

Coşkun S, et al.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Tanısi Zor Tek Gen Hastalıklarında Hedefe Yönelik Yeni Nesil Dizileme Panel Tasarımı: Primer İmmün Yetersizlik Örneği
Targeted Next Generation Sequencing Panel Design in Complex Monogenic Diseases: The Example of Primary Immunodeficiency

Non-amiloidojenik Transtiretin Gen Varyantlarının Biyoinformatik Analizi ve His90Asn Varyantının Klinik Önemi
Bioinformatic Analysis of Non-Amyloidogenic Transthyretin Gene Variants and Clinical Importance of His90Asn Variant

Çocukluk Çağı T-ALL Hastalarında PTEN ve AKT1 Gen Anlatım Düzeyleri
PTEN and AKT1 Gene Expression Levels in Childhood T-ALL Patients

Miyelodisplastik Sendromlu Olguların Kan ve Kemik İliği Örneklerinin Konvansiyonel Sitogenetik ve Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemiyle İncelenmesi
Investigation of Blood and Bone Marrow Samples of Patients with Myelodysplastic Syndrome by Conventional Cytogenetic and Fluorescent In Situ Hybridization Methods

Role of CYP3A4*1B Gene Variant In Substance Use Disorder Madde Kullanım Bozukluğunda CYP3A4*1B Gen Varyantının Rolü

Miyeloproliferatif Neoplazilerde JAK2V617F Mutasyonunun Endotel Hücrelerine Etkisi ve SOCS1-4 Gen Anlatımlarına Yansıması
The effect of JAK2V617F Mutation to the Endothelial Cells and the Expression Profiles of SOCS1-4 Genes in Myeloproliferative Neoplasms

Akraba Dışı Kordon Kanı Kaynaklı Kök Hücre Transplantasyonu Retrospektif Analizi
A Retrospective Analysis of Unrelated Cord Blood Derived Stem Cell Transplantation

İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Nutrisyon ve Mikrobiyota Araştırma Laboratuvarı Bakteriye Topluluk Analiz Algoritması
Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Clinical Nutrition and Microbiota Research Laboratory's Bacterial Community Analysis Algorithm

The Relationship Between the BCL1 Variant of the Glucocorticoid Receptor Gene and Non-Syndromic Microtia
Sendromik Olmayan Microtia ve Glucocorticoid Receptor Genindeki BCL1 Variantının İlişkisi

Statik Manyetik Alanın Trombosit Agregasyonuna Etkisi
The Effect of Static Magnetic Field on Platelet Aggregation

Cytokine Gene Polymorphisms and Chromosome 13 Deletion in Multiple Myeloma Patients
Multiple Myeloma Hastalarında Sitokin Gen Polimorfizmleri ve Kromozom 13 Delesyonu

The Prognostic Significance of the Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Patients with Multiple Myeloma: A Pilot Study
Multiple Myelom Hastalarında Nötrofil Lenfosit Oranının Prognostik Önemi

Cerrahi Kliniklerinde Yatan Hastaların Anksiyete ve Depresyon Düzeylerinin Belirlenmesi
Determination of Level of Anxiety and Depression of Patients Hospitalized in Surgery Clinics



SABIAD

SAĞLIK BİLİMLERİNDE İLERİ ARAŞTIRMALAR DERGİSİ

e-ISSN:2651-4060

JOURNAL OF ADVANCED RESEARCH IN HEALTH SCIENCES

Ekim / October 2020
Cilt / Volume 3
Sayı / Issue 3



SABIAD

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

Ekim/October 2020, Cilt/Volume 3, Sayı/Issue 3

e-ISSN:2651-4060

Sahibi / Sorumlu Müdür

Ownership / Director

Zeynep Karakaş

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

Baş Editör / Editor in Chief

Zeynep Karakaş

Editör Yardımcıları / Associate Editors

Ümmühan İšoğlu Alkaç

Volkan Arısan

Ayşe Evrim Bayrak

Meryem Sedef Erdal

İlhan İlkılıç

Kıvanç Bektaş Kayhan

Müge Sayitoğlu

Bilimsel Sekreteryası / Scientific Secretariat

Yasin Yılmaz

Aslı Gürbüz

İstatistik Danışmanı / Statistics Editor

Eray Yurtseven

Dil Editörleri / Language Editors

Alan James Newson, İstanbul, Türkiye

Elizabeth Mary Earl, İstanbul, Türkiye

Editöryal Ofis / Editorial Office

Birgül Taştemir

Safiye Özkan Sarılı

Yazışma Adresi / Correspondence Address

İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Bozdoğan Kemerli Cad. No:8 Vezneciler Hamamı Sk.

Vezneciler, Fatih 34126 İSTANBUL

Telefon / Phone: +90 (212) 440 00 00 (11280)

Faks / Fax: +90 (212) 414 30 16

E-mail: sabiad@istanbul.edu.tr

<https://dergipark.org.tr/sabiad>

Yayıncı Kuruluş / Publishing Company

İstanbul Üniversitesi Yayınevi / Istanbul University Press İstanbul
Üniversitesi Merkez Kampüsü, 34452 Beyazıt,

Fatih / İstanbul, Türkiye

Telefon / Phone: +90 (212) 440 00 00

Editör Kurulu/Editorial Board

Alper Baran, İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa, Veteriner Fakültesi, İstanbul, Türkiye

Mustafa Demir, İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye

Tamer Demiralp, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye

Günnur Deniz, İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İstanbul, Türkiye

Melek Nihal Esin, İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa, Florence Nightingale Hemşirelik Fakültesi, İstanbul, Türkiye

Ahmet Gül, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul Türkiye

Godoberto Guevara-Rojas, University of Applied Sciences, Viyana, Avusturya

Christine Hauskeller, Exeter Üniversitesi, Sosyoloji ve Felsefe Bölümü, Exeter, İngiltere

Amid Ismail, Temple University, School of Dentistry, Philadelphia, ABD

Alev Akdoğan Kaymaz, İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa, Veteriner Fakültesi, İstanbul/Türkiye

Ahmet Kizir, İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, İstanbul, Türkiye

Eitan Mijiritsky, Tel Aviv Üniversitesi, Dış Hekimliği Fakültesi, Tel Aviv, İsrail

Fuat Oduncu, Münih Ludwig Maximilian Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Münih, Almanya

Vedat Onar, İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa, Veteriner Fakültesi, İstanbul, Türkiye

Özen Doğan Onur, İstanbul Üniversitesi, Dış Hekimliği Fakültesi, İstanbul, Türkiye

Sacide Pehlivan, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul Türkiye

Hans-Martin Sass, Georgetown University, GU The Kennedy Institute of Ethics, Washington, ABD – Bochum Almanya

Emine Akalın Uruşak, İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, İstanbul, Türkiye

T. Mesud Yelbuz, King Abdulaziz Cardiac Center, Riyad, S. Arabistan

Eray Yurtseven, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye

Eda Yılmaz Alarçın, İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa, Sağlık Bilimleri Fakültesi, İstanbul, Türkiye

Fatemah Bahadori, Bezmialem Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, İstanbul, Türkiye

Dergide yer alan yazılardan ve aktarılan görüşlerden yazarlar sorumludur.

Papers and the opinions in the Journal are the responsibility of the authors.

Şubat, Haziran ve Ekim aylarında, yılda üç sayı olarak yayınlanan hakemli, açık erişimli ve bilimsel bir dergidir.

This is a scholarly, peer-reviewed, open-access journal published three times a year in February, June and October.

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

Editörden

İstanbul Üniversitesi süreli yayınlarından biri olan Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi Ekim sayısıyla hizmetinize sunulmuştur. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, uluslararası programları, birçoğu ülkemiz için öncelikli bilim alanlarında gençlerimize lisansüstü eğitim veren, üniversitemizin misyon ve vizyonuna uygun çalışmalarıyla gençlerimizin önünü açan bir kurum olmanın sorumluluğuyla, Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisini tam zamanında çıkararak yoluna devam ediyor.

Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi, lisansüstü öğrenim gören öğrencilerin yanı sıra akademik bir gelecek hedefleyen ülke çapındaki bilim insanlarımıza yayın yapabilecekleri iyi bir alternatif oluşturmayı hedefliyor, yayınlarınızı bekliyoruz.

Sevgi ve saygılarımızla.

Prof.Dr. Zeynep Karakaş

Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi Editörü



İÇİNDEKİLER / CONTENTS

| | |
|---|-----|
| Tanısı Zor Tek Gen Hastalıklarında Hedefe Yönelik Yeni Nesil Dizileme Panel Tasarımı: Primer İmmün Yetersizlik Örneği | 93 |
| <i>Targeted Next Generation Sequencing Panel Design in Complex Monogenic Diseases: The Example of Primary Immunodeficiency</i> | |
| Sinem Firtına, Özden Hatırnaz Ng, Müge Sayitoğlu, Yuk Yin Ng | |
| Non-amiloidojenik Transtiretin Gen Varyantlarının Biyoinformatik Analizi ve His90Asn Varyantının Klinik Önemi | 102 |
| <i>Bioinformatic Analysis of Non-Amyloidogenic Transthyretin Gene Variants and Clinical Importance of His90Asn Variant</i> | |
| Evrım Kömürcü Bayrak, Gizem Çelebi, Elif Eroğlu, Gökhan Kahveci, Fatih Bayrak | |
| Çocukluk Çağı T-ALL Hastalarında <i>PTEN</i> ve <i>AKT1</i> Gen Anlatım Düzeyleri | 114 |
| <i>PTEN and AKT1 Gene Expression Levels in Childhood T-ALL Patients</i> | |
| Fulya Küçükçankurt, Özden Hatırnaz Ng, Müge Sayitoğlu, Yücel Erbilgin | |
| Miyelodisplastik Sendromlu Olguların Kan ve Kemik İliği Örneklerinin Konvansiyonel Sitogenetik ve Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemiyle İncelenmesi | 122 |
| <i>Investigation of Blood and Bone Marrow Samples of Patients with Myelodysplastic Syndrome by Conventional Cytogenetic and Fluorescent In Situ Hybridization Methods</i> | |
| Selin Coşkun, Şükriye Yılmaz, Ayşe Çırakoğlu, R. Dilhan Kuru, Yelda Tarkan Argüden, Şeniz Öngören, Seniha Hacıhanefioğlu | |
| Role of <i>CYP3A4*1B</i> Gene Variant In Substance Use Disorder | 130 |
| <i>Madde Kullanım Bozukluğunda CYP3A4*1B Gen Varyantının Rolü</i> | |
| Gazi Çapar, Hayriye Şentürk Çiftçi, Sacide Pehlivan | |
| Miyeloproliferatif Neoplazilerde <i>JAK2V617F</i> Mutasyonunun Endotel Hücrelerine Etkisi ve <i>SOCS1-4</i> Gen Anlatımlarına Yansıması | 135 |
| <i>The effect of JAK2V617F Mutation to the Endothelial Cells and the Expression Profiles of SOCS1-4 Genes in Myeloproliferative Neoplasms</i> | |
| Ahmet Göksu, Hilal Hekimoğlu, Selçuk Sözer Tokdemir | |
| Akraba Dışı Kordon Kanı Kaynaklı Kök Hücre Transplantasyonu Retrospektif Analizi | 148 |
| <i>A Retrospective Analysis of Unrelated Cord Blood Derived Stem Cell Transplantation</i> | |
| Ayşe Erol, Demet Kıvanç, Mediha Süleymanoğlu, Fatma Savran Oğuz | |



