

EXPERIMED

Volume/Cilt **10** Issue/Sayı **1** April/Nisan 2020

- » **White Cabbage Extract Reduces the Harmful Effects of Amiodarone on Heart Tissue in Rats**
Hazal Hazineci, İsmet Burcu Türkyılmaz, Ünsal Veli Üstündağ, Ebru Emekli-Alturfan, Burçin Alev Tüzüner, Hazal İpekçi, Tuğba Tunalı-Akbay, Refiye Yanardağ, Ayşen Yarat
- » ***In Vitro* Fluoride-Release/Recharge Pattern and Antimicrobial Effects of Current Restorative Materials Used in Pediatric Dentistry**
Belen Şirinoğlu-Çapan, Serap Akyüz, Burçin Alev, Beste Tacal-Aslan, Tanju Kadir, Ayşen Yarat
- » **Investigation of Critical Genetic Variations of Vitamin D Metabolism and Vitamin D Serum Levels in Brain Cancer**
Murat Özdemir, M. Tolgahan Hakan, Dilara Sönmez, Ali Kafadar, İlhan Yaylım, Özlem Küçük hüseyin
- » **Investigation of *IL-10* Gene Expression and rs1554286 SNP in Behçet's Disease**
Elçin Şehitoğlu Taşar, Elif Uğurel, Erdem Tüzün, Burçak Vural
- » **Effect of Deuterium Depletion on Erythrocytes in Experimental Diabetes**
Arif Çolak, Ayşen Yarat, Turay Yardımcı
- » **Cancer and Metastasis: Importance of Cell Adhesion Molecules and Cell Junctions**
Gülçin Özkara, Oğuz Öztürk, Hülya Yılmaz Aydoğan
- » **Atypical Antipsychotics in the Treatment of Substance-Related Psychotic Disorders**
Melis Karaoğlan, Göksu Kaşarcı, Elif Şahin, Elif Sinem İplik

EXPERIMED

REPRESENTATIVE OF OWNER / YAYIN SAHİBİ TEMSİLCİSİ

Representative of Experimed on behalf of owner is
Prof. Dr. Günnur Deniz (Istanbul, Turkey)

*Experimed dergisinin sahibi adına temsilcisi:
Prof. Dr. Günnur Deniz (Istanbul, Türkiye)*

HONORARY ADVISOR / ONURSAL DANIŞMAN

Aziz Sancar

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

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

EDITORIAL MANAGEMENT / DERGİ YAZI KURULU

EDITOR IN CHIEF / BAŞ EDITÖR

Bedia Çakmaköğlü

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

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

E-mail: bedia@istanbul.edu.tr

ASSOCIATE EDITORS / YARDIMCI EDITÖRLER

Sema Sırma Ekmekçi

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

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

E-mail: sirmasem@istanbul.edu.tr

Umut Can Küçüksezer

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

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

E-mail: uksezer@istanbul.edu.tr

Vuslat Yılmaz

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

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

E-mail: vuslat.yilmaz@istanbul.edu.tr

STATISTICS EDITOR / İSTATİSTİK EDITÖRÜ

Sevda ÖZEL YILDIZ

İstanbul Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim
Dalı, İstanbul, Türkiye

LANGUAGE EDITORS / DİL EDITÖRLERİ

Elizabeth Mary EARL

İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Türkiye

Alan James Newson

İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Türkiye

PAST EDITORS / ÖNCEKİ EDITÖRLER

Erdem Tüzün

Uğur Özbek

This is an international, scholarly, peer-reviewed, open-access journal published, in April, August and December.
Nisan, Ağustos ve Aralık aylarında yayınlanan hakemli, açık erişimli ve uluslararası bilimsel bir dergidir.

The publication languages of the journal are Turkish and English.
Yayın dili Türkçe ve İngilizce'dir.

The journal is covered in Chemical Abstracts Service (CAS) and Sobiad.
Dergi Chemical Abstracts Service (CAS) ve Sobiad'da taranmaktadır.



Publisher

Istanbul University Press

Address: İstanbul University Central Campus,
34452 Beyazıt, Fatih / İstanbul - Turkey
Phone: +90 212 440 00 00

EXPERIMED

EDITORIAL BOARD / YAYIN KURULU

Abid Hussaini

Department of Pathology and Cell Biology,
Columbia University, Taub Institute, New York, USA
*Columbia Üniversitesi, Taub Enstitüsü, Patoloji
ve Hücre Biyolojisi Anabilim Dalı, New York, ABD*

Ahmet Gül

Department of Internal Medicine, İstanbul
University School of Medicine, İstanbul, Turkey
*İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi İç
Hastalıklar Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye*

Ali Önder Yıldırım

Department of Lung Biology and Diseases,
Helmholtz Zentrum München, München,
Germany
*Helmholtz Zentrum München, Akciğer Biyolojisi
ve Hastalıkları Bölümü, Münih, Almanya*

Batu Erman

Department of Molecular Biology, Genetics and
Bioengineering, İstanbul, Turkey
*Sabancı Üniversitesi, Moleküler Biyoloji,
Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, İstanbul,
Türkiye*

Çağla Eroğlu

Department of Cell Biology, Duke University,
North Carolina, USA
*Duke Üniversitesi, Hücre Biyolojisi Anabilim
Dalı, Kuzey Carolina, ABD*

Ebba Lohmann

Department of Neurodegenerative
Diseases, Tübingen University, Tübingen,
Germany
*Tübingen Üniversitesi, Nörodegeneratif
Hastalıkları Anabilim Dalı, Tübingen, Almanya*

Elif Apohan

Department of Biotechnology, İnönü University
School of Science, Malatya, Turkey
*İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji
Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Malatya, Türkiye*

Erdem Tüzün

Department of Neuroscience, İstanbul
University, Aziz Sançar Institute of Experimental
Medicine, İstanbul, Turkey
*İstanbul Üniversitesi, Aziz Sançar Deneysel Tıp
Araştırma Enstitüsü, Sinirbilim Anabilim Dalı,
İstanbul, Türkiye*

Gökçe Toruner

Department of Hematology, MD Anderson Cancer
Center, Houston, Texas, USA
*MD Anderson Kanseri Merkezi, Hematoloji
Anabilim Dalı, Houston, Teksas, ABD*

Günnur Deniz

Department of Immunology, İstanbul University,
Aziz Sançar Institute of Experimental Medicine,
İstanbul, Turkey
*İstanbul Üniversitesi, Aziz Sançar Deneysel Tıp
Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji Anabilim Dalı,
İstanbul, Türkiye*

Gürol Tunçman

Department of Genetics and Complex Diseases,
Harvard University, Massachusetts, USA
*Harvard Üniversitesi, Genetik ve Karmaşık
Hastalıklar Anabilim Dalı, Massachusetts, ABD*

Hannes Stockinger

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

Hülya Yılmaz

Department of Molecular Medicine, İstanbul
University, Aziz Sançar Institute of Experimental
Medicine, İstanbul, Turkey
*İstanbul Üniversitesi, Aziz Sançar Deneysel Tıp
Araştırma Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim
Dalı, İstanbul, Türkiye*

İhsan Gürsel

Department of Molecular Biology and Genetics,
Bilkent University, Ankara, Turkey
*Bilkent Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve
Genetik Bölümü, Ankara, Türkiye*

Melih Acar

Texas University Pediatric Research Institute,
Dallas, Texas, USA
*Teksas Üniversitesi Çocuk Araştırmaları Enstitüsü,
Dallas, Teksas, ABD*

Numan Özgen

Department of Pathology and Immunology,
Baylor University School of Medicine, Texas, USA
*Baylor Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji ve
İmmünoloji Anabilim Dalı, Texas, ABD*

Serhat Pabuççuoğlu

Department of Reproduction & Artificial
Insemination, İstanbul University-Cerrahpaşa
School of Veterinary, İstanbul, Turkey
*İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Veteriner
Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim
Dalı, İstanbul, Türkiye*

Sühendan Ekmekçioğlu

Texas University, MD Anderson Cancer Center,
Houston, Texas, USA
*Teksas Üniversitesi, MD Anderson Kanseri
Merkezi, Houston, Texas, ABD*

Yusuf Baran

Department of Molecular Biology and
Genetics, İzmir Institute of Technology,
İzmir, Turkey
*İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü,
Moleküler Biyoloji Ve Genetik Bölümü,
İzmir, Türkiye*

EXPERIMED

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

- 1** **White Cabbage Extract Reduces the Harmful Effects of Amiodarone on Heart Tissue in Rats**
Hazal Hazineci, İsmet Burcu Türkyılmaz, Ünsal Veli Üstündağ, Ebru Emekli-Alturfan, Burçin Alev Tüzüner, Hazal İpekçi, Tuğba Tunalı-Akbay, Refiye Yanardağ, Ayşen Yarat
- 7** ***In Vitro* Fluoride-Release/Recharge Pattern and Antimicrobial Effects of Current Restorative Materials Used in Pediatric Dentistry**
Belen Şirinoğlu-Çapan, Serap Akyüz, Burçin Alev, Beste Tacal-Aslan, Tanju Kadir, Ayşen Yarat
- 16** **Investigation of Critical Genetic Variations of Vitamin D Metabolism and Vitamin D Serum Levels in Brain Cancer**
Murat Özdemir, M. Tolgahan Hakan, Dilara Sönmez, Ali Kafadar, İlhan Yaylım, Özlem Küçük hüseyin
- 25** **Investigation of *IL-10* Gene Expression and rs1554286 SNP in Behçet's Disease**
Elçin Şehitoğlu Taşar, Elif Uğurel, Erdem Tüzün, Burçak Vural
- 30** **Effect of Deuterium Depletion on Erythrocytes in Experimental Diabetes**
Arif Çolak, Ayşen Yarat, Turay Yardımcı
- ### REVIEWS
- 38** **Cancer and Metastasis: Importance of Cell Adhesion Molecules and Cell Junctions**
Gülçin Özkara, Oğuz Öztürk, Hülya Yılmaz Aydoğan
- 49** **Atypical Antipsychotics in the Treatment of Substance-Related Psychotic Disorders**
Melis Karaoğlan, Göksu Kaşarçı, Elif Şahin, Elif Sinem İplik

EXPERIMED

İÇİNDEKİLER

ORJİNAL ARAŞTIRMALAR

- 1 Beyaz Lahana Ekstresi Amiodaronun Sıçanlarda Kalp Dokusu Üzerindeki Zararlı Etkilerini İyileştirir**
Hazal Hazineci, İsmet Burcu Türkyılmaz, Ünsal Veli Üstündağ, Ebru Emekli-Alturfan, Burçin Alev Tüzüner, Hazal İpekçi, Tuğba Tunalı-Akbay, Refiye Yanardağ, Ayşen Yarat
- 7 Çocuk Diş Hekimliğinde Kullanılan Güncel Restoratif Materyallerden Fluorid Salınımı, Yeniden Yüklenmesi ve Antimikrobiyal Etkilerinin *In Vitro* Olarak İncelenmesi**
Belen Şirinoğlu-Çapan, Serap Akyüz, Burçin Alev, Beste Tacal-Aslan, Tanju Kadir, Ayşen Yarat
- 16 D Vitamini Serum Düzeyleri ile D Vitamini Metabolizmasındaki Kritik Genlere Ait Varyasyonların Beyin Kanseri Üzerinde İncelenmesi**
Murat Özdemir, M. Tolgahan Hakan, Dilara Sönmez, Ali Kafadar, İlhan Yaylım, Özlem Küçükhuşeyin
- 25 Behçet Hastalığı'nda *IL-10* Geni Ekspresyonu ve rs1554286 SNP İncelenmesi**
Elçin Şehitoğlu Taşar, Elif Uğurel, Erdem Tüzün, Burçak Vural
- 30 Deneysel Diyabette Döteryum Azlığının Eritrositler Üzerine Etkisi**
Arif Çolak, Ayşen Yarat, Turay Yardımcı

DERLEMELER

- 38 Kanser ve Metastaz: Hücre Adezyon Molekülleri ve Hücreler Arası Bağlantıların Önemi**
Gülçin Özkara, Oğuz Öztürk, Hülya Yılmaz Aydoğan
- 49 Madde İlişkili Psikotik Bozuklukların Tedavisinde Kullanılan Atipik Antipsikotikler**
Melis Karaoğlan, Göksu Kaşarçacı, Elif Şahin, Elif Sinem İplik

White Cabbage Extract Reduces the Harmful Effects of Amiodarone on Heart Tissue in Rats

Beyaz Lahana Ekstresi Amiodaronun Sıçanlarda Kalp Dokusu Üzerindeki Zararlı Etkilerini İyileştirir

Hazal Hazineci¹ , İsmet Burcu Türkyılmaz² , Ünsal Veli Üstündağ³ , Ebru Emekli-Alturfan¹ , Burçin Alev Tüzüner¹ , Hazal İpeççi¹ , Tuğba Tunalı-Akbay¹ , Refiye Yanardağ² , Ayşen Yarat¹ 

¹Department of Basic Medical Sciences, Biochemistry, Faculty of Dentistry, Marmara University, İstanbul, Turkey

²Department of Chemistry, Faculty of Engineering, Istanbul University-Cerrahpaşa, İstanbul, Turkey

³Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, Istanbul Medipol University, İstanbul, Turkey

ORCID ID: H.H. 0000-0002-5178-4568; İ.B.T. 0000-0003-2789-5943; Ü.V.Ü. 0000-0003-0804-1475; E.E.A. 0000-0003-2419-8587; B.A.T. 0000-0001-5122-4977; H.L. 0000-0003-1193-168X; T.T.A. 0000-0002-2091-9298; R.Y. 0000-0003-4185-4363; A.Y. 0000-0002-8258-6118

Cite this article as: Hazineci H, Türkyılmaz İB, Üstündağ ÜV, Emekli-Alturfan E, Tüzüner BA, İpeççi H, et al. White Cabbage Extract Reduces the Harmful Effects of Amiodarone on Heart Tissue in Rats. Experimed 2020; 10(1): 1-6.

ABSTRACT

Objective: Amiodarone is used in the treatment of arrhythmia and has been shown to cause side effects in various organs. White cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata) is a widely consumed vegetable. The effects of exposure to amiodarone and white cabbage consumption on heart tissue has not previously been investigated. We aimed to investigate the effects of white cabbage extract on amiodarone given to rats' cardiac tissues.

Material and Method: Rats were given white cabbage extract and amiodarone by gavage for seven days. Amiodarone was applied 1 hour after administration of the white cabbage extract. On the eighth day, the hearts of the animals were taken and homogenized. The levels of lipid peroxidation (LPO), reduced glutathione (GSH), sialic acid (SA) and activities of glutathione-S-transferase (GST), catalase, superoxide dismutase (SOD) and tissue factor (TF) were determined.

Results: The GSH level, CAT and SOD activities decreased, while the LPO and SA levels increased in the amiodarone treated group. The White cabbage extract prevented any damage of the amiodarone by decreasing the amount of LPO and SA and also strengthened the antioxidant defence system by increasing the amount of the GSH and SOD activities and the CAT and GST activities.

Conclusion: It is suggested that the consumption of white cabbage could be an alternative approach to the prevention of the adverse effects of amiodarone on heart tissue.

Keywords: Amiodarone, side effect, white cabbage

ÖZ

Amaç: Aritmi tedavisinde kullanılan amiodaronun çeşitli organlarda yan etkilere neden olduğu gösterilmiştir. Beyaz lahana (*Brassica oleracea* L. var. capitata) yaygın olarak tüketilen bir sebzedir. Amiodaron maruziyeti ve beyaz lahana tüketiminin kalp dokusu üzerindeki etkileri araştırılmamıştır. Beyaz lahana ekstraktının amiodaron uygulanan sıçanların kalp dokuları üzerindeki etkilerini araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Sıçanlara yedi gün boyunca gavajla beyaz lahana ekstresi ve amiodaron verildi. Beyaz lahana ekstresinin uygulanmasından 1 saat sonra amiodaron uygulandı. Sekizinci günde, hayvanların kalpleri alındı ve homojenize edildi. Lipit peroksidasyon (LPO), indirgenmiş glutatyon (GSH), siyalik asit (SA) düzeyleri ile glutatyon-S-transferaz (GST), katalaz, süperoksit dismutaz (SOD) ve doku faktörü (TF) aktiviteleri belirlendi.

Bulgular: Amiodaron verilen grupta GSH, CAT, SOD aktiviteleri azalırken LPO ve SA seviyeleri arttı. Beyaz lahana, LPO ve SA miktarını azaltarak amiodaron zararını önledi. Ayrıca GSH düzeyleri ile SOD, CAT ve GST aktivitelerini artırarak antioksidan savunma sistemini güçlendirdi.

Sonuç: Beyaz lahana tüketiminin, amiodaronun kalp dokusunda olumsuz etkilerini önlemek için alternatif bir yaklaşım olabileceği ileri sürülebilir.

Anahtar Kelimeler: Amiodaron, yan etki, beyaz lahana

Corresponding Author/Sorumlu Yazar: Ebru Emekli-Alturfan **E-mail:** ebruemekli@yahoo.com

Received Date/Geliş Tarihi: 04.03.2020 **Revision Date/Revizyon Tarihi:** 12.03.2020 **Accepted Date/Kabul Tarihi:** 18.03.2020



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

INTRODUCTION

Amiodarone blocks the potassium channels that in turn inhibit the cardiac repolarization and the effective refractory period as a class III antiarrhythmic drug (1). Other actions of amiodarone include the blockades of the Na⁺, the non-competitive α -adrenergic, Ca²⁺ channels and the reserpine-like sympatholytic effect. Amiodarone is widely used for the treatment of arrhythmias because of these actions (1,2).

On the other hand, amiodarone has a very similar structure to the thyroid hormones as it is a benzofuran compound containing approximately 37% iodine by weight (3,4). Accordingly it has been suggested that the ingestion of 200 mg of amiodarone as a standard daily dosage leads to 75 mg of organic iodine ingestion each day and the subsequent deiodination via drug metabolism results in the release of nearly 6 mg of iodine circulating freely, which is much more than the daily iodine intake (4-6). Moreover, owing to its high lipid affinity, amiodarone is commonly found in the tissues of the liver, lungs, skin, eyes, adipose tissue, muscle (especially myocardium) and the thyroid gland that explains its side effects in different organs (4).

Epidemiological data and *in vitro* studies propose that vegetables with antioxidant phytochemicals possess beneficial effects against some degenerative diseases like cancer and cardiovascular diseases. Belonging to the family Cruciferae, cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata) is an important vegetable grown nearly all over the World. Cabbage is cultivated for its large leafy head and various cabbage types of differing shapes, sizes and colours exist (7). Cultivated cabbages can be found in different forms and are categorised as white, red and savoy cabbage (7,8). Cabbage has been used for medicinal purposes for different types of diseases as well (9).

Excessive reactive oxygen species (ROS) formation may directly harm macromolecules including DNA, protein and lipids and may change several signal pathways by the induction of ROS sensitive transcription factors. Accordingly antioxidant molecules are needed for the detoxification of these ROS (10). There is a debate in literature about the oxidant potential of amiodarone. Some studies suggest that amiodarone is able to inhibit lipid peroxidation, acting as an antioxidant molecule whereas others report its oxidant effect (11). It has been suggested being used as a hepatic mitochondrial uncoupling oxidative phosphorylation, to inhibit the enzymes of electron transport chain and to impair β -oxidation of fatty acids (12-14). Mitochondrial β -oxidation and oxidative phosphorylation are the major physiological processes since the disruption of these pathways affect the function of many organs (12). The heart is a vital organ with a high-energy demand that is rich in mitochondria. It has been estimated to occupy approximately one third of the cardiac myocyte volume and each adult ventricular myocyte contains several thousand mitochondria (15). Therefore the heart is especially vulnerable to mitochondrial oxidative damage. Accordingly, the aim of this study was to evaluate the effects of white cabbage on the oxidant-antioxidant potential and tissue factor activities of

amiodarone induced toxicity in rats' cardiac tissues for the first time in literature.

MATERIAL AND METHOD

Preparation of the aqueous extract of white cabbage

The leaves of white cabbages were gathered from Istanbul-Turkey. They were washed using distilled water and then the leaves were dried at room temperature. The dried leaves were extracted by adding distilled water and then they were boiled for 8 hours. After boiling, the extract was filtered and then lyophilised. Finally the extract was dissolved in distilled water and was given to the rats by gavage for seven days.

Animals and experimental procedure

In our study, 8-12 week old female Sprague Dawley type rats (300-350 g) obtained from the Marmara University Faculty of Medicine Animal Laboratory were used. All the experimental procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Marmara University (26.11.2014Mar). The experimental animals were divided into 4 groups, 5 in each. The rats were administered white cabbage extract (500 mg/kg) and amiodarone for seven days by gavage. During the experiment, amiodarone (100 mg/kg Amiodarone, Sigma, Saint Louis, USA) was administered 1 hour after the cabbage extract was given. At the end of the 7th day, all animals were fasted overnight and at the end of the 8th day they were then put down under ether anesthesia. The heart tissue samples of the rats were homogenized using saline solution (0.9% NaCl). In 10% of the homogenates that were prepared from the heart tissues, the homogenates total protein levels were determined. To assess the oxidant-antioxidant status the levels of glutathione (GSH), lipid peroxidation (LPO), sialic acid (SA) and the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and tissue factor (TF) were evaluated.

Biochemical analysis

Lowry's method was applied in order to measure the levels of total proteins. In this method, alkali medium proteins first react with copper ions and are then reduced by Folin reagent. At 500 nm the absorbance was determined. The calculated total protein levels were used to present the results per protein (16).

Malondialdehyde (MDA) is a product of LPO in tissues, and is evaluated in terms of the thiobarbituric acid reactive substances by Yagi's method (17). The LPO was expressed as nmol MDA/mg protein in terms of the MDA equivalents.

The levels of GSH were measured in tissue homogenates using Beutler's method (18) by using extinction coefficient as $1.36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ in the calculations. The results obtained were presented as mg GSH/mg protein.

CAT activities were evaluated using the method of Aebi (19) which is based on the transformation of hydrogen peroxide (H₂O₂) into water through the effect of CAT enzyme. The transformation was noted by the decrease in the absorbances obtained at 240 nm and the activity of CAT were presented as U/mg protein.

SOD activities were determined by riboflavin-sensitized photooxidation of ortho-dianisidine (20). Ortho-dianisidine oxidation, by the reaction with riboflavin is induced by SOD. The increase in absorbance depends on the SOD concentration. Finally, the coloured product's absorbance is determined using spectrophotometry at 460 nm.

The activity of GST in the samples was evaluated at 340 nm by the spectrophotometer and the results were presented as U/mg protein (21).

The levels of SA were evaluated using the method of Warren (22). For the assay, the homogenates were first incubated at 80°C for 1 hour with 0.1 NH₂SO₄ and the hydrolysate was used for analysis. The absorbances obtained from the samples were determined at 549 nm and the results were presented as the mg SA/ mg protein.

The method of Quick was used to measure the TF activities of homogenates by Quick's one-stage method. For the assay, pooled plasma was obtained from from healthy subjects. Since the clotting time is inversely proportional to the activity of TF, the lengthening of the clotting time shows decreased TF activity (23).

Statistical Analysis

Statistical analysis was applied by using GraphPad Prism version 6 (GraphPad Software, San Diego, USA). All the results obtained were presented as a means and standard deviation. The data groups were compared using Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U tests. The values of $p < 0.05$ were accepted as significant.

RESULTS

The LPO levels in terms of MDA in heart tissues of the four groups are given in Figure 1. The MDA levels of the amiodarone group were found to be higher when compared to the control group ($p < 0.05$). The MDA levels decreased significantly

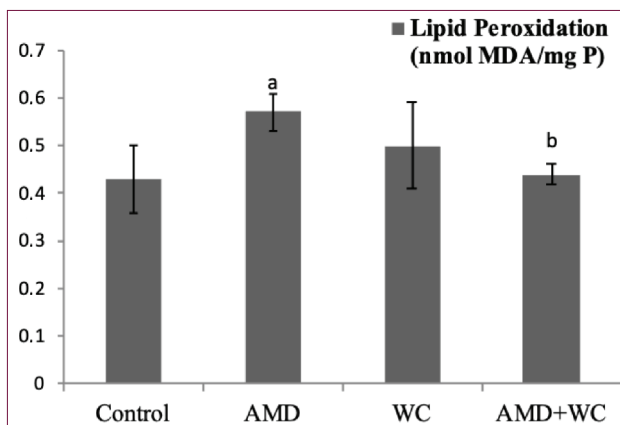


Figure 1. Lipid peroxidation levels of the Control; AMD; WC and AMD+WC groups. ^a $p < 0.05$, significantly different compared to the Control group; ^b $p < 0.05$ significantly different compared to the AMD group. AMD: Amiodarone; WC: White cabbage.

in the amiodarone+white cabbage group compared to the amiodarone group (Figure 1). The level of GSH decreased significantly when compared with the control group in the amiodarone and white cabbage groups. In the amiodarone+white cabbage group, the heart tissue GSH levels increased significantly compared to the amiodarone group (Figure 2).

When the groups were compared in terms of the catalase activities of the heart tissues, the catalase activity in the amiodarone group decreased significantly compared to the control group. In the amiodarone+white cabbage group, the catalase activity increased significantly compared to the amiodarone group (Figure 3). The SOD activity of the white cabbage and amiodaron-

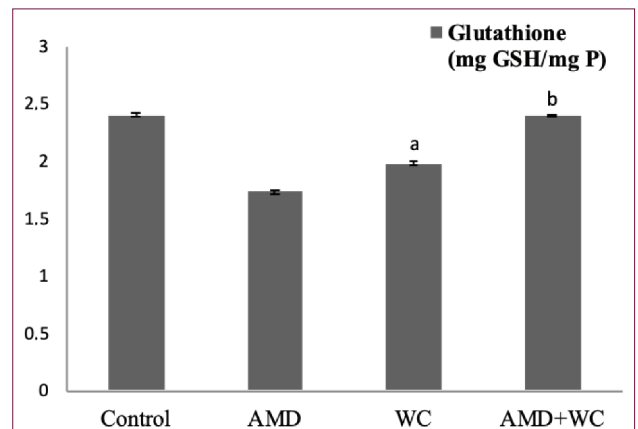


Figure 2. Glutathione levels of the Control; AMD; WC and AMD+WC groups. ^a $p < 0.05$, significantly different compared to the Control group; ^b $p < 0.05$ significantly different compared to the AMD group, Amiodarone; WC: White cabbage.

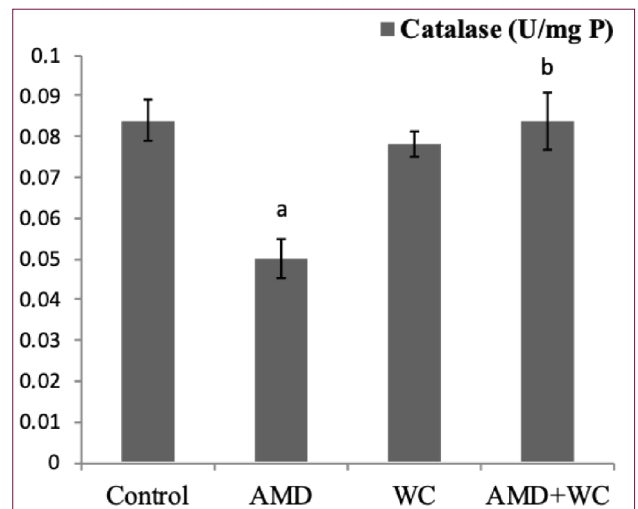


Figure 3. Catalase activities of the Control; AMD; WC and AMD+WC groups. ^a $p < 0.05$, significantly different compared to the Control group; ^b $p < 0.05$ significantly different compared to the AMD group; Amiodarone; WC: White cabbage.

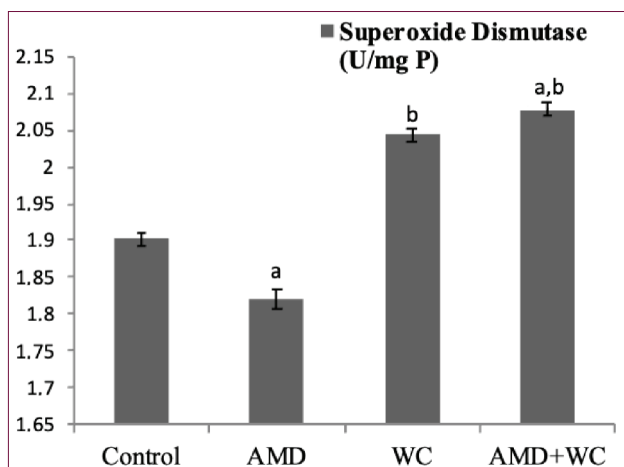


Figure 4. Superoxide dismutase activities of the Control; AMD; WC and AMD+WC groups. ^ap<0.05, significantly different compared to the Control group; ^bp<0.05 significantly different compared to the AMD group; Amiodarone; WC: White cabbage.

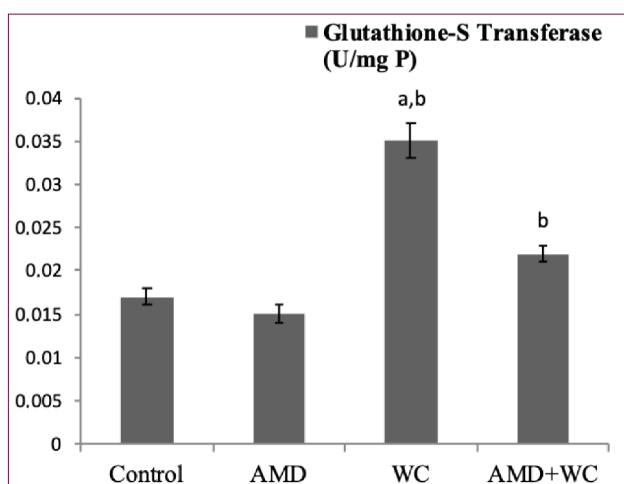


Figure 5. Glutathione-S-transferase activities of the Control; AMD; WC and AMD+WC groups. ^ap<0.05, significantly different compared to the Control group; ^bp<0.05 significantly different compared to the AMD group, Amiodarone; WC: White cabbage.

e+white cabbage groups increased significantly when compared with the control group (Figure 4). The GST activity of the white cabbage and the amiodarone+white cabbage groups were found to be significantly higher compared to the white cabbage group. Also the GST activity of white cabbage group was significantly higher compared to the control group (Figure 5). The amount of SA in the amiodarone group increased significantly compared to the control group and white cabbage treatment decreased SA levels significantly in the amiodarone group (p <0.05) (Figure 6). TF activity in amiodarone and white

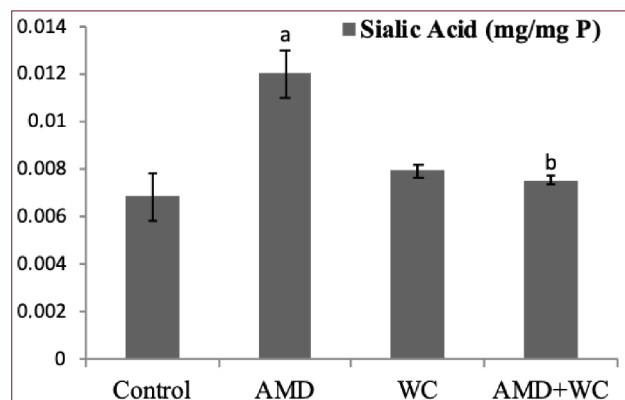


Figure 6. Sialic acid levels of the Control; AMD; WC and AMD+WC groups. ^ap<0.05, significantly different compared to the Control group; ^bp<0.05 significantly different compared to the AMD group, Amiodarone; WC: White cabbage.

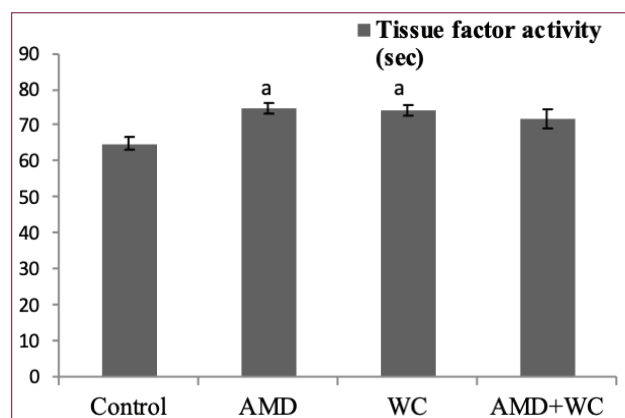


Figure 7. Tissue factor activities of the Control; AMD; WC and AMD+WC groups. ^ap<0.05, significantly different compared to the Control group, Amiodarone; WC: White cabbage.

cabbage groups was found to be significantly lower compared to the control group (Increase in seconds means a decrease in activity) (Figure 7).

DISCUSSION

According to the results of our study, white cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata) has a positive effect against the toxicity caused by amiodarone on the heart tissues of rats. The toxic effect of amiodarone administration on rat heart tissue was manifested in the form of increased LPO and SA. In the amiodarone treated group, it was observed that the amount of GSH and activities of CAT and SOD decreased significantly. White cabbage prevented the damage of amiodarone by decreasing the amount of LPO and SA in the group given amiodarone, and also strengthened the antioxidant defence system by increasing the amount of GSH and the activities of SOD, CAT and GST.

To date a lot of research has been conducted that focused on the beneficial phytochemicals present in cabbages, especially indole-3-carbinole (I3C). The indoles content and sulforaphane in cabbage induce antioxidant mechanisms and detoxification mechanisms that prevent cancer-inducing substances (24). Both epidemiological and *in vitro* studies strongly suggest that vegetables with phytochemicals having antioxidant effects may prevent different types of diseases (25). The beneficial effects of cruciferous vegetables have been shown to be related with their antioxidant phytochemicals, such as antioxidant vitamins like ascorbic acid, α -tocopherol and β -carotene (26). Carotenes, tocopherols and ascorbate are effective as antioxidants to prevent and to treat malignant diseases (27). Many studies have also reported that most of the antioxidant properties of vegetables can be due to their phenolic content like catechin, isocatechin, flavonoids, isoflavone, flavones and also anthocyanin (28).

Due to the interest in the role antioxidants in human health, new research focused on horticulture and food science to determine the antioxidant phytochemicals in different fruit and vegetables. Although carotene, tocopherol and ascorbic acid levels in the sub-species of *B. oleracea* have been determined in some studies, the number of systematic research on the measurement of the antioxidant content in cabbage cultivars in different areas of the world are very limited (27,28).

In our study, it was found that white cabbage increased the amount of GSH and the activities of CAT and SOD and decreased LPO in the amiodarone group. GSH is one of the key elements of the antioxidant defence system in the organism, it is involved in maintaining the normal structure and functions of cells with redox and detoxification reactions (26). Therefore, in our study, in the group given amiodarone, heart decreased GSH may induce the initiation of reactions due to free radicals.

The heart LPO level was found to be significantly higher in the amiodarone group compared to the control group. Disruption of the oxidant-antioxidant balance due to amiodarone has been shown previously. Chakraborty et al reported that amiodarone increased LPO in liver, kidney and testicular tissues of rats (28). LPO indicates oxidative damage of lipids in the cell membrane and is one of the side effects of amiodarone therapy (28).

In parallel with the increased LPO, amiodarone increased SA levels significantly when compared to the control group. Reactive oxygen species increase as a result of the decreased activity of antioxidant systems such as SOD, CAT and GSH. It has been reported that serum SA could be counted among the acute phase response elements and increased in some diseases such as myocardial infarction and diabetes (29). In inflammatory conditions, the amount of SA increases due to the increased concentrations of acute phase glycoproteins, whose sialization increases. Therefore, serum SA was stated be an inflammatory marker (29).

Amiodarone decreased TF activity in cardiac tissue compared to the control group. Breitenstein et al. evaluated the effects

of amiodarone on thrombus formation and TF expression and reported that amiodarone inhibits thrombus formation *in vivo* (30). In our study, white cabbage decreased the activity of TF significantly. The positive effects of vegetarian nutrition on coagulation and vegetable consumption have been shown to decrease the incidence of acute coronary disease associated with thrombosis. Fibrinogen is accepted to be an independent thrombosis risk factor and it has been found that the level of fibrinogen decreases with white cabbage consumption (30,31). There is also a strong correlation between lipids in blood and coagulation parameters. Change in lipids, coagulation protein, thrombocytes affects thrombosis through fibrinolytic factors. Accordingly it has been suggested that white cabbage may have an anticoagulant effect as a hypolipidemic vegetable (31).

CONCLUSION

Findings obtained from the results of our study show that in the case of amiodarone toxicity, white cabbage exerted its positive effects by improving the antioxidant system. The beneficial effects of white cabbage may be attributed to the high phenolic content of cabbage. Further studies that evaluate the molecular mechanisms of the effects related to the mitochondrial functions may be useful to reveal the details of these effects.

Ethics Committee Approval: All the experimental procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Marmara University (26.11.2014Mar).

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - R.Y., E.E.A., A.Y.; Data Collection and/or Processing - E.E.A.; Analysis and/or Interpretation - H.H., Ü.V.Ü., B.A.T., H.İ.; Literature Search - H.İ., İ.B.T.; Writing - H.H., E.E.A.; Critical Reviews - T.T.A., R.Y., A.Y.

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

Financial Disclosure: This study was supported by the Marmara University Scientific Research and Project Commission (Project No: SAG-CYLP-110315-0054).

Etik Komite Onayı: Tüm deneysel prosedürler Marmara Üniversitesi Kurumsal Hayvan Bakım ve Kullanım Komitesi (26.11.2014Mar) tarafından onaylanmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - R.Y., E.E.A., A.Y.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - E.E.A.; Analiz ve/veya Yorum - H.H., Ü.V.Ü., B.A.T., H.İ.; Literatür Taraması - H.İ., İ.B.T.; Yazan - H.H., E.E.A.; Eleştirel İnceleme - T.T.A., R.Y., A.Y.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Proje Komisyonu, (Proje No: SAG-C-YLP-110315-0054) tarafından desteklenmiştir.

REFERENCES

- Oliveira PF, Dias da Silva VJ, Salgado MCO, Fazan Jr. R, Aguiar CA, Salgado HC. Acute effect of amiodarone on cardiovascular reflexes of normotensive and renal hypertensive rats. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38(6): 967-76. [\[CrossRef\]](#)
- Hughes M, Binning A. Intravenous amiodarone in intensive care. *Intensive Care Med* 2000; 26: 1730-39. [\[CrossRef\]](#)
- Rao RH, McCready VR, Spathis GS. Iodine kinetic studies during amiodarone treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 62: 563-8. [\[CrossRef\]](#)
- Narayana SK, Woods DR, Boos CJ. Management of amiodarone-related thyroid problems. *TAEM* 2011; 2(3): 115-26. [\[CrossRef\]](#)
- Basaria S, Cooper DS. Amiodarone and the thyroid. *Am J Med* 2005; 118(7): 706-14. [\[CrossRef\]](#)
- Bogazzi F, Bartalena L, Gasperi M, Braverman LE, Martino E. The various effects of amiodarone on thyroid function. *Thyroid* 2001; 11(5):511-9. [\[CrossRef\]](#)
- Singh J, Upadhyay AK, Bahadur A, Singh B, Singh KP, Rai M. Antioxidant phytochemicals in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata) *Sci Hortic* 2006; 108(3): 233-37. [\[CrossRef\]](#)
- Nieuwhof M. *Cole Crops: Botany, Cultivation and Utilization*. World Crops Series. Leonard Hill, London, UK, 1969; pp353.
- DeFilippis RA, Krupnick GA. The medicinal plants of Myanmar. *PhytoKeys* 2018; 28;(102): 1-341. [\[CrossRef\]](#)
- Wells PG, McCallum GP, Chen CS, Henderson JT, Lee CJ, Perstin J, et al. Oxidative stress in developmental origins of disease: teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer. *Toxicol Sci* 2009;108: 4-18. [\[CrossRef\]](#)
- Lapenna D, Ciofani G, Bruno C, Pierdomenico SD, Cucurullo F. Antioxidant activity of amiodarone on human lipoprotein oxidation. *BJP* 2001; 133(5): 739-45. [\[CrossRef\]](#)
- Felser A, Blum K, Lindinger PW, Bouitbir J, Krähenbüh S. Mechanisms of hepatocellular toxicity associated with dronedarone--A comparison to amiodarone. *Toxicol Sci* 2013; 131(2): 480-90. [\[CrossRef\]](#)
- Lewis JH, Ranard RC, Caruso A, Jackson LK, Mullick F, Ishak KG, et al. Amiodarone hepatotoxicity: Prevalence and clinicopathologic correlations among 104 patients. *Hepatology* 1989; 9: 679-85. [\[CrossRef\]](#)
- Waldhauser KM, Török M, Ha HR, Thomet U, Konrad D, Brecht K, et al. Hepatocellular toxicity and pharmacological effect of amiodarone and amiodarone derivatives. *J. Pharmacol Exp Ther* 2006; 319: 1413-23. [\[CrossRef\]](#)
- Brown DA, Perry JB, Allen ME, et al. Expert consensus document: Mitochondrial function as a therapeutic target in heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 2017;14(4): 238-50. [\[CrossRef\]](#)
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193(1): 265-75.
- Yagi K. Assay for blood plasma or serum. *Methods Enzymol* 1984; 105: 328-37. [\[CrossRef\]](#)
- Beutler E. *Glutathione: red cell metabolism. A manual biochemical methods*. New York: Grune and Stratton; 1975.
- Aebi H. Catalase in vitro. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis*. Weinheim: Verlag Chemie; 1974. [\[CrossRef\]](#)
- Mylorie AA, Collins H, Umbles C, Kyle J. Erythrocyte SOD activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate. *Toxicol Appl Pharmacol* 1986; 82: 512-20. [\[CrossRef\]](#)
- Habig WH, Jacoby WB. Assays for differentiation of glutathione-S-transferases. *Methods Enzymol* 1981; 77: 398-405. [\[CrossRef\]](#)
- Warren L. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *J Biol Chem* 1959; 234: 1971-75.
- Ingram GIC, Hills M. Reference method for the one stage prothrombin time test on human blood. *Thromb Haemostas* 1976; 36: 237-8. [\[CrossRef\]](#)
- Brooks JD, Paton VG, Vidanes G. Potent induction of phase 2 enzymes in human prostate cells by sulforaphane. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10(9): 949-54.
- Dekker M, Verkerk R, Jongen WM. Predictive modelling of health aspects in the food production chain: a case study on glucosinolates in cabbage. *Trends Food Sci* 2000; 11: 174-81. [\[CrossRef\]](#)
- Ji C, Li C, Gong W, Niu H, Huang W. Hypolipidemic action of hydroxycinnamic acids from cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata) on hypercholesterolaemic rat in relation to its antioxidant activity. *J Food Nutr Res* 2015; 3(5): 317-24. [\[CrossRef\]](#)
- Simin N, Orcic D, Cetojevic-Simin D, Mimica-Dukic N, Anackov G, Beara I, Bozin B. Phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activities of small yellow onion (*Allium flavum* L. subsp. flavum, Alliaceae). *LWT-Food Sci Technol* 2013; 54(1): 139-46. [\[CrossRef\]](#)
- Chakraborty A, Mondal C, Sinha S, Mandal J, Chandra AK. Amiodarone induced oxidative stress in stress - vulnerable organs of adult male rats. *Asian J Pharm Clin Res*. 2014; 7: 4:177-83.
- Ponno M, Alho H, Nikkari ST, Olsson U, Ryderberg U, Sillanaukee P. Serum sialic acid in a random sample of the general population. *Clin Chem* 1999; 45: 1842-9. [\[CrossRef\]](#)
- Breitenstein A, Stämpfli SF, Camici GG, Akhmedov A, Ha H, Follath F, et al. Amiodarone inhibits arterial thrombus formation and tissue factor translation. *Arter Thromb Vasc Biol* 2008;28: 2231-8. [\[CrossRef\]](#)
- Khan R.A, Asad Ti, Feroz Z, Ahmed M. In vivo examination of the anticoagulant effect of the *Brassica oleracea* methanol extract. *Arch Biol Sci Belgrade* 2015; 67(2), 631-8. [\[CrossRef\]](#)

In Vitro Fluoride-Release/Recharge Pattern and Antimicrobial Effects of Current Restorative Materials Used in Pediatric Dentistry

Çocuk Diş Hekimliğinde Kullanılan Güncel Restoratif Materyallerden Fluorid Salınımı, Yeniden Yüklenmesi ve Antimikrobiyal Etkilerinin *In Vitro* Olarak İncelenmesi

Belen Şirinoğlu-Çapan¹ , Serap Akyüz² , Burçin Alev³ , Beste Tacal-Aslan⁴ , Tanju Kadir⁴ , Ayşen Yarat⁵ 

¹Department of Pediatric Dentistry, Faculty of Dentistry, Biruni University, Istanbul, Turkey

²Department of Pediatric Dentistry, Faculty of Dentistry, Marmara University, Istanbul, Turkey

³Center of Excellence on Biomaterials, Biomechanics and Bioelectronics, TUBITAM-MAM Materials Institute, Kocaeli, Turkey

⁴Department of Basic Medical Sciences-Microbiology, Faculty of Dentistry, Marmara University, Istanbul, Turkey

⁵Department of Basic Medical Sciences-Biochemistry, Faculty of Dentistry, Marmara University, Istanbul, Turkey

ORCID ID: B.S.C. 0000-0003-1829-0379; S.A. 0000-0002-1358-0150; B.A. 0000-0001-5122-4977; B.T.A. 0000-0001-5271-7917; T.K. 0000-0002-4668-9988; A.Y. 0000-0002-8258-6118

Cite this article as: Şirinoğlu-Çapan B, Akyüz S, Alev B, Tacal-Aslan B, Kadir T, Yarat A. *In Vitro* Fluoride-Release/Recharge Pattern and Antimicrobial Effects of Current Restorative Materials Used in Pediatric Dentistry. Experimed 2020; 10(1): 7-15.

