almalı ve bu sayfada gönderilen makalenin kategorisi, daha önce başka bir dergiye gönderilmemiş olduğu, varsa çalışmayı maddi olarak destekleyen kişi ve kuruluşlar ve varsa bu kuruluşların yazarlarla olan ilişkileri belirtilmelidir ayrıca bu husus eğer varsa çıkar çatışması (conflict of interest) metnin sonunda belirtilmelidir. Kapak sayfası ise yazının ana metninden önceki ilk sayfadır. Türkçe ve İngilizce olarak alt alta olacak şekilde yazının uzun başlığı ve 40 karakteri geçmeyen (boşluklar dahil) kısa başlığı, yazar bilgileri ve sorumlu yazar bilgilerinden oluşur.

## SAĞLIK BİLİMLERİNDE İLERİ ARAŞTIRMALAR DERGİSİ YAZIM KURALLARI

- Yazarlara, izin alınan etik kurullara ve kurumlarına ait bilgiler yazının ana metninde yer almamalıdır. YÖNTEM bölümünde bu ibareler XXXXXXXX şeklinde yazılmalıdır.
- Yazıya ait ana metnin ilk sayfada çalışmanın uzun başlığı Türkçe ve İngilizce olarak yer almalı, başlık büyük harflerle yazılmalı ve sayfanın geri kalan kısmı boş bırakılmalıdır. Başlıkta kısaltma kullanılmamalıdır.
- Daha sonra önce “ÖZET” bölümü yazılmalıdır. Bu bölüm en fazla 200 kelimedenden oluşmalıdır. Kapak sayfasından sonra yer alan ilk sayfaya Türkçe ÖZET, ikinci sayfaya İngilizce ABSTRACT yazılmalıdır. Bu sayfalar da ayrı bir sayfa olmalı ve anahtar kelimelerden başka yazı bölümü içermemelidir.
- ÖZET veya ABSTRACT yapılandırılmış olmalıdır. Yapılanırılmış ÖZET (ABSTRACT) bölümünde

“Amaç (Aim),”

“Yöntem (Methods),”

“Bulgular (Results),”

“Sonuç (Conclusion)”

olmak üzere dört alt başlık yer almalıdır. ÖZET’de paragraflar içeriden başlanmalıdır.

- ÖZET bölümünün altına yazılacak anahtar kelime sayısı en az üç en fazla beş olmalı, Türkçe ve İngilizce özetin sonunda yer almalıdır. Kelimeler birbirlerinden virgül (.) ile ayrılmalıdır. Örneğin; “Anahtar Sözcükler: Kelime 1, kelime 2, kelime 3...” İngilizce anahtar sözcükler “Medical Subject Headings (MESH)” ile uygun olarak verilmelidir. Anahtar kelime seçimi için, izleyen bağlantı tıklanarak açılan sayfada, ilgili konuya ait uygun kelime girilerek anahtar sözcüklere ulaşılabilir (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>). Türkçe anahtar sözcükler Türkiye Bilim Terimleri’ne (TBT) uygun olarak verilmelidir (<http://www.bilimterimleri.com>).
- ÖZET ve ABSTRACT bölümünden sonra yeni bir sayfa GİRİŞ bölümü ile başlamalıdır. Yazıda GİRİŞ, YÖNTEM, BULGULAR, TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER, gerekli ise TEŞEKKÜR ve KAYNAKLAR ana bölümleri yer almalıdır. Ana bölümlerin başlığı büyük harflerle ve bold olarak yazılmalıdır. Ana başlıklar sola yaslı olmalıdır.
- GİRİŞ bölümünün son paragrafı çalışmanın amacını açıklamalıdır.
- Kaynaklar metinde cümle sonunda noktalama işaretlerinden hemen sonra “Üst Simge” olarak belirtilmelidir.Örneğin; ..... 1. veya ..... 1,2. veya ..... 1-3. gibi.
- Yazıda yer alan tüm alt başlıkların sadece ilk harfi büyük olmalı ve italik yazılmalıdır.
- ŞEKİL, RESİM, TABLO VE GRAFİKLER: Şekil, resim, tablo ve grafikler hem metin içinde yer almalı hem de ayrı dosyalar olarak eklenmelidir. Şekil, resim/fotoğraflar ayrı birer .jpg veya .gif dosyası olarak (pixel boyutu en az 600×600 ve 300 dpi çözünürlükte taranarak) gönderilmelidir. Şekil, Resim,

Tablo ve Grafik yazılarının ilk harfi büyük olmalı ve bold yazılmalıdır. Tablo yazıları ilgili tablonun üzerinde, şekil yazıları ise ilgili şeklin altında yer almalıdır.