İÇİNDEKİLER / CONTENTS

| | |
|--|------------|
| İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Nutrisyon ve Mikrobiyota Araştırma Laboratuvarı Bakteriyel Topluluk Analiz Algoritması | 157 |
| <i>İstanbul University, İstanbul Faculty of Medicine, Clinical Nutrition and Microbiota Research Laboratory's Bacterial Community Analysis Algorithm</i> | |
| Dilek Sever Kaya, Bülent Saka | |
| The Relationship Between the <i>BCL1</i> Variant of the Glucocorticoid Receptor Gene and Non-Syndromic Microtia | 168 |
| <i>Sendromik Olmayan Microtia ve Glucocorticoid Receptor Genindeki BCL1 Variantının İlişkisi</i> | |
| Ayşe Feyda Nursal, Kürşat Özduilli, Mehmet Bekerecioğlu, Berker Büyükgöral, Sacide Pehlivan | |
| Statik Manyetik Alanın Trombosit Agregasyonuna Etkisi | 173 |
| <i>The Effect of Static Magnetic Field on Platelet Aggregation</i> | |
| Çiğdem Bayram Gürel, Gülsel Ayaz, Handan Tuncel, Tunaya Kalkan, Nazmiye Kurşun, Turgut Ulutin | |
| Cytokine Gene Polymorphisms and Chromosome 13 Deletion in Multiple Myeloma Patients..... | 179 |
| <i>Multiple Myeloma Hastalarında Sitokin Gen Polimorfizmleri ve Kromozom 13 Delesyonu</i> | |
| Çiğdem Kekik Çınar, Gonca Karahan, Sonay Temurhan, Sevgi Kalayoğlu Beşışık, Fatma Savran Oğuz, Filiz Aydın | |
| The Prognostic Significance of the Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Patients with Multiple Myeloma: A Pilot Study | 186 |
| <i>Multiple Miyelom Hastalarında Nötrofil Lenfosit Oranının Prognostik Önemi</i> | |
| Alpay Medetalibeyoğlu, Nur Akyüz, Sena Bayrakdar, Mustafa Altınkaya, Timur Selçuk Akpınar, Cemil Taşçıoğlu | |
| Cerrahi Kliniklerinde Yatan Hastaların Anksiyete ve Depresyon Düzeylerinin Belirlenmesi..... | 195 |
| <i>Determination of Level of Anxiety and Depression of Patients Hospitalized in Surgery Clinics</i> | |
| Fadime Gök, Filiz Kabu Hergül | |

Tanısı Zor Tek Gen Hastalıklarında Hedefe Yönelik Yeni Nesil Dizileme Panel Tasarımı: Primer İmmün Yetersizlik Örneği

Targeted Next Generation Sequencing Panel Design in Complex Monogenic Diseases: The Example of Primary Immunodeficiency

Sinem Fırtına^{1,2} , Özden Hatırnaz Ng³ , Müge Sayitoğlu² , Yuk Yin Ng⁴ 

¹ İstinye Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul, Türkiye

² İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

³ Acıbadem Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Bölümü, İstanbul, Türkiye

⁴ İstanbul Bilgi Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, İstanbul, Türkiye

ORCID: S.F. 0000-0002-3370-8545;
Ö.H.N. 0000-0001-7728-6527;
M.S. 0000-0002-8648-213X;
Y.Y.N. 0000-0001-9755-6045

Corresponding author/Sorumlu yazar:

Yuk Yin Ng,
İstanbul Bilgi Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, İstanbul, Türkiye
E-mail: yuk.ng@bilgi.edu.tr

Submitted/Başvuru: 07.09.2020

Accepted/Kabul: 25.09.2020

Citation/Atıf: Firtina S, Hatırnaz NG O, Sayitoğlu M, Ng YY. Targeted Next Generation Sequencing Panel Design in Complex Monogenic Diseases: The Example of Primary Immunodeficiency. Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi 2020; 3(3): 93-101.
<https://doi.org/10.26650/JARHS2020-790469>

ÖZ

Amaç: Yeni nesil dizileme teknolojileri bugün çok sayıda aday genin, genomun tüm kodlayan bölgelerinin hatta tüm genomun analizini tek seferde ve kısa süre içerisinde düşük maliyet ve yüksek hassasiyette, güvenilir bir şekilde mümkün kılmaktadır. Hedefe yönelik yeni nesil dizileme sistemleri genomda sadece belirli bölgenin dizilenmesine imkan veren, tüm genom dizilemelere göre uygulaması ve analizi daha kolay, hızlı ve yüksek güvenilirlikte bir yöntem olarak pek çok rutin genetik tanı uygulamalarında yerini bulmuştur.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda primer immün yetersizliklerin en yaygın grubu olan primer antikor yetersizlikleri (PAY) ve en ağır seyirli grubu ağır kombine immün yetersizlikler (AKİY) için hastalık ile ilişkili olduğu bilinen genleri kapsayan PZR temelli genetik tanı panelleri geliştirilmiş ve ortaya çıkan yüksek verinin yorumlanması için bir analiz akışı oluşturulmuştur.

Bulgular: Tasarlanan paneller ile toplam 112 hasta (PAY:64, AKİY:48) dizilenmiş ve AKİY hastalarının %58'i ve PAY hastalarının %14,2'sinde hastalık ile ilişkili varyantlar tespit edilmiştir. Tüm varyantlar Sanger dizileme ile doğrulanarak oluşturulan moleküler tanı panellerinin ve analiz algoritmasının doğruluğu kontrol edilmiştir.

Sonuç: Hedefe yönelik yeni nesil dizileme panellerinin hedeflenen bölgeye uygun olarak doğru yöntemle tasarlanması ve çıkan ham datanın doğru iş akışı ile analiz edilmesi panelin başarısını arttırmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Yeni nesil dizileme, varyant yorumlama, hedefe yönelik panel tasarımı

ABSTRACT

Objective: Next-generation sequencing technologies can generate an analysis of a large number of candidate genes, all the coding regions of a genome, or whole genomes with a high degree of accuracy and within a short amount of time. Targeted next generation sequencing systems have been found in many routine genetic diagnosis applications that allow the sequencing of only the candidate regions of the genome.

Materials and Methods: In this study, we designed PCR-based targeted next generation sequencing (NGS) panels for severe combined immunodeficiency (SCID) and primary antibody deficiency (PAD) and created an algorithm for analysing high-throughput data.

Results: We screened 112 patients (48 SCID and 64 PAD) and we detected genetic variations in 58% of the SCID and in 14.2% of the PAD patients. All variants were validated by Sanger sequencing to validate the accuracy of the NGS panel and analysis algorithm.

Conclusion: Designing targeted next generation sequencing panels with an appropriate method, in accordance with the targeted region, and analysing the raw data with a suitable workflow, increases the success of the panel.

Keywords: Next generation sequencing, variant annotation, targeted-ngs panel design

GİRİŞ

İnsan genom projesinin tamamlanmasından bu yana, genom dizileme teknolojileri hızla gelişmiş, maliyet azalmış ve daha uzun genomik bölgelerin dizilenmesini sağlayan yeni nesil dizileme (YND) teknolojileri ile olağanüstü ilerlemeler kaydedilmiştir (1,2). Yeni nesil dizileme teknolojileri sayesinde tüm genom, ekzom ve hedefe yönelik dizileme, epigenomik, RNA dizileme hatta tek hücre dizileme gibi birçok farklı alanda uygulama yapılabilmektedir (3). Son yıllarda yapılan yeni genom keşfi (de novo genome assembly), prenatal tanı, kanser ve virüs çalışmalarında, tek bir hücrenin genomunu amplifikasyon basamağı olmadan uzun okumalar yaparak dizileyebilen Tek Hücre Dizileme ya da diğer adıyla 3. Nesil Dizileme sistemleri (Pacbio ve Oxford Nanopore) oldukça sık kullanılmaktadır (4).

Yeni nesil dizileme sistemleri yöntemsel değişiklikler gösterse de temel olarak kütüphane hazırlanması, kütüphanenin işaretlenmesi ve tekrar çoğaltılması ("enrichment"), tüm kütüphanenin aynı anda dizilenmesi ve biyoinformatik araçlar ile bir referansa göre veya *de novo* olarak dizilenen parçaların tekrar birleştirilmesi basamaklarını takip eder (5). Yeni nesil dizileme yöntemleri sayesinde temel araştırma amaçlı oldukça büyük ve hızlı genomik bilgi elde edilmekle beraber, günümüzde bu sistemlerin klinik tanıda kullanımı da yaygınlaşmıştır. Bugün moleküller genetik uzmanlarının yanı sıra mikrobiyoloji, onkoloji, embriyoloji gibi birçok tıp dalında YND'nin farklı yaklaşımları kullanılmaktadır.

Hedefe yönelik yeni nesil dizileme ya da diğer bir adıyla amplikon dizileme (AD) genomda farklı lokuslardaki genlerin veya çok uzun bir genomik lokusa yayılmış bir genin, prob ya da primerler ile genomdan ayrılarak, sadece belirlenen hedef bölgenin birden fazla örnekte aynı anda dizilenmesi esasına dayanır. AD sayesinde aynı anda çok sayıda hasta örneği, yüksek hassasiyette ve tek seferde dizilenebilmektedir. Konvansiyonel Sanger dizilemenin aksine AD dizileme yönteminde her bir örneğin birden fazla kez dizilenmesi ("deep"=okuma derinliği) %1'den daha nadir gözlenen bir genetik değişimi bile yakalayabilmesine olanak sağladığından, bu yöntem tümör dokusu gibi

heterojen yapıya sahip dokulardaki farklı hücre klonlarının tespiti, hastalıkla ilişkili nadir alel bulma, HIV gibi virüslerin nadir varyantlarının tespiti veya evrim biyolojisi çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (6).