ABSTRACT

Objective: The aim of this *in vitro* study was to investigate the fluoride-releasing/recharging and antimicrobial effects of restorative materials used in pediatric dentistry.

Material and Method: High-viscosity and resin-modified glass-ionomer cement, glass carbomer, compomer, giomer and composite were tested. Dental materials' fluoride-release was measured in distilled water (DW) and artificial saliva (AS) for eight weeks using a fluoride-specific electrode. At the end of eight weeks, specimens were divided into three groups for recharging with acidulated phosphate fluoride gel and fluoride varnish. After recharge, fluoride release was measured again. Agar diffusion test was used to assess antimicrobial effects against *S. mutans* and *L. acidophilus*. The statistical analysis was done with Mann-Whitney U and Friedman tests using SPSS-22 software.

Results: High-viscosity glass-ionomer cement showed the highest fluoride-release in both storage media, followed by glass carbomer, while giomer demonstrated the lowest. After recharge, the increase in the varnish group was significantly higher than others ($p<0.05$). Fluoride-release in DW groups was significantly higher than in the AS groups for all materials during the test period ($p<0.05$). None of the materials showed antimicrobial effects.

Conclusion: It was concluded that fluoride-release from glass ionomer-based materials is higher than that from resin-based materials. Fluoride-release from materials decreases in AS. Glass carbomer can be used as an alternative to glass ionomers.

Keywords: Antimicrobial effect, fluoride-release, dental materials, giomer, glass carbomer

ÖZ

Amaç: *In vitro* çalışmamızın amacı çocuk diş hekimliğinde kullanılan güncel restoratif materyallerin florid salınımını saptamak, yeniden yükleme sonrası salınımlarını değerlendirmek ve bu materyallerin antimikrobiyal etkinliğini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda yüksek viskoziteli cam iyonomer siman, rezin modifiye cam iyonomer siman, cam karbomer, kompomer, giomer ve rezin kompozit kullanıldı. Fluorid salınımı distile su (DS) ve yapay tükürük (YT) içerisinde 8 hafta boyunca florid spesifik elektrod ile ölçüldü. 8. haftanın sonunda örnekler üç gruba ayrıldı. Birinci gruba hiçbir ajan uygulanmazken, ikinci gruba asidüle fosfat florid jel, üçüncü gruba ise florid verniği uygulandı ve yükleme sonrası salınımları incelendi. *S. mutans* and *L. acidophilus*'a karşı antimikrobiyal etkinin değerlendirilmesinde agar difüzyon testi kullanıldı. İstatistiksel analizler SPSS-22 programı kullanılarak Mann-Whitney U ve Friedman testleri ile yapıldı.

Bulgular: Her iki ortamda da en yüksek florid salınımını yüksek viskoziteli cam iyonomer siman yaparken, bunu cam karbomer izledi. En düşük salınım giomerde saptandı. Fluorid yüklemesi sonrası tüm materyallerin salınımı artarken; vernik gruplarındaki artış, diğer gruplardan anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0,05$). Çalışma boyunca materyallerin DS gruplarındaki florid salınımı YT gruplarından anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,05$). Materyallerin hiçbiri antimikrobiyal etki oluşturmadı.

Sonuç: Cam iyonomer esaslı materyallerden florid salınımının daha çok olduğu; yapay tükürük içerisinde materyallerin salınımının azaldığı ve cam karbomerin florid salınımı açısından cam iyonomer simanlara alternatif olarak kullanılabilceği görüldü.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal etki, florid salınımı, dental materyaller, giomer, cam karbomer

Corresponding Author/Sorumlu Yazar: Belen Şirinoğlu-Çapan **E-mail:** belens90@hotmail.com

Received Date/Geliş Tarihi: 05.03.2020 **Revision Date/Revizyon Tarihi:** 23.03.2020 **Accepted Date/Kabul Tarihi:** 24.03.2020



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

INTRODUCTION

A restorative material used in dental clinics should have certain properties, such as good marginal adaptation, biocompatibility, fluoride-release and high strength. Since fluoride-containing silicate cements have been shown to prevent formation of caries, interest in fluoride-releasing materials has increased (1). Among these materials, conventional glass ionomer cement (GIC) emerges at the top because of its efficacy in resisting secondary caries formation around restoration. Presently preferred restorative materials in pediatric dentistry are fluoride-releasing materials, such as conventional glass ionomer cements, resin-modified glass ionomer cements (RMGIC), compomers, glass carbomers and giomers (2,3).

Giomers are hybrid restorative materials developed over the last decade, combining the properties of "glass ionomer" and "composite" materials. Pre-reacted glass ionomer fillers (PRG) was added into the resin matrix. PRG filler is made by reacting acid-reactive glass containing fluoride with polyalkenoic acid in water before being incorporated into the resin materials. The PRG fillers allow the material to fluoride-release and recharge (4).

Glass carbomers, a new type of dental material, are glass ionomer-like cements containing carbomized nanoparticles. However, they are separated from glass ionomers by nano-sized particles and fluorapatite content. These particles reduce the solubility and increase the stress resistance. They also help to induce remineralization faster (5,6).

Glass ionomer cements have anticariogenic effects because of their long-term ion releasing properties. The fluoride content

of cements is consumed quite quickly in a few months. However, the glass ionomer cements have a fluoride uptake capacity from the environment. Different topical fluoride application methods (e.g. fluoride varnishes and fluoride gels) and different fluoride concentrations are used for fluoride-recharge of the materials (7). The storage medium also has an effect on fluoride-release (8).

In addition to the remineralization effect of fluoride, there are also antimicrobial effects. Fluoride acts on bacterial metabolism and plaque acidity by inhibiting glycolytic enzymes and proton-releasing adenosine-triphosphatase (3). Fluoride containing restorative materials are preferred in pediatric dentistry because of their anticariogenic properties. However, fluoride-release and recharge amounts also vary due to the different contents of restorative materials. The aim of this *in vitro* study was to investigate the fluoride-releasing/recharging and antimicrobial effects of current restorative materials used in pediatric dentistry in distilled water (DW) and artificial saliva (AS).

MATERIAL AND METHOD

The Ethical Committee of the Marmara University Health Sciences Institute approved the present study under report number 27.02.2014/3.

Dental materials tested in this study

High-viscosity and resin-modified glass ionomer cement, glass carbomer, compomer, giomer and composite (as control) were tested (Table 1).

Table 1. Chemical compositions of tested materials

Material	Species	Chemical composition	Manufacturer
Fuji IX GP Capsule	High viscosity glass ionomer cement	Powder: Fluoroaluminosilicate glass, polyacrylic acid dust Liquid: Polyacrylic acid, polybasic carboxylic acid, distilled water	GC, Japan
Fuji II LC Capsule	Resin modified glass ionomer cement	Fluoroaluminosilicate glass, polyalkenoic acid, HEMA, aluminum chloride, camphorquinone and water	GC, Japan
GCP Glass Fill	Glass Carbomer	Fluorosilicate glass, apatite, polyacid	GCP, Netherlands
Dyract XP	Compomer	Sr-Al-N-Fluoroaluminosilicate glass, strontium fluoride, UDMA, TEGDMA, TMPTMA, TCB resin, dimethacrylate resins, dimethylamino benzoic acid ethyl ester, camphorquinone, BHT, UV stabilizer	Dentsply, Germany
Beautifil II	Giomers	Bis-GMA, TEGDMA, S-PRG filler, aluminofluoroborosilicate glass, DL-camphorquinone	Shofu, Japan
Filtek Z 250	Resin Composite	Bis-GMA, UDMA, Bis-EMA, zirconia / silica restorative filler, inorganic filler (60%)	3M ESPE, Germany

HEMA:2-hydroxyethyl acrylate **UDMA:** Urethan dimethacrylate **TEGDMA:** Triethylene glycol dimethacrylate **TMPTMA:** Trimethylolpropane trimethacrylate **TCB resin:** Butan 1,2,3,4- tetracarboxylic acid 2-hydroxymethacrylate **BHT:** Butylated hydroxytoluene **Bis-GMA:** Bisphenol A-Glycidyl Methacrylate **Bis-EMA:** Bisfenol-A dimethacrylate dimethacrylate

Preparation of specimens

Sixty specimens of each material were prepared and placed into cylindrical teflon moulds (5.0 mm diameter × 2.0 mm height). Materials were cured or set according to the manufacturers' instructions. After disc specimens were removed from their moulds, they were stored for 24 hours in a humidior at 37°C.

Determination of fluoride ion release

Artificial saliva was prepared similar to other release studies, in order to evaluate the fluoride release of the samples in our study (9). Thirty disc samples were placed in 2 mL AS (pH=7.0) and the other thirty were placed in 2 mL DW (pH=5.0). Two disc specimens were placed in each plastic test tube. Solutions were replaced at two hours, one, two and seven days, then weekly for seven weeks. At the same time, the amount of released fluoride ions was measured. At each measuring time, each specimen was rinsed with DW, dried and transferred to the plastic test tube with fresh DW/AS. During the entire experiment, all specimens were incubated at a constant temperature of 37°C to mimic the oral environment.

One mL of solution was mixed with 0.1 mL of TISAB III (total ionic strength adjustment buffer) and the fluoride concentration was measured with a specific fluoride ion electrode (Orion9690BN electrode, Orion Research, Inc., Beverly, USA). Before each session, the electrode was calibrated. The measured fluoride ion concentrations were recorded in ppm.

Fluoride ion recharge with acidulated phosphate fluoride (APF) gel or fluoride varnish

Following the eight weeks period, the samples were divided into three groups (n=5). Then 5 mL of 12300 ppm fluoride containing APF gel (Gelato APF Fluoride Gel, Keystone Industries, New Jersey, USA) was applied to the first group for four minutes at room temperature and 0.4 mL of 22600 ppm fluoride containing fluoride varnish (Duraphat, Colgate-Palmolive Company, China) was applied to the second group. The last group was accepted as the control group. After the samples were removed from the tubes, they were washed and placed again in the newly prepared 2 mL DW/AS, without any application to them. In the first and second group, specimens were washed after recharge, placed in plastic tubes with fresh 2 mL AS/DW and stored at 37°C. The solutions were replaced at the same intervals as before, and the recharged specimens also were assessed at these same intervals for the amounts of fluoride-released over another eight weeks.

Evaluation of antimicrobial effects

The antimicrobial effects of materials against *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)(ATCC 25175) and *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*)(ATCC 11975) were evaluated with an agar diffusion test. Bacterial strains used in the study of antimicrobial activity were obtained from the Refik Saydam Hifzissihha Institute Culture Collection Center, Ankara, Turkey. The strains stored at -20°C were cultured on Mitis Salivarius agar (for *S. mutans*) and Rogosa SL Agar plates(for *L. acidophilus*)

at 37°C for 24 hours in 5% CO₂. Appropriate single colonies from plates were transferred into Hewitt THB Broth (for *S. mutans*) and Brain-Heart Infusion broth (for *L. acidophilus*) (10). Suspension of the strains prepared in PBS was then adjusted to 0.5 McFarland scale=approximately 1.5×10⁸ bacterial cells in mL. The suspension of *S. mutans* was inoculated onto the surface of Mitis Salivarius agar and *L.acidophilis* onto Rogosa SL Agar plates.

To evaluate the antimicrobial effects of the materials, forty disc-shaped specimens (5.0 mm×2.0 mm) were prepared from each material. Half of the specimens were used to observe the effect on *S. mutans* and the other half the effect on *L. acidophilus*. The specimens prepared for each bacterium were divided into four groups (n=5) to evaluate them at different times (direct, second hour, seventh day, second month) and placed in plastic tubes containing 2 mL of DW and incubated at 37°C. For the agar diffusion test, the prepared disk-shaped specimens were placed on petri dishes (150mm in diameter) with a distance of 2.5 cm between them and 1.5 cm away from the plate edge. Each petri dish was filled with one sample from each material.

The literature states that the pH changes of the materials during the setting may be responsible for their antimicrobial effects (11,12). For this reason, agar diffusion tests were repeated for two conditions. Firstly, the materials were set outside and then placed on the agar. Secondly, the materials were set in the agar. Seven wells were opened on the plates for this experiment. Restorative materials were placed in six of these wells so they did not float to the edge of the well. A commercially available toothpaste containing 1450 ppm fluoride was placed in the seventh well to be a positive control.

Plates were then incubated at 37°C for 48 hours in 5% CO₂. The presence of the inhibition zones around the specimens were measured. The tests were run in two rounds, five parallel runs and the results were expressed as the diameter of the inhibition area and the findings were evaluated.

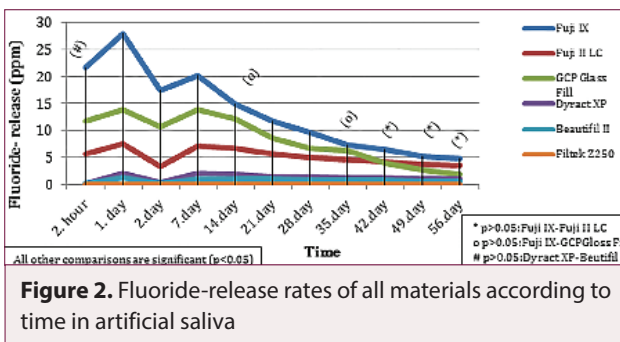
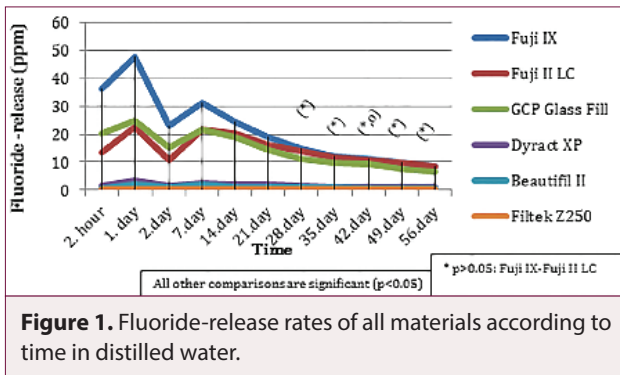
Statistical Analysis

Data were statistically analyzed using the IBM SPSS Statistics 22 (IBM SPSS, Turkey) program. According to Shapiro-Wilk test it was determined that the normal distribution of the parameters was not appropriate. The Mann-Whitney U test was used to compare the two groups of parameters. The Kruskal-Wallis test was used for inter-group comparisons, and the Mann-Whitney U test was used for post-hoc evaluations. The intra-group comparison of the parameters was performed using the Friedman test. Significance was assessed at $p<0.05$.

RESULTS

Fluoride ion release

The mean fluoride ion release from each material in both media over eight weeks before fluoride-recharge is shown in Figure 1 and Figure 2.



All materials, except for composite, show the highest fluoride-release rates on the first day, which then fell quickly on the second day. On the seventh day, the release rates increased again, and then the amount of fluoride continued to decline on other measurement days, and the decline between successive measurement days was statistically significant ($p < 0.05$).

When the materials in DW are sorted according to the fluoride-release, from highest to lowest at the second hour, the first and second day, the sequence is high-viscosity GIC (Fuji IX), Glass carbomer (GCP Glass Fill), RMGIC (Fuji II LC), compomer (Dyract XP), giomer (Beautifil II) and composite (Filtek Z250). The sequencing was observed as high-viscosity GIC, RMGIC, glass carbomer, compomer, giomer and composite, respectively, in the other measurements (Figure 1). When the amount of fluoride was measured in the AS, high-viscosity GIC released the highest fluoride until the forty-second day, followed by glass carbomer, RMGIC, giomer, compomer and composite, respectively. On the other days, RMGIC released more fluoride than glass carbomer (Figure 2).

Fluoride-release rates of all materials in the DW group were always higher than those in the AS group ($p < 0.05$) (Figure 3).

Fluoride-recharge

Following fluoride-recharge with APF gel and fluoride varnish, there was a burst of fluoride ion release from all materials, except for composite. After recharge, all materials showed the highest release amount at the second hour, and then fluoride amounts declined rapidly in the subsequent measurements. There was a statistically significant difference between the recharge materials for all tested materials in both the DW and the AS at the post-recharge measurement times ($p < 0.05$). Fluoride varnish groups of all materials showed more recharge ability than APF gel groups. No increase in the fluoride-release amounts in the control group was observed. As in the pre-recharge results, all materials showed significantly higher ion release in DW than in AS ($p < 0.05$).

In the DW, the fluoride-release of the materials in the control group was decreased in the sequence of high-viscosity GIC,

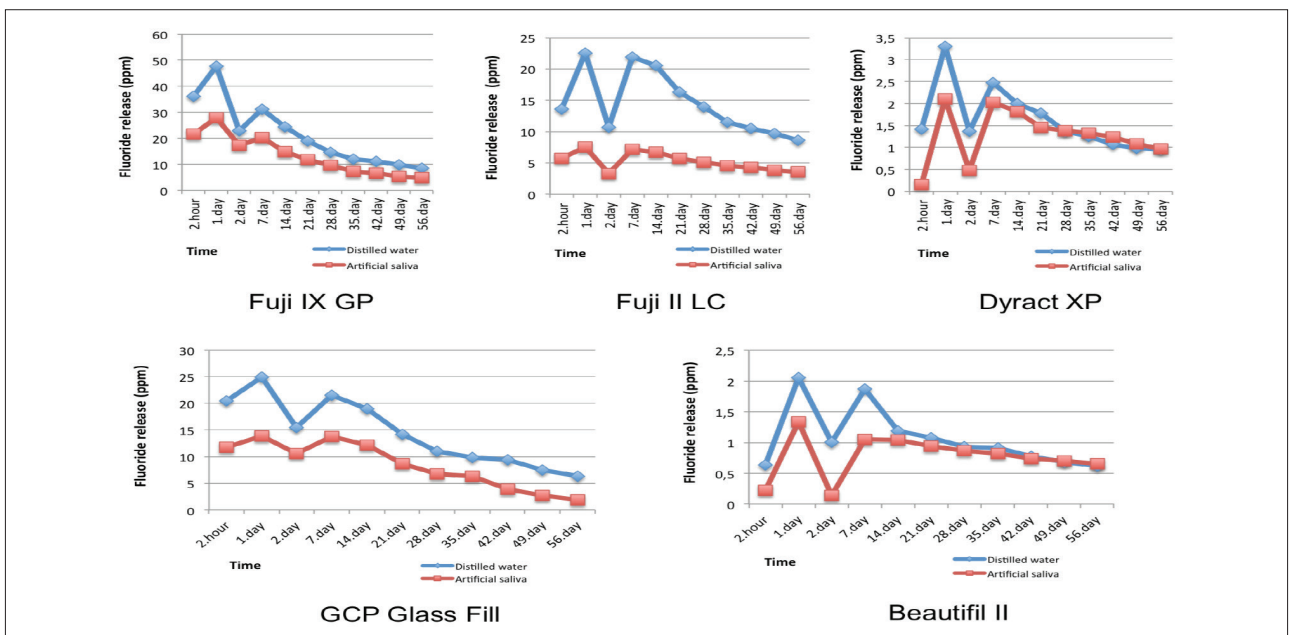


Figure 3. Fluoride-release of tested material in distilled water and in artificial saliva.

RMGIC, glass carbomer, compomer, giomer and composite, respectively. In the APF gel group, there was a statistically significant difference in release amounts at all measurement times after recharge ($p < 0.01$). The sequence of the materials from highest to lowest was seen as RMGIC = high-viscosity GIC (no significant difference between two materials $p > 0.05$), glass carbomer, compomer, giomer and composite. The sequence of

the materials in the varnish group was similar to that of the APF gel group. Fluoride-release at the second hour of the materials was reduced in the sequence of high-viscosity GIC, glass carbomer, RMGIC, compomer, giomer and composite, respectively. On and after the thirty-fifth day, RMGIC showed the highest fluoride-release. Similar results were observed in the AS groups (Figure 4, Figure 5).

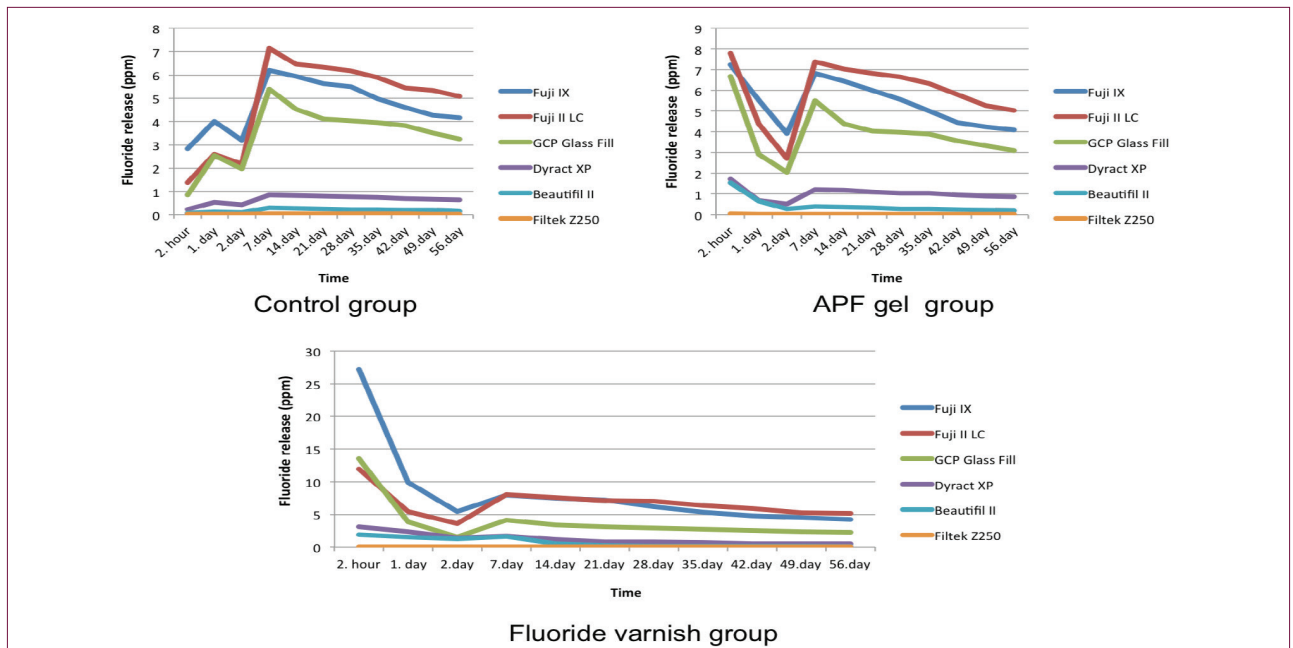


Figure 4. Fluoride-release from materials in distilled water after recharge.

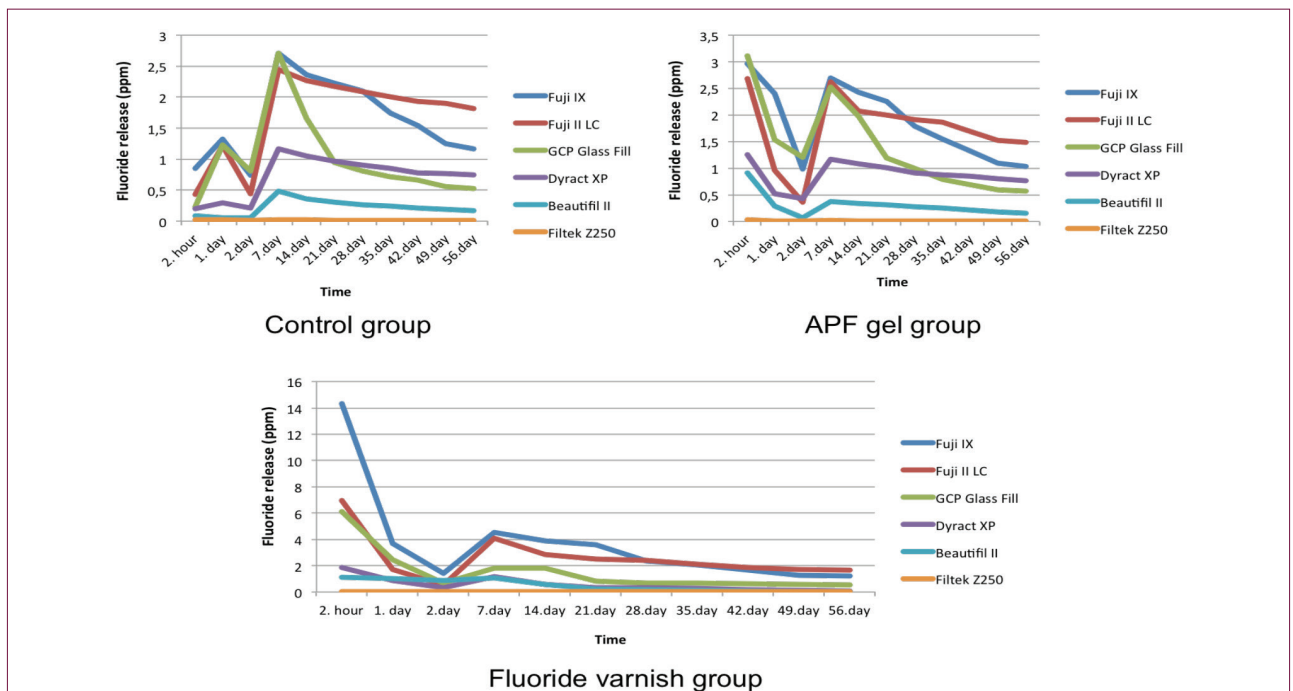


Figure 5. Fluoride-release from materials in artificial saliva after recharge.

Post-recharge fluoride-release amounts of all materials, except composite in APF gel and varnish groups, were significantly higher than pre-recharge amounts in both DW and AS ($p < 0.05$). Release rates of the materials showed an increase at the second hour after recharge with APF gel and varnish, but did not reach the highest release rates before recharge.

Antimicrobial effect

As a result of the agar diffusion tests performed on the days of the experiment, none of the set materials showed inhibition zone (Figure 6).

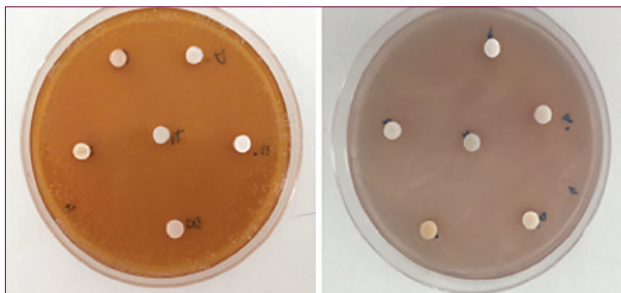


Figure 6. Set specimens placed on both Rogosa SL and MS agar

When the samples were set after placing in the agar, only RMGIC showed an inhibition zone (3 mm) on *S. mutans* (Figure 7). No inhibition zone was observed on *L. acidophilus* (Figure 8). A large inhibition zone around the toothpaste was observed on both media.

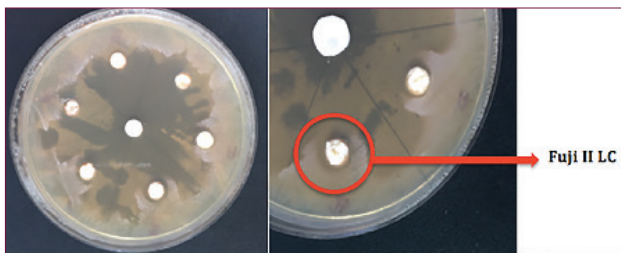


Figure 7. Inhibition zone on *S. mutans*

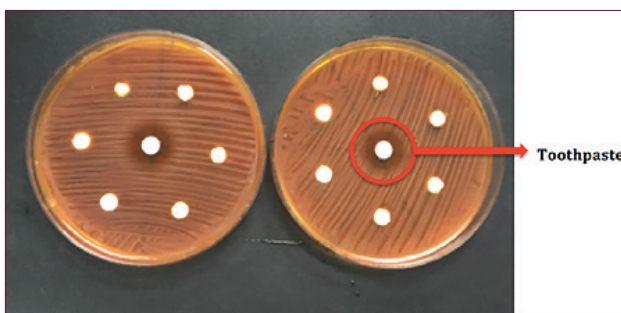


Figure 8. Inhibition zone on *L. acidophilus*

DISCUSSION

Fluoride ion release

The anticariogenic effects of fluoride-releasing materials are proportional to the amount of released fluoride. Studies on glass ionomer cements have found that there are two processes during fluoride-release: a rapid release occurs in the first of these, followed by a slower release through diffusion in the long term (3,13).

In the present study, fluoride-release from tested materials in DW and AS was compared. The highest release was found in high viscosity GIC, followed by glass carbomer, RMGIC, compomer and giomer, respectively. Similar to our study Mousavinasab and Meyers (14) compared the amounts of fluoride-release from high-viscosity GIC, RMGIC, compomer and giomer in DW. Scientists found that the highest release was in high-viscosity GIC, followed by RMGIC and lowest in the giomer. Meanwhile, Hasan et. al. (15) stated in their study that glass carbomer showed the highest fluoride-release, followed by high-viscosity GIC and RMGIC respectively. According to these results we believe fluoride ions in RMGIC have a lower fluoride release because the resin matrix surrounds them (2,14). We also found that the fluoride amount order of materials in the AS was the same as the materials in the DW. It has been determined that the environment in which the materials are stored does not change the sequence of the materials, but affects fluoride-release quantities. For this reason, it is thought that the contents of the materials play an important role in the ion release.

Giomer, used in the present study, showed the lowest release rate in both media. This finding of our study is similar to the findings of Jingawar et al. (16) and Abdul-Quader et al. (4). Lower fluoride-release from the giomer is explained by the presence of S-PRG fillers as a fluoride component. Because the glass particles in the giomer do not undergo a pronounced acid-base reaction, they contain very little glass ionomer matrix phase (14,16).

According to our study, measured fluoride amount from glass carbomer was found to be close to RMGIC in both media, lower than high viscosity GIC and higher than other materials. Similarly, Kucukyilmaz et. al. (17) reported in their study that the highest release in the high-viscosity GIC was followed by glass carbomer. In their study of glass carbomer, Thanjal et al. (18) stated that the release of fluoride is reduced when heat is applied according to the manufacturer's recommendation.

Many studies on short- and long-term fluoride-release of glass ionomer cements have shown that the highest release rate was recorded on day one, then declines rapidly, until it reaches a stable level (19,20). All the materials in the study showed the highest fluoride-release on day one, and fluoride continued to be released in relatively low amounts until day fifty-six. Glass ionomer cements and glass carbomer showed a much higher fluoride amount on the first day than other materials. Comparable to our findings, Basso et al. (20) stated that all glass ionomer

cements in their study showed the highest release values on day one and continued to decrease in release until day 28. The high release rate in the first day from the glass ionomer-based materials was probably due to the initial burst effect of the fluoride-containing glass particles (2).

All ions, including fluoride, are released in greater amounts in acid than in neutral conditions. This is associated with increased rates of overall degradation of the glass-ionomer as indicated by increases in roughness on storage in acid (3,13). Yusoff et al. (21) compared fluoride-release from CGIC, RMGIC and compomer in DW and AS. All materials released more fluoride in water than AS. In accordance with these studies, in the present study, fluoride-release from all materials in AS (pH=7,0) showed significantly lower release rate than DW (pH=5,0) at all measurement times ($p<0.05$).

Fluoride ion release after recharge

Studies in the literature have shown that fluoride released from dental materials decreases over time. Therefore these materials need to be recharged with fluoride agents at certain intervals to continue the anticariogenic effects and fluoride-release in the oral environment. As fluoride-release varies according to the materials, post-recharge release is dependent on the type of material and the kind of applied agent (3,15,22).

Abdul-Quader et al. (4) compared the fluoride-release/recharge properties of high-viscosity GIC, compomer and giomer. All materials exhibited the ability to recharge with fluoride, and the highest release rate before and after recharge was seen in high-viscosity GIC. Likewise in our study release rate of materials after recharge was similar to pre-recharge sequence. The highest release after recharge was again observed in the high-viscosity glass ionomer cement, while the lowest was found in the giomer. Glass carbomer showed higher release amount than RMGIC in the control and APF groups in the AS. At other measurement times, RMGIC showed a higher release amount than glass carbomer in all groups ($p<0.05$). Lopes et al. (23) compared fluoride-release/recharge pattern of high-viscosity GIC, RMGIC, glass carbomer and compomer. In accordance with our results, high-viscosity GIC in their study showed the highest fluoride release. The released fluoride amounts from RMGIC and glass carbomer were close to each other before and after recharge.

All of the materials used in the present study showed more fluoride-release in DW (pH=5.0) than in AS (pH=7.0) at all measurement times. Naoum et al. (24) evaluated fluoride-release and recharge properties of four dental materials in DW and lactic acid. The release of all materials in lactic acid was found to be higher than in the distilled water groups. The difference between AS and DW is explained by the fact that increasing the porosity of the materials in the acidic environment also increases the release of ions.

We found that release rate of all materials increased after recharge with APF gel and fluoride varnish. The highest increase was seen in the fluoride varnish group, which has the high flu-

oride concentration. Likewise, Fallahinejad-Ghajari et al. (25) evaluated fluoride-release of three GIC recharged with NaF and APF gels. Measured fluoride amount from all materials increased after recharge, but the highest increase was observed in the APF gel group, the group with the high concentration of fluoride.

Bansal and Bansal (26) examined the fluoride-release and recharge ability of restorative materials. They stated that all materials showed a high level of fluoride in the first measurement, but then they showed a sharp decrease. In accordance with these investigators, in our study, all materials showed the highest fluoride-release in the second hour after recharge. On the first day measurement, a sudden drop was detected, and this decline continued to pre-recharge fluoride values within one week. The high fluoride amount measured in the first 24 hours after application of fluoride agents is explained by washout of fluoride ions that are retained on the surface or in the pores of the restorative material (3,7).

In the present study, the fluoride-release values of the materials recharged with APF gel and fluoride varnish increased, but none reached the fluoride values of day one. Materials can't reach the initial fluoride amount after fluoride recharge, because of the wearing down of the materials (27).

Antimicrobial effect

Fluoride-release quantities in various materials show the antimicrobial capacity of the material. Some researchers report that the low pH value during the setting reactions of glass ionomer cements is more effective on antimicrobial effect than the fluoride-release and that they do not show any antimicrobial activity after setting has been completed (12,28).

In the present study none of the groups showed any inhibition zones in the agar diffusion tests with set specimens. In accordance with our study, Vermeersch et al. (11) investigated the antimicrobial effects of GIC, RMGIC and composite on *S. mutans* by agar diffusion test and compared the effects of set and unset materials. While none of the set specimens showed antimicrobial effect, only GIC and RMGIC showed antimicrobial effect from unset specimens. They suggested there was a significant relationship between the acidity of the material and the inhibition zone.

Vermeersch et al. (11) stated that the samples set in the agar exhibited antimicrobial effect. In their study comparing the antibacterial activities of high-viscosity GIC, RMGIC and compomer, Tiwari et al. (29) reported that there was no inhibition zone in the compomer, while an inhibition zone occurred in other materials. They thought that this result might be related with dissimilarity in release of fluoride and setting mechanisms. However in our study, only RMGIC formed an inhibition zone around the materials that were set in the agar. We thought that the reason for this result is caused by the difference in setting reactions. The RMGIC has two-stage setting reaction, the first is the acid-base reaction, and the second is the light activation. This mechanism may increase fluoride release and antimicro-

bial effect during setting reaction. In accordance with the present study, Yeşilyurt et al. (12) separated the GIC specimens into two groups, set and unset specimens. After the materials are set, they didn't form an inhibition zone, while a small inhibition zone is formed in unset specimens. Fluoride released from the materials is thought to be insufficient to generate the inhibition zone.

Studies indicate the amount of fluoride required to prevent caries has not yet been determined. The use of long-term fluoride-releasing dental materials should be preferred, especially in patients with moderate to high risk of caries, until the ideal fluoride concentration is determined (2,30).

CONCLUSION

In conclusion our results proved that the fluoride release and recharge capacity of resin-based materials is less than glass ionomer-based materials. The release rate of the materials is reduced in AS and glass carbomer can be used as an alternative to glass ionomer cements in terms of fluoride-release. It was found that the fluoride amount released from the materials was inadequate to prevent bacterial growth. It is important to know the physical and mechanical properties of restorative materials used in pediatric dentistry as well as the fluoride-release and recharge properties of these materials in clinical material choice.

Ethics Committee Approval: The Ethical Committee of the Marmara University Health Sciences Institute approved the present study under report number 27.02.2014/3.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

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

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

Financial Disclosure: This study was supported by Marmara University Scientific Research Commission Presidency, project number SAG-C-DRP-100914-0314. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Etik Komite Onayı: Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurulu bu çalışmayı 27.02.2014/3 rapor numarasıyla onaylamıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

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

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonu Başkanlığı tarafından SAG-C-DRP-100914-0314 proje numarası ile desteklenmiştir. Fon sağlayıcıların çalışma tasarımı, veri toplama ve analizi, yayınlama kararı veya makalenin hazırlanmasında rolü olmamıştır.