- Tablo ve şekiller metin içerisinde nerede geçiyor ise o bölümde ilgili cümlenin sonuna parantez içinde Tablo 1. veya Şekil 1. gibi yazılmalıdır. İlgili tablo ve şekiller hem metin içinde ilgili yerine yerleştirilmeli hem de başlıklarıyla birlikte her birisi bir sayfada olacak şekilde ayrı ayrı dosyalar olarak sisteme yüklenmelidir. Kullanılan kısaltmalar şekil, resim, tablo ve grafiklerin altındaki açıklamada belirtilmelidir. Daha önce basılmış şekil, resim, tablo ve grafik kullanılmış ise yazılı izin alınmalıdır ve bu izin açıklama olarak şekil, resim, tablo ve grafik açıklamasında belirtilmelidir.
- Çalışma nicel/nitel analiz içeriyorsa YÖNTEM bölümü Araştırmanın Tipi, Araştırmanın Evreni ve Örneklemi, Veri Toplama Araçları ve Verilerin Toplanması alt başlıklarını içermelidir. Çalışma etik kurul kararını gerektiriyorsa Araştırmanın Etik Yönü alt başlığı ile devam edilmelidir. Çalışmada veri analizi yapılmış ise YÖNTEM bölümünün son alt başlığı olarak “Verilerin Değerlendirilmesi” başlığı tanımlanmalı ve bu bölüme hangi amaç için hangi istatistiksel yöntemlerin kullanıldığı ve ilgili paket programlar yazılmalıdır.
- Bulgular bölümünde yöntem adları verilmemelidir.
- Çalışmada TEŞEKKÜR bölümü gerekli ise bu bölümde, çıkar çatışması/çakışması, finansal destek, bağış ve diğer bütün editöryal (İngilizce/Türkçe değerlendirme) ve/veya teknik yardım belirtilmelidir.
- KAYNAKLAR bölümü aşağıda belirtilen kurallara uygun olarak yazılmalıdır.

### 5.2. DERLEME TÜRÜ YAZILAR

- Başlık sayfası, Türkçe ve İngilizce özet (abstract), metin ve kaynaklar bölümlerini içermelidir. Metin amaç çerçevesinde bir yapıyı içermeli, sonuç ve öneriler bölümleriyle tamamlanmalıdır. Araştırma ve derleme yazılarında, kısaltma yapılmış ise ilk kullanımda uzun şekli yazılmalı ve hemen yanında kısaltılmış şekli parantez içinde gösterilmelidir. Daha sonra metinde kısaltılmış şekli kullanılmalıdır.

### KAYNAK YAZIM KURALLARI

- Dergilerin atf sayılarının sağlıklı olarak tespit edilebilmesi, kaynakların düzgün yazılmasıyla doğrudan ilişkilidir. Dergiye başvuru sırasında kaynakların ayrıştırılması, atıflar açısından büyük önem taşımaktadır. Kullanılan tüm kaynaklar metnin sonunda ayrı bir bölüm halinde yazar soyadlarına göre alfabetik olarak numaralandırılarak verilmelidir. Beş yazara kadar tüm yazarların adı yazılmalı, beşten fazla yazar varsa birinci yazardan sonra “ve ark.” (et al.) ifadesi kullanılmalıdır. Kaynak yazımı ile ilgili örnekler aşağıda verilmiştir.