Genetik ve klinik heterojenitenin çok olduğu tek genli kalıtım gösteren hastalıklarda, hızlı genetik tanı için hedefe yönelik YND paneller oldukça sık kullanılmaktadır. Paneller hastalığın doğasına göre tek gen, birkaç gen, onlarca ya da yüzlerce genden oluşabilmektedir. Panel tasarımları panellerde taranan hastaların tanı başarısını doğrudan etkilemektedir. Rutin kullanıma uygun, maliyeti düşük ve analizi daha kolay panel tasarımları ticari olarak bir yarış haline gelmektedir. Panel tasarımlarında hastalık spesifik yaklaşımların kullanılması panel başarılarını artırmakta ve özellikle nadir çocukluk çağı hastalarının hızlı tanı alabilmesine ve tedavilerinin (kemik iliği nakli, replasman vb.) hızla planlanmasına yol açmaktadır (7).

Primer İmmün Yetersizlikler (PİY), immün sistemin gelişim ve fonksiyonel bozuklukları ile karakterize, çoğunlukla tek genli kalıtım gösteren fakat sorumlu 400'den fazla gen tanımlanmış hastalıklar grubudur (8). Primer immün yetersizlikler genetik ve klinik heterojenite gösteren bir hastalık grubu olduğu için hastaların çoğu erken dönemde teşhis edilememektedir. Moleküler tanı, hastalığın kesin tanısı ve tedavi seçeneklerinin belirlenmesi için gerekli en önemli faktörlerden biri olsa da hastalıkla ilişkili yüzlerce genin bildirilmiş olması bu süreci zorlaştırmaktadır. Genetik tanı ayrıca genetik danışma, prenatal tanı ve hastalığın ne kadar agresif seyredeceğinin önceden bilinmesine olanak verdiğinden büyük önem taşımaktadır (9,10).

Bu çalışmada primer immün yetersizlik hastalık modeli örneği ile karmaşık tek gen hastalıklarında hedefe yönelik yeni nesil dizileme yöntemi kullanılarak oluşturulan panel tasarımı, dikkat edilmesi gereken konular, analiz yaklaşımları ve tanı başarıları bildirilmektedir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Panel Genlerinin Seçimi

PİY'lerin iki önemli alt grubu olan ağır kombine immün yetmezlik (AKİY) ve primer antikor yet-

mezliği (PAY) için hastalığa özgü genetik tanı paneli tasarlanmıştır. Çalışmada geniş bir literatür ve veri tabanı taraması sonucu sıklıkla mutasyona uğrayan ve klinik ilişkileri kanıtlanmış genler üzerine yoğunlaşmıştır. Paneller için Avrupa Klinik İmmünoloji Derneğinin PİYlerin genetik altyapısında tanımladığı genler arasından AKİY hastalarına özgü hastalıkta en sık görülen 18 gen, PAY hastalarına özgü hastalarda en sık tanımlanan 22 adet gen seçilmiştir (11). Hedef genlerin tüm ekzonları, 5'UTR (UnTranslated Region- kodlamayan bölgeler), 3'UTR ve promotör bölgelerini kapsayacak şekilde primerler tasarlanmıştır. Primer dizaynı için hg38/GRCh38 referans genom dizisi kullanılarak firma tarafından çip tasarımına uygun olarak dizayn edilmiştir. Primer dizileri genomdaki lokasyonu ve özgünlüğü, CLC Genomics (CLC Genomics Workbench, QIAGEN) ve çevrimiçi bir program olan BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ile kontrol edilmiştir.

Hedef bölgelerin baz uzunluğu AKİY paneli için 167.092 baz çifti (bç), PAY paneli için ise 234.975 baz çifti olmuştur. AKİY paneli için belirlenen 18 aday gen, ortalama 386 baz çifti (en düşük 250 en yüksek 450 baz çifti) uzunluğundaki toplam 432 PZR ile PAY paneli için belirlenen 22 aday gen ise ortalama 423 baz çifti (en düşük 253 en yüksek 646 baz çifti) olmak

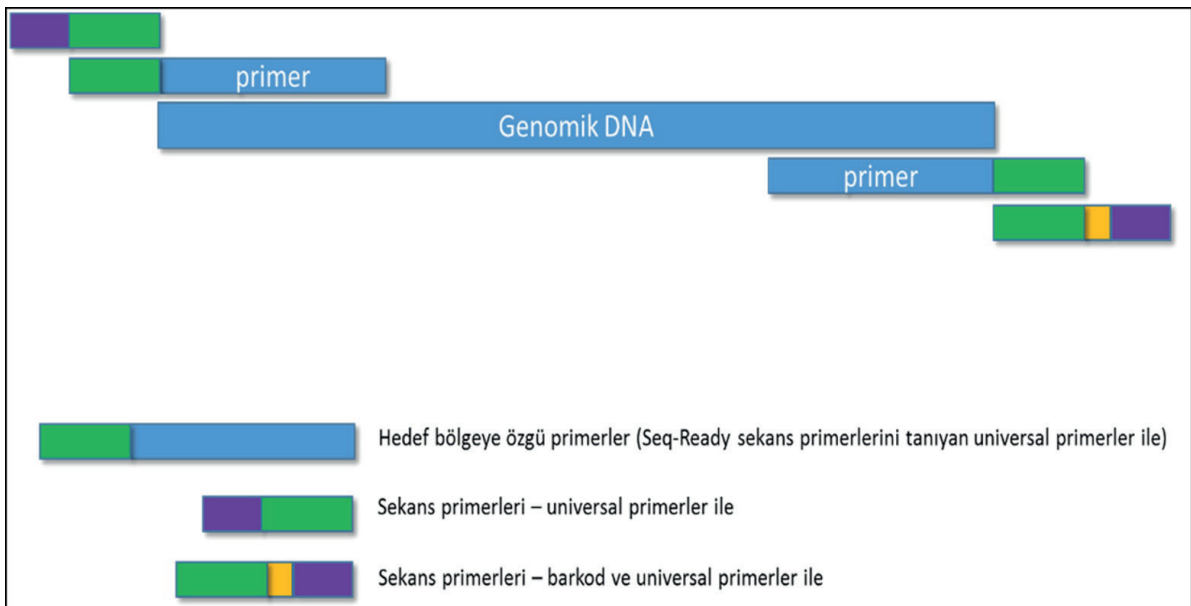
üzere toplam 555 PZR ile çoğaltılmıştır. Buna göre tasarlanan bir AKİY çipi ile aynı anda on iki, bir PAY çipi ile de sekiz hasta dizilenebilmiştir.

Amplikon Dizileme Yaklaşımının Seçilmesi

Tekrar eden genomik bölgeler (dizilemede büyük sorun yaratmaktadır) ve psödogen sorunlarını bertaraf etmek amacı ile PZR (polimeraz zincir reaksiyonu) temelli amplikon dizileme metodu tercih edilmiştir. Amplikon dizileme metodu için hedef genleri yaklaşık 250-600 baz uzunluğunda tek tek PZR'ler ile ("singleplex") çoğaltan Seq-Ready (Seq-Ready™ TE MultiSample Custom DNA Panels, Wafergen, CA, ABD) çipleri kullanılmıştır. Seq-Ready çiplerinin çalışma prensibi hedef bölgeleri her bir kuyu içerisinde sekans primerleri ve hastaya özgü atanmış barkodlar ile birleştirilmiş primerler ile çoğaltarak amplikon kütüphaneleri oluşturmaktır (Şekil 1). Kullandığımız çiplerin 5184 ayrı nano kuyudan oluşması aynı anda 5184 farklı PZR'nin yapılmasına imkan vermekte ve bu da birden fazla örneğe birden fazla PZR'nin yapılmasını sağlayan esnek bir tasarım oluşturmaktadır.

Yeni Nesil Amplikon Dizileme İş Akışı

Tasarlanan panellerinin başarılarını belirlemek için AKİY ve PAY şüphesi olan hastalarda YND



Şekil 1. PZR temelli (amplikon) hedefe yönelik yeni nesil dizileme yöntemi için primer tasarlama ve çalışma prensibi

gerçekleştirilmiştir. Yeni nesil dizilemede kullanılmak üzere amplicon kütüphanelerinin oluşturulması için öncelikle robotik sistemde çipteki her bir kuyuya DNA örneği ve barkodlu primer çiftleri eklenmiş ve bir kuyuda ayrı olarak PZR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Her bir primer çifti bir barkod taşıdığından amplifikasyon sonrası her hasta kendine ait bir barkod ile işaretli hale gelmektedir. Bu aşamadan sonra tüm ampliconlar tek bir tüpte toplanmış ve manyetik boncuklar kullanılarak kullanılmayan primerler ve PZR artıklarından temizlenmiştir. Manyetik boncuklar ile temizlenen amplicon kütüphanesinin Qubit florometre cihazı ile miktar tayini yapılmıştır (Qubit dsDNA HS Assay Kit, Thermo Fisher Scientific). Amplicon kütüphaneleri dizilemeye uygun hale getirildikten sonra illumina Miseq (Illumina, Kaliforniya, ABD) cihazında uygun dizileme protokolü kullanılarak dizilenmiştir. Çalışmamızda ampliconların uzunluğu 450-500 bp civarına kadar çıkabildiği için 500 dönümlü yapabildiği V2 kitleri kullanılmıştır. Dizileme sonunda 7.5-8.5 GB data elde edilmiş ve dizileme yaklaşık 40 saat sürmüştür.