REFERENCES

1. Khoroushi M, Keshani F. A review of glass-ionomers: From conventional glass-ionomer to bioactive glass-ionomer. *Dent Res J (Isfahan)* 2013; 10(4): 411-0.
2. Dionysopoulos D, Koliniotou-Koumpia E, Helvatzoglou-Antoniades M, Kotsanos N. Fluoriderelease and recharge abilities of contemporary fluoride-containing restorative materials and dental adhesives. *Dent Mater J* 2013; 32(2): 296-304. [CrossRef]
3. Wiegand A, Buchalla W, Attin T. Review on fluoride-releasing restorative materials - fluoride release and uptake characteristics, antibacterial activity and influence on caries formation. *Dent Mater* 2007; 23(3): 343-62. [CrossRef]
4. Abdul Quader SM, Shamsul Alam M, Bashar AKM, Gafur A, A Mansur MA. Compressive Strength, Fluoride Release and Recharge of Giomer. *Updat Dent Coll J* 2012; 2(2): 28-37. [CrossRef]
5. Koenraads H, Van der Kroon G, Frencken JE. Compressive strength of two newly developed glass-ionomer materials for use with the Atraumatic Restorative Treatment (ART) approach in class II cavities. *Dent Mater* 2009; 25: 551-6. [CrossRef]
6. Zainuddin N, Karpukhina N, Law RV, Hill RG. Characterisation of a remineralising Glass Carbomer® ionomer cement by MAS-NMR Spectroscopy. *Dent Mater* 2012; 28: 1051-8. [CrossRef]
7. Mungara J, Philip J, Joseph E, Rajendran S, Elangovan A, Selvaraju G. Comparative evaluation of fluoride release and recharge of pre-reacted glass ionomer composite and nano-ionomeric glass ionomer with daily fluoride exposure: An *in vitro* study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 2013; 31(4): 234-9. [CrossRef]
8. Nicholson JW, Czarnecka B. The release of ions by compomers under neutral and acidic conditions. *J Oral Rehabil* 2004; 31(7): 665-70. [CrossRef]
9. Sato Y, Sato T, Niwa M, Aoki H. Precipitation of octacalcium phosphates on artificial enamel in artificial saliva. *J Mater Sci Mater Med* 2006; 17(11): 1173-7. [CrossRef]
10. Hoszek A, Ericson D. *In vitro* fluoride release and the antibacterial effect of glass ionomers containing chlorhexidine-gluconate. *Oper Dent* 2008; 33(6): 696-701. [CrossRef]
11. Vermeersch G, Leloup G, Delmee M, Vreven J. Antibacterial activity of glass-ionomer cements, compomers and resin composites: relationship between acidity and material setting phase. *J Oral Rehabil* 2005; 32: 368-74. [CrossRef]
12. Yesilyurt C, Er K, Tasdemir T, Buruk K, Celik D. Antibacterial activity and physical properties of glass-ionomer cements containing antibiotics. *Oper Dent* 2009; 34: 18-23. [CrossRef]
13. Moreau JL, Xu HH. Fluoride releasing restorative materials: Effects of pH on mechanical properties and ion release. *Dent Mater* 2010; 26(11): 227-35. [CrossRef]
14. Mousavinasab SM, Meyers I. Fluoride release by glass ionomer cements, compomer and giomer. *Dent Res J (Isfahan)* 2009; 6(2): 75-81.
15. Hasan A, Sidhu S, Nicholson J. Fluoride release and uptake in enhanced bioactivity glass ionomer cement ("glass carbomer™") compared with conventional and resin-modified glass ionomer cements. *J Appl Oral Sci* 2019; 27: e20180230. [CrossRef]
16. Jingawar MM, Pathak A, Bajwa NK, Sidhu HS. Quantitative assessment of fluoride release and recharge ability of different restorative materials in different media: An *in vitro* study. *J Cli Diagn Res* 2014; 8(12): 31-4. [CrossRef]

17. Kucukyilmaz E, Savas S, Kavrik F, Yasa B, Botsali MS. Fluoride release/recharging ability and bond strength of glass ionomer cements to sound and caries-affected dentin. *Niger Clin Prac* 2017; 20(2): 226-34. [\[CrossRef\]](#)
18. Thanjal NK, Billington RW, Shahid S, Luo J, Hill RG, Pearson GJ. Kinetics of fluoride ion release from dental restorative glass ionomer cements: the influence of radiant heat and glass composition. *J Mater Sci Mater Med* 2010; 21(2): 589-95. [\[CrossRef\]](#)
19. Upadhyay S, Rao A, Shenoy R. Comparison of the amount of fluoride release from nanofilled resin modified glass ionomer, conventional and resin modified glass ionomer cements. *J Dent (Tehran)* 2013; 10(2): 134-40.
20. Basso GR, Della Bona A, Gobbi DL, Cecchetti D. Fluoride release from restorative materials. *Braz Dent J* 2011; 22(5): 355-8. [\[CrossRef\]](#)
21. Yusoff NNAbN, Ariffin Z, Hassan A, Alam MK. Fluoride Release from Dental Restorations in De-Ionized Water and Artificial Saliva. *J Int Med* 2013; 20(5): 635-8.
22. Rao BSR, Moosani GKR, Shanmugaraj M, Kannapan B, Shankar BS, Ismail PMS. Fluoride Release and Uptake of Five Dental Restoratives from Mouthwashes and Dentifrices *J Int Oral Health* 2015; 7(1): 1-5.
23. Lopes CM, Galvan J, Chibinski AC, Wambier DS. Fluoride release and surface roughness of a new glass ionomer cement: glass carbomer. *Rev Odontol UNESP* 2018; 47(1): 1-6. [\[CrossRef\]](#)
24. Naoum S, Ellakwa A, Martin F, Swain M. Fluoride release, recharge and mechanical property stability of various fluoride-containing resin composites. *Oper Dent* 2011; 36(4): 422-32. [\[CrossRef\]](#)
25. Fallahinejad-Ghajari M, Torabzadeh H, Safavi N, Sohrabi A, Ardakani FF. Fluoride release from three glass ionomers after exposure to sodium fluoride and acidulated phosphate fluoride gels. *Dent Res J (Isfahan)* 2014; 11(5): 604-9.
26. Bansal R, Bansal T. A comparative evaluation of the amount of fluoride release and re-release after recharging from aesthetic restorative materials: an *in vitro* study. *J Clin Diagn Res* 2015; 9(8): 11-4. [\[CrossRef\]](#)
27. Ahn SJ, Lee SJ, Lee DY, Lim BS. Effects of different fluoride recharging protocols on fluoride ion release from various orthodontic adhesives. *J Dent* 2011; 39(3): 196-201. [\[CrossRef\]](#)
28. Türkün LS, Türkün M, Ertuğrul F, Ates M, Brugger S. Long-term antibacterial effects and physical properties of a chlorhexidine-containing glass ionomer cement. *J Esthet Restor Dent* 2008; 20(1): 29-44. [\[CrossRef\]](#)
29. Tiwari S, Kenchappa M, Bhayya D, Gupta S, Saxena S, Satyarth S, Singh A, Gupta M. Antibacterial activity and fluoride release of glass-ionomer cement, compomer and zirconia reinforced glass-ionomer cement. *J Clin Diagn Res* 2016; 10(4): ZC90-3. [\[CrossRef\]](#)
30. Farrugia C, Camilleri J. Antimicrobial properties of conventional restorative filling materials and advances in antimicrobial properties of composite resins and glass ionomer cements-A literature review. *Dent Mater* 2015; 31: 89-99. [\[CrossRef\]](#)

Investigation of Critical Genetic Variations of Vitamin D Metabolism and Vitamin D Serum Levels in Brain Cancer

D Vitamini Serum Düzeyleri ile D Vitamini Metabolizmasındaki Kritik Genlere Ait Varyasyonların Beyin Kanserinde İncelenmesi

Murat Özdemir¹ , M. Tolgahan Hakan¹ , Dilara Sönmez¹ , Ali Kafadar² , İlhan Yaylım¹ , Özlem Küçük hüseyin¹ 

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

²Department of Neurosurgery, Istanbul University-Cerrahpaşa Medical Faculty, İstanbul, Turkey

ORCID ID: M.Ö. 0000-0002-4081-7096; M.T.H. 0000-0002-0622-7148; D.S. 0000-0002-4962-5330; A.K. 0000-0002-3312-3192; İ.Y. 0000-0003-2615-0202; Ö. K. 0000-0001-6298-5026

Cite this article as: Özdemir M, Hakan MT, Sönmez D, Kafadar A, Yaylım İ, Küçük hüseyin Ö. Investigation of Critical Genetic Variations of Vitamin D Metabolism and Vitamin D Serum Levels in Brain Cancer. Experimed 2020; 10(1): 16-24.

ABSTRACT

Recent studies imply the effects of micronutrient intake on the development of several cancers including primary brain cancer (PBC). The biological effects of vitamin D, a member of the fat-soluble vitamin family acting as a steroid hormone, was carried out by binding its receptor (VDR) through vitamin D-binding-protein (VDBP). The present study aims to investigate the effects of vitamin D levels and VDR rs2228570, VDR rs731236, VDBP 7041 polymorphisms on PBC development. The study group consisted of 71 patients and 84 controls. Vitamin D levels were determined by high-pressure liquid chromatography where polymorphisms by polymerase-chain-reaction and restriction fragment length polymorphism methods. The distribution of VDR rs2228570 variants in PBC and its subgroups were determined as FF>Ff>ff; VDBP rs7041 variants were TG>GG>TT, however, VDR rs731236 variants were Tt>TT>tt in PBC and meningioma and TT>Tt>tt in glioma. Vitamin D levels were measured below normal levels in all patients and control groups, which shows the deficiency in Turkish society in line with the literature. Our results show that low serum vitamin D level may be an individual risk factor in the development of brain tumors, however, VDR rs2228570 and rs731236 and VDBP rs7041 polymorphisms have no effect on the risk of disease development.

Keywords: Brain tumors, glioma, meningioma, VDR, VDBP, vitamin D

ÖZ

Son çalışmalar, mikrobesein alımının primer beyin kanseri (PBC) dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinin gelişimi üzerindeki etkilerine işaret etmektedir. Yağda çözünen vitaminler sınıfında yer alan ve steroid hormon olarak etki gösteren D vitamini biyolojik etkilerini reseptörü (VDR) ile vitamin D bağlayıcı protein (VDBP) aracılığıyla gerçekleştirmektedir. Çalışmamızda, D vitamini düzeyleri ile VDR rs2228570, VDR rs731236, VDBP 7041 polimorfizmlerinin PBC gelişimi üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışma grubu, beyin kanseri tanısı konmuş 71 hasta ile 84 sağlıklı bireyden oluşturulmuştur. D vitamini düzeyi, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemiyle, VDR FokI (rs2228570), TaqI (rs731236) ve VDBP rs7041 polimorfizmleri polimeraz zincir reaksiyonu ve restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi yöntemleriyle belirlenmiştir. Çalışmamızda VDR FokI gen varyantlarına ait dağılım primer beyin kanseri ve alt gruplarında FF>Ff>ff; VDBP rs7041 varyantları TG>GG>TT olarak, VDR TaqI varyantlarının ise primer beyin kanseri ve meningiomada Tt>TT>tt, gliomada TT>Tt>tt olduğu tespit edilmiştir. D Vitamini düzeyleri tüm hasta gruplarında ve kontrol grubunda normal düzeyinin altında ölçülmüş, bu durum Türk toplumundaki vitamin D düzeylerinin literatürle uyumlu bir şekilde düşük seviyede olduğunu göstermiştir. Çalışmamız sonuçları, beyin tümörleri gelişiminde düşük serum D vitamini seviyesinin bireysel bir risk faktörü olabileceğini, ancak VDR rs2228570 ile rs731236 ve VDBP rs7041 polimorfizmlerinin hastalık gelişim riskine etkisinin olmadığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Beyin tümörleri, glioma, meningioma, VDR, VDBP, D vitamini

Corresponding Author/Sorumlu Yazar: Özlem Küçük hüseyin **E-mail:** ozlemkh@istanbul.edu.tr

Received Date/Geliş Tarihi: 18.02.2020 **Revision Date/Revizyon Tarihi:** 10.03.2020 **Accepted Date/Kabul Tarihi:** 16.03.2020



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

INTRODUCTION

Brain tumors account for 1.8% of all cancers worldwide and constitute 2.3% of cancer-related deaths (1). Although primary brain tumors possess very heterogeneous pathological mechanisms, the contribution of genetic factors to the development of brain tumors is not completely understood. Recent studies focus on identifying genetic factors in the risk of cancer development due to its importance in choosing appropriate individual cancer treatment strategies (2). Besides, studies investigating the relationship between micronutrient intake and cancer development also attract attention. In fact, vitamin D and its metabolites have been shown to be associated with various types of cancer due to their direct potential to impair proliferative capacity of cancer cells and their anti-cancerogenous and toxic effects on cancer cells (3).

Vitamin D is a member of the fat-soluble vitamin family, and acts as a steroid hormone rather than a vitamin because it is incorporated into the systemic circulation to effect the target tissue and its circulating amount is regulated by feedback mechanisms. Vitamin D is taken either directly through nutrition or is endogenously synthesized in the body, however, active form of vitamin D synthesis occurs in two different tissues as liver and kidneys. Both of the skin synthesized and the dietary forms of vitamin D are converted to 25-Hydroxy Vitamin D (25-(OH)D) in the liver, which is the result of the first hydroxylation. The half-life of 25-(OH)D is 2-3 weeks and its serum level is 1000 times greater than its biologically active form, 1,25-Dihydroxy Vitamin D (1,25-(OH)₂D) metabolite. Thus, 25-(OH)D is the best measurement parameter for consideration of serum vitamin D levels. The second hydroxylation of 25-(OH)D metabolites by the 1 alpha hydroxylase enzyme in the kidney leads to the formation of the active form of vitamin D, 1,25-(OH)₂D (4).

The biological effect of vitamin D is carried out by binding its membrane-bound receptor (VDR) through vitamin D binding protein (VDBP). The direct effects, also known as non-genomic effects of vitamin D is driven by interacting with VDR. The engagement with VDR activates intracellular secondary messengers which leads normal serum levels of calcium and phosphate, regulation of osteoblastic functions and bone resorption (4,5). On the other hand, transcription factors mediate the genomic effects as cell proliferation, differentiation, and apoptosis as well as DNA repair and oxidative stress (5-7).

VDR required for vitamin D function has been shown to be present in more than 50 tissues including the central nervous system (CNS) cells as microglia, astrocyte, oligodendrocyte cells and peripheral nervous system (PSS) cells as Schwann cell nuclei which affects the metabolism of brain cells (6,8,9). *In vitro* studies in microglia cells confirmed the metabolisation of 25-(OH)D to 1,25-(OH)₂D in the brain (10). On the other hand, it is well-known in vitamin D metabolism that, 24-hydroxylase (CYP24A1) inactivates the active form of vitamin D by converting it to 1,24,25-(OH)₃D in a dose dependent manner. In fact, it was shown in rat primary glia cells that the expression of CYP24A1

mRNA was increased with the excess amounts of 1,25-(OH)₂D, which points the regulation of vitamin D levels in the brain (11).

VDR protein is a member of the nuclear receptor family. Several polymorphic sites have been identified on VDR gene. Among the most common VDR gene polymorphisms on chromosome 12q13 which alters the binding capacity of active vitamin D to VDR, FokI (rs2228570) and TaqI (rs731236) attract attention. rs2228570 polymorphism on exon 2 leads an amino acid substitution [thymine(T)→Cytosine(C)] that alters the transcriptional activity of VDR protein by formation of two different translation initiation region. As for rs731236 polymorphism on exon 9 a T to C alternation occurs and results in a synonymous transformation (isoleucine → isoleucine) that affects the mRNA levels of VDR protein (6,12-15).

VDBP, another important molecule in vitamin D metabolism, is a glycoprotein acting in various biological functions as fatty acid transportation, chemotaxis and macrophage activation (7). Several polymorphic sites have been identified on VDBP gene localized on chromosome 4q11–q13 including rs7041 and rs4588. Both polymorphisms of VDBP was responsible for the alteration of binding affinity and/or carrying capacity of VDBP that affects vitamin D serum levels (16).

Previous studies reported that the disorders of vitamin D metabolism play a central role in the pathogenesis of various diseases by affecting cell homeostasis and growth. Besides, the effects of VDR gene polymorphisms on various types of carcinomas such as breast, prostate and colon have been widely studied (6,12,13). The present study aims to investigate the effects of VDR rs2228570, rs731236, and for the first time VDBP rs7041 polymorphisms and serum levels of vitamin D on the risk of primary brain cancer development in Turkish society

MATERIAL AND METHOD

Participants

The study group comprised of 71 primary brain cancer patients followed by Istanbul University-Cerrahpasa Medical Faculty, Department of Neurosurgery and 84 healthy volunteers with no signs and no family history of any malignancy.

The present study conformed with the Helsinki Declaration. All participants in the study signed their written consent prior to the study. The blood samples were taken only with written informed consent. The study protocol was also approved by the local ethical committee (Decree No: 2017/1480) and the Research Fund of Istanbul University (Project Number: TYL-2018-28203).

Measurement of Serum Vitamin D Levels

High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) technique was used to measure the serum vitamin D levels. HPLC system (Spectra System, Thermo Scientific, USA). RP C18 analytical column 250 × 4.6 mm, 5 μm particle size (Knauer, Berlin, Germany) was used to separate the analytes. The detection was performed with a UV detector by using commercial vitamin D measurement kit and bi-level controls [Chromogen Grafelfing, Germany]

according to the manufacturer's instructions (flow rate = 0.7 ml/min; column temperature = 25 °C; wavelength = 265 nm).

Genotyping

Genomic DNA (gDNA) was isolated by a commercial DNA purification kit (Jena Bioscience, Jena, Germany). gDNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and the genotypes were analyzed with restriction fragment length polymorphism (RFLP) method as previously reported (12-17). Table 1 shows the PCR-primer sequences of rs2228570, rs731236 and rs7041 polymorphisms. The PCR products were 272 base pairs (bp) for VDR FokI, 347 bp for VDR TaqI and 482 bp for VDBP rs7041. Genotyping was performed by RFLP method with *FokI*, *TaqI* and *HaeIII* endonuclease restriction enzymes. The fragments were then viewed under UV light after staining with ethidium bromide. The fragments of VDR FokI polymorphism were 272 bp for wild type homozygous (FF) genotype and 198+74 bps for mutant (ff) genotype; VDR TaqI were 347 bp for wild type homozygous (TT) genotype and 293+54 bps for mutant (tt) genotype.; VDBP rs7041 were 482 bp for wild type homozygous (TT) genotype and 298+184 bps for mutant (GG) genotype.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS software package (revision 21.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Chi-Square (χ^2) test and Student's t-test or One-Way Anova test were used to compare the frequency of gene variants and identify the effects on the biochemical activity, respectively. $p < 0.05$ was

Table 1. The PCR primer sequences of VDR and VDBP gene polymorphisms.

SNP	Primer sequence
VDR rs:2228570 (FokI)	5'-GATGCCAGCTGGCCCTGGCACTG-3'
	5'-ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC-3'
VDR rs:731236 (TaqI)	5'-CAGAGCATGGACAGGGAGCAAG-3'
	5'-GCAACTCCTCATGGGCTGAGGTCTCA-3'
VDBP rs:7041	5'-AAATAATGAGCAAATGAAAGAAGAC-3'
	5'-TCTACTATTCTTTGCTGTTATTG-3'

SNP: single nucleotide polymorphism

considered as statistical significance. The relative risk determination was estimated by calculating odds ratio (OR) and confidence intervals. Allele frequencies were made according to the gene counting technique. The figures were obtained by using GraphPad Prism 6.0 (San Diego, CA, USA).

RESULTS

The study groups were age and sex matched ($p > 0.05$). The control group comprised of 63.1% females and 36.9% males with 49.3% females, and 50.7% males in the patient group. The mean age was 40.14 ± 13.18 in the control group, and 42.00 ± 13.43 in the patient group. The baseline of the patients group was shown in Table 2. Among the glioma and meningioma patients

Table 2. Baseline characteristics of the patients group.

Clinical features	Primary Brain Tumors (n=71)	Glioma Cases (n=40)	Meningioma Cases (n=31)
Tumor Histology (n,%)			
Astrocytoma + Oligoastrocytoma	53 (75.0%)	30 (75.0%)	-
Oligodendroglioma	18 (25.0%)	10 (25.0%)	-
Tumor Grade (n,%)			
Grade I	25 (35.8%)	5 (12.1%)	22 (69.5%)
Grade II	22 (30.4%)	16 (39.4%)	5 (17.4%)
Grade III	14 (19.6%)	9 (24.2%)	4 (13.1%)
Grade IV	10 (14.3%)	10 (24.3%)	-
Tumor Localization (n,%)			
Right Hemisphere	36 (51.1%)	22 (53.3%)	4 (11.7%)
Left Hemisphere	32 (44.7%)	18 (46.7%)	14 (47.1%)
Midline	3 (4.3%)	-	13 (41.2%)
Necrosis Pathology (n,%)			
present	38 (52.9%)	21 (52.9%)	-
absent	33 (47.1%)	19 (47.1%)	-
Vascular Endothelial Proliferation (n,%)			
present	56 (78.9%)	32 (78.9%)	-
absent	15 (21.1%)	8 (21.1%)	-

The difference between the groups was analyzed by Chi square (χ^2) test for values with percentage (%).

group, the frequency of cases with advanced tumor grade (III + IV) was lower than early-stage patients (I + II) (48.5%→51.5% and 13.0%→87.0%, respectively), as well as primary brain cancer (66.1% → 33.9%) (data not shown).

The genotype and allele frequencies of VDR rs2228570 and rs731236 and VDBP rs7041 polymorphisms in primary brain cancer patients, meningioma and glioma cases, and controls were shown in Table 3. No significant relations were found between the risk of primary brain cancer and VDR or VDBP polymorphisms ($p>0.05$). The difference between VDR rs2228570, rs731236 or VDBP rs7041 variants and clinical parameters of primary brain tumors (Table 4) and glioma or meningioma (data not shown) were also not significant ($p>0.05$).

Figure 1 shows the comparison of vitamin D (25-hydroxyvitamin D, 25-(OH)D) serum levels among the study groups. The means of serum 25-(OH)D levels in primary brain cancer, glioma and meningioma patients versus controls were 14.33 ± 1.20 ng/ml, ($p=0.042$), 13.09 ± 1.69 ng/ml ($p=0.039$), 15.74 ± 1.66 ng/ml ($p>0.05$) and 18.75 ± 1.81 ng/ml, respectively. However, no significant differences were observed between vitamin D serum levels and clinical parameters as sex, necrosis pathology, vascular endothelial proliferation, sex and advanced or early tumor grades (data not shown, $p > 0.05$).

The serum levels of 25-(OH)D among VDR rs2228570, rs731236 and VDBP rs7041 variants in primary brain cancer patients and controls were shown in Figure 2. The difference in the levels of vitamin D among VDR and VDBP variants was not significant, except heterozygous VDR FokI genotype, Ff ($p=0.047$).

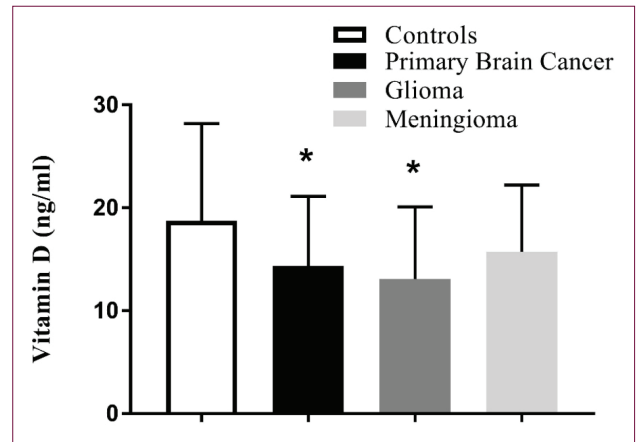


Figure 1. Serum levels of 25-(OH)D in the study groups. Unpaired student's t test was used to estimate the difference between the groups.

Table 3. The distribution of VDR rs2228570 and rs731236, and VDBP rs7041 genotypes and alleles in the whole study groups.

Genotypes and Alleles (n,%)	Control (n=84)	Primary Brain Tumors (n=71)	Glioma Cases (n=40)	Meningioma Cases (n=31)
VDR rs2228570 FF	41 (48.8%)	37 (52.1%)	20 (50.0%)	17 (54.8%)
(FokI) Ff	32 (38.1%)	25 (35.2%)	16 (40.0%)	9 (29.0%)
ff	11 (13.1%)	9 (12.7%)	4 (10.0%)	5 (16.2%)
F Allele	114 (67.9%)	99 (69.7%)	56 (70.0%)	43 (69.4%)
f Allele	54 (32.1%)	43 (30.3%)	24 (30.0%)	19 (30.6%)
VDR rs731236 TT	31 (36.9%)	29 (40.8%)	18 (45.0%)	11 (35.5%)
(TaqI) Tt	40 (47.6%)	32 (45.1%)	16 (40.0%)	16 (51.6%)
tt	13 (15.5%)	10 (14.1%)	6 (15.0%)	4 (12.9%)
T Allele	102 (60.7%)	90 (63.4%)	52 (65.0%)	38 (61.3%)
t Allele	66 (39.3%)	52 (36.6%)	28 (35.0%)	24 (38.7%)
VDBP rs7041 TT	9 (10.7%)	8 (11.3%)	5 (12.5%)	3 (9.7%)
TG	49 (58.3%)	43 (60.6%)	25 (62.5%)	18 (58.1%)
GG	26 (31.0%)	20 (28.2%)	10 (25.0%)	10 (32.3%)
T Allele	67 (39.9%)	59 (41.5%)	35 (43.7%)	24 (38.7%)
G Allele	101 (60.1%)	83 (58.5%)	45 (56.3%)	38 (61.3%)

Chi-square test was used to compare genotypes in the study group. For determining allele frequencies gene count method was used. n, number of individuals; $p<0.05$ denoted statistical significance.

Table 4. The distribution of clinical features according to VDR rs2228570 and rs731236, and VDBP rs7041 variants in primary brain tumor patients group.

Clinical features	VDR FokI				VDR TaqI				VDBP			
	FF Genotype	Ff Genotype	ff Genotype	p value	TT Genotype	Tt Genotype	tt Genotype	p value	TT Genotype	GT Genotype	GG Genotype	p value
Tumor Histology												
A+OA (n=53)	44.4%	44.4%	11.2%	0.646	37.1%	44.4%	18.5%	0.683	14.8%	59.3%	25.9%	0.921
OD (n=18)	66.7%	22.2%	11.1%		55.6%	33.3%	11.1%		11.1%	66.7%	22.2%	
Tumor Grade												
I (n=25)	61.9%	28.6%	9.5%	0.921	38.1%	47.6%	14.3%	0.649	14.3%	52.4%	33.3%	0.916
II (n=22)	47.1%	35.3%	17.6%		41.2%	52.9%	5.9%		11.8%	52.9%	35.3%	
III (n=14)	66.3%	36.4%	-		36.4%	54.5%	9.1%		18.2%	72.7%	9.1%	
IV (n=10)	50.0%	37.5%	12.5%	0.582	25.0%	37.5%	37.5%	0.451	12.5%	62.5%	25.0%	0.773
Necrosis Pathology												
(+) (n=38)	44.4%	55.6%	-	0.637	55.6%	22.2%	22.2%	0.218	11.1%	55.6%	33.3%	0.658
(-) (n=33)	62.5%	37.5%	-		37.5%	62.5%	-		25.0%	62.5%	12.5%	
Vascular endothelial proliferation												
(+) (n=56)	46.7%	53.3%	-	0.582	46.7%	33.3%	20.0%	0.451	13.3%	66.7%	20.0%	0.773
(-) (n=15)	75.0%	25.0%	-		25.0%	75.0%	-		25.0%	50.0%	25.0%	

Chi-square test was used to compare variants in the study groups. n, number of individuals; p<0.05 denoted statistical significance; A, Astrocytoma; OA, Oligoastrocytoma; OD, Oligodendroglioma.

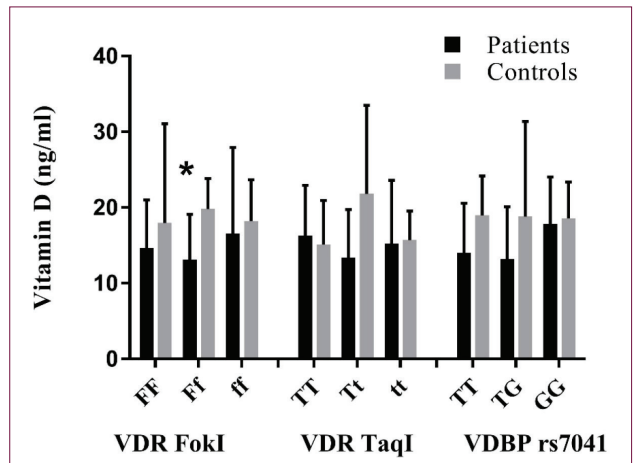


Figure 2. The serum levels of 25-(OH)D among VDR rs2228570 FokI, rs731236 TaqI and VDBP rs7041 variants in primary brain cancer patients and controls. Student's t and Anova tests were used to evaluate the difference between and within the groups. *is donated as statistical significance of Ff genotype between primary brain cancer patients and controls.

DISCUSSION

Primary brain tumors are one of the most common types among the cancer cases in the world (1,17). In Turkey, it was reported that brain cancer constitutes ~2% of all cancer types in 2017 and said to be in the top 10 cancers (18). Although the exact mechanism of the formation of brain tumors was not fully understood, environmental factors such as exposure to toxic chemicals or ionizing radiation, nutritional behaviors as micro-nutrient intake including vitamin D and genetic predisposition are some of the risk factors for the risk of primary brain tumor development (4,5,13).

Vitamin D, found in the 1800s, was shown to have important functions such as the regulation of calcium balance, bone metabolism and more recently in cancer progression and development by its genomic effects as the regulation of cell proliferation, differentiation and apoptosis, DNA repair, oxidative stress and cellular metabolism through transcription factors (4-7,19). In 2008, a report showing the evidence of the causal link between vitamin D and cancer was published by the international cancer research center. Vitamin D is considered to be among the steroid hormones that regulate cell functions such as cell proliferation and differentiation. The effect of active form of vitamin D, 1,25-(OH)₂D, on cell growth and differentiation of cancer cells makes this molecule a candidate marker in the regulation of tumor cells (20). Several studies reported the vitamin D-inhibition of proliferation and differentiation of malignant cells in various tissues such as breast, colon, skin, lung and brain (3,21-29). It has been conducted that high levels of 25-(OH)D, a vitamin D storage form, are associated with low incidence in various types of cancer (3,21-29). In fact, Shi

et al. showed lower levels of 25-(OH)D (<20 ng/ml) in 71.6% of patients diagnosed with breast cancer (25). Mezawa et al. reported significant relationships between colorectal cancer and vitamin D insufficiency (26). Moreover, Atoum et al. reported a 19.2 fold increased risk with vitamin D insufficiency (<10 ng/ml) in colorectal cancer patients (15). On the other hand, in a meta-analysis on optimal serum 25-(OH) D levels to protect from colorectal cancer, Gorham et al. reported that colorectal patients with optimal 25-(OH)D (33 ng/ml) serum levels possess 50% decreased cancer risk compared to patients with ≤ 12 ng/mL 25-(OH)D (27). In contrast to these studies, in a case-control study among 200 patients diagnosed with lung cancer and a control group of 400 people conducted by Gromowski et al., the average 25-(OH) D levels of lung cancer patients has been reported as 17.1 ng/ml while it was 17.2 ng/ml in the controls, and the study concluded as serum vitamin D levels do not affect the development of lung cancer (28).

Ogus et al. evaluated the serum vitamin D levels in the Turkish population and reported the average vitamin D levels as 22.80 ± 13.27 ng/ml (22.49 ± 13.88 in women, 23.73 ± 10.57 ng/ml in men). According to their study conducted on 2012, at least 24% of women, 29% of men and 25% of the whole population have optimal serum vitamin D levels (29). In our study, the mean 25-(OH)D level of the control group consisting of 84 people was measured as 18.75 ± 1.81 ng/ml, while it was 14.33 ± 1.20 ng/ml, ($p=0.042$) in primary brain cancer patients, 13.09 ± 1.69 ng/ml ($p=0.039$) in glioma patients and 15.74 ± 1.66 ng/ml ($p>0.05$) in meningioma patients. Holick et al. classified vitamin D levels as deficient (<20 ng/ml), insufficient (21-29 ng/ml) and adequate (> 30 ng/ml) (30). Accordingly, vitamin D deficiency is observed in the entire study group, since both the control group and the patient group have 25-(OH)D levels below 20 ng/ml. Our results are compatible with Ogus et al. (29). Despite contradictory reports related to Vitamin D and cancer risk in the literature, in our study, when evaluated for primary brain cancer and its subgroups, glioma and meningioma, our results revealed that vitamin D levels may have an independent effect on primary brain cancer and glioma development.

The biological effect of vitamin D was triggered by binding its specific receptor, VDR. While VDR is an important molecule in multiple pathways such as insulin growth factor (IGF), it also involves in inflammation and estrogen-related pathways that may be associated with cancer prognosis (3). In many studies, the effect of VDR gene polymorphisms has been shown in the development of various cancer types including breast, brain, prostate and colorectal cancer (3,6,12-15,18-28). One of the common VDR gene polymorphisms in exon 2 is FokI (rs2228570) polymorphism which leads in an alternative transcription initiation site by the substitution of cytosine (C) thymine (T) and alters the activity of the VDR protein. On the other hand, in TaqI (rs731236) polymorphism of exon 9, another well-known polymorphism, a T→C nucleotide substitution (ATT→ATC) leads to a silent mutation (isoleucine → isoleucine) in codon 352 affecting the secondary structure of the RNA

transcript (12-15). Studies have reported that VDRs localized in neuronal and glial cells affect the metabolism of brain cells and alter VDR expression (31,32).

The potential effect of vitamin D on cancer treatment was first described in myeloid leukemia cells (33), and latter synthetic vitamin D analogs have been proposed for use in the treatment of central nervous system tumors. In fact, phase II clinical trials have been associated with the positive effects of vitamin D treatment on glioblastoma cells (33-36). It has been reported that increased vitamin D production in glioma cells after treatment may regulate cell proliferation (31). Many studies have also noted the effect of VDR polymorphisms on various types of cancer.

In the case-control study of Moossavi et al., VDR-FokI (rs2228570) ff genotypes (OR=4.31, 95%CI: 2.99-6.22, $p=0.0001$), and f allele (OR=4.83, 95%CI: 0.99-23.8, $p=0.035$) were found to have a high risk of colorectal cancer (37). Yilmaz et al. reported no association between brain cavity and VDR-FokI variants in pediatric brain cancer patients diagnosed with malignant brain tumor (38). In study of Tang et al. conducted with 5284 cases and 7500 control groups in Europe, a significant increase in breast cancer risk and VDR-FokI polymorphism variants was reported (39). Toptas et al. reported a positive correlation between meningioma patients and VDR-FokI variants in brain cancer patients ($p=0.004$) in contrast to glioma patients ($p>0.05$) (3). In the present study, the relationship between polymorphisms in VDR Fok-I and Taq-I and brain cancer risk was evaluated. The distribution of genotype variants of VDR FokI polymorphism in primary brain tumors and its sub-groups, glioma and meningioma were found as FF> Ff> ff, respectively. The order of genotype frequencies in the control group was similar to that of the patient group. No significant association was found between VDR FokI polymorphism and brain cancer development. Besides, the serum levels of 25-(OH)D does not correlate with VDR TaqI genotypes in patients and control groups except Ff genotype which was found to be lower in brain cancer patients. Our results partially comply with the results of previous studies (3,38). Our findings indicate that, in meningioma patients, contrary to the study of Toptas, there is no relationship between the development of meningioma and rs2228570 variants; however, our results in glioma patients are similar to those of Toptas (3) and Yilmaz (38) et al.. Since this different result may be related to the inadequate number of specimens belonging to the meningioma patient group, which is the subtype of primary brain cancers in our study group, it may be useful to re-examine the number of patients by expanding the number of the samples and the experiments in which the situation comprise the primary limitation of our study for detection of the risks in cancer subgroups.

In the study of Toptas et al. which was conducted on patients diagnosed with brain cancer in the Turkish population, VDR-TaqI (rs731236) polymorphism variants were also examined in meningioma and glioma patients. The findings stated that there was no significant relationship ($p>0.05$) (3). Similarly, the

study of Yilmaz et al. found no association between brain tumors and VDR-Taql polymorphism variants in pediatric brain cancer patients (38). In colorectal cancer patients, Moossavi et al. also showed any significant difference for VDR-Taql variants (37). In contrast to these studies, Tang et al. reported a significant relationship between breast cancer and VDR-Taql, BsmI and Apal polymorphisms variants (39). In the study of Chen et al. published in 2018, the distribution of VDR-Taql polymorphism in prostate cancer indicated that there was an association with Asians and especially with Japanese population (40). In our study, while the order of VDR Taql variants was found as Tt> TT> tt in primary brain cancer and meningioma patients, and TT> Tt> tt in glioma patients vs Tt> TT> tt in controls, no relation was found between VDR Taql variants and primary brain cancer, glioma and meningioma patients. In addition, the lack of a significant relationship between the 25-(OH) vitamin D level and the VDR Taql gene variants indicates that there is no relationship between VDR Taq polymorphism and brain cancer.

VDBP, which plays a very important role in vitamin D metabolism, is a glycoprotein that carries vitamin D metabolites in the blood. VDBP, which is high in the blood, is required to carry vitamin D to many tissues and prevent the occurrence of various diseases (7,16). Although VDBP has been shown to have more than 120 variants, two important phenotypic alleles have been widely studied as VDBP rs7041 which causes an amino acid change (aspartic acid → glutamic acid) in codon 416 and VDBP rs4588 causes threonine to lysine change in codon 420 (7,16,14). Zhou et al. reported no association between VDBP rs7041 polymorphism and gastrointestinal, colorectal, gastric, esophageal and hepatocellular cancers (14). In contrast, Baykara et al. indicated a significant relation with lung cancer (41), as Anderson et al. in breast cancer (42). In our study, VDBP rs7041 distribution was found as TG> GG> TT. GG> TT in the whole patients' groups and controls. Our results showed any association between VDBP rs7041 polymorphism and the risk of the development of brain tumors similar to several reports in the literature. On the other hand, the lack of any association between VDBP variants and vitamin D serum levels indicates the existence of no correlation with brain tumors. To our knowledge, our findings of VDBP rs7041 are the first results in brain tumors in Turkish population which fills the gap in this subject.

Prospective and retrospective studies in the literature indicates that 25-(OH)D levels lower than 20 ng/ml increase the mortality rates by 50% in several cancer types (43). Low life expectancy was also indicated in patients diagnosed with cancer due to vitamin D deficiency. Vitamin D, of which the levels were affected by dietary habits, exposure to sunlight, seasonal changes, sex, age, malabsorption disorder, and the use of certain medications that affect absorption, has different survival roles in vital mechanisms through its blood levels via genomic and non-genomic functions as acting as anti-inflammatory, anti-oxidant, as well as playing part in DNA damage repair, apoptosis, autophagic cell death, anti-proliferation and differentiation (4,5,19,20,44).

CONCLUSION

In conclusion, our results showed that polymorphisms in the vitamin D receptor (rs2228570 and rs731236) and binding protein (rs7041) have no effect on the development and prognosis of brain tumors. However, lower serum levels of vitamin D may be an independent risk factor for the development of glioma and primary brain cancer. On the other hand, in line with the literature, vitamin D levels in Turkish society were low as it was measured below normal levels as <20 ng/mL in both patient group and control group.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for the study from Istanbul University (Decree No: 2017/1480).

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - Ö.K., M.Ö., İ.Y.; Data Collection and/or Processing - A.K., M.Ö. D.S.; Analysis and/or Interpretation - Ö.K., İ.Y., M.T.S.; Literature Search Ö.K., M.Ö., D.S.; Writing - Ö.K., İ.Y.; Critical Reviews - Ö.K., İ.Y., A.K., M.T.H.

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

Financial Disclosure: The present study was supported by a grant from the Scientific Research Projects Coordination Unit of Istanbul University (Project No: TYL-2018-28203).

Etik Komite Onayı: Çalışma için İstanbul Üniversitesi Etik Kurul'undan onay alınmıştır (Karar No: 2017/1480).

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - Ö.K., M.Ö., İ.Y.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - A.K., M.Ö. D.S.; Analiz ve/veya Yorum - Ö.K., İ.Y., M.T.S.; Literatür Taraması - Ö.K., M.Ö., D.S.; Yazan - Ö.K., İ.Y.; Eleştirel İnceleme - Ö.K., İ.Y., A.K., M.T.H.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: TYL-2018-28203).

REFERENCES

1. Araştırma UK. Dünyadaki Beyin Kanseri Vakası ve ölüm İstatistiği 2012 [updated 27.04.2018. Available from: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx?country=900.
2. Rajaraman P, Melin BS, Wang Z, McKean-Cowdin R, Michaud DS, Wang SS, et al. Genome-wide association study of glioma and meta-analysis. *Human Genetics* 2012; 131(12): 1877-88. [CrossRef]
3. Toptaş B, Kafadar AM, Cacina C, Turan S, Yurdum LM, Yiğitbaşı N, et al. The vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms in Turkish brain cancer patients. *BioMed Research International* 2013; 2013. [CrossRef]
4. Christakos S, Ajibade DV, Dhawan P, Fechner AJ, Mady LJ. Vitamin D: metabolism. *Endocrinology and Metabolism Clinics* 2010; 39(2): 243-53. [CrossRef]
5. Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D signalling pathways

- in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nature Reviews Cancer* 2007; 7(9): 684. [CrossRef]
6. Cornet A, Baudet C, Neveu I, Baron-Van Evercooren A, Brachet P, Naveilhan P. 1, 25-dihydroxyvitamin D3 regulates the expression of VDR and NGF gene in Schwann cells in vitro. *Journal of Neuroscience Research* 1998; 53(6): 742-6. [CrossRef]
 7. Gomme PT, Bertolini J. Therapeutic potential of vitamin D-binding protein. *Trends in Biotechnology* 2004; 22(7): 340-5. [CrossRef]
 8. Burkert R, McGrath J, Eyles D. Vitamin D receptor expression in the embryonic rat brain. *Neuroscience Research Communications* 2003; 33(1): 63-71. [CrossRef]
 9. Baas D, Prüfer K, Ittel ME, Kuchler-Bopp S, Labourdette G, Sarliève LL, et al. Rat oligodendrocytes express the vitamin D3 receptor and respond to 1, 25-dihydroxyvitamin D3. *Glia* 2000; 31(1): 59-68. [CrossRef]
 10. Boontanart M, Hall SD, Spanier JA, Hayes CE, Olson JK. Vitamin D3 alters microglia immune activation by an IL-10 dependent SOCS3 mechanism. *Journal of Neuroimmunology* 2016; 292: 126-36. [CrossRef]
 11. Naveilhan P, Neveu I, Baudet C, Ohya K, Brachet P, Wion D. Expression of 25 (OH) vitamin D3 24-hydroxylase gene in glial cells. *Neuroreport* 1993; 5(3): 255-7. [CrossRef]
 12. Delanghe JR, Speeckaert R, Speeckaert MM. Behind the scenes of vitamin D binding protein: more than vitamin D binding. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2015; 29(5): 773-86. [CrossRef]
 13. Sweeney C, Curtin K, Murtaugh MA, Caan BJ, Potter JD, Slattery ML. Haplotype analysis of common vitamin D receptor variants and colon and rectal cancers. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 2006; 15(4): 744-9. [CrossRef]
 14. Köstner K, Denzer N, Mueller CS, Klein R, Tilgen W, Reichrath J. The relevance of vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms for cancer: a review of the literature. *Anticancer Research* 2009; 29(9): 3511-36.
 15. Zhou L, Zhang X, Chen X, Liu L, Lu C, Tang X, et al. GC Glu416Asp and Thr420Lys polymorphisms contribute to gastrointestinal cancer susceptibility in a Chinese population. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 2012; 5(1): 72.
 16. Atoum MF, Tchoporyan MN. Association between circulating vitamin D, the Taq1 vitamin D receptor gene polymorphism and colorectal cancer risk among Jordanians. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15(17): 7337-41. [CrossRef]
 17. Miyazaki T, Ishikawa E, Matsuda M, Akutsu H, Osuka S, Sakamoto N, et al. Assessment of PD-1 positive cells on initial and secondary resected tumor specimens of newly diagnosed glioblastoma and its implications on patient outcome. *Journal of Neuro-Oncology* 2017; 133(2): 277-85. [CrossRef]
 18. Bakanlıkı TS. Kanser İstatistikleri 2017 [updated 27.04.2018. Available from: http://kanser.gov.tr/Dosya/2017Haberler/2017_4_sub-at.pdf.
 19. Mohr SB. A brief history of vitamin D and cancer prevention. *Annals of Epidemiology* 2009; 19(2): 79-83. [CrossRef]
 20. Holick MF. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. *Annals of Epidemiology* 2009; 19(2): 73-8. [CrossRef]
 21. Ögüş E, Sürer H, Kılınc A, Fidancı V, Yılmaz G, Dindar N, et al. D Vitamini düzeylerinin aylara, cinsiyete ve yaşa göre değerlendirilmesi. *Ankara Medical Journal* 2014; 15(1). [CrossRef]
 22. Grant WB. A critical review of Vitamin D and cancer: A report of the IARC Working Group on vitamin D. *Dermato-Endocrinology* 2009; 1(1): 25-33. [CrossRef]
 23. Bertone-Johnson ER, Chen WY, Holick MF, Hollis BW, Colditz GA, Willett WC, et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D and 1, 25-dihydroxyvitamin D and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 2005; 14(8): 1991-7. [CrossRef]
 24. Lowe LC, Guy M, Mansi JL, Peckitt C, Bliss J, Wilson RG, et al. Plasma 25-hydroxy vitamin D concentrations, vitamin D receptor genotype and breast cancer risk in a UK Caucasian population. *European Journal of Cancer* 2005; 41(8): 1164-9. [CrossRef]
 25. Tworoger SS, Lee I-M, Buring JE, Rosner B, Hollis BW, Hankinson SE. Plasma 25-hydroxyvitamin D and 1, 25-dihydroxyvitamin D and risk of incident ovarian cancer. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 2007; 16(4): 783-8. [CrossRef]
 26. Garland CF, Mohr SB, Gorham ED, Grant WB, Garland FC. Role of ultraviolet B irradiance and vitamin D in prevention of ovarian cancer. *American Journal of Preventive Medicine* 2006; 31(6): 512-4. [CrossRef]
 27. Shi L, Nechuta S, Gao Y-T, Zheng Y, Dorjgochoo T, Wu J, et al. Correlates of 25-hydroxyvitamin D among Chinese breast cancer patients. *PLoS One* 2014; 9(1): e86467. [CrossRef]
 28. Mezawa H, Sugiura T, Watanabe M, Norizoe C, Takahashi D, Shimojima A, et al. Serum vitamin D levels and survival of patients with colorectal cancer: post-hoc analysis of a prospective cohort study. *BMC Cancer* 2010; 10(1): 347. [CrossRef]
 29. Gorham ED, Garland CF, Garland FC, Grant WB, Mohr SB, Lipkin M, et al. Optimal vitamin D status for colorectal cancer prevention: a quantitative metaanalysis. *American Journal of Preventive Medicine* 2007; 32(3): 210-6. [CrossRef]
 30. Gromowski T, Gapska P, Scott RJ, Kałkowski K, Marciniak W, Durda K, et al. Serum 25 (OH) D concentration, common variants of the VDR gene and lung cancer occurrence. *International Journal of Cancer* 2017; 141(2): 336-41. [CrossRef]
 31. Garcion E, Wion-Barbot N, Montero-Menei CN, Berger F, Wion D. New clues about vitamin D functions in the nervous system. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2002; 13(3): 100-5. [CrossRef]
 32. Bhanushali AA, Lajpal N, Kulkarni SS, Chavan SS, Bagadi SS, Das BR. Frequency of fokI and taqI polymorphism of vitamin D receptor gene in Indian population and its association with 25-hydroxyvitamin D levels. *Indian Journal of Human Genetics* 2009; 15(3): 108. [CrossRef]
 33. Cplston K, Colston MJ, Feldman D. 1, 25-dihydroxyvitamin D3 and malignant melanoma: the presence of receptors and inhibition of cell growth in culture. *Endocrinology* 1981; 108(3): 1083-6. [CrossRef]
 34. Naveilhan P, Berger F, Haddad K, Barbot N, Benabid AL, Brachet P, et al. Induction of glioma cell death by 1, 25 (OH) 2 vitamin D3: towards an endocrine therapy of brain tumors? *Journal of Neuroscience Research* 1994; 37(2): 271-7. [CrossRef]
 35. Baudet C, Chevalier G, Naveilhan P, Binderup L, Brachet P, Wion D. Cytotoxic effects of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 and synthetic vitamin D3 analogues on a glioma cell line. *Cancer Letters* 1996; 100(1-2): 3-10. [CrossRef]
 36. Trouillas P, Honnorat J, Bret P, Jouvét A, Gerard J-P. Redifferentiation therapy in brain tumors: long-lasting complete regression of glioblastomas and an anaplastic astrocytoma under long term 1-alpha-hydroxycholecalciferol. *Journal of Neuro-oncology* 2001; 51(1): 57-66. [CrossRef]
 37. Moossavi M, Parsamanesh N, Mohammadoo-Khorasani M, Moosavi M, Tavakkoli T, Fakharian T, et al. Positive correlation between vitamin D receptor gene FokI polymorphism and colorectal cancer susceptibility in South-Khorasan of Iran. *Journal of Cellular Biochemistry* 2018; 119(10): 8190-4. [CrossRef]
 38. Yılmaz B, Tokuc GA, Koc A, Yesil E. Investigation of vitamin D recep-

- tor gene polymorphism in pediatric patients with brain cancer. Indian journal of medical and paediatric oncology: official journal of Indian Society of Medical & Paediatric Oncology 2017; 38(2): 128.
39. Tang C, Chen N, Wu M, Yuan H, Du Y. Fok1 polymorphism of vitamin D receptor gene contributes to breast cancer susceptibility: a meta-analysis. Breast Cancer Research and Treatment 2009; 117(2): 391. [\[CrossRef\]](#)
 40. Chen L, Wei J, Zhang S, Lou Z, Wang X, Ren Y, et al. Association of VDR gene TaqI polymorphism with the susceptibility to prostate cancer in Asian population evaluated by an updated systematic meta-analysis. Onco Targets and Therapy. 2018; 11: 3267. [\[CrossRef\]](#)
 41. Baykara O, Erşen E, Batur Ş, Buyru N. Role of vitamin D binding protein (VDBP) gene polymorphisms in lung cancer. Turkish Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery 2017; 25(4). [\[CrossRef\]](#)
 42. Anderson LN, Cotterchio M, Cole DE, Knight JA. Vitamin D-related genetic variants, interactions with vitamin D exposure, and breast cancer risk among Caucasian women in Ontario. Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers 2011; 20(8): 1708-17. [\[CrossRef\]](#)
 43. Giovannucci E. The epidemiology of vitamin D and cancer incidence and mortality: a review (United States). Cancer Causes & Control 2005; 16(2): 83-95. [\[CrossRef\]](#)
 44. Jeon S-M, Shin E-A. Exploring vitamin D metabolism and function in cancer. Experimental & Molecular Medicine 2018; 50(4): 20. [\[CrossRef\]](#)

Behçet Hastalığı'nda *IL-10* Geni Ekspresyonu ve rs1554286 SNP İncelenmesi

Investigation of *IL-10* Gene Expression and rs1554286 SNP in Behçet's Disease

Elçin Şehitoğlu Taşar¹ , Elif Uğurel¹ , Erdem Tüzün² , Burçak Vural¹ 

¹İstanbul Üniversitesi, Aziz Sançar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²İstanbul Üniversitesi, Aziz Sançar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Sinirbilim Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ORCID ID: E.Ş.T. 000-0002-7523-8270; E.U. 0000-0001-7789-0337; E.T. 0000-0002-4483-0394; B.V. 0000-0001-6392-7645

Cite this article as: Şehitoğlu Taşar E, Uğurel E, Tüzün E, Vural B. Investigation of *IL-10* Gene Expression and rs1554286 SNP in Behçet's Disease. Experimed 2020; 10(1): 25-9.