### ÖRNEK FORMATLAR

- a. Kitap ise; Gordon I. (2004): Reproductive Technologies in Farm Animals, Oxfordshire: CABI Publishing.
- b. Kitap bölümü ise; Hudson F.B., Hawcroft J. (1973): Duration of treatment in phenylketonuria. In: Seakins J, Saunders R, editors. Treatment of inborn errors of metabolism, London: Churchill Livingstone, 51-56.
- c. Editörlü bir kitap ise; Holst P.A. (1986): Vaginal Cytology in the Bitch. In: Morrow, D.A. (Ed.). Current Therapy in Theriogenology, Philadelphia: W.B. Saunders Company, 457-462.
- d. Çeviri kitap ise; Kramer K., Stock M., Writer M. (1993): Klinik Muayene Tanı ve Tedavi Klavuzu: Osteoporozda Tanı Yöntemleri, Çeviren: Ü. Ünlü, 2. Basım, Yüce Yayınları, İstanbul.
- e. Yazar adı olmayan kurum yayını ise; Türk Standartları Enstitüsü (TSE) (1974): Adlandırma İlkeleri, Ankara.
- f. Dergide yayınlanan makale ise; Burrow M.F., Tagami J., Negishi T. (1994): Early tensile bone strengths of several enamel and dentin bonding systems, Journal of Dentist Research, 74(2): 522-528.
- g. Kongre/Sempozyum bildirisi ise; Kongre bildirileri kitap haline getirilmiş ise; Kayır A. (1986): Tek ve kardeşli ergenlerde şahsiyet yapısı, XXI. Ulusal Psikiyatri ve Nörolojik Bilimler Kongresi Kitabı, Mimeray Ofset, İstanbul, 546-552.
- h. Kongre bildirileri kitap haline getirilmemiş ise; Kanan N. (2001): Ağrı Yönetimi, XIV. Ulusal Kanser Kongresi, 30 Nisan- 04 Mayıs, İstanbul.
- i. Tez ise; Aktaş E. (2012): Çalışan Çocuklarda Deri ile İlgili Sorunlar ve İlişkili faktörler. Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- j. İnternet kaynağı ise; Hiro D. (1998): Politics Lebanon: Lebanese voting again. IPS World News, 17-25, <http://www.oneworld.org/ips2> (10.02.2000).
- k. Bir yazarın aynı yılda yayınlanmış birden fazla yayını kullandı ise;

Ferrans C. E., Powers M.S. (1985a): Quality of life index: Development and psychometric properties, Advances in Nursing Science, 8(1): 15-24.

Ferrans C. E., Powers M. S. (1985b): Psychometric assesment of the quality of life index, Research in Nursing and Health, 15: 26-36.

### 6. GENEL AÇIKLAMALAR

Medical Subject Headings (MeSH) nedir?

- Uluslararası başlıca makale tarama dizinleri ve veri tabanlarında, makalelerin sınıflandırılması için kullanılmakta olan, tıbbi-biyolojik terminolojiye standart getirmeyi amaçlayan

ve sürekli güncellenen, İngilizce makalelerin anahtar sözcüklerinin seçilebileceği, geniş bir tıbbi-biyolojik terimler dizinidir.

- Türkiye Bilim Terimleri (TBT) nedir?
- Ulusal düzeyde tıbbi-biyolojik terminolojiye standart getirmeyi amaçlayan, şimdilik 186.000 tıbbi-biyolojik terim içeren ve sürekli güncellenen, Türkçe makalelerin anahtar sözcüklerinin seçilebileceği tıbbi-biyolojik terimler dizinidir.

Anahtar Sözcükler Neden MeSH ya da TBT Arasından Seçilmelidir?

- MeSH ve TBT terimleri, ana başlıklar ve alt başlıklardan oluşan, birbiri ile ilişkilendirilmiş hiyerarşik bir yapı ile kodlanmışlardır
- Böylece tek bir terim ile yapılan aramada, ana başlıklar yanında terimin ilişkilendirildiği tüm alt başlıklar da otomatik olarak aramaya dahil edilir.
- Aynı terim, birden çok terminoloji ile tanımlanmış olduğundan, araştırmacının az veriyle, kolay ve hızlı bir şekilde mümkün olduğunca çok makaleye ulaşabilmesini sağlar.

### KISALTMALAR

- Kelimenin ilk geçtiği yerde parantez içinde verilmeli ve tüm metin boyunca o kısaltma kullanılmalıdır. Uluslararası kullanılan kısaltmalar için "Bilimsel Yazım Kuralları" (Scientific style and format: the CBE manual for authors, editors, and publishers) kaynağına başvurulabilir.

### 7. YAZININ GÖNDERİM AŞAMASINDA DİKKAT

#### EDİLECEK NOKTALAR

- Yazılar; derginin e-mail adresine (sabiad@istanbul.edu.tr) online olarak ya da 3 kopya halinde ve CD'ye son şekli ile kayıt edilmiş olarak yazışma adresine gönderilebilir. Yazarın / yazarların dergi web sitesinde yer alan "Yazarlık / Yayın Hakkı Onay Formu" ve "Yazarların Araştırmaya Katkı Formu"nu imzalayarak yazı ile birlikte göndermeleri gerekmektedir. Dergi sistemine başvururken, editöre sunum sayfası, yazının ana metni, Yazarlık / Yayın Hakkı Onay Formu, Yazarların Araştırmaya Katkı Formu ve varsa resim veya şekilleri ayrı dosyalar halinde yüklemelidir. Yazarlar, ünvanlarını ve güncel iletişim bilgilerini (adres, e-posta, telefon, faks) Editöre Sunum sayfasında bildirmelidirler. Editörler, hakemleri seçme hakkını korur ve hakemler her türlü eleştiriyi yapma hakkına sahiptir.