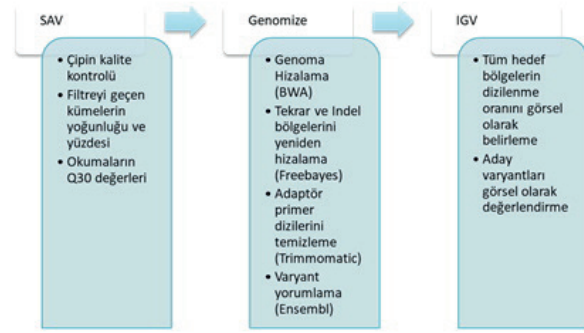
Kalite/Kontrol Değerlendirilmesi

Ham datanın kalitesi ve dizileme metriklerini incelemek amacı ile Illumina'nın geliştirdiği "Sequence Analysis Viewer"-SAV programı kullanılmıştır. Çip üzerindeki amplicon yoğunluğunu ortalama 900-1300 K/mm² aralığında olan, çipteki okumaların en az %80'inde Q30 değer skoru ile dizilenmiş olması ve çip üzerinde filtreyi geçen kümelerin (cluster passing filter) yüzdesinin %80 ve üzeri olan dizilemeler çalışmaya dahil edilmiştir.

Analiz İş Akışı ve Varyant Yorumlama

Miseq cihazından FASTQ formatında çıkan ham datanın kalite kontrolü yapıldıktan sonra Seq analiz programı (Genomize, İstanbul, Türkiye) ile ileri analizler yapılmıştır. Öncelikle Burrows-Wheeler Alignment (BWA) aracı ile ham datanın genomu hizalanması yapılmıştır (12). Panelin tüm tasarımları hg38'e göre yapılmış olduğundan genomu hizalama analizleri için hg38 genom versiyonu kullanılmıştır.

Genom hizalama işleminden sonra Freebayes ile varyantlar belirlenmiş, Trimmomatic ile adaptör primerlerin amplicon dizilerinden temizlenmesi işlemi yapılmıştır (13). Çoğaltılan bölgeler ve varyantları görsel olarak analiz etmek için IGV programı kullanılmıştır (14). Miseq cihazından alınan ham datadan varyantları belirlemeye kadar geçen tüm aşamalar özet olarak belirtilmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. Amplicon dizileme analizinde kullanılan programlar ve takip edilen iş akışı

Yeni nesil dizileme ile tespit edilen varyantların yorumlanması için SIFT (15), Polyphen (16), Variant effect predictor (VEP) (17), Mutation Taster (18), SNPeff (19), Gene splicer (20) ve CADD (Combined Annotation Dependent Depletion) (21) programları kullanılmıştır. dbSNP veritabanı (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>), 1000 Genom projesi örnekleri (<http://www.1000genomes.org/>), the Exome Variant Server (ESP) veritabanı (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), The Human Gene Mutation Database (HGMD) veritabanı (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>) ve the Exome Aggregation Consortium (ExAC) (<http://exac.broadinstitute.org/>) veritabanı varyantların frekans verisinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır.

BULGULAR

Tasarlanan paneller ile 48 AKİY ve 64 PAY şüphesi olan hastalar dizilenmiştir. AKİY ve PAY paneli çiplerinin kümelenme yoğunluğu ortalama 800-1200K/mm², filtreyi geçen küme yoğunluğu

ortalama %95 ve Q30 değerleri %80-90 aralığında görülmüştür. Tasarlanan YND panellerinde hedef genlerin tüm ekzonları, 5'UTR, 3'UTR bölgeleri ve ekzon-intron bağlantıları çalışmaya dahil edilmiştir.

AKİY panelinde tüm bölgelere primeri kapsayan primerler tasarlanmasına rağmen dizileme başarısı; hedef bölgelerde ortalama okuma kapsamı (coverage) %96,35, genlerin kodlayan bölgelerinin okuma kapsamı ise ortalama %97,89 olarak görülmüştür. Çalışmaya dahil edilen 18 aday genin 11'i yüksek kalitede dizilenirken *CORO1A* (ekzon 1, 2, 11), *ADA* (ekzon 1), *JAK3* (ekzon 1,13) ve *IL7R* (ekzon 7) bölgeleri hastalarda çoğaltılmamış ya da düşük güvenilirlikte tespit edilmiştir. *PRKDC*, *LIG4* ve *ZBTB24* genlerinin tüm kodlayan bölgeleri dizilenirken kodlama-yan bölgelerinde kaçırılan kısımlar olmuştur.

PAY panelinde ise tüm hedef bölgelerin ortalama okuma kapsamı %92,04 olarak görülmüşken, bu oran

kodlayan bölgelerde %92,96 olarak tespit edilmiştir. *TNFRSF12*, *CD19* ve *BTK* genlerindeki hedef bölgelerin tamamı dizilenmiş, *TNFRSF13C*, *CD40*, *AICDA*, *TCF3*, *TRNT1* ve *CD40L* genlerinin kodlamayan bölgelerinde dizilenmeyen bölgeler olsa da tüm kodlayan bölgeleri dizilenmiştir. Ayrıca *CR2* (ekzon 8,10 ve 11'in bir kısmı), *MS4A1* (ekzon 6), *PIK3R1* (ekzon 6,7), *TTC37* (ekzon 7,12), *CD79A* (ekzon 4), *BLNK* (ekzon 8,11), *NFKB2* (ekzon15 ve 18'in bir kısmı), *ICOS* (ekzon 2), *CD81* (ekzon 1,7), *UNG* (ekzon 7'nin bir kısmı), *IGLL1* (ekzon 2), *TNFRSF13B* (ekzon 4), *LRBA* (ekzon 10,17,31,33,48 ve 57) ve *CD79B* (ekzon 2) bölgeleri hastalarda dizilenememiş ya da düşük güvenilirlikte dizilenememiştir (Tablo 1).

Aday Varyantların Belirlenmesi

Varyantlar öncelikle güvenilirliklerine göre filtrelenmiş ve en az 20 okuma derinliği olan (20X), hete-

Tablo 1. Tasarlanan AKİY ve PAY panellerinin okuma derinliği analizleri

| Panel | Gen | Transkript | Cov (%) | Trans. cov (%) | Panel | Gen | Transkript | Cov (%) | Trans. cov (%) |
|------------|-----------|--------------|---------|----------------|-------------|----------|--------------|---------|----------------|
| Pay Paneli | TNFRSF12 | NM_003809 | 100 | 100 | Akiy Paneli | CD3E | NM_000733 | 100 | 100 |
| | CD19 | NM_001178098 | 100 | 100 | | NHEJ1 | NM_024782 | 100 | 100 |
| | BTK | NM_001287344 | 100 | 100 | | RAG2 | NM_000536 | 100 | 100 |
| | IGHM | | 100 | 100 | | CD3D | NM_000732 | 100 | 100 |
| | TNFRSF13C | NM_052945 | 99,89 | 100 | | RAG1 | NM_000448 | 100 | 100 |
| | CD40 | NM_001250 | 98,27 | 100 | | DCL-RE1C | NM_001033855 | 100 | 100 |
| | AICDA | NM_020661 | 94,98 | 100 | | PNP | NM_000270 | 100 | 100 |
| | TCF3 | NM_003200 | 93,89 | 100 | | CD247 | NM_198053 | 100 | 100 |
| | TRNT1 | NM_182916 | 88,57 | 100 | | PTPRC | NM_002838 | 100 | 100 |
| | CD40LG | NM_000074 | 82,99 | 100 | | AK2 | NM_001625 | 100 | 100 |
| | CR2 | NM_001006658 | 97,08 | 96,29 | | IL2RG | NM_000206 | 100 | 100 |
| | MS4A1 | NM_021950 | 96,84 | 96,18 | | PRKCD | NM_006254 | 87,64 | 100 |
| | PIK3R1 | NM_181523 | 92,83 | 95,79 | | ZBTB24 | NM_014797 | 97,51 | 100 |
| | TTC37 | NM_014639 | 89,61 | 92,63 | | LIG4 | NM_206937 | 98,74 | 100 |
| | CD79A | NM_001783 | 95,53 | 91,73 | | CORO1A | NM_001193333 | 73,24 | 85,55 |
| | BLNK | NM_013314 | 93,63 | 91,51 | | JAK3 | NM_000215 | 90,87 | 89,5 |
| | NFKB2 | NM_001077494 | 91,2 | 90,83 | | IL7R | NM_002185 | 96,99 | 89,95 |
| | CD81 | NM_004356 | 79,25 | 90,48 | | ADA | NM_000022 | 89,47 | 97,04 |
| | ICOS | NM_012092 | 91,55 | 89,43 | | | | | |
| | UNG | NM_080911 | 88,31 | 86,97 | | | | | |
| | IGLL1 | NM_020070 | 87,18 | 82,03 | | | | | |
| | TNFRSF13B | NM_012452 | 87,95 | 81,43 | | | | | |
| | LRBA | NM_006726 | 83,07 | 80,54 | | | | | |
| | CD79B | NM_001039933 | 84,5 | 72,38 | | | | | |

Kap: Kapsam, Trans Kap: Transkript Kapsamı

rozigot varyantlar için en az %20, homozigot varyantlar için ise en az %95 kapsamda görülen varyantlar yüksek güvenilirlikli varyantlar, bunun dışında kalan varyantlar ise düşük güvenilirlikli varyantlar olarak değerlendirilmiştir. İlk aşamada yüksek güvenilirlikli varyantlar analize dahil edilmiş fakat aday varyant bulunamayan hastalarda düşük güvenilirlikli varyantlar da Q30 skorlarına bakılarak analize dahil edilmiştir. İkinci aşama olarak, varyantlar öncelikle literatürdeki ve aynı dizileme panelinde dizilenen hastalar arasındaki alel frekanslarına göre değerlendirilmiş ve minör alel frekansı 0.05'in altındaki varyantlar ile analize devam edilmiştir. İkinci filtreleme işleminden sonra kalan varyantlar proteine etkisine göre tekrar değerlendirilmiş ve patojenik olduğu düşünülen varyantların hastanın kliniği ile uyumu araştırılmış ve genotip-fenotip ilişkisi uygun varyantlar aday varyant olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada takip edilen iş akışının özeti aşağıdaki şekilde gibidir (Şekil 3).