ÖZ

Amaç: Behçet hastalığı (BH) genel olarak tekrarlayan oral aftlar, genital ülserasyonlar, deri lezyonları ve üveit ile karakterize olan kronik inflamatuvar bir hastalıktır. BH'nin etiyopatogenezini aydınlatmayı hedefleyen pek çok genetik çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada *IL-10*'da bulunan rs1554286 tek nükleotid polimorfizmi (SNP) ve *IL-10* gen ekspresyonunun BH'nda incelenmesi amaçlanmıştır.

Gerçek ve Yöntem: Bu çalışmada DNA ve RNA izolasyonu için Behçet Hastaları (n=45) ve sağlıklı kontrollere (n=28) ait kan örnekleri toplanmış ve rs1554286 SNP genotipleme gerçek zamanlı PZR ile çalışılmıştır. Yeterli miktarda RNA elde edilen örneklerden (29 BH, 23 sağlıklı kontrol) cDNA elde edilerek *IL-10* gen ekspresyonu yapılmıştır.

Bulgular: *IL-10* geni ekspresyon ve SNP genotipleme sonucunda BH ve sağlıklı kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunmamıştır.

Sonuç: Behçet hastaları ve sağlıklı kontroller arasında *IL-10* geni ekspresyon ve SNP genotipleme karşılaştırması yapılan çalışmamızda iki grup arasında fark saptanmamıştır. Bu durum çalışmamızdaki örneklem sayısının azlığı nedeniyle ortaya çıkmış olabileceğinden daha yüksek örneklem sayılı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Behçet hastalığı, *IL-10*, rs1554286

ABSTRACT

Objective: Behçet's disease (BD) is a chronic, recurrent and inflammatory disorder characterized by oral and genital aphthous ulcerations, uveitis, skin lesions and skin pathergy reaction. There are many genetic studies focused on determining BD etiology. In this study, we aimed to investigate *IL-10* gene expression and rs1554286 single nucleotide polymorphism (SNP) which is located in *IL-10* gene.

Material and Method: In this study, the blood specimens of BD patients (n=45) and healthy controls (HC) (n=28) were collected for RNA and DNA extraction. We genotyped rs1554286 from the DNA samples (45 BD, 28 HC) using real time PCR. We identified the *IL-10* gene expression levels from cDNA samples of patients with sufficient sample amounts (29 patients with BD and 23 HCs).

Results: We compared the expression levels of *IL-10* gene and also genotyping analysis, and no significant difference was observed between BD patients and HC.

Conclusion: In our study, which compared *IL-10* gene expression and SNP genotyping between Behçet patients and healthy controls, no difference was found between the two groups. Since this may have occurred due to the low number of samples in our study, studies with higher sample numbers are needed.

Keywords: Behçet's disease, *IL-10*, rs1554286

GİRİŞ

Behçet Hastalığı (BH), Türk dermatolog Hulusi Behçet tarafından ilk kez 1937 yılında tekrarlayıcı oral aft, genital ülserasyon ve üveit ile birlikte üç semptomlu kompleks bir hastalık olarak tarif edilmiştir. BH tanısı, birçok ülkeye göre farklılıklar göstermekle beraber tanısı ancak tanı kriterleri kullanılarak konulmaktadır (1,2).

Kronik inflamatuvar bir bozukluk olarak bilinen BH'nin etiyolojisi bilinmemektedir. BH'na genetik yatkınlık gösteren bireylerde görülen immünolojik anormalliklerin nedeninin mikrobiyal patojenler olduğu ileri sürülmektedir. BH'nda artmış monosit ve lenfosit sitokin sekresyonu, özellikle Th1 tipi proinflamatuvar sitokinlerin artmış ekspresyonu, genellikle BH'nin aktif döneminde belirgindir. Bunun yanında Behçet hastalarında görülen oligoklonal T hücre genişle-

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Burçak Vural **E-posta:** vburcak@istanbul.edu.tr

Geliş Tarihi/Received Date: 12.03.2020 **Revizyon Tarihi/Revision Date:** 19.03.2020 **Kabul Tarihi/Accepted Date:** 27.03.2020



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

mesi, BH'nin immünopatogenezinde görülen immün yanıtın antijen kaynaklı olduğunu göstermektedir (3).

İnsan genomu, topluluklar arasında görülen genetik farklılıklar, hastalıklara yatkınlık, duyarlılık ve dirençten sorumlu, fenotipte değişikliklere neden olan milyonlarca tek nükleotid polimorfizmi (SNP) ve kopya sayısı değişiklikleri (CNV) içermektedir. Epidemiyolojik ve biyomedikal araştırmalar, farklı topluluklarda hasta bireyler ve sağlıklı kontroller arasındaki SNP farklılıklarını ortaya koymaktadır. Bu farklılıkların ortaya çıkması ve hastalıklara yatkınlığa neden olan genlerin belirlenmesi için bağlantı analizi çalışmaları yapılmaktadır. 2005 yılında Karasneh ve arkadaşlarının, HLA dışı lokuslardaki BH'ye yatkınlık genlerinin belirlenmesi amacıyla çoklu ailelerde uyguladıkları ilk tüm genom bağlantı analizi çalışmasında, 12p12-13 ve 6p22-24 lokuslarını hastalığa yatkınlıkta en güçlü aday bölgeler olarak göstermiş ve bu çalışmada ilk kez BH için 14 potansiyel yeni lokus belirlenmiştir (4).

Bugüne kadar BH genetik yatkınlığı ile ilgili birçok genom boyu ilişkilendirme (GWAS) çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalarda Japon, Türk, Çin ve diğer topluluklarda, BH ile *IL23R-IL12RB2*, *IL10* ve *STAT4* gibi lokuslarda yer alan SNP'ler ilişkilendirilmiştir (5,6,7,8).

2010 yılında Mizuki ve arkadaşlarının Japon toplumunda ve Remmers ve arkadaşlarının ise Türk toplumundaki Behçet hastaları ile yürüttüğü iki Genom Boyu İlişkilendirme Analizleri (GWAS) çalışmasının sonuçlarına göre; Mizuki ve arkadaşlarının BH grubundaki çalışmasında; kromozom 1p31.3' te, *IL23R-IL12RB2* lokuslarının intergenik bölgesinde yer alan rs12119179 ve 1q32.1'de *IL-10* lokusunun 3. intronunda lokalize olan rs1554286 tek nükleotid polimorfizmleri BH ile ilişkili olarak belirlenmiştir. Bu çalışmanın replikasyon aşamasında, Remmers ve arkadaşlarının Türk toplumunda çalıştığı örnekler ve Koreli Behçet hasta örnekleri, anlamlılık değerine ulaşan 3 SNP (*IL23R-IL12RB2*'de rs1495965; *IL-10*'da rs1800872 ve rs1800871) için taranmış ve *IL23R-IL12RB2* bölgesindeki rs1495965, Türk toplumunda BH ile ilişkili bulunmuş fakat Korelilerde anlamlılığa ulaşmamıştır. Bu çalışmada, rs1495965'in hastalıkla ilişkili alelinin her üç toplulukta da BH için artmış risk aleli olduğu gösterilmiştir. *IL-10* bölgesindeki her iki SNP ise; hem Türk ve Korelilerde yapılan replikasyon çalışmasında, hem de meta analiz sonucunda en anlamlı ilişkiyi göstermiştir (5).

Türk toplumundaki GWAS çalışmasında; Japon toplumunda yürütülen çalışmada tanımlanmış olan *IL-10* ve *IL23R-IL12RB2* bölgeleri tekrar detaylı haritalanmış, *IL-10* lokusunda rs 1518111 ve *IL23R-IL12RB2* lokusunda rs924080 SNP'leri BH ile ilişkili varyantlar olarak belirlenmiştir ($p < 0.0001$). Bu çalışmada ek olarak, *IL-10* geninde bulunan rs1518111 haplotipini heterozigot taşıyan sekiz sağlıklı kişinin monositlerinden izole edilmiş pre-mRNA lar da, her iki alelin (hastalık ile ilişkili kopya ve normal alel kopyası) rölatif ekspresyon farklılığı ölçülerek alelik dengesizliği belirlenmiştir. Sekiz kişinin hepsinde rs1518111 A* alelinin pre-mRNA transkripti, G alelini taşıyan transkriptler ile karşılaştırıldığında, A* aleli düşük seviyelerde bulunmuştur (A: hastalıkla ilişkili alel, G: normal alel). Özellikle anti-inflamatuar bir sitokin olan *IL-*

10'un düşük seviyede üretimine neden olan genetik varyasyonların BH patogenezinde gelişen inflamasyon ile ilişkili olduğu ve hastalığa yatkınlık riskini arttırdığı gösterilmiştir (6).

Remmers ve arkadaşlarının BH genom boyu analiz çalışmasında, *IL-10* bölgesindeki varyasyonların ve hastalıkla ilişkili haplotipe sahip alel kopyasının *IL-10*'u çok düşük seviyelerde eksprese ettiği bulunmuş ve *IL-10*'un düşük doz üretimine neden olan genetik varyasyonların BH patogenezinde gelişen inflamasyon ile ilişkili olduğu ve hastalığa yatkınlık riskini arttırdığı gösterilmiştir. Behçet Hastalarının kullandığı ilaçlar, çalışılan bölgedeki genlerin ekspresyonları üzerinde değişikliklere neden olabileceğinden dolayı, Behçet hastalarında belirlenen hastalığa yatkınlık bölgelerindeki varyasyonların ekspresyon çalışmaları için bu varyasyonlara sahip olan ve olmayan sağlıklı gönüllüler tercih edilmiştir. *IL-10* aktivitesinin BH'nda önemli rol oynadığı gösterilmiştir (6). Bu ilişkinin altında otoantikör gelişim mekanizmalarının yatıyor olması mümkündür. Bu çalışmada *IL-10* geni üzerinde yer alan rs1554286 SNP'nin ve *IL-10* ekspresyonunun BH'nda incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hasta ve Kontrol Grubu

Bu çalışmada İ.Ü., İ.T.F. Nöroloji Anabilim Dalı, İç Hastalıkları Anabilim Dalı ve Romatoloji Bilim Dalı'nda BH tanısı ile izlenen ve tedavi edilen, yaş aralığı 18-55 olan toplam 45 hasta ve ailesinde veya kendisinde BH tanısı konulmamış 28 sağlıklı birey kontrol olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda kullanılan örnekler için İ.T.F. Klinik Araştırmalar Etik Kurul (1033 sayılı 25.06.2012 tarihli) onayı alınmıştır.

Örnekler toplanırken gönüllü bilgilendirme formu imzalatılmış olup, örnekler -80°C'de çalışma için saklanmıştır.

DNA izolasyonu

Tuz çöktürme metodu ile DNA izolasyonu yapılmış ve elde edilen DNA'lar kullanılabildiği kadar -20°C'de saklanmıştır.

RNA izolasyonu

Hasta ve sağlıklı kontrollerden EDTA'lı tüp içerisine alınan periferik kan örneklerinden "RNeasy Mini Kit" ile RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve RNA konsantrasyonu ve kalitesinin tayini için spektrofotometre (nd-1000, NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, USA) kullanılmıştır. Örnekler çalışılana kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

cDNA Sentezi

Elde edilen RNA örneklerinden High Fidelity cDNA sentez kiti (Roche) kullanılarak cDNA sentezi yapılmıştır. Örnekler son konsantrasyon değeri 500 ng/µl olacak şekilde sulandırılmış ve her bir örnek için aşağıda verilen miktarlar kullanılarak karışım hazırlanmıştır. Daha sonra; 45°C 30 dk ve 85°C 5 dk inkübe edilerek -20°C'de çalışıncaya kadar saklanmıştır.

IL-10 Geni Ekspresyonu

IL-10 geni kantitatif ekspresyon ölçümü için gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) (LightCycler, Ro-

che Diagnostics GmbH, Germany) kullanılmıştır. Araştırılacak olan genlerin ifade düzeyleri sayısal olarak ölçülmüştür. Her bir genin konsantrasyonu "Light cycler" programı ile belirlenmiş. *IL-10* ve *GAPDH* (house-keeping) geni için kullanılan primer dizileri Tablo 1'de verilmiştir. *IL-10*'nun anlatım miktarını rölatif olarak hesaplamak için "ΔΔCt yöntemi" kullanılmıştır.

rs 1554286 SNP Genotiplenmesi

SNP genotiplenmesi için gerçek zamanlı PZR (LightCycler, Roche Diagnostics GmbH, Germany) kullanılmıştır. Araştırılan rs 1554286 numaralı SNP'nin erime eğrisi (melting curve) analizi ile genotiplendirilmesi yapılmıştır. rs 1554286 için kullanılan referans dizisi Tablo 2'de verilmiştir.

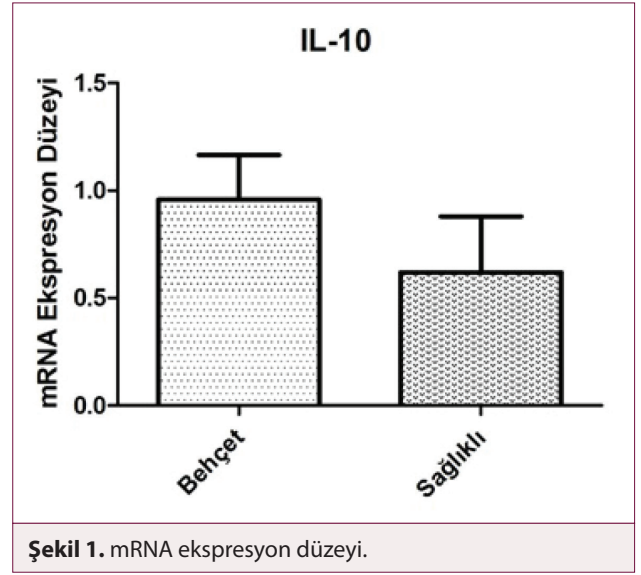
İstatistiksel Hesaplamalar

Gen anlatımı ve genotiplenmenin çalışma grupları arasındaki farkı, Student's t ve ki-kare testi kullanılarak yapılmış ve $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel analiz için Graphpad Prism 8 programı kullanılmıştır.

BULGULAR

IL-10 geninin mRNA ekspresyonlarının hasta ve sağlıklı kontrol grupları arasında karşılaştırılması

Yapılan istatistiksel analizde, hasta bireylerin lökositlerinde *IL-10* ekspresyon düzeylerinin sağlıklı bireyler ile karşılaştırılmasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p=0.463$) (Şekil 1).



Genotipleme sonuçlarının hasta ve sağlıklı kontrol grupları arasında karşılaştırılması

Yapılan istatistiksel analizde, hasta bireylerin rs1554286 SNP alel ve genotipleme sıklıkları sağlıklı bireyler ile karşılaştırılmış ve ki-kare testi sonucunda anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Tablo 3).

Tablo 1. Gerçek zamanlı kantitatif PZR'de kullanılan hedef ve referans genlerin primer dizileri

Gen adı	Forward Primer	Reverse Primer	Ürün Bant Uzunluğu
<i>IL-10</i>	gat gcc ttc agc aga gtg aa	gca acc cag gta acc ctt aaa	105 bç
<i>GAPDH</i>	ccc cgg ttt cta taa att gag c	cac ctt ccc cat ggt gtc t	127 bç

Tablo 2. rs1554286 referans dizisi

GCGCTGTGTAAGTAGCAGATCAGTT [C / T] TTTCCCTTGACAGCTGCCCCAAAAT

Tablo 3. rs 1554286 SNP alel ve genotipleme dağılımı

Genotip	Behçet Hastası		Sağlıklı Kontrol		p değeri
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
CC	22 (49)	14 (50)	14 (50)	14 (50)	1.0
TC	15 (33)	12 (43)	12 (43)	12 (43)	0.46
TT	8 (18)	2 (7)	2 (7)	2 (7)	0.71
Toplam	45	28	28	28	

Alel	Behçet Hastası		Sağlıklı Kontrol		p değeri
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
C	59 (65.6)	40 (71.4)	40 (71.4)	40 (71.4)	0.27
T	31 (34.4)	16 (28.6)	16 (28.6)	16 (28.6)	
Toplam	90	56	56	56	

TARTIŞMA

Bugüne kadar farklı topluluklarda, BH'nda *IL-10* gen ekspresyon seviyelerinin ve farklı *IL-10* SNP'lerinin incelendiği birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada, Türk Behçet hastalarında da bulunan rs1554286 SNP'si ve *IL-10* ekspresyonu araştırılmıştır.

Remmers ve arkadaşlarının BH GWAS çalışmasında, *IL-10* bölgesindeki varyasyonların, ve hastalıkla ilişkili haplotipe sahip alel kopyasının *IL-10*'u çok düşük seviyelerde eksprese ettiği bulunmuş ve *IL-10*'un düşük doz üretimine neden olan genetik varyasyonların BH patogenezinde gelişen inflamasyon ile ilişkili olduğu ve hastalığa yatkınlık riskini arttırdığı gösterilmiştir (6). Ayrıca Remmers ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, *IL-10* geni üzerinde bulunan rs1518111 SNP'nin, sağlıklı kontrollerin monosit hücrelerinde *IL-10* geni ekspresyon seviyesi incelenmiştir. Genin ekspresyon seviyeleri sağlıklıların A ve G alelleri ile karşılaştırıldığında, G aleline sahip olan sağlıklılarda, A aleline sahip olan sağlıklılara göre yüksek ekspresyon seviyesi gözlenmiştir. A/G değişimi BH ile ilişkilendirilmiş ve antiinflamatuar hastalıklarda artan *IL-10* geni seviyeleri bildirilmiştir (5). Bu çalışmada, Behçet hastalarının *IL-10* mRNA ekspresyon seviyeleri sağlıklı bireyler ile karşılaştırılmış ve anlamlı bir sonuç elde edilememesine rağmen hasta grubunda sağlıklı gruba göre artan bir ekspresyon seviyesi gözlenmiştir.

Afkari ve arkadaşlarının İranlı Behçet hastalarında yaptıkları çalışmada *IL-10* geninde yer alan rs1800872 incelenmiş, *IL-10* gen ekspresyonu ve *IL-10* serum seviyeleri çalışılmıştır. rs1800872 A aleli Behçet hastalarına kıyasla kontrollerde anlamlı olarak daha az görülmüş ve *IL-10* gen ekspresyon seviyesinin de kontrollere göre Behçet hastalarında azalmış olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada rs1800872 A alelinin *IL-10* gen ekspresyonunu düzenleyerek BH'da genetik yatkınlığa neden olacağı sonucuna varılmıştır (9).

Yu ve arkadaşlarının Çinli Behçet hastalarında yaptıkları GWAS tekrar çalışmasında ise daha önceki çalışmada belirlenmiş 26 aday SNP incelenmiş ve *IL-10*'da rs1800871 ve *IL23R-IL12RB2* bölgesinde yer alan rs924080 SNP'leri doğrulanmıştır. Bu çalışmada aynı zamanda *IL-10* geni ve *IL23R-IL12RB2* bölgesinde iki yeni yatkınlık SNP'i (rs3024490 ve rs12141431) daha belirlenmiştir. Aynı zamanda çalışmada *IL-10*'da yer alan rs3024490/TT genotipini taşıyanlarda azalmış *IL-10* gen ekspresyonu gözlenmiştir (10).

Alipour ve arkadaşlarının İranlı Behçet hastalarında yaptıkları bir çalışmada, *IL-10* ekspresyon seviyelerinin BH hastalarında kontrole kıyasla düşük olduğunu ve *IL-10* geni promoter bölgesindeki metilasyonun *IL-10* mRNA seviyesi düşük olan hasta grubunda yüksek olduğunu belirlemiş ve *IL-10* geni promoter hipermetilasyonunun düşük *IL-10* mRNA seviyelerine nedeni olduğunu belirtmişlerdir (11).

Monosit, Th2 ve Treg hücrelerinden üretilen *IL-10*, inflamasyonu kontrol edip immün yanıtı düzenlediğinden *IL10* geninin ekspresyonunun azalması durumunda otoimmünite düzenlenememektedir. Yapılan güncel çalışmalarda *IL10* geni üzerinde oluşan polimorfizmler ve promotor bölgesinde oluşan hipermetilasyonlar, Behçet hastalarında *IL10* geninin ekspresyon se-

viyesinin sağlıklı kontrollere göre daha düşük olduğunu göstermiştir (9,10,11). Bazı çalışmalarda BH'da *IL-10* düzeyinin düşük bulunmasına rağmen bizim çalışmamızda benzer bir sonuç belirlenmiştir. *IL-10* düzeyinin düşük bulunduğu çalışmalarda atak ve tedavi durumları belirtilmemiştir. Klinik aktivitenin karıştırıcı bir faktör olarak dikkate alınmamış olması farklı çalışmalarda farklı sonuçların elde edilmesi ne neden olduğu düşünülebilir.

Bugüne kadar Türk Behçet hastalarında bazı *IL-10* SNP'leri bulunmuş ve doğrulama çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmamızda yeni bulunan rs1554286 SNP'nin Türk toplumunda doğrulamasını amaçlamış olmamıza karşın; Japon Behçet hastalarında anlamlı bulunan rs1554286 SNP'si için Türk Behçet hastalarında anlamlı sonuç elde edilmemiştir.

IL-10 geninde hastalık yatkınlığı ile ilişkili farklı SNP'lerin belirlenmesi etnocoğrafik farklılıkları göstermektedir. *IL-10* üretimini etkileyen SNP'lerin toplumlar arasında farklı olması BH'da *IL-10* ekspresyon değişiklikleri etkilemektedir. Ayrıca bugüne kadar yapılan çoğu çalışmada BH atak dönemlerinin ve tedavi faktörlerinin de hesaba katılmadığı görülmektedir.

SONUÇ

Sonuç olarak, hastaların klinik tabloları tekrar ele alınarak, hastalığın farklı tutulum gösteren alt gruplarının eşit dağılım gösterdiği geniş hasta gruplarında ekspresyon ve genotipleme analizlerinin tekrarlanması çalışmanın doğrulanması açısından uygun olabilir.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik kurul onayı, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu (1033 sayılı 25.06.2012 tarihli karar) tarafından verilmiştir.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - E.Ş.T., E.U., E.T., B.V.; Denetleme - E.Ş.T., E.U., E.T., B.V.; Gereçler - E.Ş.T., E.U., E.T., B.V.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - E.Ş.T., E.U., E.T., B.V.; Analiz ve/veya Yorum - E.Ş.T., E.U., E.T., B.V.; Literatür Taraması - E.Ş.T., E.U., E.T., B.V.; Yazan - E.Ş.T., E.U., E.T., B.V.; Eleştirel İnceleme - E.Ş.T., E.U., E.T., B.V.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 26909).

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the Istanbul University, Istanbul Medical Faculty Clinical Research Ethics Committee (dated 25.06.2012; Cert No. 1033).

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - E.Ş.T., E.U., E.T., B.V.; Supervision - E.Ş.T., E.U., E.T., B.V.; Materials - E.Ş.T., E.U., E.T., B.V.; Data Collection and/or Processing - E.Ş.T., E.U., E.T., B.V.; Analysis and/or Interpretation - E.Ş.T., E.U., E.T., B.V.; Literature Search - E.Ş.T., E.U., E.T., B.V.; Writing - E.Ş.T., E.U., E.T., B.V.; Critical Reviews - E.Ş.T., E.U., E.T., B.V.

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

Financial Disclosure: The present work was supported by a grant from the Scientific Research Projects Coordination Unit of İstanbul University (Project No: 26909).

KAYNAKLAR

1. Alpsoy E, Aktekin M, Er H, Durusoy C, Yılmaz E. Distribution and frequency of papulopustular lesions in Behçet's disease. *Int J Dermatol* 1998; 37: 839-43. [\[CrossRef\]](#)
2. Borlu M. Behçet Hastalığında Etyopatogenez ve Klinik bulgular. *Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences)* 2007; 16(1): 63-72.
3. Gül A, Ollier WE, Silman AJ, Worthington J. Behçet's disease: An update on the pathogenesis. *Clin Exp Rheumatol*. 2001; 19(Suppl. 24): S6-S12.
4. Karasneh J, Gül A, Ollier WE, Silman AJ, Worthington J. Whole-Genome Screening for Susceptibility Genes in Multicase Families With Behçet's Disease. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 1836-42. [\[CrossRef\]](#)
5. Mizuki N, Meguro A, Ota M, Ohno S, Shiota T, Kawagoe T, et al. Genome-wide association studies identify IL23R-IL12RB2 and IL10 as Behçet's disease susceptibility loci. *Nature Genetetic* 2010; 42: 703-7. [\[CrossRef\]](#)
6. Remmers EF, Cosan F, Kirino Y, Ombrello MJ, Abaci N, Satorius C, Le JM, et al. Genome-wide association study identifies variants in the MHC Class 1, IL 10 and IL 23R-IL12RB2 regions associated with Behçet's disease. *Nature Genetic* 2010; 42: 698-702. [\[CrossRef\]](#)
7. Hou S, Yang Z, Du L, Jiang Z, Shu Q, Chen Y, et al. Identification of a susceptibility locus in STAT4 for Behçet's disease in Han Chinese in a genome-wide association study. *Arthritis Rheum* 2012; 64: 4104-13. [\[CrossRef\]](#)
8. Kang EH, Kim S, Young Park M, Choi JY, Choi IA, Kim MJ, et al. Behçet's disease risk association fine-mapped on the IL23R-IL12RB2 intergenic region in Koreans. *Arthritis Res Ther* 2017; 19: 227. [\[CrossRef\]](#)
9. Afkari B, Babaloo Z, Dolati S, Khabazi A, Jadidi-Niaragh F, Talei M, et al. Molecular analysis of interleukin-10 gene polymorphisms in patients with Behçet's disease. *Immunol Lett* 2018; 194: 56-61. [\[CrossRef\]](#)
10. Alipour S, Nouri M, Khabbazi A, Samadi N, Babaloo Z, Abolhasani S, et al. Hypermethylation of IL-10 gene is responsible for its low mRNA expression in Behçet's disease. *J Cell Biochem* 2018; 119: 6614-22. [\[CrossRef\]](#)
11. Yu H, Zheng M, Zhang L, Li H, Zhu Y, Cheng L, Li L, et al. Identification of susceptibility SNPs in IL10 and IL23R-IL12RB2 for Behçet's disease in Han Chinese. *J Allergy Clin Immunol* 2017; 139: 621-7. [\[CrossRef\]](#)

Effect of Deuterium Depletion on Erythrocytes in Experimental Diabetes

DeneySEL Diyabette Döteryum Azlığının Eritrositler Üzerine Etkisi

Arif Çolak¹, Ayşen Yarat¹ , Turay Yardımcı²

¹Department of Basic Medical Sciences, Biochemistry, Faculty of Dentistry, Marmara University, İstanbul, Turkey

²Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Girne American University, North Cyprus

ORCID ID: A.Y. 0000-0002-8258-6118

Cite this article as: Çolak A, Yarat A, Yardımcı T. Effect of Deuterium Depletion on Erythrocytes in Experimental Diabetes. Experimed 2020; 10(1): 30-7.

ABSTRACT

In the development of diabetic complications, oxidative stress caused by hyperglycemia plays an important role. Deuterium depletion has protective effect against cellular damage and tumor suppressor effect in cancer cell lines. The purpose of this study was to examine and evaluate the effect of deuterium depletion on erythrocyte oxidant and antioxidant system parameters in experimental diabetes induced by streptozotocin (STZ) in rats. On the 30th or 40th day after STZ injection, blood samples were taken and blood glucose levels were measured. Erythrocyte hemolysates were also prepared. Lipid peroxidation and glutathione levels and glutathione-S-transferase, superoxide dismutase and catalase enzyme activities of erythrocytes were determined. At the 30 or 40 day periods, deuterium depleted water (DDW) consumption had differently affected oxidant-antioxidant parameters of erythrocytes. The clear effect of deuterium depletion in drinking water from 150 ppm to 85 ppm was observed in glutathione levels and it increased erythrocyte glutathione levels in both the control and diabetic groups. In conclusion, deuterium depletion may have protective effects on diabetes induced oxidative stress. Further studies are needed to be done to determine the mechanism of action and the useful dosage and the application period of DDW.

Keywords: Experimental diabetes, erythrocyte, deuterium depletion, antioxidant and oxidant parameters

ÖZ

Diabetik komplikasyonların gelişmesinde, hiperglisemi kaynaklı oksidatif stres çok önemli bir rol oynamaktadır. Döteryum azlığının hücreSEL hasara karşı ve tümör baskılayıcı etki üzerine koruyucu etkisi olduğu kanser hücre hatlarında gösterilmiştir. Çalışmanın amacı, döteryum azaltılmasının sıçanlarda streptozotocin (STZ) ile oluşturulmuş deneySEL diyabette eritrosit oksidan ve antioksidan sistem parametreleri üzerindeki etkisinin araştırılması ve değerlendirilmesidir. STZ enjeksiyonunu takiben 30. veya 40. günde, kan örnekleri alınıp, kan glukoz değerleri ölçülmüş, eritrosit hemolizatları da hazırlanmıştır. Eritrositlerin lipid peroksidasyon ve glutatyon seviyeleri ile glutatyon-S-transferaz, süperoksit dismutaz ve katalaz enzim aktiviteleri tayin edilmiştir. 30 veya 40 günlük periyotlardaki döteryumu azaltılmış su tüketiminin, eritrosit oksidan-antioksidan parametre düzeylerine etkisinin farklı olduğu görülmüştür. İçme suyunda döteryumun 150 ppm den 85 ppm'e azaltılmasının net etkisi glutatyon düzeylerinde gözlenmiş olup hem kontrol hem de diyabetik gruplarda eritrosit glutatyon düzeylerini artırdığı saptanmıştır. Sonuç olarak, döteryumu azaltılmış suyun, diyabete bağlı oksidatif hasara karşı koruyucu etkisi olabilir. Döteryumu azaltılmış suyun etki mekanizmasının, uygun dozunun ve uygulama süresinin aydınlatılması için daha fazla çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: DeneySEL diyabet, eritrosit, döteryum azlığı, antioksidan ve oksidan parametreler

INTRODUCTION

The mass difference between the two stable isotopes, hydrogen and deuterium, leads to differences in their physical and chemical behavior (1,2). The effect of hydrogen replacing with deuterium in the biological systems has also been well documented (3,4). To date, the effects of deuterium in organisms has focused mainly on deuterated water;

however few studies have been conducted on deuterium depletion.

Deuterium concentration is approximately 150 ppm in healthy human blood and it can be changed by age and sex. Drinking waters have different deuterium concentrations because of geographical differentiations. This situation causes different deuterium concentrations in blood

Corresponding Author/Sorumlu Yazar: Ayşen Yarat **E-mail:** ayarat@marmara.edu.tr

Received Date/Geliş Tarihi: 05.03.2020 **Revision Date/Revizyon Tarihi:** 14.03.2020 **Accepted Date/Kabul Tarihi:** 18.03.2020



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

and urine (5-7). Usage of deuterium-depleted water (DDW) has had growing interest recently.

It has been revealed that, deuterium is essential for normal growth of animal and plant cells (7-9). Inhibition of cell proliferation and increased apoptosis by the effect of DDW have been shown in some *in vitro* studies. It has been also shown in some animal experiments that growth of tumor cells is decreased by DDW (10-13). However, a slight increase in deuterium concentration has caused stimulation to growing of tumor cells (14,15).

An increased production of reactive oxygen species in diabetes mellitus is associated with a reduction in antioxidant defenses. Streptozotocin (STZ) has been widely used to induce diabetes. Selective destruction of pancreatic B cells, probably because of a free radical-mediated mechanism, occurs (16). During the reduction of O₂, free radicals are formed, such as peroxy, hydroxyl, and superoxide radicals, which either directly or indirectly cause cell damage.

Erythrocyte membrane tightness and antioxidant enzyme activities are also altered in diabetes mellitus (17-19).

Few studies related with deuterium depletion and diabetes are present in the literature (8,20,21). Reduction or stabilization of blood sugar levels has been reported in diabetic patients who were consuming DDW (5,20,21). However, there have not been any reports on the effect of DDW consumption on erythrocytes of diabetic patients in the literature.

In this study, the effect of deuterium depletion on erythrocytes was investigated. Lipid peroxidation (LPO) and glutathione (GSH) levels, glutathione-S-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities were determined in the erythrocyte hemolysates of the normal and diabetic rats given DDW.

MATERIAL AND METHOD

The study was approved by the Animal Ethics Committee of Marmara University (Registration no: 52.2008.mar). A total of 40 rats (Sprague Dawley) of either sex (240-485 g) were obtained from the animal house facility of Marmara University. They were maintained under standard laboratory conditions at 20 ± 2°C, relative humidity (50 ± 15%) and normal photoperiod (12-hour light-dark cycle) for the duration of the experiment. A commercial pellet diet (Coban Cesme Animal Food Factory, Istanbul, Turkey) and water were provided *ad libitum*.

Animals were divided into six groups of G1, G2, G3 as the controls and G4, G5, G6 as the diabetics. To every diabetic group, a single dose of 35 mg/kg STZ (Sigma, St. Louis, Mo, USA), freshly dissolved in citrate buffer (pH: 4.5) was injected intraperitoneally and blood glucose was checked two days later. Tap water was given to one of control and diabetic groups (G1 and G4). DDW (Preventa, Hungary) was given to G2 and G5 groups 10 days before diabetes improvement and to G3 and G6 groups after diabetes improvement. Deuterium concentration of tap

water and DDW were around 150 and 85 ppm respectively. Deuterium concentration of tap water samples was determined in the Government Stable Isotope Laboratory in Ankara.

On the 30th or 40th day of diabetes induction, blood samples were collected from the hearts of the control and diabetic groups of rats under ether anesthesia. 10% erythrocyte hemolysate was prepared. Blood glucose levels were determined according to glucose oxidase method. Antioxidant enzymes activities, namely GST, (22) CAT, (23) SOD (24) and for LPO, (25) and GSH (26) levels were determined in erythrocytes hemolysates.

Statistical analysis was carried out using SPSS 18.0. All data were expressed as mean±standard deviation. In statistical analysis, Mann-Whitney U test, Kruskal Wallis test, Kolmogorov Smirnov test, Levene test, ANOVA test, Tukey test, Welch test or Dunnett T3 were applied. P values less than 0.05 were considered to be significant.

RESULTS

Prior to diabetes induction, blood glucose levels and body weights were not significantly different between all of the groups (p>0.05). Two days after STZ injection, blood glucose levels of diabetic groups (G4, G5 and G6) were significantly higher than their initial levels (p<0.05). Therefore, animals of these groups were accepted as diabetic.

Comparison of Control and Diabetic Groups

No significant differences were found in the body weights between control and diabetic groups at the end of the experiment. However, food and water consumption and blood glucose levels were significantly increased (Table 1). The blood glucose levels after two days of STZ injection were also significantly higher than those of the controls.

Comparison between groups in point of erythrocyte parameters was also seen in Table 1. No significant differences were present in GST activities between control and diabetic groups. In the diabetic groups, Hb levels were increased and LPO levels and SOD activities were decreased significantly compared to the controls. Erythrocyte GSH levels, CAT and SOD activities were significantly decreased in tap water drinking and 30 days DDW drinking diabetic groups (G4, G5) compared to matched controls (G1 and G2). However, GSH was significantly increased, SOD was significantly decreased and CAT was not significantly changed in 40 days DDW drinking diabetic group (G6) compared to 40 days tap water drinking control group (G3) (Table 1).

Effect of DDW in Control Group

Blood glucose levels and body weights were not affected by DDW consumption. Food and DDW consumptions were greater than those in tap water drinking control and diabetic groups (Table 2).

DDW consumption did not cause any change in erythrocyte GST activities in the control groups. However, it caused signifi-

Table 1. Comparison of food and water consumption, body weight, blood glucose levels and erythrocytes parameters in control and diabetic groups.

	Control Group (G1) (n=6)	Diabetic Group (G4) (n=6)	P
Weight (gr)	350.83±78.89	294.50±85.54	0.263
Food (gr/day)	24.61±0.0	29.44±0.0	0.001
Tap Water (ml/day)	36.22±0.0	89.11±0.0	0.001
Blood glucose (mg%)	109.50±6.44	270.61±28.53	0.0001
Hb (gr%)	2.18±0.13	2.87±0.16	0.0001
LPO (µmol MDA/gr Hb)	0.28±0.04	0.23±0.02	0.009
GSH (µmol/gr Hb)	0.41±0.11	0.11±0.03	0.0001
GST (U/gr Hb)	2.75±1.53	2.82±1.28	0.935
CAT (kU/gr Hb)	216.07±16.65	167.50±8.62	0.0001
SOD (U/mg Hb)	1.91±0.50	1.24±0.41	0.030
	Control + DDW₃₀ (G2) (n=6)	Diabetic + DDW₃₀ (G5) (n=8)	P
Weight (gr)	340.00±80.25	266.88±62.68	0.079
Food (gr/day)	26.39±0.0	28.92±0.0	0.001
DDW (ml/day)	45.17±0.0	98.67±0.0	0.001
Blood Glucose (mg%)	97.33±11.96	204.38±26.70	0.0001
Hb (gr%)	1.70±0.15	3.11±0.07	0.0001
LPO (µmol MDA/gr Hb)	0.27±0.04	0.14±0.01	0.0001
GSH (µmol/gr Hb)	0.36±0.11	0.23±0.04	0.005
GST (U/gr Hb)	2.82±1.92	3.01±0.92	0.811
CAT (kU/gr Hb)	270.48±35.21	145.41±8.66	0.0001
SOD (U/mg Hb)	3.21±0.70	1.40±0.22	0.0001
	Control + DDW₄₀ (G3) (n=6)	Diabetic + DDW₄₀ (G6) (n=6)	P
Weight (gr)	339.50±59.63	270.67±72.41	0.102
Food (gr/day)	24.50±0.0	33.96±0.0	0.001
DDW (ml/day)	39.13±0.0	92.67±0.0	0.001
Blood Glucose (mg%)	118.00±20.83	391.17±119.71	0.0001
Hb (gr%)	2.42±0.07	2.54±0.08	0.021
LPO (µmol MDA/gr Hb)	0.19±0.01	0.18±0.01	0.032
GSH (µmol/gr Hb)	0.61±0.06	0.91±0.06	0.0001
GST (U/gr Hb)	2.57±0.83	2.82±1.52	0.723
CAT (kU/gr Hb)	164.05±23.36	165.31±26.36	0.932
SOD (U/mg Hb)	2.23±0.23	1.40±0.15	0.0001

Values are given as mean ± standard deviation. Hb: Hemoglobin, LPO: Lipid peroxidation, GSH: Reduced glutathione, GST: Glutathione-S-transferase, CAT: Catalase, SOD: Superoxide dismutase, DDW: Deuterium depleted water, DDW₃₀: DDW consumption for 30 days, DDW₄₀: DDW consumption for 40 days.

Table 2. Effect of DDW on food and water consumption, body weight, blood glucose levels and erythrocyte parameters in control groups.

	Control Groups			P
	Tap Water Given Group	DDW Given Groups		
	G1 (n=6)	G2 (n=6)	G3 (n=6)	
Weight (gr)	351±79	340±80	340±60	0.956
Food (gr/day)	21.61±0.0	26.39±0.0	24.50±0.0 ^b	0.0001
Water/DDW (ml/day)	36.22±0.0	45.17±0.0 ^a	39.13±0.0	0.0001
Blood Glucose (mg%)	109.50±6.44	97.33±11.96	118.00±20.83	0.104
Hb (gr%)	2.18±0.13	1.70±0.14 ^a	2.42±0.07 ^{a,b}	0.0001
LPO (µmol MDA/gr Hb)	0.28±0.04	0.27±0.04	0.19±0.01 ^{a,b}	0.0001
GSH (µmol/gr Hb)	0.41±0.11	0.36±0.11	0.61±0.06 ^{a,b}	0.001
GST (U/gr Hb)	2.75±1.53	2.82±1.92	2.57±0.83	0.955
CAT (kU/gr Hb)	216±17	270±35 ^a	164±23 ^{a,b}	0.0001
SOD (U/mg Hb)	1.91±0.50	3.21±0.70 ^a	2.23±0.23 ^c	0.002

Values are given as mean ± standard deviation. Hb: Hemoglobin, LPO: Lipid peroxidation, GSH: reduced glutathione, GST: Glutathione-S-transferase, CAT: Catalase, SOD: Superoxide dismutase, ^ap<0.01 significantly different from G1; ^bp<0.01 and ^cp<0.05 significantly different from G2, DDW: Deuterium depleted water.

Table 3. Effect of DDW on food and water consumption, body weight, blood glucose levels and erythrocyte parameters in diabetic groups.

	Diabetic Group			P
	Tap Water Given Group	DDW Given Groups		
	G4 (n=6)	G5 (n=8)	G6 (n=6)	
Weight (gr)	294.50±85.54	266.88±62.68	270.67±72.41	0.765
Food (gr/day)	29.44±0.0	28.92±0.0	33.96±0.0 ^d	0.0001
Water/ DDW (ml/day)	89.11±0.0	98.67±0.0 ^b	92.67±0.0	0.0001
Blood Glucose (mg%)	271±29	204±27 ^b	391±120 ^c	0.002
Hb (gr%)	2.87±0.16	3.11±0.07 ^a	2.54±0.08 ^{b,c}	0.0001
LPO (µmol MDA/gr Hb)	0.23±0.02	0.14±0.01 ^b	0.18±0.01 ^{b,c}	0.0001
GSH (µmol/gr Hb)	24.52±7.16	25.20±9.63	79.14±12.19 ^b	0.0001
GST (U/gr Hb)	2.82±1.28	3.01±0.92	2.8±1.52	0.946
CAT (kU/gr Hb)	167.50±8.62	145.41±8.66 ^b	165.31±26.36	0.004
SOD (U/mg Hb)	1.24±0.41	1.40±0.22	1.40±0.15	0.684

Values are given as mean ± standard deviation. Hb: Hemoglobin, LPO: Lipid peroxidation, GSH: Reduced glutathione, GST: Glutathione-S-transferase, CAT: Catalase, SOD: Superoxide dismutase ^p<0.05 and ^bp<0.01 significantly different from G4; ^cp<0.05 and ^dp<0.01 significantly different from G5, DDW: Deuterium depleted water.

cant changes in the other erythrocyte parameters. Erythrocyte hemoglobin values decreased significantly in 30 days DDW drinking group (G2) and increased significantly in 40 days DDW drinking group (G3) compared to tap water drinking group (G1). LPO levels in 40 days DDW drinking group were significantly lower than those in both tap water and 30 days DDW

drinking groups. In contrast to LPO levels, GSH levels increased significantly in 40 days drinking DDW group compared to tap water and 30 days DDW drinking groups. CAT and SOD activities were significantly increased by DDW consumption first, however, later than they were decreased by prolonged DDW consumption (Table 2).

Effect of DDW in Diabetic Group

DDW consumption did not cause any change in weights in diabetic groups (G4, G5, G6). Food consumption rose significantly in 40 days DDW drinking diabetic group (G6) compared to 30 days DDW drinking diabetic group (G5). Also, DDW consumption was much more than those in tap water drinking diabetic group. Blood glucose level was significantly lower in 30 days DDW drinking diabetic group than those of tap water drinking and 40 days DDW drinking diabetic group (Table 3).

DDW consumption did not cause any significant change in erythrocyte GST and SOD activities in diabetic groups. Hemoglobin value increased in 30 days DDW drinking diabetic group (G5), in contrast, it decreased significantly in 40 days DDW drinking diabetic group (G6) compared to tap water drinking diabetic group (G4). Erythrocyte LPO levels decreased significantly in 30 and 40 days DDW drinking diabetic group compared to tap water drinking diabetic group. DDW consumption increased the GSH level significantly in 40 days DDW drinking diabetic group (G6) compared to those of other diabetic groups (G4 and G5). Consumption of DDW caused a significant decrease in CAT activity in 30 days DDW drinking diabetic group compared to those of tap water drinking diabetic group. However, CAT activity in 40 days drinking DDW group (G6) was not significantly different from tap water drinking group (G4) (Table 3).

DISCUSSION

Increased oxidative stress, altered lipid peroxidation, and decreased antioxidant enzymes activities are important risk factors for diabetes (16,27,28). Diet undoubtedly plays a key role as a chemopreventive agent against diabetes as well as various other diseases and optimizing the diet has a preventative function. Erythrocytes were selected as the experimental material in this study, as they interact with oxygen, exposed to oxidative stress and are affected more than other cells from hyperglycemia in diabetes. Moreover, there is no data related with the erythrocytes and DDW consumption in diabetes in the concerning literature. Therefore, in the present study, the effect of DDW consumption on LPO, GSH levels and SOD, CAT, GST activities of erythrocytes were examined in experimental diabetes in rats.

Hyperglycemia and weight loss are the common features of STZ induced experimental diabetes unless it is treated (29-31). Thirty five mg/kg of STZ injection may raise blood glucose level around 130 mg% and 175 mg% after 7 days and 28 days, respectively (30-32). However, in the present study, blood glucose levels were found to be more than 175 mg% in diabetic groups at the end of the experiment (at 30 days). Weight loss in the diabetic groups was not significant which is in contrast with other studies (29-31). The reasons for this finding could be the differences in dose of STZ, experimental period, animal species or genus in different studies.

Long-term high blood glucose concentration increases oxidative stress via free radical formation in diabetes. This is tried to be overcome by the antioxidant defense system. Therefore, antioxidant system parameters are reduced in uncontrolled di-

abetes (16,27,33). Oxidative stress affects not only some organs such as the pancreas, kidney, eyes and skin, but also the vascular structure and blood cells.

There were conflicting findings about antioxidant parameters in diabetes. The activities of the antioxidant enzymes have been found to be increased, decreased or not to be changed in those studies (34-36). This may be due to the differences between the studies in point of duration of diabetes, investigative parameters and tissues analyzed.

In some studies, erythrocyte CAT enzyme activity was found to be increased in diabetes (37-39). In contrast with these studies, it has been reported that erythrocyte LPO level and GST activity increased, GSH level and SOD, CAT and GPx enzyme activities decreased in diabetes (33,38-46). While the increase in CAT activity was attributed to high level free radicals and their harmful effects on cell membrane proteins and lipids, the decrease in SOD, CAT, and GPx activities and the increase in MDA level were attributed to the increased oxidative stress and decreased antioxidant reserve during hyperglycemia. In the present study, diabetic erythrocyte antioxidant parameters (GSH, SOD, CAT) decreased when compared with the controls, however, in contrast with them, there was a significant decrease in diabetic LPO levels. Similar to the study by Tatsuki et al. (32), this may be due to the suppression of MDA increase by the effect of antioxidants developed in shorter time. Tatsuki et al. found that finding at the end of the 7th week, which is 3 weeks longer than our diabetes model.

Nowadays, different natural products and sources are used for the treatment of diabetes. In the present study, we used DDW for this purpose. It has been reported that deuterium is necessary for human, animal and plant cell growth; (5,7,8) DDW inhibits cell proliferation and induces apoptosis and reduces tumor growth rate; (2,7,8,47) affects vascular reactivity; (48) has radioprotective and immunostimulating effects; (49) and a slight increase in the deuterium concentration stimulates cell growth (8).

The proposed action mechanisms for DDW can be summarized as follows: It has been supposed that cells have a D-H metabolism which regulates the D/H ratio in cells and, through this, a number of other processes too. The pH regulation of cells, and processes happening through the cell membrane might be connected with the change in the intracellular D/H ratio. The D/H ratio can increase in the cells if one of the H⁺ transport systems (H-ATPase, Na⁺/H⁺ antiporter system) gets activated in the membrane. This process prefers H⁺, thus H⁺ and D⁺ get ejected from the cell or organelle (e.g. mitochondria) not in proportion to their ratio of occurrence. A wide variety of external signals enhances the affinity of the antiporter for H⁺ at neutral pH, leading to alkalization of the cells (2,8,10,11).

During several external effects, cells are able to adapt to this new condition. Deuterium depletion induces a stress in cells. While healthy cells quickly adapt to deuterium depletion, the other cells are unable to do so or most adapt much more slowly (8).

Cell division is triggered by the change of the D/H ratio. Deuterium is important for cell proliferation and through deuterium depletion in the body, either the conditions for cell division do not exist, or the cell can only achieve this ratio considerably later. It has also been shown that deuterium depletion inhibits cyclooxygenase-2 activity (8,11).

Moreover, it has been reported that facilitative glucose transporters (GLUTs) act as a transmembrane pathway for water flow (50).

There are a very limited number of studies about DDW and diabetes in the literature. While investigating anti-cancer effects of DDW it has been observed that the state of diabetes mellitus was improved in some patients having tumors associated diabetes mellitus. After drinking DDW their blood glucose levels that had earlier been fluctuating became steady or the high blood glucose levels decreased more or less to normal range. The positive effect of DDW on blood glucose was also found in patients with type I and type II diabetics in another study (5). Tatsou et al. (21) and Alekseevich et al. (20) found that DDW decreased blood glucose levels in diabetics.

In the present study, the blood glucose level significantly decreased in 30 days DDW drinking diabetic group, but it significantly increased in 40 days DDW drinking diabetic group compared to tap water drinking diabetic group. The reason for the decrease in blood glucose in 30 days drinking DDW diabetic group may be due to the enhanced glucose uptake caused by DDW, and the later increase in blood glucose may be due to the adaptation of the cell to D-depletion. It seems that consumption time and concentration of deuterium are important factors for its effect. Further investigation is necessary to clarify the mechanism of action of DDW on blood glucose.

DDW consumption was much higher in both control and diabetic groups than those in tap water drinking groups in the present study. Moreover, food consumption was also high in DDW drinking groups. This finding can also be contributed to the unexpected weight increase in diabetics and controls.

In the present study 30 days and 40 days DDW (85 ppm) consumption have different effects on erythrocyte antioxidant and oxidant system parameters. The net effect had been found on GSH. DDW caused an increase in GSH levels in both of control and diabetic groups. GSH plays a central role in antioxidant defense by detoxifying reactive oxygen species directly or in a GPx catalyzed mechanism. One of the above mechanisms may be responsible for the significant increase in erythrocyte GSH content.

Various clinical and experimental studies with DDW have been conducted to date. According to the results of these studies, it has been suggested that DDW consumption regulates cellular respiration, increases cellular energy, has antioxidant activity, hypoglycemic and antitumor effect, has a positive effect on mental functions, radioprotective effect, detoxification and the immune system (48,51-59).

In conclusion, DDW, by increasing erythrocyte GSH levels, can be protective against diabetic complications due to the oxidative stress. The period of use of DDW and consumption dose of DDW could affect the results of the experiments. In order to determine the mechanism of action, the useful dosage and the application period of DDW, more research need to be done. We believe that the present study will enlighten future studies.

Ethics Committee Approval: The study was approved by the Animal Ethics Committee of Marmara University (Registration no: 52.2008.mar).

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - A.Ç., A.Y., T.Y.; Supervision - A.Ç., A.Y., T.Y.; Materials - A.Ç., A.Y., T.Y.; Data Collection and/or Processing - A.Ç., A.Y., T.Y.; Analysis and/or Interpretation - A.Ç., A.Y., T.Y.; Literature Search - A.Ç., A.Y., T.Y.; Writing - A.Ç., A.Y., T.Y.; Critical Reviews - A.Ç., A.Y., T.Y.

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

Financial Disclosure: This study was supported by a grant from Scientific Research Project Department of Marmara University (Project No: SAĞ-C-YLP-171108-0261).

Etik Komite Onayı: Bu çalışma Marmara Üniversitesi Hayvan Etiği Komitesi tarafından onaylanmıştır (Kayıt no: 52.2008.mar).

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - A.Ç., A.Y., T.Y.; Denetleme A.Ç., A.Y., T.Y.; Gereçler - A.Ç., A.Y., T.Y.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - A.Ç., A.Y., T.Y.; Analiz ve/veya Yorum - A.Ç., A.Y., T.Y.; Literatür Taraması - A.Ç., A.Y., T.Y.; Yazan - A.Ç., A.Y., T.Y.; Eleştirel İnceleme - A.Ç., A.Y., T.Y.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Bölümü tarafından desteklenmiştir (Proje No: SAĞ-C-YLP-171108-0261).

REFERENCES

- Collins CJ, Bowman NS (Eds). Effects In Chemical Reactions. Van Nostrand Reinhold, York, pp. 286-363, 1971.
- Wiberg KB. The Deuterium Isotope Effect. Chem Rev. 1955, 55: 713-43. [CrossRef]
- Jancso G, Van Hook WA. Condensed Phase Isotope Effects: Especially Vapor Pressure. Isotope Effects 1974; 74: 689-750. [CrossRef]
- Rundel PW, Ehleringer JR, Nagy KA: Stable In Ecological Research. Springer, York, pp. 7-9, 1988. [CrossRef]
- Blaga L. The Deuterium content of human metabolic fluids in relation with human metabolic processes (in Romania), IFA-Bucuresti, Scientific Report, 1978, 1-4.
- Berdea P, Cuna S, Cazacu M, Tudose M. Deuterium Variation of Human Blood Serum. Studia Universitatis Babeş-Bolyai, Physica, Special Issue 2001; 256-8.
- Somlyai G, Jancso G, Jakli G, Vass K, Barna B, Lakics V, Gaal T. Naturally occurring deuterium is essential for the normal growth rate of cells. FEBS Letters 1993; 317: 1-4. [CrossRef]

8. Somlyai G. Defeating Cancer. The Biological Effect of Deuterium Depletion by Gabor Somlyai HYD Ltd. for Research and Development ISBN: 0-7596-9261-0;2002.
9. Somlyai G, Laskay G, Berkenyi T, Galbacs Z, Galbacs G, Kiss SA, Jakli GY, Jancso G. The Biological Effects of Deuterium-Depleted Water, a Possible New Tool in Cancer Therapy. *Journal of Oncology* 1998; 30(4): 91-4.135.
10. Cong F, Zhang Y, Sheng H, Ao Z, Zhang S, Wang J. Deuterium-depleted water inhibits human lung carcinoma cell growth by apoptosis. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2010; 1: 277-83. [\[CrossRef\]](#)
11. Somlyai G, Molnar M, Laskay G, Szabo M, Berkenyi T, Guller I, Kovaks A. Biological significance of naturally occurring deuterium: the antitumor effect of deuterium depletion. *Orvosi Hetilap* 2010; 5; 151(36): 1455-60. [\[CrossRef\]](#)
12. Keempels K, Somlyi I, Somlyai G. A retrospective evaluation of the effects of deuterium depleted water consumption on 4 patients with brain metastases from lung cancer. *Integrative Cancer Therapies* 2008; 7(3): 172-81. [\[CrossRef\]](#)
13. Katz JJ, Crespi HL, Hasterlik RJ, Thomson JF, Finkel AJ. Some Observations on Biological Effects of Deuterium, with Special Reference to Effects on Neoplastic Processes. *Journal of the National Cancer Institute* 1957; 18(5): 641-58.
14. Synergistic Effects of Deuterium Oxide and Gemcitabine in Human Pancreatic Cancer Cell Line, *Cancer Letter* 2008; 259: 231-9. [\[CrossRef\]](#)
15. Bahk JY, Lee JH, Chung HS, LeeHY, Chung BC, Park MS, Min SK, Kim MO. Anticancer Effect of Deuterium Oxide on a Bladder Cancer Cell Related to Bcl-2 and Bax. *Journal of Indian Engineering Chemistry* 2007; 13(4): 501-7.
16. MaritimAC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, Oxidative Stress and Antioxidants: A Review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 2003; 17(1): 24-38. [\[CrossRef\]](#)
17. Nwose EU, Jelinek HF, Richards RS, Kerr PG. Erythrocyte oxidative stress in clinical management of diabetes and its cardiovascular complications. *British Journal of Biomedical Sciences* 2007; 64(1): 35-43. [\[CrossRef\]](#)
18. Shin S, Ku Y, Babu N, Singh M. Erythrocyte deformability and its variation in diabetes mellitus. *Indian Journal of Experimental Biology* 2007; 45(1): 121-8.
19. Leoncini S, Rossi V, Signorini C, Tanganelli I, Comporti M, Ciccoli L. Oxidative stress, erythrocyte ageing and plasma non-protein-bound iron in diabetic patients. *Free Radical Research* 2008; 42(8): 716-4. [\[CrossRef\]](#)
20. Alekseevich TA et al. Method for treatment of patients with diabetes mellitus, 01-10(ru2270017), 2006.
21. Tatsuo U, Kunihiro S. Treatment of Cancer, Diabetes Mellitus, Leukemia, Aplastic Anemia and Insomnia, Treatment and Prevention of Severe Acute Respiratory Syndrome (Sars), Rejuvenation, Activation of Cell and Promotion of Increase of Immune Cell by Soy Sauce Prepared by Using Deuterium-Attrited Water (Super Light Water) as Raw Material, and Method for Producing The Same. *Internat Scienc KK. A23L1/238; 12-24 (JP2004357678)*, 2004.
22. Habig WH, Jacoby WB. Assays for differentiation of glutathione-s- transferases. *Methods in Enzymology* 1981; 77: 398-405. [\[CrossRef\]](#)
23. Aebi H.: Catalase invitro. In: *Methods of enzymatic Analysis*, 2nd Edition, vol.2, Bergmeyer HU (Ed), FL., pp.121-126.
24. Mylorie AA, Collins H, Umbles C, Kyle J. Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1986; 82: 512-520. [\[CrossRef\]](#)
25. Ledwozyw A, Michalak D, Stepien A, Kadziolka A. The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta* 1986; 155; 275-83. [\[CrossRef\]](#)
26. Beutler E.: *Glutathione in Red Cell Metabolism: A manual of Biochemical methods*, 2nd ed.: Grune and Stratton, NY., pp.112-114.
27. Watkins PJ. *ABC of Diabetes*. 5th ed, BMJ Publishing Group Ltd, London, p.2-3,2003.
28. Pietropaolo M, Trucco M.Genetics of Type I Diabetes. In: *Type 1 Diabetes*. Ed: Sperling MA, Humana Press Inc, New Jersey, p.28, 2003.
29. Yarat A, Yanardag R, Tunali T, Sacan O, Gursoy F, Emekli N, Ustuner A, Ergenekon G. Effects of glibornuride versus metformin on eye lenses and skin in experimental diabetes. *Arzneimittel Forschung Drug Research* 2006; 56(7): 541-6. [\[CrossRef\]](#)
30. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological Research* 2001; 50: 536-46.
31. Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: Relation of dose to metabolic response. *The Journal of Clinical Investigation* 1969; 48: 2129-39. [\[CrossRef\]](#)
32. Tatsuki R, Satoh K, Yamamoto A, Hoshi K, Ichihara K. Lipid peroxidation in the pancreas and other organs in streptozotocin diabetic rats. *Japanese Journal Pharmacology* 1997; 75: 267-73. [\[CrossRef\]](#)
33. Coşkun O, Ocakçı A, Bayraktaroğlu T, Kanter M. Exercise training prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and β- cell damage in rat pancreas. *Tohoku Journal Experimental Medicine* 2004; 203: 145-54. [\[CrossRef\]](#)
34. Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* 2001; 358: 221-9. [\[CrossRef\]](#)
35. Griesmacher A, Kindhauser M, Andert SE, Schreiner W, Tomo C, Kroebel P, Pietschmann P, Prager R, Schnack C, Scherthaner G, Mueller M. Enhanced Serum levels of thiobarbituric acid - reactive substances in diabetes mellitus. *American Journal of Medicine* 1995; 98(5): 469-75. [\[CrossRef\]](#)
36. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996; 19: 257-67. [\[CrossRef\]](#)
37. Qujeq D, Rezvani T. Catalase (antioxidant enzyme) activity in streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Diabetes and Metabolism* 2007; 15: 22-4.
38. Sekar N, Kanthasamy A, William S, Balasubramaniyan N, Govindasamy S. Antioxidant effect of vanadate on experimental diabetic rats. *Acta Diabetologica Latina* 1990; 27: 285-93. [\[CrossRef\]](#)
39. Mukherjee B, Mukherjee JR, Chatterjee M. Lipid peroxidation, glutathione levels and changes in glutathione-related enzyme activities in streptozotocin-induced diabetic rats. *Immunology and Cell Biology* 1994; 72: 109-14. [\[CrossRef\]](#)
40. Ramakrishna V, Jaikhani R. Evaluation of oxidative stress in insulin dependent diabetes mellitus (IDDM) patients. *Diagnostic Pathology* 2007; 2: 22. [\[CrossRef\]](#)
41. Peuchant E, Brun JL, Rigalleau V, Dubourg L, Thomas MJ, Daniel JY, Leng JJ, Gin H. Oxidative and antioxidative status in pregnant women with either gestational or type 1 diabetes. *Clinical Biochemistry* 2004; 37: 293-8. [\[CrossRef\]](#)
42. Bhatia S, Shukla R, Madhu SR, Gambhir JK, Prabhu KM. Antioxidant status, lipid peroxidation and nitric oxide end product in patients of type 2 diabetes mellitus with nephropathy. *Clinical Biochemistry* 2003; 36: 557-62. [\[CrossRef\]](#)
43. Memişoğulları R, Taysı S, Bakan E, Capoğlu I. Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus. *Cellular Biochemical Function* 2003; 21: 291-6. [\[CrossRef\]](#)

44. Sailaja YR, Baskar R, Saralakumari D. Antioxidant status during maturation of reticulocytes to erythrocytes in type 2 diabetics. *Free Radical Biology and Medicine* 2003; 35(2): 133-9. [\[CrossRef\]](#)
45. Vural H, Sabuncu T, Arslan SO, Aksoy N. Melatonin inhibits lipid peroxidation and stimulates the antioxidant status of diabetic rats. *Journal of Pineal Research* 2001; 31: 193-8. [\[CrossRef\]](#)
46. Chandramohan G, Al-Numair KS, Pugalendi KV. Restoration of altered plasma, erythrocyte and liver antioxidant levels. *International Journal of Integrative Biology* 2009; 5(3): 176-81.
47. Bild W, Nastasa V, Haulica I. In vivo and in vitro research on biological effects of deuterium-depleted water: 1. Influence of deuterium-depleted water on cultured cell growth. *Romanian Journal of Physiology* 2004; 41(1-2): 53-67.
48. Haulica I, Peculea M, Stefanescu I, Titescu G, Todiras M, Bild W. Effects of heavy and deuterium-depleted water on vascular reactivity. *Romanian Journal of Physiology* 1998; 35(1-2): 25-32.
49. Bild W, Stefanescu I, Haulica I, Lupusoru C, Titescu G, Iliescu R, Nastasa V. Research concerning the radioprotective and immunostimulating effects of deuterium depleted water. *Romanian Journal of Physiology* 1999; 36(3-4): 205-18.
50. Loike JD, Caol L, Kuang K, Vera JC, Silverstein SC, Fischbarg J. Role of facilitative glucose transporters in diffusional water permeability through J774 cells. *Journal of Genetic Physiology* 1993; 102(5): 897-906. [\[CrossRef\]](#)
51. Kovács A, Guller I, Krempels K, Somlyai I, Jánosi I, Gyomgyi Z, Szabó I, Ember IGS (2011) Deuterium depletion may delay the progression of prostate cancer. *J Cancer Ther* 2011; 2: 548-56. [\[CrossRef\]](#)
52. Ávila DS, Somlyai G, Somlyai I, Aschner M. Anti-aging effects of deuterium depletion on Mn-induced toxicity in a *C. Elegans* Model. *Toxicol Lett* 2012; 211: 319-24. [\[CrossRef\]](#)
53. Gyöngyi Z, Budan F, Szabo I, Ember I, Kiss I, Krempels K, Somlyai I, Somlyai G. Deuterium depleted water effects on survival of lung cancer patients and expression of Kras, Bcl2, and Myc genes in Mouse lung. *Nutr Cancer* 2013; 65(2): 240-6. [\[CrossRef\]](#)
54. Mladin C, Ciobica A, Lefter R, Popescu A, Bild W. Deuterium depleted water has stimulating effects on long-term memory in rats. *Neurosci Lett* 2014; 583: 154-8. [\[CrossRef\]](#)
55. Soleyman-Jahi S, Zendehtdel K, Akbarzadeh K, Haddadi M, Amanpour S, Muhammadnejad S. In vitro Assessment of antineoplastic effects of deuterium depleted water. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15(5): 2179-83. [\[CrossRef\]](#)
56. Lisitsyn AB, Baryshev MG, Basov AA, Barysheva EV, Bykov IM, Dydykin AS, Tekutskaia EE, Timakov AA, Fedulova LV, Chernukha IM, Dzhimak SS. Influence of deuterium depleted water on the organism of laboratory animals in various functional conditions of nonspecific protective system. *Biofizika* 2014; 59(4): 757-65. [\[CrossRef\]](#)
57. Strelakova T, Evans M, Chernopiatko A, Couch Y, Costa-Nunes J, Cespuoglio R, Chesson L, Vignisse J, Steinbusch HW, Anthony DC, Pomytkin I, Lecsh KP. Deuterium content of water increases depression susceptibility: The potential role of a serotonin-related mechanism. *Behavioural Brain Res* 2015; 277: 237-44. [\[CrossRef\]](#)
58. Boros LG, D'Agostino DP, Katz HE, Roth JP, Meuillet EJ, Somlyai G. Submolecular regulation of cell transformation by deuterium depleting water exchange reactions in the tricarboxylic acid substrate cycle. *Med Hypothesis* 2016; 87: 69-74. [\[CrossRef\]](#)
59. Dzhimak SS, Basov AA, Baryshev MG. Content of deuterium in biological fluids and organs: Influence of deuterium depleted water on D/H gradient and the process of adaptation. *Doki Biochem Biophys* 2015; 465(1): 370-373. [\[CrossRef\]](#)

Kanser ve Metastaz: Hücre Adezyon Molekülleri ve Hücreler Arası Bağlantıların Önemi

Cancer and Metastasis: Importance of Cell Adhesion Molecules and Cell Junctions

Gülçin Özkar¹ , Oğuz Öztürk¹ , Hülya Yılmaz Aydoğan¹ 

¹İstanbul Üniversitesi, Aziz Sançar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ORCID ID: G.Ö. 0000-0002-4383-6890; O.Ö. 0000-0002-2439-9269; H.Y.A. 0000-0002-8837-6664

Cite this article as: Özkar G, Öztürk O, Yılmaz Aydoğan H. Cancer and Metastasis: Importance of Cell Adhesion Molecules and Cell Junctions. Experimed 2020; 10(1): 38-48.

ÖZ

Kanser hücrelerinde metastaz pek çok biyokimyasal ve moleküler faktör tarafından yönlendirilen kompleks bir süreçtir. Metastaz kanser tedavilerinde yüksek oranda sınırlayıcı bir faktör olup kanserden ölümlerin %90'ından sorumludur. Bu nedenle kanser metastazında altta yatan mekanizmaların aydınlatılması kanser metastazının önlenmesi için tedavi yöntemleri geliştirmek açısından önemlidir. Metastaz, lokal invazyon (epitelyal-mezenkimal geçiş), intravazasyon, dolaşımda sağkalım, ekstravazasyon (transendotelial migrasyon/diapedez), mikrometastaz oluşumu ve metastatik koloni oluşumu gibi basamakları içermektedir. Tümör hücreleri integrin selektin gibi adezyon moleküllerinde yaptıkları ekspresyon değişimleri aracılığıyla plateletleri "kalkan" ve endotele bağlanmak için "aracı" olarak kullanarak dolaşımdaki immün sistem hücrelerinden ve apoptoztan kaçarlar. Tümör hücrelerinde ekstravazasyon metastazın anahtar basamaklardan biridir ve moleküllerde ufak farklılıklar olsa da tüm süreç temel olarak lökositlerde olduğu gibidir; yuvarlanma, adezyon ve transmigrasyon (diapedez). Integrinler gibi hücre adezyon molekülleri ve Jam proteinleri gibi hücreler arası bağlantılar ekstravazasyon aşamasında kilit rollere sahiptir. Bu sebeple hücre adezyon molekülleri ve hücreler arası bağlantılar kanser tedavisinde potansiyel hedefler olarak kullanılabilir. Bu derlemede kanser metastazında yer alan genel süreçler ile hücre adezyon molekülleri ve hücreler arası bağlantıların metastazdaki rolleri özetlenmiştir.

Keywords: Kanser, metastaz, adezyon molekülleri, hücreler arası bağlantılar

GİRİŞ

Kanser hücrelerinde metastaz pek çok biyokimyasal ve moleküler faktör tarafından yönlendirilen kompleks bir süreçtir. Metastaz kanser tedavilerinde yüksek oranda sınırlayıcı bir faktör olup kanserden ölümlerin %90'undan sorumludur

ABSTRACT

Metastasis is a complex process which is driven by several biochemical and molecular factors. Metastasis is a condition which severely limits cancer therapies and is responsible for 90% of cancer deaths. Therefore, it is of crucial importance to gain a greater understanding of the underlying mechanisms of metastasis in terms of developing treatment methods for metastasis prevention. Included in metastasis are multiple steps such as local invasion (epithelial-mesenchymal transition), intravasation, survival in the circulatory system, extravasation (transendothelial migration/diapedesis), formation of micrometastasis and metastatic colony. Tumor cells escape from circulating immune cells and apoptosis using platelets as a "shield" and a "link" for binding to endothelium via altering expression patterns of adhesion molecules. Extravasation in tumor cells is one of the key steps of metastasis and despite small differences in molecules, the whole process is basically the same in leukocytes; rolling, adhesion, and transmigration. Cell adhesion molecules such as integrins, and cell junctions such as Jam proteins, are key players in the extravasation step. Therefore, cell adhesion molecules and cell junctions can be used as potential targets for cancer therapy. In this review, the general processes of metastasis and the roles of cell adhesion molecules/cell junctions on metastasis were summarized.

Anahtar Kelimeler: Cancer, metastasis, cell adhesion molecules, cell junctions

(1). Metastaz, lokal invazyon (epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT)), intravazasyon, dolaşımda sağkalım, ekstravazasyon (transendotelial migrasyon/diapedez), mikrometastaz oluşumu ve metastatik koloni oluşumu gibi basamakları içermektedir. Kanser hücrelerinin invazif karakter kazanmasında EMT sürecinde E-kaderin ekspresyonunda azalma,

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Gülçin Özkar **E-posta:** gulcinozkara@gmail.com

Geliş Tarihi/Received Date: 25.02.2020 **Revizyon Tarihi/Revision Date:** 19.03.2020 **Kabul Tarihi/Accepted Date:** 20.03.2020



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

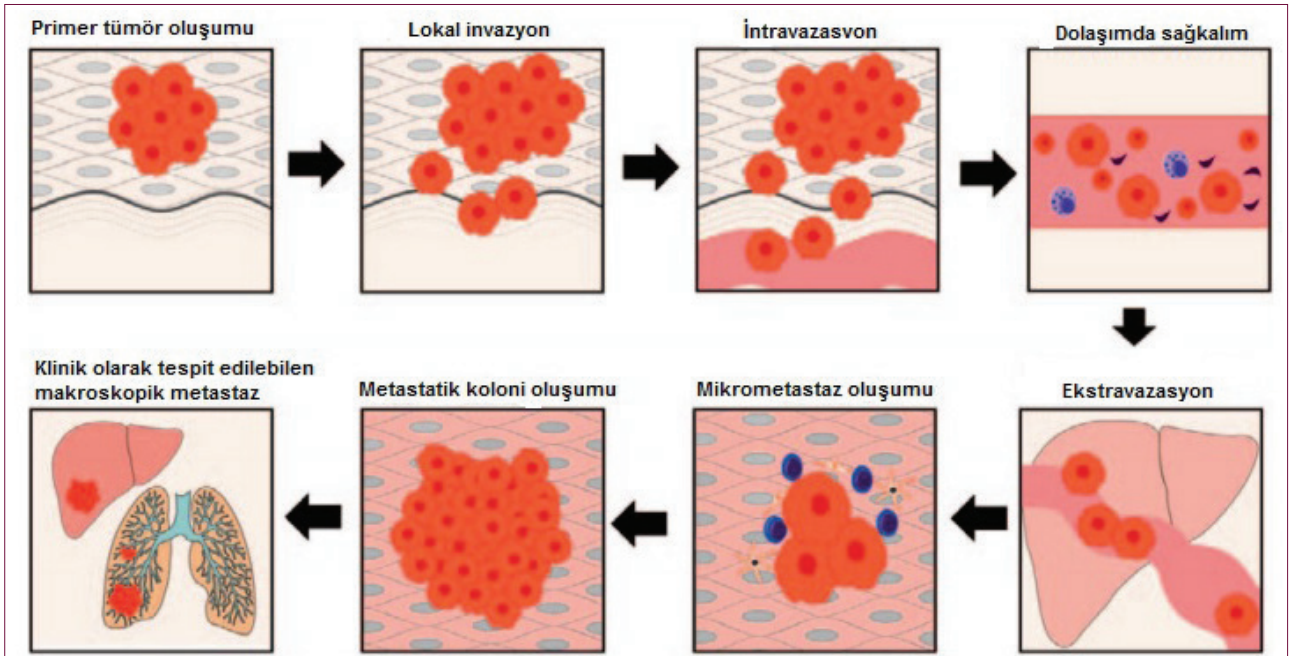
N-kaderin ekspresyonunda artış görülmesi anahtar aşamalardan biridir. Transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi moleküller aracılığıyla anjiogenez sağlanarak tümör hücrelerini besleyecek yeni damarlar oluşturulur. Diğer yandan integrin gibi moleküllerin ekspresyonlarında yaptıkları değişiklikler ve selektin gibi moleküller aracılığıyla plateletleri kendilerine çekip kalcan oluşturarak dolaşımdaki immün sistem hücrelerinden ve apoptoztan kaçmayı başarırlar. Dolaşım sistemi aracılığıyla ilgili organın damar sistemine ulaşıp çeşitli proteazlar salgılayarak damar parankimine geçmeyi başarırlar (ekstravazasyon, diapedef). Tümör hücreleri stromada önce inflamasyonu uyarıp daha sonra inflamatuvar mediatörleri kendi lehine kullanacak kadar akıllıdır. Ekstravazasyon, tümör hücre metastazında diğer anahtar basamaklardan biridir ve ufak farklılıklar olsa da süreç lökositlerdeki gibi yuvarlanma, adezyon ve transmigrasyon (diapedef) şeklinde ilerlemektedir. Ekstravazasyonda integrinler, selektinler gibi hücre adezyon molekülleri, Jam proteinleri gibi hücreler arası bağlantılar anahtar rollere sahiptir. İsteddiği dokunun parankimine giren tümör hücreleri burada yine anjiogenik faktörler aracılığıyla beslenip büyüyerek makrometastazlar oluşturup yeni hedef dokulara metastaz stratejileri planlarlar. Metastaz döngüsünün kırılması kanser tedavisi için büyük öneme sahiptir. Bu sebeple, bu derlemede metastaz basamakları ile metastazda hücre adezyon molekülleri ve hücreler arası bağlantıların önemi ele alınmıştır.

METASTAZ

Literatürde metastaz kaskadı pek çok yazar tarafından aşağıdaki 6 basamak ile açıklanmıştır (2, 3) (Şekil 1).

Lokal İnvazyon

Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT), embriyogenez (Tip 1 EMT), yara iyileşmesi ve doku yenilenmesinde (Tip 2 EMT) normal ve geri dönüşümlü bir süreç iken tümör metastazında (Tip 3 EMT) patolojik olarak yer alır (4). Patolojik EMT sürecinde hücre-hücre adezyonu, hücre-ekstraselüler matriks (ECM) adezyonu çözülmeye ve hücre polaritesi kaybedilmeye başlanır, ilgili moleküllerde aşağı regülasyon (downregülasyon) görülür, mezenkimal hücre adezyon moleküllerinin hücre yüzeyinde yukarı regülasyonu (upregülasyon) görülerek mezenkimal-kök hücre görünümü yeni bir invazif hücreye dönüşüm gerçekleşir (5). Metastaz ile ilişkili EMT sürecinde tümör hücreleri bazal membran ve lamina propriayı aşip bağ dokuyu işgal eder ve farklılaşmış (diferansiye) hücreler farklılaşmamış (indiferansiye) hücelere dönüşür. ECM bağlantısını kaybetmesi sonucu apoptoza (anoikis) giden epitel hücrelerinin aksine tümör hücreleri primer tümörden ayrılmak için mekanizmalar geliştirirler. Bu süreçlerde epitelyal hücre-hücre adezyonunun ana proteini olan E-kaderin Slug, Snail, Twist ve ZEB-1/-2 gibi transkripsiyon faktörleri ile downregüle olarak epitelin daha geçirgen olmasına yol açar (3). Kanser hücrelerinin EMT sürecinde E-kaderin ekspresyonu kaybolurken, *de novo* N-kaderin ekspresyonunda artış görülür. E-kaderin ekspresyonundaki kaybolma epitel hücreleri arasındaki bağlantıların, apiko-bazal hücre polaritesinin ve epitel doku yapısının bozulmasına neden olurken, N-kaderin ekspresyonundaki artış ise kanser hücrelerinin primer dokudan serbestleşmesini, invazif kapasite kazanmasını kolaylaştırır. "Kaderin değişimi (cadherin-switch)" olarak adlandırılan bu olay tümörün invazifliği ve kötü prognoz ile ilişkilidir (6). Meme, pankreas, akciğer, mesane gibi kanser hücre hatlarında yapılan çalışmalarda normal E-kaderin ekspresyonu gösteren hücrele-

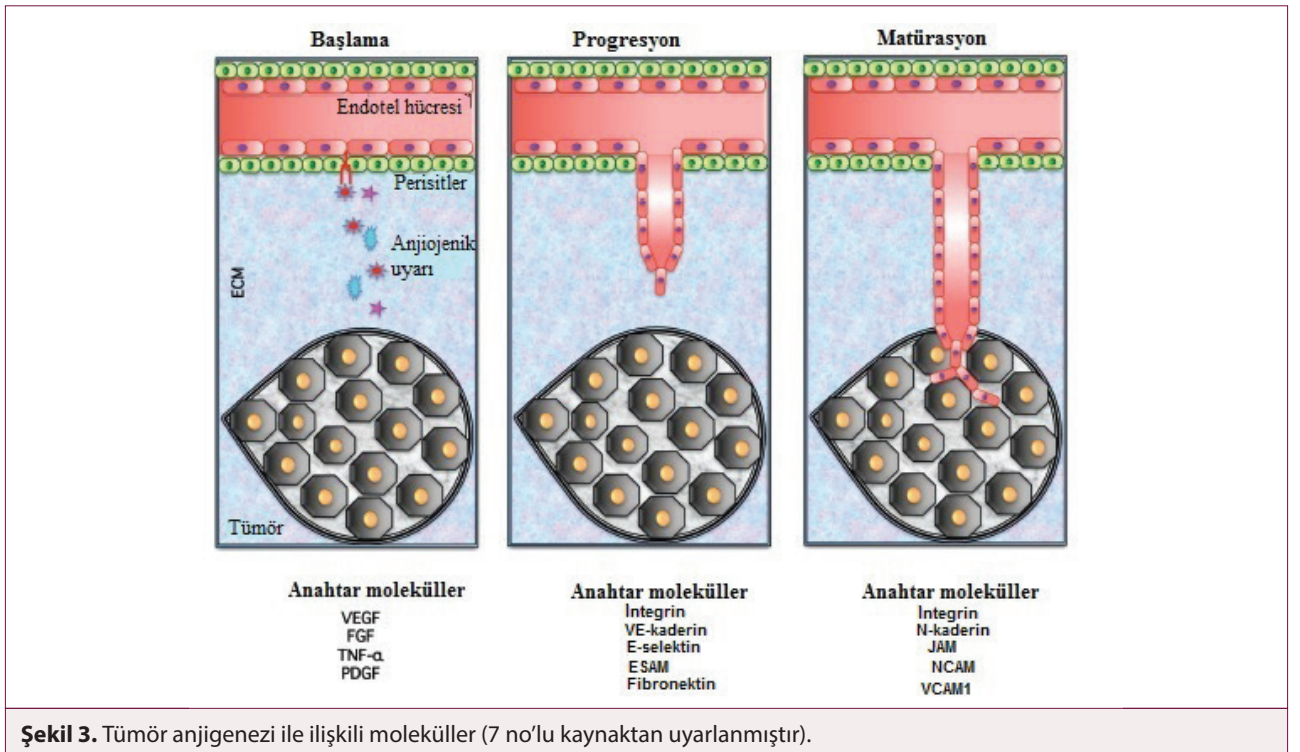
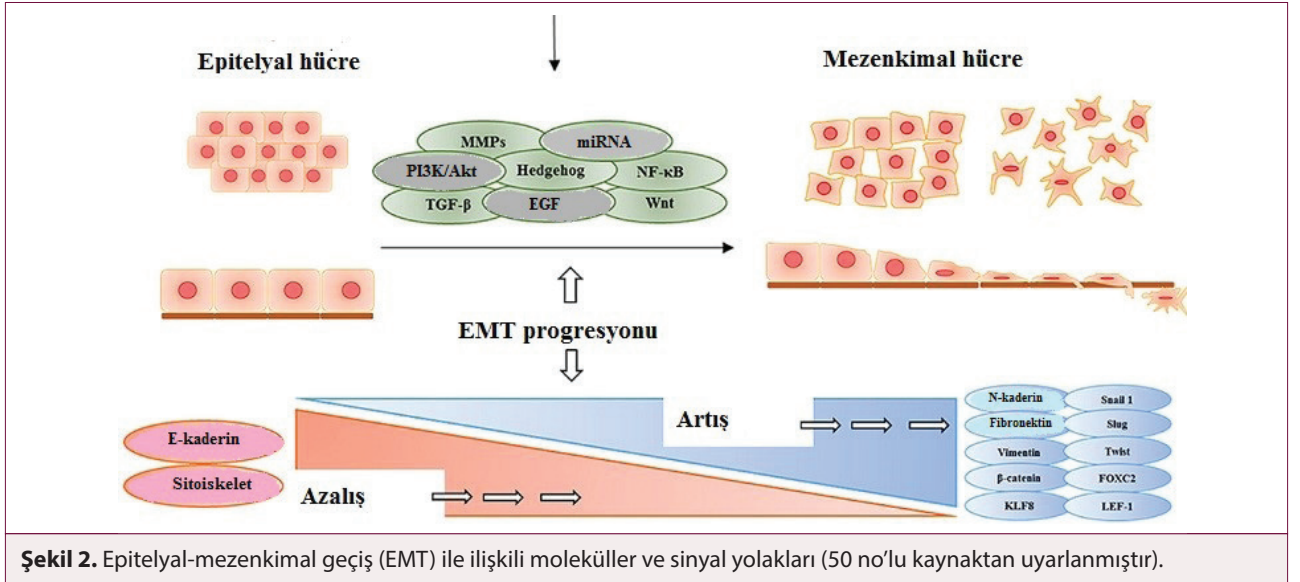


Şekil 1. Metastaz oluşum basamakları (3 no'lu kaynaktan uyarlanmıştır).

rin epiteloid fenotip gösterdiği ve invazif olmadığı, buna karşın düşük E-kaderin ekspresyonu gösterenler ise fibroblast benzeri fenotip gösterdiği ve invazif olduğu belirtilmiştir (7). Bazal membran, integrin-aracılı hücre-matriks adezyonlarının sinyal iletimi süreçlerinde yer alması nedeniyle invazyonda önemli role sahiptir (2). ECM degradasyonu sağlayan tümör hücreleri tarafından salgılanan Matris Metaloproteinaz (MMP) proteinlerinin de süreçte yer alması ile ECM geçilir ve stromaya ulaşan tümör hücreleri burada çoğalır (3, 8). EMT ile ilişkili moleküller ve sinyal yolları Şekil 2'de sunulmuştur.