Şekil 3. Hastalığa sebep olan aday varyantları belirlemede kullanılan analiz iş akışı ve çevrimiçi programlar

Analizler sonucunda, AKİY paneli ile hastaların %58'inde, PAY paneli ile de hastaların %14,2'sinde hastalığa sebep olan varyantlar tespit edilmiş, Sanger dizileme ile varyantların doğruluğu gösterilmiştir. Panel ile bulunan varyantların 11 tanesi ilk defa bu çalışma ile gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Yeni nesil dizileme teknolojileri aynı anda birçok genin incelenmesine imkan verdiği için PİY gibi yüksek genetik heterojenite gösteren hastalık gruplarının kesin moleküler tanısı için sıklıkla tercih edilen güncel bir yaklaşımdır (7). Hedefe yönelik yeni nesil dizileme yöntemleri aday genlerin aynı anda

incelenmesine olanak veren, hızlı, analizi tüm genom yaklaşımlarına göre daha basit, maliyeti düşük ve güvenilir bir yöntemdir. PİY'lerde hedefe yönelik yeni nesil dizileme ile hastalarda kesin genetik tanıyı belirleme oranı hastalık spesifik panellerde %25-40 civarındadır (10, 22-26). Bu farklılık hastalığın etiolojisinde var olan heterojenite ile orantılı gözükmektedir. Bu çalışmada, aday genlere özgü primerler tasarlanarak, AKİY ve PAY özgü iki ana amplikon dizileme paneli geliştirilmiş ve tasarlanan paneller PİY şüphesi olan hastalarda valide edilmiştir.

AKİY paneli ile hastaların %58'inde hastalığa sebep olan varyantlar tespit edilmiştir. Panel ile bulunan varyantların sekiz tanesi ile defa bu çalışma ile gösterilmiştir (27-29). AKİYlerin monogenik arka planı diğer immün yetersizliklere oranla daha iyi karakterize edilmiş ve sorumlu genleri büyük ölçüde tanımlanmış bir hastalık grubudur. Bu nedenle tasarlanan panelin tanı başarısı %60 civarındadır. Literatürde AKİY hastalarında yapılan panel ya da ekzom dizileme çalışmalarında başarı oranları %90 hatta %100'lere kadar çıkabilmektedir. AKİY, diğer PİY gruplarına göre genetik altyapısı bilinen, genetik ve klinik açıdan tanımlanabilen bir gruptur, bizim panel başarımızın daha düşük olmasının sebebi kısıtlı gen sayısına bağlıdır. Ayrıca, AKİY hastaları için, panel sonrası yapılan tüm ekzom dizileme analizlerinde hastaların bir kısmında primer immün yetersizliğe yol açan genetik sendromların (Ataksi telenjipektazi ve FOXN1 eksikliği gibi) olduğu görülmesi tasarlanan genetik tanı panellerinin daha kapsamlı olması gerektiği savını doğrulamaktadır.

Primer antikor yetersizlikleri (PAY) paneli ile 64 yeni tanı hasta dizilenmiş, hastaların %14,2'inde hastalık ile ilişkili varyantlar tespit edilmiştir. Literatürde PAY hastalarındaki genetik tanı başarısının %2-10 seviyesinde olduğu düşünülürse, tasarladığımız genetik tanı paneli bu hastalar için uygun başarı oranını yakalamıştır. Fakat bu başarı oranları PAY için tasarlanan genetik tanı panellerinin hastalığın tanısında kullanılabilmesi için yeterli bir seviyede değildir. Her geçen gün sayıları artan hastalıkla ilişkilendirilmiş gen/varyasyon bulunmaktadır. Ancak hala çok sayıda genetik sebebi açıklanamamış PAY fenotipi

tipleri bulunmaktadır. Genetik etiolojinin tam çözümlenememiş olması panel başarılarını doğrudan etkilemektedir. İlave olarak Tablo 1’de yer aldığı gibi her iki panelde de tüm genleri %100 kapsamayan dizileme sonuçları bu bölgelerde var olan varyasyonların tanımlanamamasına ve düşük panel başarısına sebebiyet vermektedir.

Amplikon dizileme yönteminde doğru kütüphane hazırlama yöntemini belirlemek, çalışmanın kalitesi ve doğruluğunu da belirlemektedir. Prob tabanlı sistemlerde, kullanıcılar tek tek prob tasarlamak güç olduğu için problemler genellikle çevrimiçi programlar ile otomatik olarak tasarlanmakta ve çalışma başladıktan sonra amplifiye olmayan bölgelere tekrar prob tasarlamak mümkün olamamaktadır. Ayrıca problemler sistemlerde genomik tekrarlar belirlenememekte ve hedef bölgenin genomda psödogeni varsa problemler psödogen bölgelerinden kaçamamaktadır. PZR tabanlı metotlarda ise tasarlanan primer çiftlerini yenileyerek çok kolay optimizasyon yapılabilmekte ve hedef dizileme kalitesini arttırılabilmek mümkündür. Bunun yanında kopya sayısı değişiklikleri analizleri her zaman yapılamamaktadır. Ayrıca hedef bölgeler çoğaldıkça primer maliyeti ve optimizasyon güçlüğü yaşanabileceğinden, geniş panellerde (200-300 gen) prob tabanlı, ufak panellerde ise PZR tabanlı yaklaşımlar tercih edilmektedir (30). Hedef bölgelerin tekrar bölgeleri veya psödogenler ile ortak dizileri olduğu takdirde PZR ve prob kombinasyonu ile hazırlanan kütüphaneler de tercih edilmektedir (10).

Bu çalışmada PZR temelli bir YND panelinin tercih edilmesi tekrar bölgeler ve psödogenler açısından zengin olan immün sistem genlerinin doğru olarak dizilenebilmesi içindir. Hedef bölgelerin psödogenler ile ortak dizileri sadece kodlayan gen bölgesine özgün tasarlanan primer ile dışlanabilmiştir. Örnek vermek gerekirse AKİY panelinde bulunan *DCLRE1C* geninin moleküler analizleri psödogeni ile yüksek benzerlik göstermesi sebebiyle oldukça zordur (31). Çalışmamızda tespit edilen p.L187* varyantı genin psödogeni ile yüksek oranda benzerlik gösterdiği ekzon 8 bölgesinde yer almaktadır. Panel oluşturulduğunda tercih ettiğimiz amplikon dizileme metodu ile psödogen dizilerini hedeflemeyen primerler tasar-

lanmış ve kodlayan bölgedeki varyantları doğru tespit edebilmemiz mümkün olmuştur.

Bu çalışma ile ikinci olarak PİY’lerin genetik tanısında kullanılacak bir analiz algoritması oluşturulmuştur. Belirlenen iş akışı tüm tek gen hastalıklarının moleküler tanı sonucu ortaya çıkan varyantlarının yorumlanmasında kullanılacak bir akıştır. YNDnin ürettiği ham verinin yaklaşık %1,3’ünün yalancı negatiflikler olduğu bilinmektedir (32). Yalancı pozitiflik/negatifliklerin önüne geçilmesi için öncelikle aday varyantın ‘yüksek güvenilirlikte’ dizilenmiş olduğu kontrol edilmelidir. Yeni nesil verisi ile ortaya çıkan varyantların analizinde öncelikle aday varyantın kalite/kontrol parametrelerine göre en az 20 kere (20X) ve %99,9 (Q30) güvenilirlikle dizilenmiş olması çok büyük oranda yalancı negatiflik veya pozitiflik oranını düşürmek için bakılması gereken ilk parametrelerdendir. Bizim çalışmamızda aday tüm varyantlar Sanger dizileme ile tekrar doğrulanmıştır. Varyant yorumlamada ikinci aşama olarak minör alel frekansı (MAF) <0.01 olan varyantlar ile devam edilmiştir. Bugün patojenik varyantların frekanslarının %0,1’den küçük olduğu bilinmektedir (33). Varyantların frekansları literatürde düşük olsa da aday varyantın çalışmada aynı teknik ile dizilenen tüm hastalarda da frekansının düşük olması gerekmektedir. Zira olası PZR ve dizileme hataları yalancı pozitifliğe sebep olabilmektedir. Son olarak aday varyantın proteine etkisi araştırılmalı ve varyantın hastalık ile genotip-fenotip ilişkisini açıklıyor olması gereklidir.

SONUÇ

Sonuç olarak, zaman ve maliyet açısından en doğru yaklaşım öncelikle sık görüldüğü bildirilen genler açısından hastayı taramak ve sonrasında daha ileri tüm genom yaklaşımlarına geçmektir. Hedefe yönelik yeni nesil dizileme sistemleri bu amaçla etkin olarak kullanılacak bir yaklaşımdır ve pek çok rutin genetik tanı uygulamalarında yerini bulmuştur. Çok sayıda aday genin tek seferde ve kısa süre içerisinde analizini uygun fiyatla, yüksek hassasiyette ve güvenilir bir şekilde mümkün kılmaktadır. Fakat yYND ile ortaya çıkan verinin yorumlanması oldukça zordur. Bunun için hastanın öyküsü ve aile ağacı ayrıntılı alınarak

hastalığın kalıtım modeli doğru belirlenmeli, hastalığa uygun analiz iş akışı belirlendikten sonra moleküller tanı mutlaka ayrıntılı muayene, immünotipleme ve basit fonksiyonel testler ile desteklenmelidir.

Teşekkür: Çalışmaya dahil edilen hasta örneklerini sağlayan Doç. Dr. Selda Hançerli Torun, Prof. Dr. Elif Aydın, Doç. Dr. Ayca Kiykim, Prof. Dr. Yıldız Camcioglu, Prof. Dr. Safa Baris ve Prof. Dr. Ahmet Ozen'e, Çalışmaya bilimsel katkıları için Prof. Dr. Ugur Ozbek'e teşekkürlerimizi sunarız.

Acknowledgement: We would like to thank to Dr. Selda Hancerli Torun, Dr. Elif Aydin, Dr. Ayca Kiykim, Dr. Yıldız Camcioglu, Dr. Safa Baris and Dr. Ahmet Ozen for providing patient samples and thank Dr. Ugur Ozbek for his scientific contributions for the study.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- S.F., Y.Y.N. M.S., Ö.H.N.; Veri Toplama- S.F., Y.Y.N.; Veri Analizi/Yorumlama- S.F., M.S., Y.Y.N.; Yazı Taslağı- S.F., M.S.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- Y.Y.N., M.S., Ö.H.N.; Son Onay ve Sorumluluk- S.F., Ö.H.N., M.S., Y.Y.N.

Author Contributions: Conception/Design of Study- S.F., Y.Y.N. M.S., Ö.H.N.; Data Acquisition- S.F., Y.Y.N.; Data Analysis/Interpretation- S.F., M.S., Y.Y.N.; Drafting Manuscript- S.F., M.S.; Critical Revision of Manuscript- Y.Y.N., M.S., Ö.H.N.; Final Approval and Accountability- S.F., Ö.H.N., M.S., Y.Y.N.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Finansal Destek: Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje numarası: 52575 ve 20499) ve İstanbul Bilgi Üniversitesi araştırma fonu (NGYY-2018.01.0006) tarafından desteklenmiştir.