Intravazasyon

Tümör hücrelerinin salgıladığı MMP-1, -2, ve -9 ile birlikte proteolitik ürokinaz-tip plazminojen aktivatör sisteminin (uPA/uPAR) aktivasyonu ile kan ve lenf damarlarına girmesine "intravazasyon" adı verilir (3). Intravazasyon tümör hücrelerinin perisit ve endotel bariyerini aşmasını kolaylaştıran TGF- β ve VEGF gibi moleküller aracılığıyla hızlanır (1, 8). VEGF gibi moleküller aracılığıyla anjiogenez başlar ve yeni damarlar oluşturularak çoğalan tümör hücrelerinin daha fazla besin ve oksijene ulaşması sağlanır (9). Hipoksi de anjiogenez ile ilgili moleküller yolları



tetikleyici bir faktördür. Hipoksik koşullarda aktive olan hipoksi ile indüklenen faktör-1 (HIF-1) ile angiogenez uyarıcı faktörler, anaerobik metabolizma, hücre motilitesi ve apoptoza karşı direnç sağlayan faktörler aktiflenir. HIF-1 ayrıca tümör hücrelerin organ spesifik yayılımını sağlayan bir kemokin reseptörü olan CXCR4 gen ekspresyonunu uyarır ve kollajen metabolizmasında etkili lizil oksidaz (LOX) enzimi ile etkileşir (10, 11). Tümör angiogenezi ile ilgili moleküller Şekil 3'de sunulmuştur.

Dolaşımda Sağkalım ve İlgili Organda Durma

Tümör hücrelerinin küçük bir kısmı dolaşımda hayatta kalıp metastaz oluşturabilir. Pek çok tümör hücresi hemodinamik güçler, anoikis, sitotoksik immün sistem hücrelerinin saldırısı sonucu dolaşımdan uzaklaştırılır (11). Tümör hücreleri normal hücre sağkalımında önemli olan integrin-bağımlı ECM adezyonu sağlayan moleküllerden yoksundur. Bu moleküllerden yoksun olan ve ECM'e tutunamayan epitel hücreleri anoikis adı verilen apoptoz mekanizması ile dolaşımdan uzaklaştırılır (12). Kanser hücreleri ise integrin gibi moleküllerde yaptıkları değişiklikler ile anoikis karşı direnç geliştirip dolaşımda varlıklarını sürdürebilirler (2). Ayrıca kanser hücreleri doku faktörü, L-, P- Selektinler, trombin, Katepsin B, MMP-2/-14 gibi faktörler salgılayarak platelet agregasyonunu uyarıp kendilerine platelet kalkanı oluşturarak immün sistemden kaçarlara (2, 13, 14).

Tümör hücreleri belirli organlara afinite gösterirler. Buna doku tropizmi adı verilir. Bunun sebeplerinden birisi her organ tarafından salınan belirli kemokinlerin uygun reseptörlerinin tümör hücresinde eksprese olmasıdır. Örneğin meme kanserinde kemokin reseptörü-4 (CXCR4), -2 (CXCR2) eksprese eden tümör hücreleri bu reseptörün ligandının (CXCL12) daha çok bulunduğu organlara (akciğer, karaciğer, kemik iliği gibi) göç ederken epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) eksprese edenler daha çok santral sinir sistemini tercih ederler (3, 15, 16).

Ekstravazasyon (Transendotelial Migrasyon, Tümör Hücresi Diapedezi)

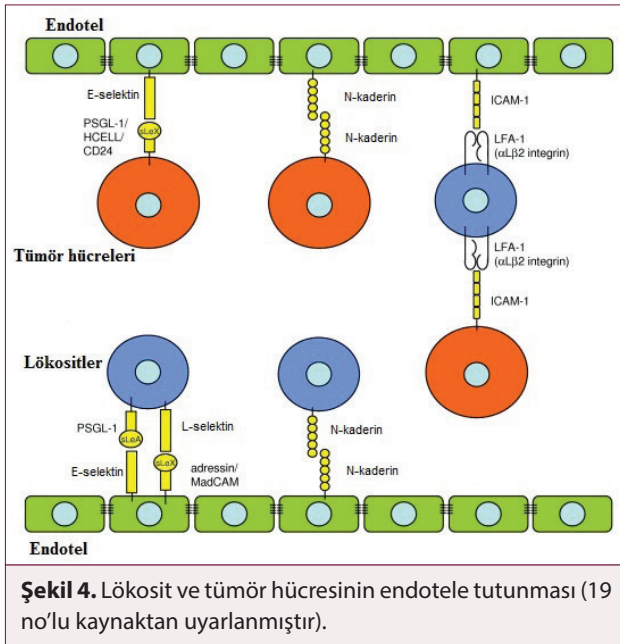
Dolaşımdaki tümör hücreleri, ilgili organların damar sistemine ulaştıklarında lümen içinde büyüyerek mikro koloni oluştururlar ve sonunda damar duvarını delerek parankim dokuya ulaşırlar (17). Dolaşımdaki tümör hücrelerinin endoteli aşır organlara ulaşması ekstravazasyon olarak adlandırılır. Primer tümör tarafından salgılanan Angptl4 (vascular hyperpermeability like protein angiopoietin like-4) ve MMP-1/-2 gibi faktörler ile ekstravazasyon süreci uyarılır (2). Stromadaki CD4⁺ T lenfositler tümör-ilişkili makrofajları (TAM) uyarak karsinoma hücrelerindeki EGFR sinyal yolağını aktive ederler (17). Meme kanseri hücrelerinden salgılanan IL-4 ise TAM'lardaki katepsin proteaz aktivitesini uyarak karsinoma hücrelerinin invazyonunu artırır (18). Literatürdeki bu bulgular tümör hücrelerinin önce stromada inflamasyonu uyardığı, daha sonra oluşan inflamasyonu metastaz lehine kullandıklarını ortaya koyar.

Ektravazasyon hem lökosit hem de tümör hücrelerinde üç aşamalı bir süreçtir; yuvarlanma, adezyon, vasküler endotelden geçiş (transmigrasyon, diapedez). Lökositler transmigrasyonda hem paraselüler (iki endotel hücresi arasından geçiş, hücreler arası bağlantılar bozulur) hem de transselüler (endotel hücresi içinden geçiş, hücreler arası bağlantılar bozulmaz) yolu kullanırlar, kanser hücreleri ise lökositlerden daha büyük oldukları için endotel arasına sıkışıp kalamazlar, endotelial bağlantıları bozarak paraselüler şekilde geçerler (5). Lökositler tarafından oluşturulan inflamasyon sonucu endotel yüzeyinde E-ve P-selektin, lökosit yüzeyinde L-selektin eksprese edilir. Lökosit selektinler aracılığıyla endotele düşük afinite ile bağlanıp kan akımı yüzünden yuvarlanmaya başlar. Mukozal adressin hücre adezyon molekülü (MadCAM), P-selektin glikoprotein ligand-1 (PSGL-1) gibi moleküller yuvarlanma sürecinde rol oynar. Tümör hücresi ve lökosit ekstravazasyonunda rol oynayan moleküller Tablo 1'de

Tablo 1. Lökosit ve tümör ekstravazasyonunda yer alan moleküller

Hücre	Yuvarlanma	Adezyon	Diapedez
Tümör hücreleri	PSGL-1 – E-selektin	$\alpha 4\beta 1 / \beta 7$ – VCAM	N-kaderin – N-kaderin
	HCELL(CD44) – E-selektin	CD44v6 – galektin-3	Apoptotik mekanizmalar
	CD24 – E-selektin	Lamp1/2 – galektin-3	
	CEA – E/L-selektin	$\alpha 5\beta 3$ – L1CAM	
	N-kaderin – N-kaderin ICAM-1/LFA-1		
Lökositler	PSGL-1 – E-selektin	LFA-1 – ICAM-1/2	Paraselüler
	HCELL – E-selektin	Mac-1 – ICAM-1/2	Jam-C – Jam-B
	CD24 – E-selektin	LFA-1 – Jam-A	LFA-1 – Jam-A
	L-Selektin – PNA	Mac-1 – Jam-C	VLA-4 – Jam-B
	L-Selektin – MadCAM	VLA-1 – VCAM	Mac-1 – Jam-C
	N-kaderin – N-kaderin	L1CAM – VLA-5	CD99 – CD99
		Glikolize proteinler – galektinler	PECAM-1 – PECAM-1
			Transselüler
			LFA-1 – ICAM-1
			PECAM-1 – PECAM-1

PSGL-1: P-selektin glikoprotein ligand-1, HCELL: hematopoetik hücre E-/L-selektin ligandı, CEA: karsinoembriyjenik antijen, ICAM-1: hücreler arası adezyon molekülü-1, LFA-1: lenfosit fonksiyon-ilişkili antijen-1, PNA: Periferik nod adressin, MadCAM: mukozal adressin hücre adezyon molekülü, VCAM: vasküler hücre adezyon molekülü, LAMP1/2: lizozom ilişkili membran proteini, L1CAM: nöronal hücre adezyon molekülü L1, Mac-1: Makrofaj-1 antijen, Jam-A/B/C: hücre-hücre yapışma molekülü A/B/C, VLA-1/4/5: very late antigen 1/4/5, PECAM-1: platelet endotelial hücre adezyon molekülü (19 no'lu kaynaktan yararlanılmıştır)



verilmiştir. Tümör hücrelerinde selektin ekspresyonu olmaz, bu hücreler ligandları (N-kaderin) aracılığıyla veya lökositleri/plateletleri kullanarak bağlanırlar (Şekil 4). Tümör hücrelerinde eksprese edilen ICAM-1/2 aracılığıyla lökositlerdeki $\beta 2$ integrinlere (LFA1, Mac-1) bağlanır ve böylece endotelde bulunan vasküler endotelial kaderin (VE-kaderin) fosforilasyona uğrayarak endotel arası bağlantılar gevşer. Bir yandan kemokinler aracılığıyla aktive olan integrinler (inside-out sinyalizasyon) yardımıyla endotel ile sıkı bağlantı gerçekleşirken (adezyon), bir yandan da lökosit/tümör hücresi endotel arası bağlantıya sızır (transmigasyon, diapedez). Adezyonda lökositlerde eksprese olan LFA-1 endotel sıkı bağlantılarından Jam-A ile, Mac-1 ise Jam-C ile, lökositlerdeki PECAM-1 de lökositlerdeki PECAM-1 ile etkileşime geçer. Tümör hücresi ve lökositlerde eksprese olan $\beta 1$ integrinlerden VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$) ise endoteldeki VCAM-1, fibronektin ve Jam-B ile bağlanır (19). Tümör hücreleri ve lökositler farklı moleküller eksprese etseler de endoteldeki ligandları ve ekstrasözasyon süreci benzerdir.

Mikrometastaz Oluşumu

Metastaz oluşumu için karsinoma hücrelerinin kendine yabancı bir organın parankim dokusunda hayatta kalması esastır. Bunu sağlayabilmek için primer kanser hücreleri dolaşıma LOX gibi gidecekleri dokunun fibroblastlarından fibronektin gibi molekülleri uyararak, tümör oluşacak alanda VEGF-A, plasental büyüme faktörü (PIGF), TGF- β , Kalprotektin (S100A8/9) gibi moleküllerin upregülasyonunu uyararak sinyaller salgılayarak tümörün gelecekteki proliferasyon zemini olacak olan 'metastatik niş'i' oluştururlar (2, 10, 20). Fibronektin reseptörü olan integrin $\alpha 4\beta 1$ (CD49d/CD29, VLA-4, ITGA4) ve VEGF reseptörü (VEGFR1+) eksprese eden hematopoetik kök hücreler kemik iliğinden metastaz alanına doğru yola çıkarlar. Daha sonra bu hematopoetik hücreler MMP-9 gibi molekülleri salgılayıp diğer integrinleri de uyararak karsinoma hücreleri için kemoatraktan ECM moleküllerden biri olan Stromal hücre-kökenli faktör-1

(stromal cell-derived factor-1, SDF-1) gibi moleküllerin salınımını gerçekleştirirler. Bu gibi predispozan değişiklikler ile gidecek dokunun mikroçevresinde tümörün hayatta kalabileceği değişiklikler gerçekleştirilir (2, 21).

Metastatik Koloni Oluşumu

Metastatik alanda daha önceden gerçekleşen EMT tersine dönerek mezenkimal-epitelyal dönüşüm gerçekleşir (MET) ve tümör hücreleri çoğalarak organda makro koloniler oluşturur (5). Kanser hastalarının %50'sinde makroskopik metastazlar gerçekleşir. Oluşan mikrometastazlar farklı dokulara dağılıp makroskopik metastazlar oluşturabilir. Ancak bu belli bir paternde gerçekleşmez (3). Tümör hücreleri bazen buldukları yerde yıllarca sessizce yer alabilirler. Adaptif (edinsel) immünite sayesinde sessizleştirilerek bir süre ikincil bir tümör oluşumuna yol açamazlar ancak genetik modifikasyonlar ve mikroçevre ile etkileşerek, örneğin Snail gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ile immünsupresyon görülür ve tümör hücreleri zamanla metastatik hale dönüşebilirler (7, 11).

ADEZYON MOLEKÜLLERİ VE KANSER METASTAZINDAKİ ROLLERİ

Adezyon molekülleri primer olarak hücre-hücre, hücre-ECM arası bağlanmayı sağlayan, hücre sinyalizasyonu, doku ve hücre yapısının korunması, doku tamiri, yara iyileşmesi, bağışıklık (lökosit göçü), tümör metastazı gibi süreçlerde rol alan hücre yüzey proteinleridir (22, 23). Hücre adezyon molekülleri 5 grupta incelenir: hücre-hücre adezyonunda görev yapan selektin, kaderin, immünoglobulin süper ailesi (IgSF), ECM'e bağlanan integrinler ve diğerleri (müsin vb.) (23).

Selektinler

Selektinler dolaşım sisteminde lökosit, platelet ve endotel arası etkileşimi sağlayan glikoprotein yapıda vasküler hücre adezyon molekülleri. Protein ve karbonhidrat ligandlara bağlanabilirler. Selektinler buldukları hücrelere göre P- (plateletlerde α -granüllerinde ve endotelde Weibel-Palade cisimciklerinde), E- (aktive olmuş endotelde) ve L- (lökositlerde) selektinler olarak ayrılır (24).

Selektinler lökosit trafiği ve göçünde önemlidir. Selektinlerin en önemli fonksiyonu erken dönem lökosit yuvarlanmasındaki rolleridir. Lökositlerin endotel üzerinde sıralanıp yuvarlanma süreci, selektinlerin ve karbonhidrat ligandlarının hızlı ve reversibl etkileşimi ile sağlanır. Selektin ligandları genellikle protein bir omurga üzerinde tetrasakkarid çekirdek yapı (sialyl Lewis^{x/a} (sLe^x/sLe^a)) taşıyan belirgin bir glikan yapı içermektedir (24).

Normal durumda boşluklu organların lümenini kaplayan epitel hücreleri, yüksek moleküler ağırlıklı ve O-bağlı glikan içeren müsin ile kaplıdır. Malign transformasyon sürecinde tümör hücreleri üzerindeki glikanlarda selektin ligandları olan sLe^x veya sLe^a ekspresyonları artar ve bu ligandları taşıyan tümör hücreleri dolaşımdaki lökosit, platelet ve endotel üzerindeki selektinlerle etkileşip bağışıklık sistemi hücrelerinden kaçarak metastaz sürecine devam ederler. Plateletler ile etkileşimi gerçekleşmemiş tümör hücreleri dolaşımdan doğal öldürücü hücreler (natural

killer NK) ile uzaklaştırılır (24). P-selektin yokluğunda fare akciğerlerinde tümör hücresi adezyonunun azaldığı gözlenmiştir (24, 25). İntravenöz enjeksiyon öncesi tümör hücre yüzeyinden münlerin uzaklaştırılması, lökosit göçü ve metastatik niş oluşumuna katılan L-selektinin yokluğunun metastazı azalttığı bildirilmiştir (24). P- ve L- selektinlerin platelet ve lökositlerde aşırı ekspresyonları tümör metastazı için ideal ortam oluşturur (7). Daha önceki çalışmalarda E-selektin downregülasyonunun deneysel olarak karaciğer kanseri metastazında azalmaya yol açtığı, transgenik olarak karaciğerde aşırı ekspresyonunun ise karaciğere metastazı arttırdığı belirtilmiştir (24, 26).

Kaderinler

Kaderinler hücre-hücre adezyonunda yer alan transmembran moleküllerdir. Kaderinler aynı zamanda epitelyal-mezenkimal geçiş, hücre migrasyonu gibi süreçlerde kateninler (β -katenin/Wnt sinyal yolağı) aracılığıyla hücre sinyalizasyonunda görev alırlar (22). İsimlerinden de anlaşıldığı gibi yapı ve fonksiyonlarında kalsiyum bağımlıdır (Cadherins- **Calcium dependent adherent proteins**). Kaderinler klasik tip (I ve II), protokaderin ve atipik kaderinler olmak üzere alt sınıflara ayrılır (23). Genel olarak en çok bilinenleri E-kaderin (epitelyal), N-kaderin (nöronal) ve P-kaderin (plasental)'dir. E-kaderin komşu epitelyal hücrelerindeki E-kaderin molekülleri ile homofilik olarak etkileşime geçerek hücre adezyonunda görev alır (27). N-kaderin embriyolarda sinir sistemi, beyin, kalp, iskelet kası, kan damarları gibi dokuların gelişimi ve fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol alır. Genelde nöronal hücrelerde ekspresyon olur ve nöronal hücrelerin intersellüler adezyonunda rol alır. Son zamanlarda meme, prostat, akciğer, karaciğer gibi kanserli dokularda N-kaderin ekspresyonunun değişikliğe uğradığı ve tümör invazyonu ve kanser metastazları ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (28). VE-kaderin vasküler endotelde bulunup endotel arası bağlantıların korunması ve lökosit ekstravazasyonunda rol oynar (29).

Qureshi ve ark. tarafından invazif lobular karsinomların %90'ında E-kaderin ekspresyonunun kaybolduğu bildirilmiştir (30). Elmoneim ve ark.nın çalışmasında invazif duktal karsinoma vakalarında E-kaderin ekspresyonunun azaldığı (%37,1), N-kaderin ekspresyonunun arttığı (%51,9) bulunmuştur (31). P-kaderinler normal meme dokusunda myoepitelyal hücrelerde ekspresyon olurlar. Agresif östrojen-negatif meme kanserlerinde P-kaderinin ekspresyon seviyesindeki artış ile histolojik evre ve kötü prognoz arasında korelasyon bulunmuştur (32).

İmmünoglobulin Süper Ailesi (IgSF)

IgSF ailesinin tüm üyeleri en az bir immünoglobulin veya immünoglobulin benzeri bölge içerir ve çoğu ekstraselüler bölge içeren tip 1 transmembran proteindir (23). Yara iyileşmesi ve immün cevap oluşumu gibi süreçlerde yer alırlar, lenfatik trafiği düzenleyici, inflamasyon alanında immünkompetent hücrelere saldırma gibi görevleri vardır (7). Bu grupta, L1-CAM (merkezi ve periferik sinir sistem kökenli), N-CAM (nöronal hücre adezyon molekülü, CD56) (nöral doku ve kas hücreleri kökenli), ICAM (hücreler arası adezyon molekülü) (endotel, lökosit kökenli), VCAM (vasküler hücre adezyon molekülü) (endotel, makrofaj, fibroblast kökenli), PECAM (platelet endotel hücre adezyon

molekülü) (lökosit, trombosit, endotel, platelet kökenli), LFA (lenfosit fonksiyon-ilişkili antijen-1, lymphocyte function-associated antigen-1) (lökosit, endotel, epitelyal hücreler), MHC (major histocompatibility complex) klas I ve II molekülleri, TCR (T hücre reseptör kompleksi), MadCAM-1 (endotel kökenli), AL-CAM (aktive lökosit hücre adezyon molekülü, endotel kökenli) gibi proteinler yer alır (23, 33). Diğer bir IgSF ailesi ise endotel, epitel ve nöral gibi pek çok dokuda hücre-hücre adezyonunu uyaran nektinlerdir. Nektinler birbirleriyle homofilik veya diğer nektinler veya ligandlarla heterofilik bağlantılar yapabilir, hücreler arası bağlantılar (aderans bağlantılar) yapmak üzere kaderinler ile işbirliği yapabilirler. Çoğu tümörde nektinlerin artmış ekspresyonları bildirilmiştir. ICAM-1/2, VCAM-1, MadCAM-1 gibi moleküllerin downregülasyonları pek çok tümörle ilişkilendirilmiştir (23). ICAM-1'in lenfatik endotel hücrelerde bulunmasının karsinoma hücrelerinin lenf nodu metastazları için uygun ortam oluşturduğu belirtilmiştir (7).

İntegrinler

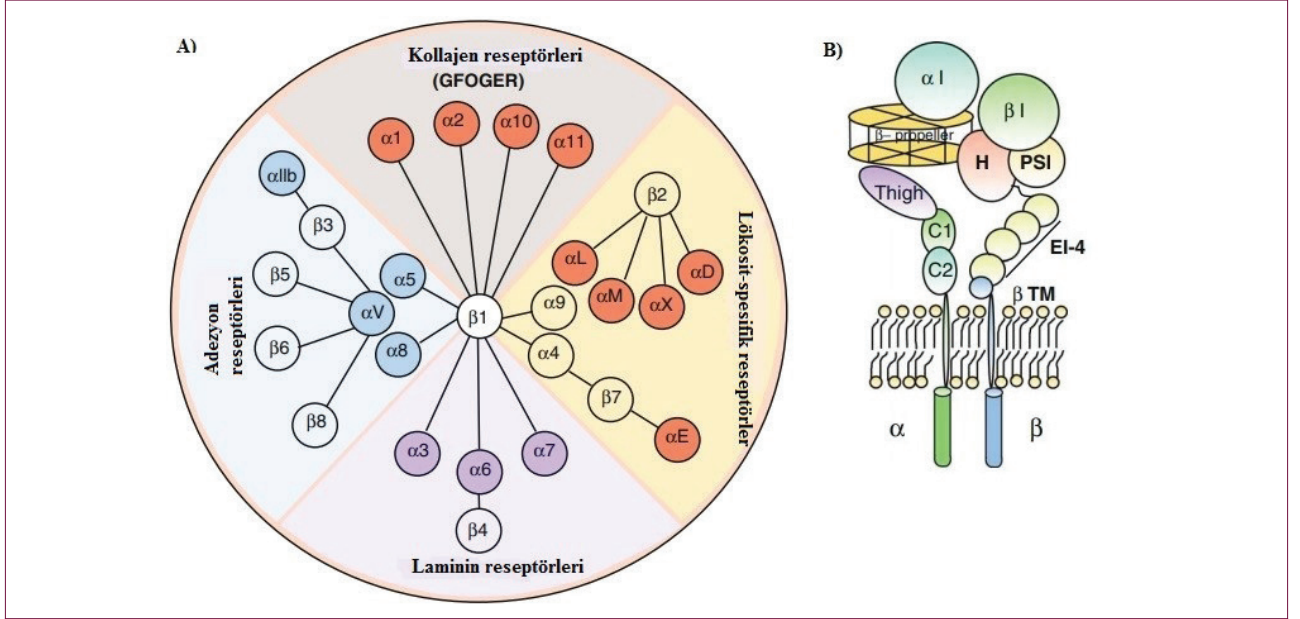
İntegrinler gelişimsel ve patolojik pek çok süreçte yer alan bir α ve bir β altbirimi içeren 24 farklı (18 α ve 8 β) heterotrimerik transmembran hücre yüzey reseptörü ailesidir (Şekil 5A). İntegrinlerin ekstraselüler bölge pek çok bölgeden oluşur. Ligand spesifitesinden sorumlu α altbirimi 7 adet β -pervane yapısı ve ona bağlı C-1 ve C-2 bölgelerinin oluşturduğu bacak ve bacakların desteklediği ligand bağlayıcı baş kısmından oluşur. β -pervane yapısının 3 veya 4 tanesi Ca^{+2} bağlayıcı EF bölgesi içerir. β -2 integrinlerin α altbirimlerinde Mg^{+2} bağımlı ligand bağlama gerçekleştiren I (A olarak da adlandırılır) bölgesi yer alır. I bölgesi merkezde β tabaka ve onu çevreleyen 7 adet α -heliks yapısından oluşur. Ligand bağlanması, açık konformasyonda bu bölgede yer alan "metal iyon bağımlı adezyon bölgesi (MIDAS- **Metal ion dependent adhesion site**)" adı verilen alanda bulunan 3 adet yüzey kıvrımı (loop) Mg^{+2} iyonlarına bağlanırken 4. bağ ligandda yer alan glutamat veya aspartat aminoasitleri ile yapılır. Ligand bağlanmasının gerçekleşmediği kapalı konformasyonda 4. bağ su molekülleri ile yapılır. α zincir sitoplazmik bölgeleri çok çeşitli olsa da hepsinde GFFKR dizi homolojisi görülür. Sitoiskelete bağlanan ve pek çok sinyal yolağını tetikleyen β altbirimi pleksin-semaforin-integrin (PSI), hibrit ve β 1 bölgeleri ve 4 adet sistein aminoasiti açısından zengin EGF tekrarları içerir. β 1 bölgesi de Mg^{+2} bağlayıcı MIDAS ve bitişinde inhibitör bağlayıcı MIDAS-komşu (ADMIDAS- adjacent to MIDAS) bölgesini içerir (Şekil 5B). Bu bölge Mg^{+2} ile bağımlı integrin molekülünde konformasyonel değişiklik olur ve aktif form oluşur. Ligandın bağlı olmadığı zamanlarda α ve β zincirlerin ekstraselüler baş kısımlarının her ikisi de aşağı doğru iken (inaktif form) ligand bağlandığında bu zincirlerin her ikisi de dik konumda (aktif) bulunur (23, 34).

İntegrinlerin fibronektin, laminin, vitronektin, kollajen gibi ECM proteinleri, büyüme faktörleri, sitokinler, ECM degradasyon proteazları gibi pek çok ligandı bulunduğundan sınıflandırılması oldukça zordur. İntegrinler ligand bağlayıcı özelliklerine veya taşıdıkları altbirimlerine göre sınıflandırılır. β 1, β 2 ve α v altbirimlerini taşıyan integrinler 3 büyük sınıfı oluşturur (34).

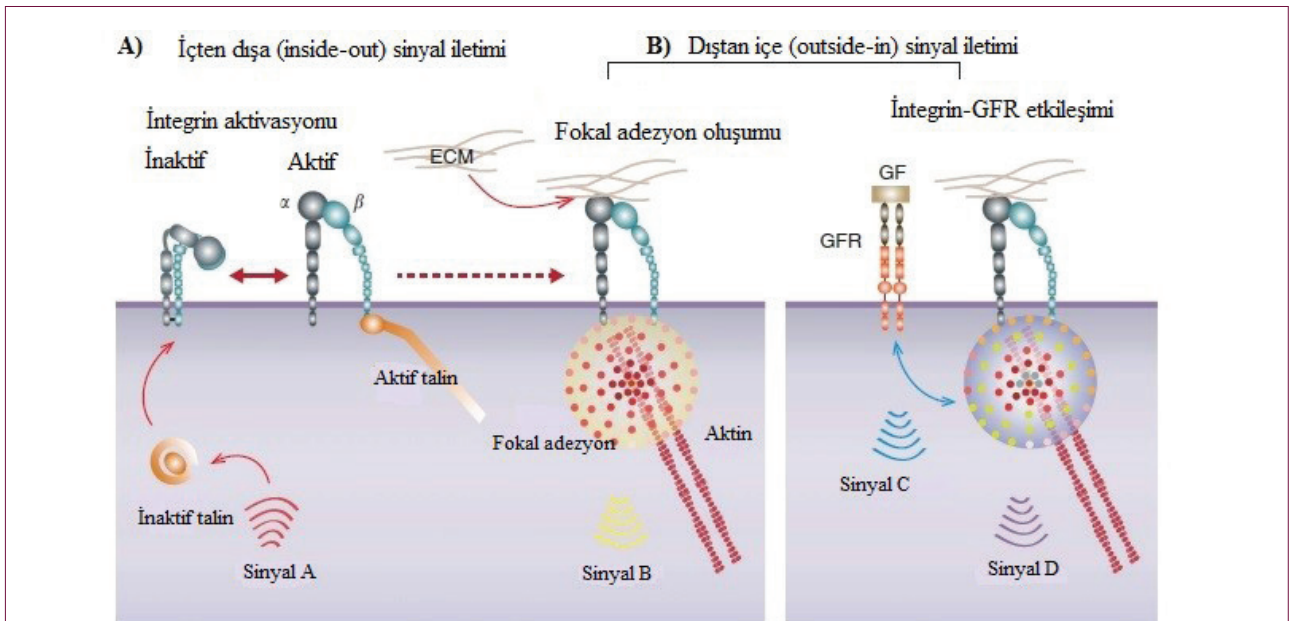
$\beta 1$ altbirimi integrinlerin 12 tanesinde bulunur ve kollajen, laminin, fibronektin, tenaskin C ve vitronektin gibi ECM ligandlarına bağlanır. Kıkırdak ve kemik oluşumu, iskelet kası gelişimi, epidermis oluşumu, serebral korteks gelişimi ve anjiogenez gibi pek çok süreçte görev alır. Meme epitelinde bazal membranda luminal kısma göre daha fazla bulunurlar ve meme dokusunun bütünlüğünün korunmasında önemlidirler. *In vitro* çalışmalar $\beta 1$ -integrinlerin meme gelişiminde hormonal kont-

rolde önemli olduklarını göstermiştir. Meme kanseri hücreleriyle yapılan *in vitro* çalışmalarda $\beta 1$ -integrinlerin tümör hücrelerinin proliferasyonu, sağkalımı ve invazifliği için önemli olduğu gösterilmiştir (35).

İntegrinler farklı ligandlar bağlayabildikleri gibi, aynı ligand farklı integrinler tarafından da paylaşılabilir. Bu durum integrinlerin hücreler arası iletişimdeki önemini ortaya koyar (24).



Şekil 5. A) İntegrin ailesi, B) İntegrin altbirimlerinin yerleşimi (34 no'lu kaynaktan uyarlanmıştır).



Şekil 6. İntegrinlerde hücre içinden dışına (inside-out) (A) ve hücre dışından içine (outside-in) (B) sinyal iletimi (36 no'lu kaynaktan uyarlanmıştır).

İntegrinler iki yönlü (hücre içinden dışına (inside-out) ve hücre dışından içine (outside-in) sinyal iletiminde rol alırlar. İntegrinlere hücre içi sinyaller intrasitoplazmik talin gibi adaptör proteinler aracılığıyla iletildiğinde integrin β altbiriminin intrasitoplazmik kuyrukları aktive olur ve integrin konformasyonel değişikliğe uğrar, ekstraselüler bölge aktive olur ve integrinin ECM ligandlarına afinitesi artar (inside-out sinyalizasyon) (Şekil 6A) (34, 36). İntegrin aktivasyonunda rol alan diğer hücre içi moleküller kindling, filamin, migfilin, FAK (fokal adezyon kinaz), ILK (integrin-bağlı kinaz, integrin linked kinase)'dir (34). Öte yandan integrin-ECM etkileşimi hücre içi adaptör ve sinyal proteinlerini integrinin sitoplazmik bölgesine getirerek fokal adezyonlar adı verilen makromoleküler komplekslerin oluşumunu uyarır bu da α -aktinin, vinkulin gibi sitoskelet elemanlarını aktive ederek diğer hücrel süreçleri başlatır (outside-in sinyalizasyon). Yine büyüme faktörü reseptörleri (GFR) ile integrin ekstraselüler bölgesi arasındaki etkileşim hücre içerisinde hücre migrasyonu, gen ekspresyonu gibi süreçleri başlatan farklı sinyaller oluşturur (Şekil 6B) (23, 36).

Lökositlerde çok çeşitli integrinler eksprese edilir; $\beta 1$ integrinler; $\alpha 4\beta 1$ (CD49d/CD29, VLA-4, ITGA4), $\beta 2$ integrinler; $\alpha L\beta 2$ (LFA-1, CD11a/CD18, ITGAL), $\alpha M\beta 2$ (Mac-1, CD11b/CD18), $\alpha X\beta 2$ (CD11c/CD18), $\alpha D\beta 2$ (CD11d/CD18). LFA-1 tüm lökositlerde eksprese edilirken Mac-1 myeloid lökosit, nötrofil, NK, B ve bazı T lenfositlerde eksprese edilir. $\alpha X\beta 2$ daha çok myeloid dendritik hücrelerde, $\alpha D\beta 2$ ise nötrofil, monosit ve NK hücrelerinde eksprese edilir (23). Lökositlerde eksprese edilen integrinler lökosit adezyonu ve transendotelial migrasyonunda (diapedez) rol oynarlar.

Pek çok tümör epitel hücresi kaynaklı olduğundan ve integrinler epitel hücrelerinde de eksprese olduğundan kanser metastazında önemli moleküllerdir. Pek çok çalışmada integrin ekspresyon seviyelerindeki değişim kanser ilerleyişi, hasta sağ kalım süresi ve metastaz ile ilişkilendirilmiştir. Tümör hücrelerinde $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ (CD51/ $\beta 5$), $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$ gibi integrinlerin eks-

presyonlarının melanoma, meme, prostat, pankreas ve akciğer kanserinde metastaz ile ilişkisi bildirilmiştir (24).

Diğer Adezyon Molekülleri

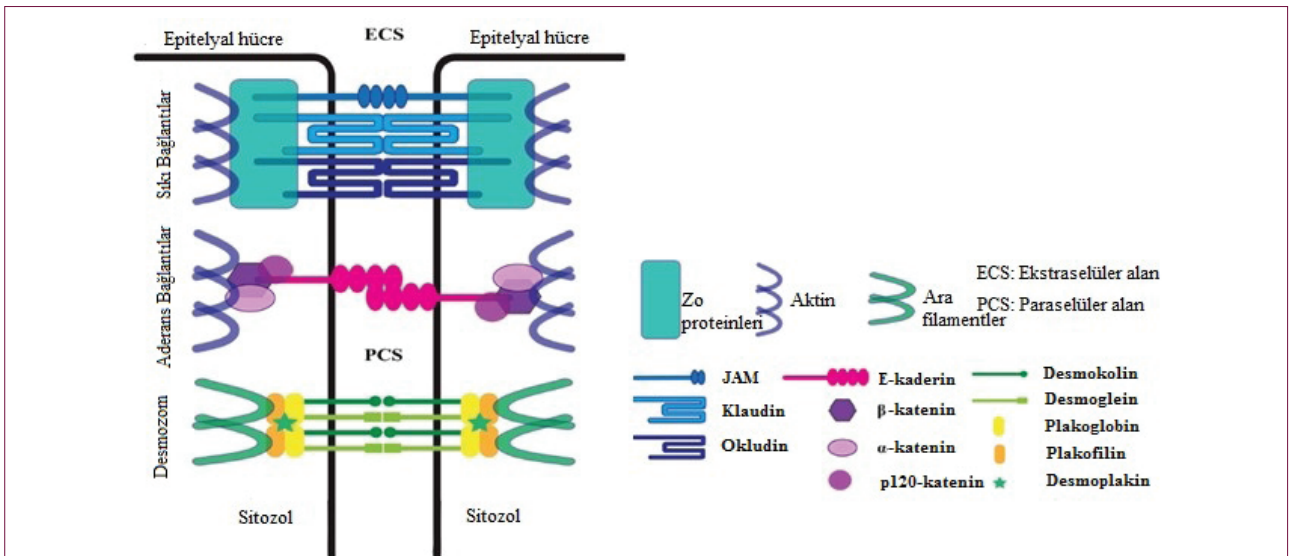
PSGL-1, MadCAM-1 ve PNAd gibi müsinler glikoprotein yapısındadır ve pek çok selektinin ligandı olarak görev yaparlar. Müsinler sindirim, solunum, ürogenital sistemde yer alan epitel hücrelerini koruyan mukusun yapısında bulunurlar. MUC-1 gibi müsinlerin kanser hücrelerinin büyüme ve sağkalımında önemli role sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca vasküler adezyon protein-1 (VAP-1) gibi enzimlerin de hücre adezyonunda görev aldığı belirtilmiştir (23).

HÜCRELER ARASI BAĞLANTILAR VE KANSER METASTAZINDAKİ ROLLERİ

Hücreler arası bağlantılar; desmozomlar, aderans bağlantılar (adherens junctions) ve sıkı bağlantılar (tight junctions) olarak gruplandırılır ve hücrelerin bir arada tutulması, hücreler arası sinyallerin iletilmesinde ve hücre adezyonunun sağlanmasında görev alırlar. Tümör hücrelerinin EMT sürecine direnç göstererek epitelial bütünlüğü korumaya çalışırlar. Onkogenik transformasyon ve kanser metastazında hücrel bağlantılar ile ilişkili genlerin ekspresyonlarında değişiklikler, hücre-hücre adezyonunda düzensizlik ve bozulmalar meydana gelir (4).

Desmozomlar

Desmozomlar sitoskelet ve plazma membranı arasındaki bağlantı proteinleridir (Şekil 7). Sitolazmik ve ekstraselüler bölgelerine bağlanan proteinler ile hücreler arası sitoskelet elemanlarının bağlanmasını sağlayarak mekanik bütünlük sağlarlar. Bu grupta kaderinler, armadillo protein ve plakinler yer alır. Desmokolin (DSC1-3) ve desmoglein (DSG1-4) transmembran boşlukta komşu hücrelerle hiper-adezif bağlantı sağlayan heterodimer kaderin proteinleridir. Bu proteinler mekanik strese karşı yoğun direnç göstermelerinin yanısıra hücre dışında ar-



Şekil 7. Hücreler arası bağlantılar ve ilgili proteinler (4 no'lu kaynaktan uyarlanmıştır).

madillo proteinler ile ilişki de içindedirler. Armadillo proteinler olan plakofilin (PKP1-4) ve plakogloblin (JUP) transmembran kaderinler ve desmoplakin proteinleri ile etkileşim sağlayan 41 aminoasitlik 'armadillo' tekrarları içerirler. Desmozomal genler EMT sürecinde yer alan Snail, Slug ve Twist gibi transkripsiyon faktörleri ile düzenlenir (4).

Desmoplakin Wnt sinyali yolağını ve β -katenin ekspresyonunu inhibe ederek tümör baskılayıcı protein olarak işlev görür. Tümör invazyonunda desmoplakin proteinindeki azalma sebebiyle desmozomal bütünlük bozulur. Plakofilin (PKP) armadillo proteinlerinin tümör progresyonu ve metastazı ile ilişkisi belirtilmiştir. Bu proteinlerden PKP3'ün downregülasyonunun *in vitro* epitel hücre migrasyonunda artışa ve nude farelerde deri ve akciğerde tümör oluşumuna yol açtığı bildirilmiştir (37).

Aderans Bağlantılar (Adherens Junctions)

Aderans bağlantılar lateral hücre-hücre adezyonunda rol oynarlar. Bu bağlantılarda da desmozomlarda olduğu üzere kaderin, armadillo protein ve plak proteinler yer alır. Bağlantı alanlarındaki esas protein E-kaderin proteindir. Desmoglein, desmoglein ve N-kaderin EMT sürecinde yer alan diğer aderans bağlantı proteinleridir. Armadillo proteinlerden α - and β -katenin (CTNNA1-3, CTNNB1) p120-katenin (CTTND1-2) ile birlikte E-kaderin ve sitoskelet elemanı aktin arasındaki etkileşimi kolaylaştırır (4). Prostat, over, oral ve renal kanserlerde α - ve β -kateninlerin azalmış ekspresyonlarının hasta sağkalımını ve klinik sonuçları kötü etkilediği bildirilmiştir (38).

Sıkı Bağlantılar (Tight Junctions)

Epitel hücre membranlarının apiko-bazal bölgesinde lokalizedirler (Şekil 7). Hücreleri bağlayıcı görevlerinin dışında hücresel permeabilitenin düzenlenmesi ve hücre polaritesinin sağlanmasında bariyer olarak görev yaparlar (4). Kan-beyin, kan-retina, kan-testis bariyerlerindeki esas bağlantılardır. Endotel ve epitel arasındaki apikal ve bazolateral sıvı kompartmanlarını birbirinden ayırırlar (39). Bağlantı kompleksi gap junction (neksus) ve sitoskelet elemanı aktin proteini ile etkileşimde olan hücre-hücre yapışma molekülü (JAM, junctional adhesion molecule) ve triselülin (tricellulin) ile ilişkili okludin ve kludin proteinlerinden oluşur. Sıkı bağlantı proteinleri kludin ve okludin proteinleri hücreler arası bağlantılardan iyonların geçişini kontrol ederek apikal-bazolateral permeabilitenin düzenlenmesinde görev alırlar (4). Tüm sıkı bağlantı proteinleri bağlantıda omurga görevi yapan periferik plak proteinleri ZO-1 ve -2 proteinleri ile etkileşimdedir (39).