Financial Disclosure: This project was supported by Istanbul University Research Fund (Project no: 52575 and project no: 20499) and Istanbul Bilgi University Research Fund (NGYY-2018.01.0006).

KAYNAKLAR/REFERENCES

1. Goodwin S, JD, McPherson, WR McCombie. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet* 2016; 17(6):333-51.
2. Shendure J, H Ji. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol*, 2008; 26(10):1135-45.
3. Mardis ER. DNA sequencing technologies: 2006-2016. *Nat Protoc* 2017; 12(2):213-8.
4. Giani AM, Gallo L GR. Gianfranceschi G. Formenti, Long walk to genomics: History and current approaches to genome sequencing and assembly. *Comput Struct Biotechnol J* 2020; 18:9-19.
5. Pettersson E, Lundeberg J, Ahmadian A. Generations of sequencing technologies. *Genomics* 2009; 93(2):105-11.
6. Cifaldi C, Brigida I, Barzaghi F, Zoccolillo M, Ferradini V, Petricone D et al. Targeted NGS Platforms for Genetic Screening and Gene Discovery in Primary Immunodeficiencies. *Front Immunol* 2019;10:316.
7. Raje N S, Soden D, Swanson CE, Ciaccio SE, Kingsmore DL, Dinwiddie. Utility of next generation sequencing in clinical primary immunodeficiencies. *Curr Allergy Asthma Rep* 2014; 14(10):468.
8. Notarangelo LD. Primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125(2 Suppl 2):S182-94.
9. Parvaneh N, Casanova JL, Notarangelo LD, Conley ME. Primary immunodeficiencies: a rapidly evolving story. *J Allergy Clin Immunol* 2013; 131(2):314-23.
10. Stoddard JL, Niemela JE, Fleisher TA, Rosenzweig SD. Targeted NGS: A Cost-Effective Approach to Molecular Diagnosis of PIDs. *Front Immunol* 2014;5:531.
11. Al-Herz, Bousfiha WA, Casanova JL, Chatila T, Conley ME, Cunningham-Rundles C, et al. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. *Front Immunol* 2014; 5:162.
12. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 2009; 25(14):1754-60.

13. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 2014; 30(15):2114-20.
14. Robinson JT, Thorvaldsdottir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, et al. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* 2011; 29(1):24-6.
15. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc* 2009; 4(7):1073-81.
16. Adzhubei IA, Schmidt S, L. Peshkin, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 2010; 7(4):248-9.
17. McLaren W, Gil L, Hunt SE, Riat HS, Ritchie GR, Thormann A, et al. The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol* 2016; 17(1):122.
18. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods* 2014; 11(4):361-2.
19. Cingolani P, Platts A, Wang le L, Coon M, Nguyen T, Wang L, et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)* 2012; 6(2):80-92.
20. Pertea M, Lin X, Salzberg SL. GeneSplicer: a new computational method for splice site prediction. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(5):1185-90.
21. Kircher M, Witten DM, Jain P, O'Roak BJ, Cooper GM, Shendure J. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet* 2014; 46(3):310-5.
22. Nijman IJ, Montfrans JM van, Hoogstraat M, Boes ML, van de Corput L, Renner ED, et al. Targeted next-generation sequencing: a novel diagnostic tool for primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133(2):529-34.
23. Al-Mousa H, Abouelhoda M, Monies DM, Al-Tassan N, Al-Ghoniaim A, Al-Saud B, et al. Unbiased targeted next-generation sequencing molecular approach for primary immunodeficiency diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2016; 137(6):1780-7.
24. Yu H, Zhang VW, Stray-Pedersen A, Hanson IC, Forbes LR, de la Morena MT, et al. Rapid molecular diagnostics of severe primary immunodeficiency determined by using targeted next-generation sequencing. *J Allergy Clin Immunol* 2016; 138(4):1142-1151 e2.
25. Fang M, Abolhassani H, Lim CK, Zhang J, Hammarstrom L. Next Generation Sequencing Data Analysis in Primary Immunodeficiency Disorders - Future Directions. *J Clin Immunol* 2016; 36 Suppl 1:68-75.
26. Erman B, Bilic I, Hirschmugl T, Salzer E, Boztug H, Sanal O, et al. Investigation of Genetic Defects in Severe Combined Immunodeficiency Patients from Turkey by Targeted Sequencing. *Scand J Immunol* 2017; 85(3):227-34.
27. Firtina S, Yin Ng Y, Hatirnaz Ng O, Kiykim A, Aydiner E, Nepesov S, et al. Mutational landscape of severe combined immunodeficiency patients from Turkey. *Int J Immunogenet* 2020;00:1-10.
28. Firtina S, Ng YY, Ng OH, Nepesov S, Yesilbas O, Kilercik M, et al. A novel pathogenic frameshift variant of CD3E gene in two T-B+ NK+ SCID patients from Turkey. *Immunogenetics* 2017; 69: 653-9.
29. Firtina S, Cipe F, Ng YY, Kiykim A, Ng OH, Sudutan T, et al. A Novel FOXP1 Variant Is Identified in Two Siblings with Nude Severe Combined Immunodeficiency. *J Clin Immunol* 2019; 39(2):144-147.
30. Mamanova L, Coffey AJ, Scott CE, Kozarewa I, Turner EH, Kumar A, et al. Target-enrichment strategies for next-generation sequencing. *Nat Methods* 2010; 7(2):111-8.
31. Pannicke U, Honig M, Schulze I, Rohr J, Heinz GA, Braun S, et al. The most frequent DCLRE1C (ARTEMIS) mutations are based on homologous recombination events. *Hum Mutat* 2010; 31(2):197-207.
32. Mu W, Lu HM, Chen J, Li S, Elliott AM. Sanger Confirmation Is Required to Achieve Optimal Sensitivity and Specificity in Next-Generation Sequencing Panel Testing. *J Mol Diagn* 2016; 18(6):923-32.
33. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 2016; 536(7616):285-91.



Non-amiloidojenik Transtiretin Gen Varyantlarının Biyoinformatik Analizi ve His90Asn Varyantının Klinik Önemi

Bioinformatic Analysis of Non-Amyloidogenic Transthyretin Gene Variants and Clinical Importance of His90Asn Variant

Evrım Kömürcü Bayrak^{1,2}, Gizem Çelebi¹, Elif Eroğlu³, Gökhan Kahveci⁴, Fatih Bayrak³

ÖZ

Amaç: Transtiretin (TTR) amiloidozu, otozomal dominant kalıtmımlı değişken penetransa sahip bir hastalıktır. TTR genindeki patojenik varyantlar, TTR proteininin yanlış katlanmasına yol açarak kardiyomiyositlerde birikime ve kalp yetmezliğine sebep olabilmektedir. Bu çalışmada, biventriküler konsantrik hipertrofi olan hastada TTR geninde saptanan His90Asn (H90N) varyantının hastalık patogenezinin etkisinin ve non-amiloidojenik varyantlarının biyoinformatik analizlerle klinik önemlerinin belirlenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: İndeks vaka, 18 yıl kardiyolojik açıdan takip edildi ve Illumina TruSight Kardiyomiyopati paneli kapsamında 46 genin ekzonik bölgelerindeki varyantlar araştırıldı. TTR geninde H90N varyantı saptanan vakadan klinik olarak amiloidoz şüphesi ile rektal biopsi örneği alındı. Bu varyant, Sanger dizileme yöntemi ile konfirme edildi.

Bulgular: Onbir yıl önce tanı alan ve ICD implante edilen 32 yaşındaki bir erkek vakada TTR geninin ekzon 3'ünde H90N varyantı heterozigot olarak belirlendi. İndeks vaka, kardiyak amiloidoz açısından değerlendirildiğinde, progresif sistolik disfonksiyona sahip olduğu (sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu, 2013'te %60, 2016'da %35 ve 2017'de %20) ve amiloidoz ile uyumlu epikardiyal ve endokardiyal tabakalarda global longitudinal strain (GLS) skoru ve strain rate değerinin azaldığı belirlendi. Rektal biyopsisinde kongo kırmızısı boyamasında amiloid birikimi gözlenmedi. Bu varyant, asemptomatik olan babasında da tespit edildi. İlk defa bu çalışmada, TTR genindeki non-amiloidojenik aminoasit değişimine neden olan tüm varyantlar biyoinformatik analizlerle karşılaştırıldı.

Sonuç: Bu çalışmada, H90N varyantının infiltratif miyokard hastalığındaki patojenik etkisi kanıtlanamamış olsada TTR genindeki H90N varyantı gibi non-amiloidojenik varyantların klinik değerlendirmede dikkate alınması gerektiği ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Kardiyak amiloidoz, transtiretin, His90Asn varyantı

ABSTRACT

Objective: Transthyretin (TTR) amyloidosis is an autosomal dominant inherited disease with variable penetration. Cardiac deposition of misfolded TTR protein due to missense pathogenic variants causes heart failure. Our aim was to determine the effect of the TTR gene His90Asn (H90N) variant on the pathogenesis of disease in a patient with biventricular concentric hypertrophy, and the clinical significance of variants defined as non-amyloidogenic with bioinformatic analysis.

Materials and Methods: The index case was followed cardiologically for 18 years and pathogenic variants were investigated in the exonic regions of 46 genes using the Illumina TruSight Cardiomyopathy panel. Rectal biopsy specimen was taken from a case where the H90N variant was detected in the TTR gene, with clinical suspicion of amyloidosis. This variant was confirmed by the Sanger sequencing method.

Results: Heterozygote H90N variant was determined in exon3 of the TTR gene in index case of a 32-year-old man with severe heart failure who was diagnosed 11 years ago and implanted with an ICD. He had progressive systolic dysfunction (left ventricular ejection fraction, 60% in 2013, 35% in 2016, and 20% in 2017). GLS score and strain rate were reduced in the epicardial and endocardial layers compatible with amyloidosis in the patient.