Okludin ekspresyonunun metastatik meme kanserlerinde belirgin olarak düştüğü gösterilmiştir (40). Okludin proteininin susturulmasının kanser hücrelerinin metastatik özelliklerini uyardığı bildirilmiştir (41).

Kludin proteininin ekspresyon değişimleri pek çok çalışmada meme kanseri agresifliği ile ilişkilendirilmiştir (42, 43).

Hücre-Hücre Yapışma Molekülü (Junctional Adhesion Molecule, Jam)

Epitel ve endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantı proteinlerinden biri olan Jam protein ailesi, plateletlerde ve pek çok lökosit

hücrelerinde eksprese edilen, hücre polaritesi, hücre geçirgenliği, lökosit migrasyonu gibi çeşitli immün ve adeziv süreçlerde görev alan küçük proteinlerdir (33, 39). Bu aile Ig benzeri bölge içermesi nedeniyle Ig Süper ailesi adezyon moleküllerinden de sayılır ve Jam-A (-1), -B (-2), -C (-3) ve -L (-4) olarak sınıflandırılır. Epitel hücrelerinde Jam-A ve -C sıkı bağlantılarda yer alırken, Jam-B lateral membranda bulunur. Okludin ve kludinin aksine ekstraselüler bölgesi 2 adet Ig motif (N-terminal) ve sitoplazmik bir kuyruk (C-terminal) içeren tek bir transmembran bölgeye sahiptir (33). Jam-A, LFA-1'in ligandı olarak erken safha lökosit transmigresyonunda anahtar rol oynar (45). Literatürde Jam-A geni ekspresyonunun up- ya da downregülasyonları pek çok kanser ile ilişkilendirilmiştir (44, 46, 47). Jam-2 ekspresyonunun *in vitro* azaltılması kolorektal kanser hücrelerinde metastaz ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiş ve Jam-2'nin tümör baskılayıcı ve metastazı önleyici özelliği olabileceği önerilmiştir (48). Hücreler arası bağlantılarda homodimerler veya Jam-B ile heterodimerler yapan Jam-C'nin yönlendirilmiş mutagenез ile mutasyona uğratılmasının akciğer kanseri hücre hatlarında tümörün metastatik özelliğini azalttığı gösterilmiştir (49).

SONUÇ

Kanser hücrelerinde metastaz, pek çok biyokimyasal ve moleküler faktör tarafından yönlendirilen kompleks bir süreçtir ve kanser tedavilerinde yüksek oranda sınırlayıcı olup kanserden ölümlerin %90'ından sorumludur. Bu nedenle kanser metastazında altta yatan mekanizmaların aydınlatılması kanser metastazının önlenmesine yönelik tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi açısından önemlidir. Bu derlemede metastaz basamakları ile hücre adezyon molekülleri ve hücreler arası bağlantı proteinlerinin metastatik süreçlerdeki önemi özetlenmeye çalışılmıştır. Bu proteinlerin kanser metastazına karşı tedavilerin geliştirilmesinde ve hastanın yaşam süresinin arttırılmasında potansiyel hedefler olarak kullanılabilmesi vurgulanmaya çalışılmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

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

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

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

Peer-review: Externally peer-reviewed.

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

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

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

KAYNAKLAR

1. Reymond N, d'Águal BB, Ridley AJ. Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nature Reviews Cancer* 2013; 13(12): 858-70. [\[CrossRef\]](#)
2. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* 2011; 147: 275-92. [\[CrossRef\]](#)
3. Pacmayr E, Treese C, Stein U. Underlying Mechanisms for Distant Metastasis - Molecular Biology. *Visc Med.* 2017; 33: 11-20. [\[CrossRef\]](#)
4. Knights AJ, Funnell APW, Crossley M, Pearson CMR. Holding Tight: Cell Junctions and Cancer Spread. *Trends Cancer Res.* 2012; 8: 61-9.
5. Sökeland G, Schumacher U. The functional role of integrins during intra- and extravasation within the metastatic cascade. *Molecular Cancer* 2019; 18:12. [\[CrossRef\]](#)
6. Gheldof A, Bex G. Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2013; 116: 317-36. [\[CrossRef\]](#)
7. Farahani E, Patra HK, Jangamreddy JR, Rashedi I, Kawalec M, Rao Pariti RK, et al. Cell adhesion molecules and their relation to (cancer) cell stemness. *Carcinogenesis* 2014; 35(4): 747-59. [\[CrossRef\]](#)
8. Anderberg C, Cunha SI, Zhai Z, Cortez E, Pardali E, Johnson JR, et al. Deficiency for endoglin in tumor vasculature weakens the endothelial barrier to metastatic dissemination. *J. Exp. Med.* 2013; 210: 563-79. [\[CrossRef\]](#)
9. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646-74. [\[CrossRef\]](#)
10. Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, Dornhöfer N, Kong C, Le QT, et al. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* 2006; 440: 1222-6. [\[CrossRef\]](#)
11. Kozłowski J, Kozłowska A, Kocki J. Breast cancer metastasis - insight into selected molecular mechanisms of the phenomenon. *Postepy Hig Med Dosw* 2015; 69: 447-51. [\[CrossRef\]](#)
12. Paoli P, Giannoni E, Chiarugi P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1833(12): 3481-98. [\[CrossRef\]](#)
13. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 239-52. [\[CrossRef\]](#)
14. Yan M, Jurasz P. The role of platelets in the tumor microenvironment: from solid tumors to leukemia. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1863: 392-400. [\[CrossRef\]](#)
15. Weil RJ, Palmieri DC, Bronder JL, Stark AM, Steeg PS. Breast cancer metastasis to the central nervous system. *Am. J. Pathol.* 2005; 167: 913-20. [\[CrossRef\]](#)
16. Sarvaiya PJ, Guo D, Ulasov I, Gabikian P, Lesniak MS. Chemokines in tumor progression and metastasis. *Oncotarget* 2013; 4: 2171-85. [\[CrossRef\]](#)
17. DeNardo DG, Barreto JB, Andreu P, Vasquez L, Tawfik D, Kolhatkar N, et al. CD4+ cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell* 2009; 16: 91-102. [\[CrossRef\]](#)
18. Gocheva V, Wang HW, Gadea BB, Shree T, Hunter KE, Garfall AL, et al. IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes Dev.* 2010; 24: 241-55. [\[CrossRef\]](#)
19. Strell C, Entschladen F. Extravasation of leukocytes in comparison to tumor cells. *Cell Communication and Signaling* 2008; 6: 10. [\[CrossRef\]](#)
20. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005; 438: 820-7. [\[CrossRef\]](#)
21. Psaila B, Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 285-93. [\[CrossRef\]](#)
22. Makrilia N, Kollias A, Manolopoulos L, Sygios K. Cell adhesion molecules: role and clinical significance in cancer. *Cancer Invest.* 2009; 27: 1023-37. [\[CrossRef\]](#)
23. Harjunpää H, Lloret Asens M, Guenther C, Fagerholm SC. Cell Adhesion Molecules and Their Roles and Regulation in the Immune and Tumor Microenvironment. *Front. Immunol.* 2019; 10:1078. [\[CrossRef\]](#)
24. Bendas G, Borsig L. Cancer cell adhesion and metastasis: selectins, integrins and, the inhibitory potential of heparins. *Int J Cell Biol.* 2012; 2012: 676731. [\[CrossRef\]](#)
25. Ludwig RJ, Boehme B, Podda M, Henscheler R, Jager E, Tandi C, et al. Endothelial P selectin as a target of heparin action in experimental melanoma lung metastasis. *Cancer Research* 2004; 64(8): 2743-50. [\[CrossRef\]](#)
26. Laubli H, Borsig L. Selectins as mediators of lung metastasis. *Cancer Microenvironment* 2010; 3(1): 97-105. [\[CrossRef\]](#)
27. Van Roy F, Bex G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell. Mol. Life Sci.* 2008; 65: 3756-88. [\[CrossRef\]](#)
28. Cao ZQ, Wang Z, Leng P. Aberrant N-cadherin expression in cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2019; 118: 109320. [\[CrossRef\]](#)
29. Vestweber D. VE-cadherin: The major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2008; 28(2): 223-32. [\[CrossRef\]](#)
30. Qureshi HS, Linden MD, Divine G. E-cadherin status in breast cancer correlates with histologic type but does not correlate with established prognostic parameters. *Am J Clin Pathol* 2006; 125: 377-85. [\[CrossRef\]](#)
31. Elmoneim HM, Zaghoul NM. Expression of E-cadherin, N-cadherin and snail and their correlation with clinicopathological variant: an immunohistochemical study of 132 invasive ductal breast carcinomas in Egypt. *Clinics (Sao Paulo)* 2011; 66(10): 1765-71.
32. Paredes J, Correia AL, Ribeiro AS, Milanezi F, Cameselle-Teijeiro J, Schmitt FC. Breast carcinomas that co-express E- and P- cadherin are associated with p120-catenin cytoplasmic localisation and poor patient survival. *Journal Clin Pathol.* 2008; 61: 856-62. [\[CrossRef\]](#)
33. Shin K, Fogg VC, Margolis B. Tight junctions and cell polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006; 22: 207-235. [\[CrossRef\]](#)
34. Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. Integrins. *Cell Tissue Res.* 2010; 339: 269-80. [\[CrossRef\]](#)
35. Lahlou H, Muller WJ. β 1-integrins signaling and mammary tumor progression in transgenic mouse models: implications for human breast cancer. *Breast Cancer Research* 2011; 13: 229. [\[CrossRef\]](#)
36. Hamidi H, Pietila M, Ivaska J. The complexity of integrins in cancer and new scopes for therapeutic targeting. *British Journal of Cancer* 2016; 115: 1017-23. [\[CrossRef\]](#)
37. Khapare N, Kundu ST, Sehgal L, Sawant M., Priya R, Gosavi P, et al. Plakophilin3 leads to an increase in PRL3 levels promoting K8 dephosphorylation, which is required for transformation and metastasis. *PLoS One* 2012; 7:e38561. [\[CrossRef\]](#)
38. Aaltomaa S, Karja V, Lipponen P, Isotalo T, Kankkunen JP, Talja M, et al. Reduced α - and β -catenin expression predicts shortened survival in local prostate cancer. *Anticancer Research* 2005; 25: 4707-4712.
39. Salvador E, Burek M, Förster CY. Tight Junctions and the Tumor Microenvironment. *Curr Pathobiol Rep.* 2016; 4: 135-45. [\[CrossRef\]](#)

40. Martin TA, Mansel RE, Jiang WG. Loss of occludin leads to the progression of human breast cancer. *Int. J. Mol. Med.* 2010; 26 (5): 723-34. [\[CrossRef\]](#)
41. Osanai M, Murata M, Nishikiori N, Chiba H, Kojima T, Sawada N. Epigenetic silencing of occludin promotes tumorigenic and metastatic properties of cancer cells via modulations of unique sets of apoptosis-associated genes. *Cancer Research* 2006; 66(18): 9125-33. [\[CrossRef\]](#)
42. Lanigan F, McKiernan E, Brennan DJ, Hegarty S, Millikan RC, McBryan J, et al. Increased claudin-4 expression is associated with poor prognosis and high tumor grade in breast cancer. *Int. J. Cancer* 2009; 124(9): 2088-97. [\[CrossRef\]](#)
43. Morohashi S, Kusumi T, Sato F, Odagiri H, Chiba H, Yoshihara S, et al. Decreased expression of claudin-1 correlates with recurrence status in breast cancer. *Int. J. Mol. Med.* 2007; 20(2): 139-43. [\[CrossRef\]](#)
44. McSherry EA, McGee SF, Jirstrom K, Doyle EM., Brennan DJ., Landberg G, et al. JAM-A expression positively correlates with poor prognosis in breast cancer patients. *Int J Cancer* 2009; 125(6): 1343-51. [\[CrossRef\]](#)
45. Naik UP, Eckfeld K. Junctional adhesion molecule 1 (JAM-1). *J Biol Regul Homeost Agents* 2003; 17(4): 341- 7.
46. Tian Y, Tian Y, Zhang W, Wei F, Yang J, Luo X, et al. Junctional adhesion molecule-A, an epithelial-mesenchymal transition inducer, correlates with metastasis and poor prognosis in human nasopharyngeal cancer. *Carcinogenesis* 2015; 36: 41-8. [\[CrossRef\]](#)
47. Ikeo K, Oshima T, Shan J, Matsui H, Tomita T, Fukui H. et al. Junctional adhesion molecule-A promotes proliferation and inhibits apoptosis of gastric cancer. *Hepato-Gastroenterol.* 2015; 62(138): 540-5.
48. Zhao H, Yu H, Martin TA, Zhang Y, Chen G, Jiang WG. Effect of junctional adhesion molecule-2 expression on cell growth, invasion and migration in human colorectal cancer. *International Journal of Oncology* 2016; 48: 929-6. [\[CrossRef\]](#)
49. Garrido-Urbani S, Vonlaufen A, Stalin J, De Grandis M, Ropraz P, Jemelin S, et al. Junctional adhesion molecule C (JAM-C) dimerization aids cancer cell migration and metastasis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2018; 1865(4): 638-49. [\[CrossRef\]](#)
50. Lee HM, Hwang KA, Choi KC. Diverse pathways of epithelial mesenchymal transition related with cancer progression and metastasis and potential effects on endocrine disrupting chemicals on epithelial mesenchymal transition process. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2017; 457: 103-13. [\[CrossRef\]](#)

Madde İlişkili Psikotik Bozuklukların Tedavisinde Kullanılan Atipik Antipsikotikler

Atypical Antipsychotics in the Treatment of Substance-related Psychotic Disorders

Melis Karaođlan¹ , Göksu Kaşarcı² , Elif Şahin³ , Elif Sinem İplik⁴ 

¹ İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, İstanbul, Türkiye

² İstanbul Üniversitesi, Aziz Sançar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

³ İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

⁴ İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ORCID ID: M.K. 0000-0003-4164-5991; G.K. 0000-0001-9766-4361; E.Ş. 0000-0002-0027-6723; E.S.İ. 0000-0003-3465-1808

Cite this article as: Karaoğlan M, Kaşarcı G, Şahin E, İplik ES. Atypical Antipsychotics in the Treatment of Substance Induced Psychotic Disorders. Experimed 2020; 10(1): 49-58.

ÖZ

Son yıllarda madde ile ilişkili bozukluklar, madde bağımlılığının gittikçe yaygınlaşması ve madde kullanımının daha ileri dönemlerde kişinin sinir sistemi üzerinde yarattığı etkileri dolayısıyla önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Maddenin yol açtığı bozukluklar temel olarak 2 gruba ayrılmaktadır; madde kullanım bozuklukları ve maddenin yol açtığı bozukluklar. Maddenin yol açtığı bozukluklar; maddenin intoksikasyonu, madde yoksunluğu ve maddenin yol açtığı psikotik bozukluklar gibi diğer madde ilişkili bozukluklardır. Madde ilişkili psikotik bozuklukların ileriki dönemlerde şizofreni veya bipolar bozukluk gibi kronik psikotik bozukluklara dönüşme olasılığı, bozukluğun tanısı ve tedavisinin oldukça önemli olduğunu gözler önüne sermektedir. İlgili vakalarda birincil psikotik bozukluk ve maddenin yol açtığı psikotik bozukluk ayrımlarının yapılması, doğru tanı ve etkin tedavi uygulamaları açısından önem arz etmektedir. Maddenin yol açtığı psikotik bozuklukların güncel tedavi seçenekleri arasında tipik (klasik) ve atipik antipsikotiklerin kullanımı yer almaktadır. Günümüzde, psikotik belirtiler üzerindeki olumlu etkilerinin yanı sıra; madde kullanma arzusu ve madde arayışını azaltmaları ve klasik antipsikotiklere oranla daha az ekstrapiramidal sistem yan etkilerine sahip olmaları sebebiyle atipik antipsikotikler ilk tercih edilen ilaç grubudur.

Bu derleme kapsamında madde ilişkili gelişen psikotik bozuklukların patogenezi ve farmakoterapide kullanılan atipik antipsikotiklerin güncel bilgiler ışığında tartışılması amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Atipik antipsikotikler, madde ilişkili bozukluklar, psikotik bozukluk

ABSTRACT

In recent years, substance-related disorders have become an important public health problem due to the effects of substance use on the nervous system later in life periods. Substance-related disorders are basically divided into two categories; substance use disorders and substance-induced disorders. Substance-related disorders consist of substance intoxication, substance withdrawal and other substance-induced disorders such as substance-induced psychotic disorders. The possibility of conversion of substance use disorders to chronic psychotic disorders such as schizophrenia, bipolar disease reveals the importance of its diagnosis and treatment. In related cases, it is important to make distinction between the primer psychotic disorder and substance related disorder for correct diagnosis and effective treatment. Current treatment options for psychotic disorders caused by the substance include the use of typical (classic) and atypical antipsychotics. Nowadays, atypical antipsychotics are the primary drug of choice in the treatment of substance-induced psychotic disorders, not only because of their positive impacts on psychotic symptoms but also because of their reducing effect on substance craving and seeking and fewer extrapyramidal side effects compared to typical antipsychotics.

This review aims to explain the pathogenesis of substance-related psychotic disorders and to discuss the atypical antipsychotics used in the treatment within the framework of current literature.

Keywords: Atypical antipsychotics, substance-related disorder, psychotic disorder

Bu çalışmanın bir kısmı 5-7 Eylül 2019 tarihinde VII. Uluslararası Moleküler Tıp Kongresi'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Elif Sinem İplik **E-posta:** sinem.iplik@yeniuyuzyil.edu.tr

Geliş Tarihi/Received Date: 06.03.2020 **Revizyon Tarihi/Revision Date:** 19.03.2020 **Kabul Tarihi/Accepted Date:** 26.03.2020



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

GİRİŞ

Psikoz, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Amerikan Psikiyatri Birliği tarafından "içgörüsüz halüsinasyonlar veya sanrıların varlığı" olarak tanımlanmaktadır. Bu ortak tanımda yer alan "içgörü" ifadesi Aubrey Lewis tarafından "kişinin kendinde ortaya çıkan morbid değişiklikleri doğru biçimde algılayabilmesi" şeklinde açıklanmıştır (1). Psikiyatrik değerlendirmeler için önemli bir kavram olan içgörü özellikle şizofreni hastalarında hastalık belirtilerinin tanımlanması ve tedavi seyrinin takibi açısından oldukça değerlidir. WHO tarafından 1973 yılında yapılan şizofreni ile ilgili çalışmada psikotik bozukluk yaşayan bireylerin %97'sinde içgörünün bulunmadığı belirlenmiştir (2).

Psikotik bozukluk vakalarında madde kullanım bozukluğuna sıkça rastlanmaktadır. Çeşitli çalışmalarda şizofreni veya bipolar bozukluk gibi ciddi psikotik bozukluğu bulunan bireyler arasında madde kullanım bozukluklarının daha yaygın olduğu ortaya koyulmuştur (3-5). Toplum genelinde madde kullanım bozukluğu %15 oranla yaygınlık göstermekteyken; psikotik bozukluk vakalarının %50'sinde yaşamlarının bir periyodunda madde kullanım bozukluğu görülmektedir (3).

Madde ile ilişkili bozukluklar ve psikiyatrik bozuklukların bir arada seyretmesi durumu; tanı ve tedaviyi zorlaştıran, hastanede yatış süresini uzatan, semptomların hafiflemesini geciktiren ve intihar girişimi riskini arttıran ciddi bir sağlık problemidir (6). Tedavinin başarısız sonuçlandığı vakaların büyük çoğunluğunda, bu durum her iki bozukluğun tedavisinin hastaya uygulanmamasıyla ilişkilendirilmiştir. Bu bağlamda ele alındığında, madde aracılı gelişen psikotik bozuklukların başarılı bir şekilde tedavi edilebilmesi için hem madde ile ilişkili bozukluğun hem de ruhsal bozukluğun tedavi edilmesi gerekmekte olup her problemin ayrı ayrı ele alındığı geleneksel yöntemler yerine bütüncül tedavi programları tercih edilmelidir. Bu bütüncül tedavi programı, farmakolojik tedavinin yanı sıra, içerisinde motivasyonel görüşme, kısa girişimler, bilişsel davranışçı terapi, edimsel yöntem ve kendine yardım gruplarının yer aldığı psikososyal yaklaşımlardan oluşmaktadır.

Günümüzde şizofreninin farmakolojik tedavisinde tipik antipsikotiklerin yerini alarak kullanılmakta olan atipik antipsikotikler, maddenin yol açtığı psikotik bozuklukların farmakolojik tedavisinde de tercih edilen bir ilaç grubudur. Atipik antipsikotik ilaçların, madde bağımlılığının gelişiminde rol oynadığı düşünülen ortak nöronal devre üzerinde etki göstermelerinin anlaşılması üzerine, bu ilaç grubunun madde bağımlılığı tedavisindeki etkisi araştırılmıştır. Psikoaktif maddelerin yol açtığı psikotik bozukluğun tedavisinde atipik antipsikotiklerin tercih edilmelerinin sebepleri; ortak nöronal devreye etkileri, dopamin D₂ reseptörü üzerine seçici etki göstermeleri, bilişsel fonksiyonlar üzerindeki olumlu etkileri, serotonin ve noradrenalin reseptörleri üzerindeki etkilerinin sonucu olarak duyu durum üzerindeki olumlu etkileri ve serotonin 5-HT₃ reseptörüne gösterdikleri afiniteyle ilişkilendirilen madde kullanma arzusunu azaltmalarıdır (7).

Bu derleme kapsamında; madde kullanımına bağlı olarak gelişen psikotik bozuklukların tedavisinde kullanılan atipik antipsi-

kotik ilaçlar, bu ilaçların kullanım hedefleri ve etkilerinin güncel bilgiler ışığında tartışılması amaçlanmıştır.

MADDE KAVRAMI VE TÜRLERİ

Bağımlılık yapan maddeler, merkezi sinir sistemini önemli derecede etkileyerek kişinin algılayma, duyu durum, mental durum, davranış ve motor fonksiyonlarında bozukluk yapan psikoaktif maddeler olarak tanımlanmaktadır. "Psikoaktif madde" terimi yalnızca primer olarak beyni etkileyen maddeleri kapsadığı için; bağımlılığa veya kötüye kullanıma yol açabilecek ve beyni etkileme özelliğine sahip diğer maddeleri de kapsayabilecek bir terim olan "madde" günümüzde kabul görmektedir (8).

Özgül Madde Türleri

Amerikan Psikiyatri Birliği tarafından Mental Bozuklukların Tanısal ve İstatistiksel El Kitabı'nın beşinci baskısı (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders Fifth Edition, DSM-V) kapsamında; uzun süreli kullanımları veya suistimal edilmeleri durumunda bireyde fizyolojik veya psikolojik olarak çeşitli bozukluklara yol açabilen maddeler on farklı sınıfta değerlendirilmiştir (Tablo 1) (8). Uyarıcı nitelikte farklı sınıflarda gruplandırılan bu maddeler, aşırı miktarda alınmaları durumunda beynin ödül sistemini direkt olarak aktive etmeleri açısından ortak özelliklere sahip olup ödül yollarını normal yollarla uyarıma göre daha hızlı ve etkin bir şekilde uyarmaktadırlar (9).

Tablo 1. DSM-V'e göre Özgül Madde Türleri (8)

Alkol
Kafein
Kannabis
Halüsinojen
İnhalanlar
Opiyat
Sedatifler
Stimulanlar
Tütün
Diğer

Amfetamin, kannabis, alkol ve diğer uyarıcı maddeler uzun süredir psikotojenik bileşenler olarak kabul edilmekle birlikte yapılan çeşitli çalışmalarda bu maddelerin kontrolsüz alımlarının kişide psikoz gelişiminde rol oynadığı ortaya koyulmuştur (10).

Alkol

Eski kültürlerden itibaren alkol, opiyat ile birlikte insan tarafından kullanılan ilk psikoaktif maddelerden biri olup günümüzde de birçok toplumda dini veya kültürel amaçlarla yaygın olarak kullanılmaktadır. Fizyolojik olarak metabolize edilmesi sırasında organizma üzerinde olumlu veya olumsuz çeşitli etkileri bulunmaktadır (11).

Kullanım açısından en sık suistimal edilen psikoaktif maddelerden biri olan alkol; yoksunluk belirtileriyle birlikte intoksikasyon, deliryum tremens, Wernicke ensefalopatisi ve alkol halüsinozunun sebep olduğu ciddi psikoaktif bozukluklar gibi çeşitli klinik tablolara neden olabilmektedir. Bununla birlikte yapılan epidemiyolojik çalışmalara gore; çeşitli psikiyatrik bozukluklara sahip hastalardan; Bipolar Tip I hastalarının %46'sı, Bipolar Tip II hastalarının %39'u, şizofreni hastalarının %34'ü, kişilik bozukluğına sahip hastaların %29'u ve major depresif bozukluğa sahip hastaların ise %7'si bu bozukluklarla eş zamanlı olarak alkol kullanımı bozukluğu tanısı da almıştır (11).

Kafein

Dünya üzerinde en yaygın kullanılan psikoaktif maddelerden biri olan kafein, çay ve kahvenin dışında, çikolata, kakao ve enerji içecekleri gibi pek çok farklı maddenin içerisinde de yer almaktadır. Tüm dünya genelinde kahve ve kafein içeren diğer yiyecek ve içecekler günlük diyetin önemli bir parçasını oluşturmaktadır (12). Diyetle alımını takiben hızla emilen ve dolaşıma katılan kafeinin merkezi sinir sistemi üzerindeki etkinliğinin benzodiazepin reseptörleri aracılığı ile serotonin ve nor-adrenalin salımının artırılması şeklinde olduğu düşünölmektedir (14). Ayrıca kafein adenosin A₁ ve A_{2A} reseptörlerinin yarışmalı antagonisti olarak da işlev göstermekte ve mezolimbik dopamin yolağında dopamin aktivitesini etkileyebilmektedir. Bu şekilde modüle edilen dopaminerjik sinyal iletiminin, kafeinin çeşitli psikoaktif belirtilerin de dahil olduğu davranış, algı ve düşünce süreçleri üzerindeki etkilerinin temelini oluşturduğu düşünölmektedir (12).

Yapılan farklı araştırmalar doğrultusunda kafein tüketimi ile psikoaktif bozukluk semptomlarının gelişimi arasındaki ilişki uzun zamandır bilinmektedir. Hedges ve ark. tarafından kafein kullanımının sağlıklı insanlarda psikoz gelişimini indükleyebildiği gösterilmiştir (13). Bununla paralel olarak bir başka çalışmada psikoaktif bozukluğu olan bireylerde kafein kullanımı ile birlikte psikoaktif semptomların giderek kötüleştiği kaydedilmiştir (14).

Kannabis

Kannabis (esrar) hint kenevirinden (*Cannabis sativa*) elde edilen bir madde olup 421 çeşit kimyasal içermektedir (15). İntoksikasyondan ve davranışsal değişikliklerden sorumlu psikoaktif etken maddesi tetrahidrokannabinolün (THC) delta-9 izomeridir. Esrar, alkol ve tütünlle birlikte tüm dünyada sıklıkla kullanılan keyif verici maddelerin başında gelmekte ve kullanım sıklığı giderek artmaktadır.

16 yaşından önce kannabis kullanımı; kişilik bozuklukları, anksiyete bozukluğu ve depresyonun da içerisinde yer aldığı mental bozukluklara ve madde kullanım bozukluklarına yatkınlık riskini arttırmaktadır (48). Kannabis kullanmış tüm bireylerin yaklaşık %9'unda, kullanıma ergenlikte başlayanlarda ise 6 kişiden 1'inde kannabis kullanım bozukluğu gelişmektedir (16). Her gün kannabis kullandığını belirten kişilerin 1/4'ünden 1/2'sine kadar oranda kannabis kullanım bozukluğu geliştiği bildirilmiştir (17). Birleşmiş Milletler Uyuşturucu ve Suç Ofisi (UNODC)'nin 2018 yılı raporuna göre kannabisin kısa süreli etkileri arasında paranoya, psikoz ve motor koordinasyonda bozukluk bulunurken, uzun süreli veya ağır kullanımının etkileri arasında şizofreni de dahil

olmak üzere artmış kronik psikoaktif bozukluk riski, kronik bronşit semptomları ve okul başarisında azalma yer almaktadır (16).

Halüsinojenler

Halüsinojenler; kişinin çevresi veya kendi düşünce ve duyguları hakkındaki farkındalığını değiştirebilen bir çeşit kimyasal gruptur. Çok eski kültürlerde dini veya mistik amaçlı olarak kullanılan halüsinojenler çeşitli mantar veya bitkilerden doğal olarak elde edilebildiği gibi sentetik olarak da üretilebilmektedir. Sentetik olarak üretilen ilk halüsinojen liserjik asit dietilamid (LSD)'dir. LSD, Albert Hofmann tarafından 1938 yılında üretilmesine rağmen psikoaktif etkileri ancak 5 yıl sonrasında anlaşılmıştır (18). Halüsinojenler oldukça büyük heterojen bir grup olmakla birlikte kimyasal benzerliklerine göre farklı alt sınıflara ayrılmışlardır (19). Organizmada, metabolize edilmelerini takiben, serotonin agonistleri şeklinde hareket ederek en nihayetinde kişide değişen gerçeklik algıları üretirler (19).

İnhalanlar

İnhalanlar, kişinin yalnızca soluma yoluyla alabildiği maddeleri kapsayan ve kişide psikoaktif etki gösteren uçucu maddelerdir. Bunlar arasında toluen, n-hekzan, trikloretilen, diklorometan, benzin ve bütan gibi yaygın kullanılan uçucu hidrokarbonlar yer almaktadır. Bu kimyasal maddeler ticari olarak; solventler, aerosol spreyler, tiner gibi incelticiler ve sıvı yakıtlar içerisinde olmak üzere 4 farklı formda satılır.

Çoğu inhalan madde, merkezi sinir sistemini yavaşlatma yoluyla etki gösterir. Sağlık üzerindeki kısa süreli etkileri konuşma bozukluğu, koordinasyon eksikliği, baş dönmesi ve halüsinasyonlar şeklinde gözlenirken uzun süreli kullanım durumlarında karaciğer ve böbrek hasarı, gecikmiş davranış gelişimi ve beyin hasarı gözlenebilmektedir. Çok yaygın olmamakla birlikte inhalanların tekrar tekrar kullanımları madde kullanım bozukluğuna ve buna bağlı olarak daha ileri dnemelerde çeşitli psikoaktif bozukluklara yol açabilmektedir (20).

Opiyat

Opiyat (afyon), haşhaştan elde edilen doğal alkaloidler ve bunların yarı sentetik bileşiklerini ifade etmekte olup opioidlerin bir alt kümesidir. Doğal opiyatlar arasında morfin ve kodein gibi yüksek etkili ağrı kesiciler yer alırken, yarı sentetik opiyatlar arasında hidrokodon, oksikodon ve eroin yer almaktadır. Dünya genelinde klinik kullanımda olan kimyasal olarak birbirinden farklı 20 çeşit opioid bulunmaktadır. Endüstriyel olarak gelişmiş ülkelerde kötüye kullanıma ve bağımlılığa en sık eşlik eden opioid madde eroindir. Eroinin dışında, güçlü analjezik etkileri dolayısıyla son 20 yılda kronik ağrı tedavisinde doktorlar tarafından da giderek daha fazla tercih edilmektedir (21).

Çeşitli alışmalar opioidlerin pediatrik olarak tıbbi olmayan amaçlarla da kullanıldığına dikkat çekmekte ve bu durumun ilerleyen dnemelerde madde kullanımına bağlı gelişen bozukluklar açısından risk taşıdığını vurgulamaktadır (22).

Madde ile İlişkili Bozukluklar, Epidemiyoloji ve Etiyolojisi

Madde ile ilişkili bozukluklar tüm dünya çapında yarattığı sorunlar nedeniyle önemli bir halk sağlığı sorunu olarak kabul

edilmektedir. Dünya nüfusunun yaklaşık %5,6'sına karşılık gelen, 15-64 yaş aralığındaki 275 milyon kişinin 2016 yılında en az bir kez madde kullandığı ve ayrıca 31 milyon madde kullanıcısında tedavi edilmesi gereken madde kullanım bozukluklarının geliştiği belirlenmiştir (23). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2015 yılında yaklaşık 450,000 kişinin madde kullanımı sonucu hayatını kaybettiğini ortaya koymuştur. Bu ölümlerin 167,750'sinin doğrudan madde kullanım bozukluklarından (çoğunlukla aşırı doz), geriye kalan ölümlerin ise dolaylı olarak madde kullanım bozuklukları ve bunun yanı sıra sağlıksız enjeksiyon uygulamaları sebebiyle bulaşan İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü (HIV), Hepatit C gibi viral etkenlerden kaynaklandığı bildirilmiştir (23).

Birleşmiş Milletler Uyuşturucu ve Suç Ofisi (United Nations Office on Drugs and Crime, UNODC) tarafından yayınlanan 2018 raporunda; 2016 yılı içerisinde 192 milyon kannabis, 34 milyon opiyat, 21 milyon ekstazi, 34 milyon amfetamin ve reçeteli uyarıcı ve 18 milyon kokain kullanıcısı olduğu vurgulanmaktadır. Ayrıca, 130 ülkeden elde edilen veriler ışığında 2016 yılında çoğu öğrenci olan ve genel nüfusun yaklaşık %5'ine karşılık gelen 15-16 yaş aralığındaki 13,8 milyon gencin son 12 ayda en az bir kez kannabis kullandığı belirlenmiş olup birçok ülkede kannabisin hem genç popülasyon hem de genel popülasyon tarafından en yaygın kullanılan madde türü olduğu ortaya koyulmuştur (23).

Aşırı dozda madde kullanımı dolayısıyla gerçekleşen ölümler, 2016 yılında Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde bir önceki yıla kıyasla %21'lik bir artış göstermiş olup 63,632 kişinin bu sebeple hayatını kaybettiği rapor edilmiştir. 2016 yılında fentanil ve analoglarının aşırı dozda kullanımına bağlı ölümlerin Kanada'da ciddi sayılara ulaştığına dair veriler mevcuttur. Aşırı doz madde kullanımı ile ilişkili ölümlerdeki bu artışın nedeni olarak özellikle fentanil ve analoglarının illegal olarak 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA veya ekstazi), eroin, kokain veya sentetik opioidlerin içerisinde ekleniyor olması öne sürülmüştür (23). Bu durum madde kullanıcılarının, çoğu zaman kendilerini aşırı doz sonucu ölüme sürükleyen bu maddelerin içeriğinden habersiz bir şekilde hayatlarını kaybettiklerini ortaya koymaktadır.

Madde kötüye kullanımının ya da yatkınlığının cinsiyetler arasındaki farklılığına dair de pek çok çalışma yapılmış olup önceleri kadınlara oranla erkeklerde daha fazla gözlenen bu suistimal durumunun kadınlarda da giderek arttığı rapor edilmiştir (17). 1980'lerin başlarında yapılan bir çalışmada alkol kullanım bozukluğunun erkek/kadın oranı 5:1 olarak bildirilmişken daha güncel çalışmalar bu oranı 3:1 olarak kaydetmiştir (24). Buna ek olarak kadınlar erkeklere oranla daha az miktarda ve daha kısa periyotta madde kullansalar dahi, madde bağımlılığı tedavisine başladıkları zaman erkeklere kıyasla davranışsal, psikolojik ve sosyal problemlerin daha şiddetli olduğu klinik tablolar ile karşılaşılmaktadır (17).

Amerikan Psikiyatri Derneği tarafından DSM-V kapsamında değerlendirilen ve genişletilerek son halini alan madde ile ilişkili bozukluklar; madde kullanım bozuklukları ve madde kullanımının yol açtığı bozukluklar olmak üzere 2 grupta incelenmek-

tedir (8). Madde kullanım bozukluğunun temel özelliği, bireyin madde ile ilişkili problemler yaşamasına rağmen madde kullanımına devam ettiğini gösteren bir dizi bilişsel, davranışsal ve fizyolojik semptomların gözlenmesidir (25). Maddenin yol açtığı bozukluklar ise, kişide madde kullanım öyküsü öncesinde psikotik bozukluk belirtilerinin gelişmemesi ve psikotik bozuklukların madde kullanımı sonucunda gelişmesi durumu olarak değerlendirilmektedir. Madde kullanımının yol açtığı bozukluklar; madde intoksikasyonu, madde yoksunluğu ve maddenin yol açtığı diğer bozukluklar alt başlıklarından oluşmaktadır:

Madde İntoksikasyonu: Aşırı madde kullanımının ardından meydana gelen akut klinik bir tablodur. Maddenin yalnızca bir kere kullanılmasının ardından gelişebilecek madde ile ilişkili tek bozukluktur ve herkeste intoksikasyon gelişebilmektedir. Nikotin dışındaki diğer maddeler, ayırt edici intoksikasyon sendromları oluştururlar. Kişide, merkezi sinir sistemini etkileyen bir maddeyi kullanmasının ardından fiziksel belirtiler ve davranışsal veya psikolojik değişimler meydana gelir (26).

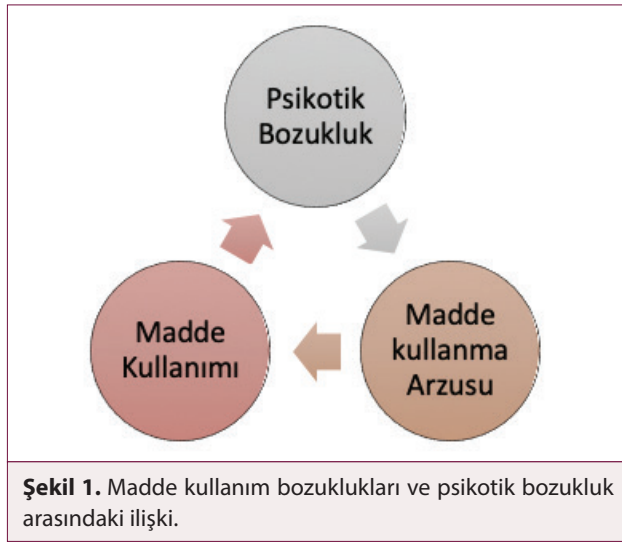
Madde Yoksunluğu: Yoksunluk semptomları, madde kullanıcısının beyninde madde yoğunluğunun azalması sonucunda gelişir ve kişide sıkıntı veya işlevsizlik yaratır. Bu semptomlar kullanılan maddeye göre değişmekle birlikte; bazı semptomlar birçok madde için ortaktır. Madde bağımlılarının büyük çoğunluğunda maddenin birden kesilmesi ile birlikte yoksunluk oluşurken, halüsinojenler gibi bazı maddeler bağımlılık yarattığı halde yoksunluğa yol açmaz. Yoksunluğun zamanı maddenin yarılanma ömrü ile ilişkilendirilir. Genellikle son doz alımının 12-24 saat sonrasında başlayan ve madde kullanma arzusunun eşlik ettiği yoksunluk semptomları birkaç günden uzun sürmemektedir (26).

Maddenin Yol Açtığı Diğer Bozukluklar: Maddeye bağlı gelişen bu etki, şiddetli seyretme potansiyeline sahip olup genelde geçici bir durum teşkil etmektedir; fakat madde suistimali, ilacın veya şiddetli toksinlerin etkisiyle kalıcı merkezi sinir sistemi sendromları oluşturabilmektedir. DSM-V'te maddenin/ilacın yol açtığı diğer bozukluklar; psikotik bozukluklar, bipolar ve ilişkili bozukluklar, depresif bozukluk, anksiyete bozukluğu, obsesif kompulsif ve ilişkili bozukluklar, uyku bozukluğu, cinsel disfonksiyon, deliryum ve nörolojik-bilişsel bozukluklar olarak tanımlanmıştır (8).

Maddenin Yol Açtığı Psikotik Bozukluklar

Madde kullanan bireylerde psikoz gelişme oranı normal popülasyona kıyasla daha yüksektir. Madde ile ilişkili bozuklukların prognozu ve tedavi başarısının psikoz gelişiminden olumsuz yönde etkilendiği bilinmektedir. Maddenin yol açtığı psikotik bozuklukların oluşum mekanizmalarının doğru açıklanması bu bozuklukların etiyojilerinin daha iyi anlaşılmasını sağlar. Bununla birlikte, maddenin yol açtığı psikotik bozukluk ile birincil psikotik bozukluk ayırımının doğru yapılması bu vakaların değerlendirilmesinde en zor noktalardan birisidir. Literatürde alkol, kannabis, kokain ve inhalan gibi psikoaktif maddelerin psikotik bozukluklar ile ilişkisini kanıtlayan farklı çalışmalar mevcuttur (27).

Madde kullanım bozukluğu ve ruhsal bozukluk arasındaki ilişki oldukça karmaşıktır. Şekil 1'de gösterildiği üzere, psikotik bo-



zukuluk tanıli hastaların büyük bir bölümünde madde ile ilişkili bozukluklar gözlenebildiği gibi benzer şekilde, psikoaktif maddelerin yol açtığı bozuklukların gözlendiği bireylerde psikotik bozukluk gelişme riski de artmaktadır. Yapılan araştırmalar, alkol bağımlılarının 1/3'ünden fazlasında ve bütün madde bağımlılarının 1/2'sinden fazlasında ruhsal bozukluklar gözlendiğini bildirmektedir (28).

Birçok kullanıcı için, yoksunluk esnasında tamamen giderilebilen maddenin indüklediği psikotik semptomlar, ICD-10 (Uluslararası Hastalık Sınıflaması, 10. Revizyon) içerisinde psikoaktif maddenin veya maddelerin indüklediği psikotik bozukluklar olarak tanımlanmaktadır. Fakat yapılan son çalışmalar, madde aracılı psikotik bozukluk geçiren bazı hastalarda sonraki dönemlerde şizofreni gelişiminin beklenenden daha yüksek oranlarda olduğunu ortaya koymuştur. Niemi-Pynttari ve arkadaşları tarafından Finlandiya'da gerçekleştirilmiş bir çalışmada, kannabis, amfetamin ve alkolün indüklediği psikotik bozuklukların 3 yıl içerisinde şizofreni spektrum bozukluklarına dönüşüm oranlarının sırasıyla %46, %30 ve %5 olduğu belirlenmiştir (29).

Maddenin Yol Açtığı Psikotik Bozuklukların Tanı Kriterleri

DSM-V'e göre maddenin yol açtığı psikotik bozuklukların tanı kriterlerinden sanrılar veya varsanılardan en az birinin varlığı karakteristik belirteç olarak kabul edilmektedir (8). Bununla birlikte gözlenen bu sanrı/varsanıların ilaç veya madde kullanımını takiben gelişmesi ve bu bahsi geçen madde veya ilacın karakteristik belirteç olarak kabul edilen sanrı/varsanı belirtilerini oluşturma durumu değerlendirilir. Ayrıca bu bulgulara paralel olarak bozukluğun deliryum esnasında gelişmiyor olması ve klinik olarak anlamlı sorunlara veya toplumsal alan ve iş hayatında işlevsizliklere sebebiyet vermesi de tanıya yardımcı olan faktörler arasındadır (8).