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

² İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

³ Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Kardiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

⁴ İstanbul Kartal Koşuyolu Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kardiyoloji Kliniği, İstanbul, Türkiye

ORCID: E.K.B. 0000-0003-1271-1208;

G.Ç. 0000-0002-7129-3045;

E.E. 0000-0001-6700-9390;

G.K. 0000-0001-8367-6505;

F.B. 0000-0002-1574-1085

Corresponding author/Sorumlu yazar:

Evrım Kömürcü Bayrak,

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

E-mail: ebayrak@istanbul.edu.tr

Submitted/Başvuru: 16.09.2020

Accepted/Kabul: 13.10.2020

Citation/Atf: Kömürcü Bayrak E, Çelebi G, Eroğlu E, Kahveci G, Bayrak F. Bioinformatic Analysis of Non-Amyloidogenic Transthyretin Gene Variants and Clinical Importance of His90Asn Variant. Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi 2020; 3(3): 102-113.

<https://doi.org/10.26650/JARHS2020-795625>



In congo red staining of rectal biopsy, amyloid deposition was not observed. This variant was detected also in the patient's father, who did not have clinical symptoms. For the first time in this study, all variants that cause non-amyloidogenic amino acid substitutions in the *TTR* gene were compared with bioinformatics analyzes.

Conclusion: In this study, although the pathogenic effect of the H90N variant in infiltrative myocardial disease was not proven, it was revealed that non-amyloidogenic variants such as the H90N variant in the *TTR* gene should be considered in clinical evaluation.

Keywords: Cardiac amyloidosis, transthyretin, His90Asn variant

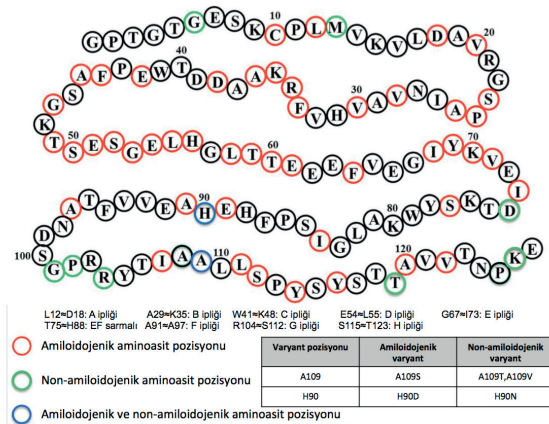
GİRİŞ

İlk kez 150 yıl önce keşfedilmiş olan geniş bir protein katlanma hastalık grubu olan amiloidozlara sebep olan amiloid agregatları, β -kırımlı tabaka yapısında sert, çözünmeyen (insolubl), dallanmayan fibriler yapıya sahiptir (1). Şimdiye kadar insanlarda *in vivo* olarak yaklaşık 36 farklı prekürsör proteinin amiloid agregatları oluşturarak amiloidoza sebep olduğu belirlenmiştir (2). Bu proteinlerden atriyal natriüretik faktör amiloidozu (AANF) kalpte atriyumlara lokalizedir, sistemik olarak ise çoğunlukla böbrek, sinir sistemi, gastrointestinal sistem, dalak ve yumuşak dokular ile birlikte kalpte de amiloid fibrilleri olarak biriken fibrinojen alfa zincir (AFib), apolipoprotein AIV (AApoAIV), apolipoprotein AII (AApoAII), serum amiloid A (AA), immunoglobulin ağır zinciri (AH), immunoglobulin hafif zinciri (AL) ve transtiretin (ATTR) prekürsörleri, kalıtsal veya edinsel tipte amiloidozlara sebep olmaktadır (3). Kardiyak amiloidozlar, sonuç olarak oldukça heterojen bir etiopatogeneze ve kliniğe sahiptir ve çoğunlukla kardiyoloji, nefroloji, nöroloji, hematoloji, radyoloji, genetik ve patolojiyi ilgilendiren multidisipliner yaklaşımlar ile tanının konulabildiği hastalık grubudur.

Transtiretin (TTR) ilişkili amiloidozlar (ATTR), mutant formdaki transtiretin proteini sebebiyle oluşan ailesel ATTRv (amiloid TTR varyantı) ile doğal-tip transtiretin proteini sebebiyle oluşan edinsel veya senil ATTRdt olarak gruplandırılmaktadır (3). ATTRdt, çoğunlukla sadece kalbi etkilerken bazen yumuşak doku tutulumu ile bilateral karpal tünel sendromu, biseps tendon rüptürü ve spinal stenoza da sebep olmaktadır. ATTRv'nin ise kardiyak tutulumu yanı sıra sıklıkla kalıtsal sensör ve motor sinir küçük lif polinöropatisi meydana gelir. TTR ilişkili kardiyak amiloidozun klinik seyri, transtiretin fibrilinin doğal veya mutant formda olmasına, hastalığın başlangıç yaşına ve spesifik patojenik varyantlara göre değişmektedir (4).

TTR (prealbümin olarak da adlandırılan) proteini, karaciğer, koroid pleksus ve retinal pigment epitelinde sentezlenir, 147 aminositlik primer polipeptidten ilk 20 aminositlik sinyal peptid çıkarılır ve kalan 127 aminoasitten oluşan 14 kDa'lık monomerin iki boyutlu yapısında, bir alfa sarmal

(EF sarmalı) ve 8 beta iplik bulunur (5) (Şekil 1). Plazmada dördüncül formdaki homo-tetramer yapıda, birincil olarak retinolün (Vitamin A) minor olarak tiroksinin (T4) taşınmasından sorumludur. Yaşlanma veya TTR gen varyantları sebebiyle, TTR proteininin tetramer yapısının monomere ayrılacak şekilde tekrar yanlış katlanmalarla oligomer veya fibril yapılarının oluşmasına bağlı olarak, dokularda amiloid fibril birikimi sonucu organ disfonksiyonu meydana gelmektedir (5). TTR genindeki patojenik varyantlar nedeniyle oluşan amiloidozlar (ATTRv), ailesel amiloid polinöropati (FAP) veya ailesel amiloid kardiyomyopati (FAC) veya her ikisine birden neden olabilmektedir (6). Günümüzde insan genom mutasyon veri bankasında (HGMD), TTR geninde 198 adet varyant listelenmektedir ve bunların 191 tanesi aminoasit değişimine neden olan tek nükleotid varyantlarıdır (SNV). Bunlar arasında, amiloid fibrilleri oluşturmayıp ancak *in vivo* fonksiyonel anormalliklere neden olabilen (7) ve non-amiloidojenik olarak gruplandırılan varyantlar da mevcuttur (5). Bu varyantların, farklı popülasyonlarda allel frekansları değişkendir ve özellikle amiloidojenik varyantlar ile birlikte birleşik heterozigositeye sahip olup klinik tabloya ve semptomların şiddetine etki etmektedir (7). Şekil 1'de gösterildiği gibi 127 aminoasitlik matür polipeptid dizisinde 109. pozisyondaki Alanin, amiloidojenik varyant olarak Serine (A109S) değişerek geç başlangıçlı, sensör-motor polinöropatisine neden olurken (8), non-amiloidojenik varyantlar olarak Treonin (A109T) veya



Şekil 1. TTR polipeptidinde amiloidozlarla ilişkili varyantlar ve pozisyonları (7, 10)

Valin'e (A109V) değiştiğinde dominant kalıtlı ötiroid hipertiroksinemiye neden olmaktadır (9). Matür polipeptidde 90. Pozisyondaki Histidin, Aspartat'a değiştiğinde (H90D) amiloidojenik varyant olarak geç başlangıçlı FAP'a (10) sebep olurken Asparajin'e değiştiğinde (H90N) non-amiloidojenik varyant olarak tanımlanmaktadır (7,10).

Bu çalışmada, kardiyoloji tarafından 18 yıl takip edilmiş ileri biventriküler konsantrik hipertrofi erkek hastada *TTR* geninde saptanan H90N varyantının hastalık patogenezinin etkisinin ve diğer muhtemel non-amiloidojenik varyantların biyoinformatik analizlerle klinik önemlerinin belirlenmesi amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Vaka Seçimi ve Genetik Analizi

Bu çalışma kapsamında yapılan genetik araştırma, İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurul onayı ile gerçekleştirildi ve katılımcılardan çalışma hakkında bilgilendirme sonrasında onam alındı. İndeks vakasının kardiyolojik değerlendirmeler ve takibi, 16 yaşından 34 yaşında eksitus oluncaya kadar devam etti. Kardiyolojik değerlendirmeler, fizik muayene, elektrokardiyografik ve ekokardiyografik olarak yapıldı.

16 yaşında iken hipertofik kardiyomiyopati (HKM) olarak değerlendirilen indeks vaka 28 yaşında iken kendisinden ve ebeveynlerinden EDTA'lı tüplere 10 ml periferik kan alındı. Periferik kandan ayrıştırılan lökositlerinden standart tuzla çöktürme yöntemi ile genomik DNA örnekleri izole edildi. DNA örneklerinin konsantrasyonları nanodrop cihazında ölçüldü. İndeks vakada, kardiyomiyopati ile ilişkili 46 genin ekzonik bölgelerindeki (Illumina TruSight kardiyomiyopati paneli, www.illumina.com/trusight) değişimler, yeni nesil dizileme (YND) platformu ve protokolleri (Illumina MiSeq, U.S.) kullanılarak hizmet alımı şeklinde MiSeq Reporter yazılımı ile araştırıldı. Elde edilen vcf (variant call format) dosyaları incelenerek varyantların hastalıkla ilişkileri değerlendirildi. İndeks vakada, *TTR* geninde heterozigot olarak belirlenen His90Asn (H90N, His110Asn, H110N) varyantının konfirmasyonu ve aile segregasyon analizi için ebeveynlerinin genotiplenmeleri, *TTR* geni 3. ekzonu daha önce tarif edilen yöntemdeki gibi

(11) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Sanger dizileme ile yapıldı.