Maddenin Yol Açtığı Psikotik Bozuklukların Risk Faktörleri

Maddenin yol açtığı psikozların yaygınlığı üzerindeki epidemiyolojik verilerin erişilebilirliği mümkün değilken; yoğun madde

kullanımının ardından psikotik belirtiler tecrübe ettiğini bildirmiş kişiler üzerinde yapılan klinik araştırma sayısı azımsanmayacak ölçüdedir.

Çin'in Pekin ve Guangdong bölgelerinde 18 yaş ve üzerindeki metamfetamin kullanıcıları üzerinde yapılmış olan bir çalışmaya göre; metamfetamin kullanıcıları arasında metamfetamin ile ilişkili psikotik semptomların yaygın olduğu belirlenmiştir. Metamfetamine bağlı psikotik semptomların risk faktörleri arasında; yüksek doz ve uzun süreli metamfetamin kullanımı, eroin veya tütün kullanım hikayesi, depresyon veya anksiyete sorununun yer aldığı sonucuna varılmıştır. Bu bulgular; metamfetamin kullanan bireylerde kullanımı önleyici ve psikotik bozuklukları tedavi edici stratejilerin geliştirilmesinin önemini gözler önüne sermiştir (30). Roncero ve arkadaşlarının, indüklenmiş psikotik bozuklukların kokain kullanıcıları üzerindeki etkilerine dair yaptıkları çalışmada ise kokain kullanan bireylerin yaşamları boyunca en az bir defa psikotik semptom geçirme durumlarının %29'dan %75'e kadar yükselbildiği not edilmiştir (31).

Madde aracılı gelişen bu ve bunlara benzer bozuklukların risk faktörleri arasında; madde cinsi, kullanım süresi ve yaş, cinsiyet, genetik faktörler, ailede şizofreni hikayesi, uygulama yolu, doz, nörofizyolojik yatkınlık, beden kitle indeksi, psikiyatrik bozukluk eş tanısı ve birden fazla madde kullanımı yer almaktadır (31). Bütün maddelerin indüklenmiş psikoz oluşumunda risk teşkil etmesine rağmen aynı anda birden fazla madde kullanımının psikoz oluşumu için en güçlü risk faktörü olduğu belirtilmektedir (32).

Maddenin Yol Açtığı Psikotik Bozuklukların Tedavisi

Madde kötüye kullanımının yol açtığı tıbbi, sosyal ve psikolojik zararların indirgenmesinde en etkin araç tedavidir. Madde kullanımını sonlandırmak asıl hedef olsa da kullanım miktarı ve sıklığının azaltılabilmesi de doğacak problemlerin hafiflemesini sağlayabilmektedir (33).

Maddenin yol açtığı psikotik bozuklukların tedavisinde başlıca hedefler:

- 1) Madde kullanma arzusu ve madde kullanımının indirgenmesi,
- 2) Bireyin sağlığının ve işlevselliğinin düzeltilmesi,
- 3) Komplikasyon ve nüks risklerinin azaltılarak olası tehlikelerin önlenmesidir (34).

Bu amaçlar doğrultusunda güncel klinik olarak hem farmakolojik hem de bireyin psikososyal durumuna yardımcı olabilecek psikolojik danışmanlık ve rehabilitasyon hizmetleri uygulanmaktadır.

50'nin üzerinde yapılmış kontrollü çalışmadan varılan sonuca göre; madde ile ilişkili bozukluk ve mental bozukluk eş tanısında farklı disiplinlerin kullanıldığı bütüncül bir tedavi yaklaşımının uygulanmasında büyük önem taşıdığı görülmektedir. Madde kötüye kullanımı tedavi programı ve toplum ruh sağlığı merkezlerinin felsefi açıdan tedaviye yaklaşımları birbirlerinden ayrılrsa da hastaların hem mental bozukluklarının hem de madde kullanımlarının aynı önemde tedavi edilmesi gerektiği

mesajı, bu kliniklerdeki uzmanlar tarafından hastaya hissettirilmelidir. Madde kullanımı ve mental bozukluk eş tanısında başarılı bir tedavi, farmakoterapi, psikososyal tedavi ve madde kötüye kullanımı ile ilgili danışmanlık programlarının koordinasyonu ile mümkündür.

Maddenin yol açtığı psikotik bozuklukların farmakolojik tedavi uygulamaları arasında spesifik olarak kullanılan çeşitli ilaç grupları yer almaktadır.

McEvoy ve arkadaşlarının 1995 yılında yapmış oldukları çalışmalar sonucunda, yüksek etkili tipik antipsikotiklerin psikotik belirtilerin azaltılmasında etkin olmalarına rağmen hastaların madde kullanım oranlarını arttırdıkları belirlenmiştir (35). Bununla birlikte; düşük etkili tipik antipsikotiklerin madde kullanım oranlarını azaltmada başarılı olmalarına karşın; psikotik belirtilerin azaltılmasında yetersiz kaldıkları belirtilmiştir. Bunu takiben Green ve arkadaşları 1999 yılında yapmış oldukları çalışmada bu durumun nedeni olarak; yüksek etkili tipik antipsikotiklerin düşük etkili tipik antipsikotiklere göre mezokortikolimbik ödül yolağında daha yüksek seviyede dopamin antagonisti etkinliği gösteriyor olmalarını öne sürmüşlerdir (36).

Diğer taraftan, atipik antipsikotiklerin; dopamin reseptörü antagonizmasında seçici olmaları ve serotonin, noradrenalin ve histamin yolları üzerindeki etkinlikleri sebebiyle maddenin yol açtığı psikotik bozuklukların tedavisinde tipik antipsikotiklerin yerine daha sıklıkla tercih edildikleri bilinmektedir. Atipik antipsikotik ilaçların antihistaminik etki mekanizmaları ile bireylerde uyku halinin oluşmasının yanı sıra; anksiyetede azal-

ma gözlemlendiği ve özellikle 5-HT₂ reseptörleri üzerindeki anti-serotoninerjik etki mekanizmaları ile kişilerin psikoaktif madde kullanımlarına yönelik takıntılı düşüncelerini gidermede daha başarılı olduğu da farklı çalışmalarda gösterilmiştir (8).

Atipik antipsikotiklerin, negatif semptomlar üzerinde daha etkili, ekstrapiramidal sistem yan etkilerinin daha az olması ve serotonin, histamin ve norepinefrin üzerinden de aktivite göstermeleri dolayısıyla tipik antipsikotik ilaçlara göre avantaj sağladıkları kaydedilmiştir (37).

Tedavide Kullanılan Atipik Antipsikotikler

Atipik antipsikotikler, klasik antipsikotiklere göre D₂ reseptörünü daha az bloke ederek işlev gösteren ve ayrıca diğer dopamin reseptörleri, serotonin (5-HT) reseptörleri ve çeşitli nörotransmitterler üzerinde de etkisi bulunan ilaç grubudur. Antipsikotik etkilerinin temeli, dopamin sistemi ile ilişkilendirilirken; antipsikotik etki ve yan etkide öncelikle serotonin olmak üzere diğer nörotransmitterlerin de rol oynadığı öngörülmektedir (38). Klozapin, risperidon, olanzapin, ketiapin, ziprasidon, aripiprazol, sülpirid bu grupta olmakla birlikte Tablo 2'de atipik antipsikotiklerin genel kullanım alanları ve Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onay tarihleri özetlenmiştir.

Klozapin

Atipik antipsikotiklerin prototipi olan klozapin'in 1960'ların ortalarında etkili bir antipsikotik olduğu gözlenmiş fakat, 1974 yılında Finlandiya'da Klozapin kullanmış 8 hastanın agranülositoz sonucu hayatını kaybetmesiyle birlikte rutin kullanımı sonlandırılmıştır (39). 1990'da ise ekstrapiramidal sistem yan etkileri

Tablo 2. Atipik Antipsikotik İlaçların Kullanım Alanları (37)

Atipik Antipsikotik İlaçlar	Kullanım Alanları	FDA Onayı
Klozapin	Tedaviye dirençli şizofrenik hastaların tedavisi Klasik antipsikotik kullanımı sonucu ekstrapiramidal yan etki gelişen hastalarda tedavi	1990
Risperidon	Uzun süreli şizofreni tedavisi Bipolar bozuklukla ilişkili manik durumların kısa süreli tedavisi	1993
Olanzapin	Şizofreni grubu psikotik bozuklukların tedavisi	1996
Ketiapin	Akut şizofreni ve şizoaffektif bozukluk tedavisi	1997
Ziprasidon	Şizofreni ve bipolar bozukluk, Travma sonrası stres bozukluğu ve depresyon tedavileri	2001
Aripiprazol	Akut psikoz, şizofreni tedavileri Bipolar bozukluk ilişkili manik durumların stabilizasyonu	2002
Paliperidon	Şizofreni ve şizoaffektif bozukluk tedavisi	2007
Asenapin	Şizofreninin idame tedavisi Akut bipolar bozukluk tedavisi	2009
Amisülpirid	Akut psikotik hastalıkların tedavisi	2020
Sülpirid	Akut psikoz, şizofreni ve majör depresif bozukluk tedavisi	YOK

ve tardif diskinezi oluşturmaları sebebiyle tipik antipsikotikleri tolere etmekte güçlük çeken şizofreni hastaları için FDA tarafından onaylanmıştır. Pozitif semptomları tedavi ettiği gibi, psikozun negatif ve defisit semptomlarının tedavisinde de oldukça başarılıdır (38).

Etki mekanizması: Klozapin, santral sinir sisteminde başlıca D₁ ve D₄ tipi dopamin reseptörlerini antagonize etmektedir. Ekstrapiramidal sistem yan etkilerinin klasik antipsikotiklere göre daha az olması D₂ tipi dopamin reseptörleri üzerindeki etkisinin daha düşük olması ile açıklanmaktadır. Bununla birlikte, dirençli şizofreni vakalarında klozapin'in tedavi başarısının serotonin 5-HT₂ reseptörlerini antagonize etmesine dayandığı düşünülmektedir (8).

Risperidon

Klozapin'in ardından ABD'de FDA tarafından Aralık 1993'te şizofreninin akut tedavisi için onaylanmış atipik antipsikotiktir. Risperidon'un devamlı kullanımı hastalığın nüksünü engellediği için, Mart 2002'de FDA tarafından şizofreninin uzun süreli tedavisinde onaylanmıştır. Bunun yanı sıra; oral risperidon bipolar maninin kısa süreli tedavisinde tek başına ya da lityum veya valproat ile birlikte kullanılmak üzere Aralık 2003'te onay almıştır (40).

Etki mekanizması: Serotonin 5-HT₂ ve dopamin D₂ reseptörlerine yüksek afinite göstermektedir. Dopamin D₂ reseptörlerinin antagonize edilmesi ile, şizofreninin pozitif belirtileri arasında yer alan halüsinasyon, hatalı konuşma ve delüzyonun iyileşmesine katkı sağlanmaktadır. Serotonin ve dopamin reseptörlerinin her ikisine karşı antagonist etki göstermesinin, şizofreninin negatif ve pozitif belirtilerini iyileştirmesini ve ekstrapiramidal sistem yan etkilerinin oluşmamasını sağladığı düşünülmektedir (40).

Sülpirid

Bazı özellikleri ile tipik antipsikotiklere benzemekle birlikte özellikle D₂ reseptörlerine karşı seçici afinite göstermesi dolayısıyla atipik antipsikotikler altında sınıflandırılmıştır. Uzun süreli kullanımında dopaminerjik reseptörler üzerinde aşırı duyarlılık yaratmaması veya çok az yaratması kullanımı açısından avantaj sağlamaktadır (41).

Etki mekanizması: Antipsikotik etkisi merkezi sinir sisteminde postsinaptik dopamin D₂ reseptörlerini selektif olarak antagonize etmesiyle gerçekleşmektedir.

Amisülpirid

Amisülpirid, D₂/D₃ dopamin reseptörlerine seçiciliği ve serotonin 5-HT_{2A} reseptörlerine afinitesi nedeniyle atipik antipsikotikler arasında yer alan önemli bir ilaçtır (37).

Etki Mekanizması: Tipik ve atipik antipsikotiklerden ayrılarak, α-adrenerjik, kolinerjik ve histamin H₁ reseptörlerine karşı afinitesi bulunmamakla birlikte dopamin D₂ ve D₃ reseptörlerine selektif afinite göstermesi dolayısıyla şizofreninin pozitif ve negatif belirtileri üzerinde güçlü etkinlik gösterir (37).

Ketiapin

Kimyasal yapı olarak klozapine benzeyen bir atipik antipsikotiktir. Bu sebeple klozapine benzer biçimde şizofreninin pozitif ve negatif belirtileri üzerinde etkinlik gösterirken; ekstrapiramidal sistem yan etkilerine yol açmamaktadır. Ketiapin'in hematolojik parametreler üzerinde değişikliğe yol açmayan bir atipik antipsikotik olması, şizofreni tedavisinde ilk tercih edilen ilaç konusunda yer almasını sağlamaktadır (42).

Etki mekanizması: Orta derecede dopamin D₂ ve güçlü derecede serotonin 5-HT₂ reseptör antagonisti olarak etki gösteren bir atipik antipsikotiktir. Ketiapin; serotonin 5-HT_{1A}, histamin H₁, adrenerjik α1-, adrenerjik α2- ve dopamin D₁ reseptörlerini antagonize ederken; kolinerjik, muskarinik ve benzodiazepin reseptörlerine karşı etki göstermemektedir.

Olanzapin

Kimyasal yapı ve etki mekanizması bakımından klozapin'e benzeyen olanzapin, FDA tarafından Ekim 1996'da şizofreni tedavisi için; Mart 2000'de akut bipolar mani tedavisinde tek başına kullanılmak üzere onaylanmıştır. Reseptör afinite profili oldukça geniş olup mezolimbik dopaminerjik aktiviteyi selektif olarak etkiler (43).

Etki Mekanizması: Olanzapin α1-, dopamin, muskarinik, histamin H₁- ve serotonin 5-HT₂ reseptörlerine bağlanan bir atipik antipsikotiktir. Antipsikotik etkisi, dopamin ve serotonin 5-HT₂ reseptörlerini antagonize etmesiyle ilişkilendirilmiştir. Olanzapin'in dopamin D₂ reseptörlerine göre 5-HT₂ reseptörleri üzerindeki afinitesinin yaklaşık olarak 2 kat daha fazla olması; ekstrapiramidal sistem yan etkilerini azaltmaktadır (43).

Ziprasidon

FDA tarafından 2001 yılında onaylanmış olan Ziprasidon benzisotiyazol piperazin grubuna ait bir atipik antipsikotik ilaçtır (44). Serotonin ve norepinefrin taşıyıcıları için yüksek bir afiniteye sahip olma açısından da diğer atipik antipsikotiklerden farklılık göstermektedir.

Etki Mekanizması: Atipik antipsikotikler arasında ziprasidon, serotonin 5-HT_{2A} reseptörlerine karşı ters agonist, 5-HT_{1A} reseptörlerine karşı agonist ve 5-HT_{1D} ve 5-HT_{2C} reseptörlerine karşı antagonist aktivite sergileyebilen benzersiz bir moleküldür (44). 5-HT_{1A} reseptörleri üzerindeki agonist etkisi dolayısıyla kortikal dopamin salınımını artırarak D₂ antagonistlerinin yol açtığı ekstrapiramidal yan etkilerin azaltılmasını sağlar (44).

Aripiprazol

FDA tarafından, 15 Kasım 2002'de şizofreni tedavisi için; 2003'te şizofreninin idame tedavisi için, 29 Eylül 2004'te akut bipolar mani tedavisi için ve 7 Mart 2005'te bipolar bozukluğun idame tedavisi için onaylanmıştır. Diğer antipsikotik ilaçlardan ayrılan ve dopamin sistemi stabilizasyonu olarak isimlendirilen yeni bir atipik antipsikotik sınıfının ilk üyesi olan Aripiprazol, parsiyel dopamin agonistidir. Şizofreninin negatif ve kognitif belirtileri üzerinde iyileşme sağlarken, ekstrapiramidal sistem yan etkileri diğer antipsikotik ilaçlara oranla daha az gözlenmektedir (45).

Etki Mekanizması: Aripiprazol, dopamin D₂ ve serotonin 5-HT_{1A} reseptörleri üzerinde parsiyel agonist etki gösterirken, serotonin 5-HT_{2A} reseptörleri üzerinde antagonist etki göstermektedir. Dopamin D₂ reseptörlerine oranla serotonin 5-HT_{1A} ve 5-HT_{2A} reseptörlerine daha yüksek afinite göstermesi daha az ekstrapiramidal sistem yan etkilerine sebep olmasını açıklamaktadır. Ayrıca dopamin D₃, D₄, serotonin 5-HT_{2C}, 5-HT₇, α -1 adrenerjik ve histamin H₁ reseptörlerini de etkilemesi sebebiyle, aripiprazol, ortostatik hipotansiyon ve somnolans gibi etkiler oluşturmaktadır (45).

Paliperidon

Atipik antipsikotikler sınıfında yer alan ve risperidon'un ana aktif metaboliti olan paliperidon'un uzatılmış salımı, FDA tarafından Aralık 2006'da yetişkinler için şizofreninin akut tedavisinde ve Nisan 2007'de şizofreninin idame tedavisi için onaylanmıştır. Risperidon'a benzer şekilde ekstrapiramidal sistem yan etkilerine yol açmadan, şizofreninin negatif ve pozitif semptomlarını gidermektedir. Şizofreni hastalarında paliperidon kullanımı, hastalar üzerinde stabilitede ve hastaların işlevselliğinde artış sağlamaktadır (46).

Etki Mekanizması: Santral dopamin D₂ ve serotonin 5-HT_{2A} reseptörlerini bloke ederek şizofreninin pozitif ve negatif semptomlarını gidermektedir. α 1 ve α 2 adrenerjik reseptörlerini antagonize etmesi sonucunda ortostatik hipotansiyon gibi yan etkiler oluşturmaktadır. Paliperidon, histamin H₁ reseptörleri üzerine antagonist etki gösterirken; kolinerjik veya β -adrenerjik reseptörlere afinite göstermemektedir (46).

Asenapin

FDA tarafından Ağustos 2009'da yetişkinler için şizofreni ve bipolar I bozukluğun akut tedavisi için onaylanan asenapin, Ağustos 2010'da şizofreninin idame tedavisi ve bipolar I bozukluk için kullanılmakta olan lityum ve valproat'a ek olarak akut tedavide onaylanmıştır (47). 31 Ocak 2013 tarihinde, Türkiye'de şizofreni ve bipolar bozukluk tedavisi için ruhsat almıştır.

Etki mekanizması: Dopamin D₂ ve serotonin 5-HT_{2A} reseptörleri üzerindeki antagonist etkisi şizofreni tedavisindeki aktivitesi ile ilişkilendirilmektedir. Asenapin'in serotonin 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₅, 5-HT₆ ve 5-HT₇, dopamin D₁, D₂, D₃ ve D₄, α 1-, α 2- adrenerjik ve histamin H₁ reseptörlerine karşı afinite gösterdiği belirlenmiştir. Histamin H₂ reseptörlerine karşı afinitesi orta seviyede; muskarinik reseptörlere bağlanmamaktadır. Şizofreninin negatif semptomlarını iyileştirmesi, serotonin reseptörlerine karşı antagonist etki göstermesiyle ilişkilendirilmiştir. Asenapin, α -1-adrenerjik reseptörlerini antagonize etmesi sebebiyle kullanıma bağlı ortostatik hipotansiyon, baş dönmesi ve taşikardi gibi yan etkiler gözlemlenir (47).

TARTIŞMA

Maddenin yol açtığı psikotik bozukluk tanısı için, madde kullanım öyküsünden önce psikotik bozukluk belirtilerinin gelişmemesi ve psikotik bozukluk belirtilerinin madde kullanımının ardından gelişmesi gerekmektedir. Sanrılar ve/veya varsanılar olarak belirtiler gösteren bu bozukluk, kişide klinik olarak anlam-

lı sorunlara veya toplumsal ve çalışma hayatında işlevsizliklere yol açmaktadır (9). Madde kullanıcılarının normal popülasyon ile psikoz gelişme yaygınlığı açısından kıyaslanması sonucunda, madde kullanımının psikotik bozukluklar için bir risk faktörü olduğu belirlenmiştir. Madde ile ilişkili bozuklukların etkin biçimde tedavi edilebilmesi için, öncelikli olarak doğru teşhisin koyulması gerekmektedir. Maddenin yol açtığı psikotik bozukluğun ve birincil psikotik bozukluk ayrımının yapılabilmesi, hastalığın prognozunu ve tedavisini birinci dereceden etkilemektedir.

Alkol, kannabis, kokain, inhalan ve amfetamin kullanımının psikotik bozukluk ile ilişkisini kanıtlayan çeşitli çalışmalar literatürde mevcuttur. 2015 yılında yapılan bir araştırmaya göre madde aracılı psikoz geçiren kişilerin %23'ünün takip eden 3 yıl içerisinde şizofreni tanısı aldığı gösterilmiş olup (11), farklı araştırmalarda madde kullanan kişilerde ileri dönemlerde kronik psikotik bozuklukların geliştiği kaydedilmiştir (48). Özellikle kannabisin indüklediği psikoz tanılarının %50'ye yaklaşan oranda şizofreniye dönüştüğü gözlemlenmiştir. Bunların yanı sıra, amfetamin, opioid ve alkolün yol açtığı psikozların sırasıyla; %50; %30 ve %24'e yakın oranda şizofreniye dönüştüğü bildirilmiştir (48).

Madde kötüye kullanımının yol açtığı tıbbî, sosyal ve psikolojik zararların indirgenmesinde en etkin araç bütüncül yaklaşımların kullanılarak hem madde aracılı gelişen psikotik bozuklukların hem de madde kullanma arzusunun hedef alındığı tedavi yöntemleridir.

Yüksek etkili tipik antipsikotikler, psikotik belirtilerin azaltılmasında etkin olmalarına karşın, bireylerin madde kullanım oranlarını arttırmış olmaları ve düşük etkili tipik antipsikotiklerin madde kullanım oranlarını azaltmada etkin olmalarına rağmen, psikotik belirtilerin azaltılmasında yetersiz kalmaktadırlar. Bunun nedeni mezokortikolimbik ödül yolağında yüksek etkili tipik antipsikotiklerin düşük etkili tipik antipsikotiklere göre daha yüksek düzeylerde dopamin antagonist aktivitesi sergilemesidir. Bu sebeplerle tipik antipsikotik ilaçlar, maddenin yol açtığı psikotik bozukluk tedavisinde tercih edilmemektedir. Şizofreni tedavisinde ilk geliştirilen ilaç grubu olan tipik antipsikotiklerin yol açtığı yan etkilerin hastaların ilaç uyumunu olumsuz etkilemesi sebebiyle atipik antipsikotikler geliştirilmiştir. Tipik antipsikotiklere göre yan etkilerin daha iyi tolere edilebildiği atipik antipsikotikler, dopamin reseptörüne seçici antagonist etki göstermelerinin yanı sıra, serotonin, noradrenalin ve histamin reseptörleri üzerinde de aktivite göstermeleri nedeniyle, maddenin yol açtığı psikotik bozukluğun farmakolojik tedavisinde birinci sırada tercih edilen ilaç grubudur (49).

Atipik antipsikotiklerin, maddenin yol açtığı psikotik bozukluk tedavisinde tipik antipsikotiklere üstünlüklerinin sebepleri; tipik antipsikotikler kadar pozitif semptomları etkin biçimde iyileştirmeleri, negatif semptomları tipik antipsikotikler kadar veya daha etkin iyileştirmeleri, antidepresan veya duyu duyma dengeleyici etkinlik göstermeleri, saldırganlık ve dürtüselliklerin giderilmesinde başarılı olmaları, ekstrapiramidal sistem yan etkilerinin daha az olması, intihar eğilimini azaltmaları ve bilişsel gelişimi desteklemeleri şeklinde sıralanabilir (50).

SONUÇ

Sonuç olarak, dünya genelinde giderek artan madde kullanımı ve buna bağlı olarak toplumda giderek yaygınlaşan madde ile ilişkili bozukluklar medikal, psikolojik ve sosyal açıdan ciddi sorunlara yol açmaktadır. Madde ile ilişkili olarak başlayan bozukluğın daha ileri dnemelerde şizofreni veya bipolar bozukluk gibi önemli psikotik hastalıklara dönüşme olasılığı bu bozuklukların tanı ve tedavilerinin doğru ve etkin bir şekilde yapılması gerekliliğini gözler önüne sermektedir. Bu açıdan ele alındığında en etkin tedavi yöntemi olarak hem kişinin madde kullanma arzusunun hem de kullanılan madde ile birlikte gelişen psikotik bozukluk durumunun hedeflendiği farmakoterapi, psikososyal yaklaşımlar veya elektrokonvulzif tedaviyi içeren bütüncül tedavi programlarının uygulanması gerekmektedir. Maddenin yol açtığı psikotik bozukluğun farmakolojik tedavisinde atipik antipsikotikler ekstrapiramidal sistem yan etki profillerinin diğer grup ilaçlara göre daha az olması ve madde kullanma arzusu üzerindeki etkinliklerinin daha fazla olması sebebiyle birinci sırada tercih edilen ilaç grubudur.

Maddenin yol açtığı psikotik bozuklukların risk faktörlerinin de göz önüne alınmasıyla hastalığın önlenmesi ve erken tanı ve tedavi uygulamaları sonucunda hastalığın ciddi boyutlara ulaşmadan tedavi edilebilmesi mümkündür.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - M.K., G.K.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - M.K., G.K.; Analiz ve/veya Yorum - M.K., G.K., E.ř., E.S.İ.; Literatür Taraması - M.K., G.K., E.ř., E.S.İ.; Yazan - M.K., G.K.; Eleştirel İnceleme - E.S.İ., E.ř.

ıkar atışması: Yazarlar çıkar atışması bildirmemişlerdir.

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

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - M.K., G.K., Data Collection and/or Processing - M.K., G.K., Analysis and/or Interpretation - M.K., G.K., E.ř., E.S.İ.; Literature Search - M.K., G.K., E.ř., E.S.İ.; Writing - M.K., G.K.; Critical Reviews - E.S.İ., E.ř.

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

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

KAYNAKLAR

- Lewis A. The Psychopathology Of Insight. Br J Med Psychol 1934; 14(4): 332-48. [CrossRef]
- Amador XF, Strauss DH, Yale SA, Gorman JM. Awareness of illness in schizophrenia. Schizophr Bull 1991; 17(1): 113-32. [CrossRef]
- Mueser KT, Gingerich S. Treatment of co-occurring psychotic and substance use disorders. Soc Work Public Health 2013; 28(3-4): 424-39. [CrossRef]
- Kessler RC, Wai TC, Demler O, Walters EE. Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. Arch Gen Psychiatry 2005; 62(6): 617-27. [CrossRef]
- Rush B, Koegl CJ. Prevalence and profile of people with co-occurring mental and substance use disorders within a comprehensive mental health system. Can J Psychiatry 2008; 53(12): 810-21. [CrossRef]
- Hasin DS, Stinson FS, Ogburn E, Grant BF. Prevalence, Correlates, Disability, and Comorbidity of DSM-IV Alcohol Abuse and Dependence in the United States: Results From the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. Arch Gen Psychiatry 2007; 64(7): 830-42. [CrossRef]
- Akerman SC, Brunette MF, Noordsy DL, Green AI. Pharmacotherapy of Co-Occurring Schizophrenia and Substance Use Disorders. Curr Addict Rep 2014; 1(4): 251-60. [CrossRef]
- American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition. Arlington, VA: American Psychiatric Association, 2013. p.481-585. [CrossRef]
- Adinoff B. Neurobiological processes in drug reward and addiction. Harv Rev Psychiatry 2004; 12(6): 305-20. [CrossRef]
- Chen WL, Hsieh CH, Chang HT, Hung CC, Chan CH. The epidemiology and progression time from transient to permanent psychiatric disorders of substance-induced psychosis in Taiwan. Addict Behav 2015; 47: 1-4. [CrossRef]
- Dilbaz N, Akvardar Y, Berkman K, Oral G, Uluğ B, Uzbay T, et al. Madde Bağımlılığı Tanı ve Tedavi Kılavuzu El Kitabı. T. C. Sağlık Bakanlığı Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, BÖLÜM 4: Alkol Kullanım Bozukluğu. 2012. p.105-23.
- Wang HR, Woo YS, Bahk WM. Caffeine-induced psychiatric manifestations: A review. Int Clin Psychopharmacol 2015; 30(4): 179-82. [CrossRef]
- Hedges BDW, Woon FL, Hoopes SP. Caffeine-Induced Psychosis. CNS Spectr 2009; 14(3): 127-9. [CrossRef]
- Lucas PB, Pickar D, Kelsoe J, Rapaport M, Pato C, Hommer D. Effects of the acute administration of caffeine in patients with schizophrenia. Biol Psychiatry 1990; 28: 35-40. [CrossRef]
- Sharma P, Murthy P, Bharath MMS. Chemistry, metabolism, and toxicology of cannabis: Clinical implications. Iran J Psychiatry 2012; 7(4): 149-56.
- United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). World Drug Report 2019 Booklet 5: Cannabis And Hallucinogens. (United Nations publication, Sales No. E.19.XI.8.p.9-49. Available from: https://wdr.unodc.org/wdr2019/
- Greenfield SF, Back SE, Lawson K, Brady KT. Substance Abuse in Women. Psychiatr Clin North Am 2010; 33(2): 339-55. [CrossRef]
- Garcia-Romeu A, Kersgaard B, Addy PH. Clinical applications of hallucinogens: A review. Exp Clin Psychopharmacol 2016; 24(4): 229-68. [CrossRef]
- United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). World Drug Report 2019 Booklet 5: Cannabis And Hallucinogens. United Nations publication, Sales No. E.19.XI.8.p.51-73. Available from: https://wdr.unodc.org/wdr2019/
- Dilbaz N, Akvardar Y, Berkman K, Oral G, Uluğ B, Uzbay T, et al. Madde Bağımlılığı Tanı ve Tedavi Kılavuzu El Kitabı. T. C. Sağlık Bakanlığı Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, BÖLÜM 9: Uuların Kullanımına Bağlı Ruhsal Ve Davranişsal Bozukluklar. 2012. p.157-67.
- Robinson SM, Adinoff B. The classification of substance use disorders: Historical, contextual, and conceptual considerations. Behav Sci (Basel) 2016; 6(3): 1-23. [CrossRef]

22. Frese WA, Eiden K. Opioids: Nonmedical use and abuse in older children. *Pediatrics in Review* 2011; 32(4): e44-e52. [\[CrossRef\]](#)
23. United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). World Drug Report 2018 Booklet 1: Executive Summary and Policy Implications. United Nations publication, Sales No. E.18.XI.9.p.1-32. Available from: <https://www.unodc.org/wdr2018/> [\[CrossRef\]](#)
24. Hasin DS, Stinson FS, Ogburn E, Grant BF. Prevalence, correlates, disability, and comorbidity of DSM-IV alcohol abuse and dependence in the United States: Results from the national epidemiologic survey on alcohol and related conditions. *Arch Gen Psychiatry* 2007; 64(7): 830-42. [\[CrossRef\]](#)
25. Kluwe-Schiavon B, Viola TW, Sanvicente-Vieira B, Lumertz FS, Salum GA, Grassi-Oliveira R, et al. Substance related disorders are associated with impaired valuation of delayed gratification and feedback processing: A multilevel meta-analysis and meta-regression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2020; 108: 295-307. [\[CrossRef\]](#)
26. Dilbaz N, Akvardar Y, Berkman K, Oral G, Uluğ B, Uzday T, et al. Madde Bağımlılığı Tanı ve Tedavi Kılavuzu El Kitabı. T. C. Sağlık Bakanlığı Sağlık Hizmetleri Genel M¼d¼rl¼đ¼, Madde Kullanımı İle İlişkili Bozukluklar (DSM-IV-TR'ye G¼re). 2012. p.22-45.
27. Prom-Wormley EC, Ebejer J, Dick DM, Bowers MS. The genetic epidemiology of substance use disorder: A review. *Drug Alcohol Depend* 2017; 180: 241-59. [\[CrossRef\]](#)
28. Balhara YPS, Kuppili PP, Gupta R. Neurobiology of Comorbid Substance Use Disorders and Psychiatric Disorders: Current State of Evidence. *J Addict Nurs* 2017; 28(1): 11-26. [\[CrossRef\]](#)
29. Niemi-Pynttari JA, Sund R, Putkonen H, Vormaa H, Wahlbeck K, Pirkola SP. Substance-Induced Psychoses Converting Into Schizophrenia: A Register-Based Study of 18,478 Finnish Inpatient Cases. *J Clin Psychiatry* 2013; 74(1): e94-e99. [\[CrossRef\]](#)
30. Su MF, Liu MX, Li JQ, Lappin JM, Li SX, Wu P, et al. Epidemiological characteristics and risk factors of methamphetamine-associated psychotic symptoms. *Front Psychiatry* 2018; 9: 489. [\[CrossRef\]](#)
31. Roncero C, Ros-Cucurull E, Daigre C, Casas M. Prevalence and risk factors of psychotic symptoms in cocaine-dependent patients. *Actas Esp Psiquiatr* 2012; 40(4): 187-97.
32. Rognli EB, Berge J, Håkansson A, Bramness JG. Long-term risk factors for substance-induced and primary psychosis after release from prison. A longitudinal study of substance users. *Schizophr Res* 2015; 168(1-2): 185-90. [\[CrossRef\]](#)
33. Straussner SLA, Hanson M, Seiger BH, Davis J, et al. Assessment and Treatment of Clients with Substance Use Disorders: An Overview. In Shulamith Lala Ashenberg Straussner editor, *Clinical work with substance-abusing clients* (2nd ed.). Guilford Publications. 2014.p.3-35.
34. Murty P, Chand P. Treatment of dual diagnosis disorders. *Curr Opin Psychiatry* 2012; 25(3): 194-200. [\[CrossRef\]](#)
35. McEvoy JP, Freudenreich O, Levin ED, Rose JE. Haloperidol increases smoking in patients with schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* 1995; 119(1); 124-6. [\[CrossRef\]](#)
36. Green AI, Zimmet S V., Strous RD, Schildkraut JJ. Clozapine for comorbid substance use disorder and schizophrenia: Do patients with schizophrenia have a reward-deficiency syndrome that can be ameliorated by clozapine? *Harvard Review of Psychiatry* 1999; 6(6): 287-96. [\[CrossRef\]](#)
37. Marin-Mayor M. Atypical Antipsychotic Drugs in Dual Diagnosis Patients: A Review. *Int J Neurol Neurother* 2015; 2: 1-13. [\[CrossRef\]](#)
38. Duran A. Psikiyatride İlaçla Tedavi. In: *T¼rkiye'de Sık Karşılaşılan Psikiyatrik Hastalıklar. İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fak¼ltesi S¼rekli Tıp Eğitimleri Etkinlikleri Sempozyum Dizisi No:62*. 2008. p.275-302.
39. Hippus H. The history of clozapine. *Psychopharmacology (Berl)* 1989; 99: S3-S5. [\[CrossRef\]](#)
40. Chopko TC, Lindsley CW. Classics in Chemical Neuroscience: Risperidone. *ACS Chemical Neuroscience* 2018; 9(7): 1520-9. [\[CrossRef\]](#)
41. Caley CF, Weber SS. Sulpiride: An antipsychotic with selective dopaminergic antagonist properties. *Ann Pharmacother* 1995; 29(2): 152-60. [\[CrossRef\]](#)
42. Lieberman JA, Scott Stroup T, McEvoy JP, Swartz MS, Rosenheck RA, Perkins DO, et al. Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. *N Engl J Med* 2005; 353(12): 1209-23. [\[CrossRef\]](#)
43. Tamminga CA, Lahti AC. The new generation of antipsychotic drugs. In: *International Clinical Psychopharmacology* 1996; 11(Suppl 2): 73-6. [\[CrossRef\]](#)
44. Masand PS, Nemeroff CB, Newcomer JW, Lieberman JA, Schatzberg AF, Weiden PJ, et al. From Clinical Research to Clinical Practice: A 4-Year Review of Ziprasidone. *CNS Spectrums*. Cambridge University Press; 2005; 10 (S17): 1-20. [\[CrossRef\]](#)
45. Prommer E. Aripiprazole: A New Option in Delirium. *Am J Hosp Palliat Med* 2017; 34(2): 180-5. [\[CrossRef\]](#)
46. Corena-McLeod M. Comparative pharmacology of risperidone and paliperidone. *Drugs RD* 2015; 15(2): 163-74. [\[CrossRef\]](#)
47. Vieta E, Montes JM. A Review of Asenapine in the Treatment of Bipolar Disorder. *Clin Drug Investig* 2018; 38(2): 87-99. [\[CrossRef\]](#)
48. Starzer MSK, Nordentoft M, Hjorthøj C. Rates and predictors of conversion to schizophrenia or bipolar disorder following substance-induced psychosis. *Am J Psychiatry* 2018; 175(4): 343-50. [\[CrossRef\]](#)
49. Green AI, Noordsy DL, Brunette MF, O'Keefe C. Substance Abuse and Schizophrenia: Pharmacotherapeutic Intervention. *J Subst Abuse Treat* 2008; 34(1): 61-71. [\[CrossRef\]](#)
50. Meltzer HY. Update on Typical and Atypical Antipsychotic Drugs. *Annu Rev Med* 2013; 64: 393-406. [\[CrossRef\]](#)

EXPERIMED

AIMS AND SCOPE

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Editor in Chief: Prof. Bedia Çakmakoğlu

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

Phone: +90 212 414 2000-33305

Fax: +90 212 532 4171

E-mail: bedia@istanbul.edu.tr

Publisher: İstanbul University Press

Address: İstanbul University Central Campus, 34452 Beyazit, Fatih / İstanbul - Turkey

Phone: +90 212 440 0000

EXPERIMED

AMAÇ VE KAPSAM

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

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

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

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

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

Derginin tüm masrafları İstanbul Üniversitesi tarafından karşılanmaktadır.

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

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

Baş Editör: Prof. Dr. Bedia Çakmakoğlu

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

Telefon: 0212 414 2000-33305

Faks: 0212 532 4171

E-posta: bedia@istanbul.edu.tr

Yayıncı: İstanbul Üniversitesi Yayınevi

Adres: İstanbul Üniversitesi Merkez Kampüsü, 34452 Beyazıt, Fatih / İstanbul - Türkiye

Telefon: 0212 440 0000

EXPERIMED

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Context

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

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

Editorial Policy

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

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

Peer-Review Policy

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

Ethical Principles

An approval of research protocols by the Ethics Committee in accordance with international agreements (World Medical Association Declaration of Helsinki "Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects," amended in October 2013, www.wma.net) is required for experimental, clinical, and drug studies and for some case reports. If required, ethics committee reports or an equivalent official document will be requested from

the authors. For manuscripts concerning experimental research on humans, a statement should be included that shows that written informed consent of patients and volunteers was obtained following a detailed explanation of the procedures that they may undergo. For studies carried out on animals, the measures taken to prevent pain and suffering of the animals should be stated clearly. Information on patient consent, the name of the ethics committee, and the ethics committee approval number should also be stated in the Materials and Methods section of the manuscript. It is the authors' responsibility to carefully protect the patients' anonymity. For photographs that may reveal the identity of the patients, signed releases of the patient or of their legal representative should be enclosed.

Plagiarism

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

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

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

Authorship

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

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

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

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

EXPERIMED

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

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

Conflict of Interest

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

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

Copyright and Licensing

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

Disclaimer

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

MANUSCRIPT PREPARATION

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

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

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

Authors are required to submit the following:

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

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

Preparation of the Manuscript

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

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

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

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

EXPERIMED

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

Manuscript Types

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

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

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

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

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

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

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

Letters to the Editor: This type of manuscript discusses important parts, overlooked aspects, or lacking parts of a previously published article. Articles on subjects within the scope of the journal that might attract the readers' attention, particularly educative cases, may also be submitted in the form of a "Letter to the Editor." Readers can also present their comments on the published manuscripts in the form of a "Letter to the Editor." Abstract, Keywords, and Tables, Figures, Images, and other media should not be included. The text should be unstructured. The manuscript that is being commented on must be properly cited within this manuscript.

Tables

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

Figures and Figure Legends

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

Table 1. Limitations for each manuscript type

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

EXPERIMED

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

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

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

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

References

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

REVISIONS

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

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

Editor in Chief: Prof. Bedia Çakmakoğlu
Address: İstanbul University, Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine, Vakıf Gureba Avenue, 34093, Çapa, Fatih, İstanbul, Turkey
Phone: +90 212 414 2000-33305
Fax: +90 212 532 4171
E-mail: bedia@istanbul.edu.tr

Publisher: İstanbul University Press
Address: İstanbul University Central Campus,
34452 Beyazıt, Fatih / İstanbul - Turkey
Phone: +90 212 440 0000

EXPERIMED

YAZARLARA BİLGİ

İçerik

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

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

Yayın Politikası

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

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

Değerlendirme Süreci

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

Etik İlkeler

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

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

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

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

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

Yazarlık

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

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

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

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

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

EXPERIMED

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

Çıkar Çatışması

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

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

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

Telif ve Lisans

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

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

Sorumluluk Reddi

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

MAKALE HAZIRLAMA

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

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

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

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

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

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

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

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

Makale Türleri

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

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

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

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

EXPERIMED

rafından kısaca yorumlanması amacını taşımaktadır. Yazarları, dergi tarafından seçilip davet edilir. Özet, anahtar sözcük, tablo, şekil, resim ve diğer görseller kullanılmaz.

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

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

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

Tablolar

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

Resim ve Resim Altyazıları

Resimler, grafikler ve fotoğraflar (TIFF ya da JPEG formatında) ayrı

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

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

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

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

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

Kaynaklar

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

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

Tablo 1. Makale türleri için kısıtlamalar

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

EXPERIMED

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

REVİZYONLAR

Yazarlar makalelerinin revizyon dosyalarını gönderirken, ana metin üzerinde yaptıkları değişiklikleri işaretlemeli, ek olarak, hakemler tarafından öne sürülen önerilerle ilgili notlarını "Hakemlere Cevap" dosyasında göndermelidir. Hakemlere Cevap dosyasında her hake-min yorumunun ardından yazarın cevabı gelmeli ve değişikliklerin yapıldığı satır numaraları da ayrıca belirtilmelidir. Revize makaleler karar mektubunu takip eden 30 gün içerisinde dergiye gönderilmelidir. Makalenin revize versiyonu belirtilen süre içerisinde yüklenmezse, revizyon seçeneği iptal olabilir. Yazarların revizyon için ek süreye ihtiyaç duymaları durumunda uzatma taleplerini ilk 30 gün sona ermeden dergiye iletmeleri gerekmektedir.

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

Baş Editör: Prof. Dr. Bedia Çakmakçoğlu

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

Telefon: 0212 414 2000-33305

Faks: 0212 532 4171

E-posta: bedia@istanbul.edu.tr

Yayıncı: İstanbul Üniversitesi Yayınevi

Adres: İstanbul Üniversitesi Merkez Kampüsü,

34452 Beyazıt, Fatih / İstanbul - Türkiye

Telefon: 0212 440 0000