Biyoinformatik Analizler

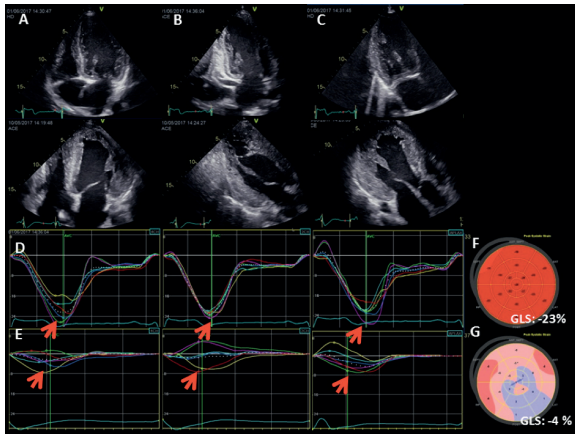
YND yöntemi ile tanımlanan varyantlar, varyant yazılımı (VariantStudio) ile gen transkriptindeki lokalizasyonları ve amino asit substitüsyonları belirlendi. Varyant minimum allel frekansları (MAF: %5 altı), dominant kalıtım modeli ve ekzonik pozisyonuna göre filtrelemeler yapılarak varyant listesi incelendi. İndeks vakada, potansiyel olarak hastalık sebebi olarak, *TTR* genindeki H90N aminoasit değişimine sebep olan c.328C>A varyantı heterozigot olarak belirlendi. Bu varyant ile birlikte *TTR* genindeki diğer non-amiloidojenik varyantlar, varyant dizilerinin yorumlamasında kullanılan ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) sınıflaması (12) ve DANN, MutationTaster, FATHMM, SIFT, PROVEAN, PrimateAI ve GERP araçları kullanılarak elde edilen *in silico* analiz sonuçları için VarSome (<https://varsome.com/>) veritabanında, popülasyonlardaki allel sıklıkları (ExAc, erişime açık data) için dbSNP veritabanında (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>), ATTRv ile ilişkileri için HGMD (Human Genome Mutation Database; BIOBASE, <https://portal.biobase-international.com/cgi-bin/portal/login.cgi>) mutasyon veritabanında araştırıldı.

BULGULAR

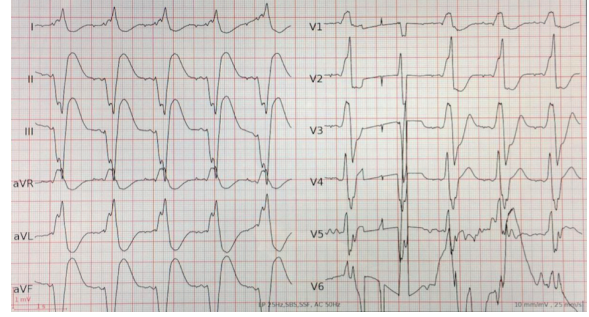
Hasta Hikayesi ve Klinik Değerlendirme

2001 yılında 16 yaşında iken ilk kardiyolojik değerlendirmelerinde hipertrofik kardiyomiyopati tanısı olarak takip edilen erkek hastaya 5 yıl sonra, tam atriyoventriküler blok sebebi ile DDD kalp pili implantasyonu uygulaması yapıldı. Kardiyoloji takipleri düzenli devam eden hastanın 2013 yılında yapılan ekokardiyografik incelemesinde, ejeksiyon fraksiyonu (EF) %60, sol ve sağ ventrikül konsantrik hipertrofisi izlendi, interventriküler septum (ivs): 3.3 cm, posterior duvar kalınlığı (pdk): 2.4 cm, mitral yetersizliği 1. seviye olarak değerlendirildi ve lead ekstraksiyonu ile ICD (kardiyak defibrilatör) implantasyonu yapıldı. 2014 yılındaki kontrollerinde, EF %40 ve biventriküler hipertrofisi olduğu gözlemlendi. 2016

ylındaki kontrollerinde ise EF %35, ivs:3.1 cm, pdk:2.1 cm olarak belirlendi ve CRT-D upgrade işlemi için yeni sol ventrikül lead implantasyonu yapıldı. Bu işleminden 5 ay sonra "atriyal flutter" bulgusu sebebi ile intrakardiyak kardiyoversiyon, 4 ay sonrasında ventriküler taşikardi için uygun ICD şoklaması ortaya çıktı. 32 yaşında EF'si %20, biventrikular hipertrofi and sol ventrikül dilatasyonu gözlemlenen hastadan amiloidoz şüphesi ile rektal biopsi (0.2 cm çapında 4 doku parçası incelenmiş) uygulaması yapıldı ve histopatolojik olarak kongo kırmızısı boyaması ile incelenen dokularda amiloid birikimi saptanmadı. Ancak ekokardiyografik bulguları, Şekil 2'de gösterildiği gibi kardiyak amiloidoz şüphesini doğrulamaktadır. İndeks vaka 32,5 yaşında iken EKG bulguları Şekil 3'de izlenmektedir. EKG bulguları atriyumdan ve takiben ventrikülden yapılan pil ritmi ile uyumludur. QRS ileri derecede genişlemiştir (320 msn). Aynı zamanda vakada, kısa süreli kooperasyon bozulması ve konuşma bozukluğu gelişmesi sebebi ile nörolojik olarak değerlendirildiğinde kontrastsız kaniyal BT sonucunda, belirgin kanama veya patolojik bulgu saptanmadı, karotid ve vertebral arterlerin renkli doppler ultrasonografik incelemesi normal sınırlarda bulundu. Bi-



Şekil 2. Sağlıklı kontrol bireyinde Global longitudinal strain (GLS) analizi (üst panel) ve amiloidoz hastasında GLS analiz (alt panel). Strain ölçümleri apikal 4 boşluk (A), 3 boşluk (B), ve 2 boşluk (C) görüntülerinden elde edilmiştir. Pik sistolik strain aortik kapak kapanmasından önceki en negatif değer olarak saptanmıştır (D, E; oklar). GLS, 3 apikal görüntüden elde edilen ortalama pik sistolik strain olarak tanımlanmıştır. 18 segmetli sol ventrikül strain grafikleri izlenmektedir (F, G). Kontrol bireyde normal GLS (-23 %) ve amiloidozlu hastada ciddi azalmış GLS (-4 %) değerleri izlenmiştir



Şekil 3. İndeks vakanın 32,5 yaşındaki elektrokardiyografi görüntüsü

yokimyasal kan parametreleri, serumda serbest tiroksin (FT4) 25,52 pmol/L (referans değerleri; 11,5-22,7) olarak arttığı, tiroid stimulan hormon (TSH) 3.92 uIU/mL (referans değerleri; 0,25-4,55) olarak normal aralıkta olduğu belirlendi. 1 hafta sonra tekrarlanan ölçümlerde serbest tiroksin (FT4) 29,04 pmol/L (referans değerleri; 11,5-22,7) olarak arttığı, tiroid stimulan hormon (TSH) 1.61 uIU/mL (referans değerleri; 0,25-4,55), serbest triiodotironin (FT3) 3.91 pmol/L (referans değerleri; 3.5-6.5) olarak normal aralıkta olduğu belirlendi. Hasta, 34 yaşında ciddi kalp yetmezliği ve pompa yetersizliği sebebiyle eksitus olduğunda, kardiyak amiloidozu histopatolojik olarak incelenemedi. Hastanın klinik takip aşamaları Tablo 1'de özetlenmektedir.

İncelenen Illumina TruSight kardiyomiyopati gen paneli bölgeleri %98 oranında dizilenmiş olup indeks vakada 97 varyant tespit edildi ve filtrelemeler ardından aminoasit değişimine sebep olan ve klinik önemi belirsiz *TTR* geninde H90N varyantı heterozigot olarak tespit edildi. *TTR* genindeki H90N varyantı için yapılan aile segragasyonu incelemesinde, klinik bulguları olmayan babanın taşıyıcı olduğu tespit edildi. Şekil 4'de Sanger dizileme sonucu gösterilmektedir.

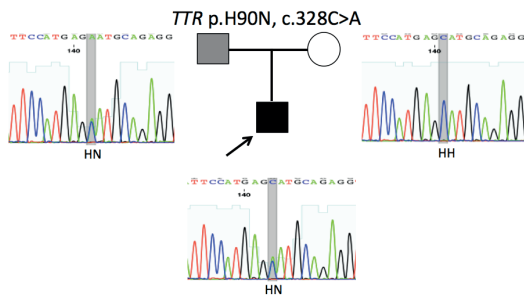
H90N ve Non-amiloidojenik Varyantların Biyoinformatik Değerlendirmesi

Literatürde *TTR* geninde non-amiloidojenik olarak gruplandırılmış 12 farklı yanlış anlamlı (missens) varyant mevcuttur. Amiloidojenik olarak sınıflandırılan H90D ve A109S varyantları ile aynı pozisyondaki non-amiloidojenik varyantlar birlikte biyoinformatik analizlerle incelendi. Toplam 14 adet varyant, Şekil 5'de gösterildiği gibi açık erişimli veribankaları

Tablo 1. İndeks vakanın klinik bulguları

| Takip Dönemleri | Bulgular | Klinik Operasyonlar |
|--------------------|--|---|
| 2001 | HCM (hipertrofik kardiomyopati) tanısı | |
| 2006 | Tam atriyoventriküler blok | DDD Kalp Pili implantasyonu |
| 2013 | Ekokardiyografi: EF: %60, lv ve rv konsantrik hipertrofi, ivs:3.3, pdk: 2.4, my: 1. seviye | Lead extraction ICD değişimi |
| 2014 | EF: %40, biventriküler hipertrofi | |
| 2016 Mart ve Nisan | EF: %35, ivs: 3.1, pw: 2.1 | CRT yükseltme, lead revizyonu |
| 2016 Temmuz | atriyal flutter | Intrakardiyak kardiyoversiyon |
| 2016 Kasım | Uygun ICD şoku | VT kardiyoversiyon |
| 2017 | EF: %20, biventriküler hipertrofi ve lv dilatasyon | Rektal Biyopsi (Kongo kırmızısı boyaması): amiloid birikimi negatif |
| 2019 | İleri kalp yetmezliği ile eksitus | |

EF: Ejeksiyon fraksiyonu, lv: sol ventrikül, rv: sağ ventrikül, ivs: intraventriküler septum, pdk: diyastolik posterior duvar kalınlığı, my: mitral yetersizliği, ICD: implante edilebilir kardiyoverter defibrilatör



Şekil 4. TTR p.H90N (c.328C>A) varyantının aile segregasyonu. Ok, indeks vakayı, gri kare, asemptomatik taşıyıcı babayı göstermektedir

ve biyoinformatik araçlar kullanılarak *in silico* analizlerle karşılaştırıldı. Şekil 5'de, sinyal peptid (20 aminositlik) çıkartıldıktan sonra oluşan matür polipeptiddeki pozisyonları, referans transkriptteki nükleotid pozisyonları dikkate alınarak, HGMD'de ve dbSNP veritabanlarında daha önce tanımlanmış olanların kodları belirtildi. Ayrıca her bir varyantın, ACMG sınıflamasına göre belirlenen klinik önemle-

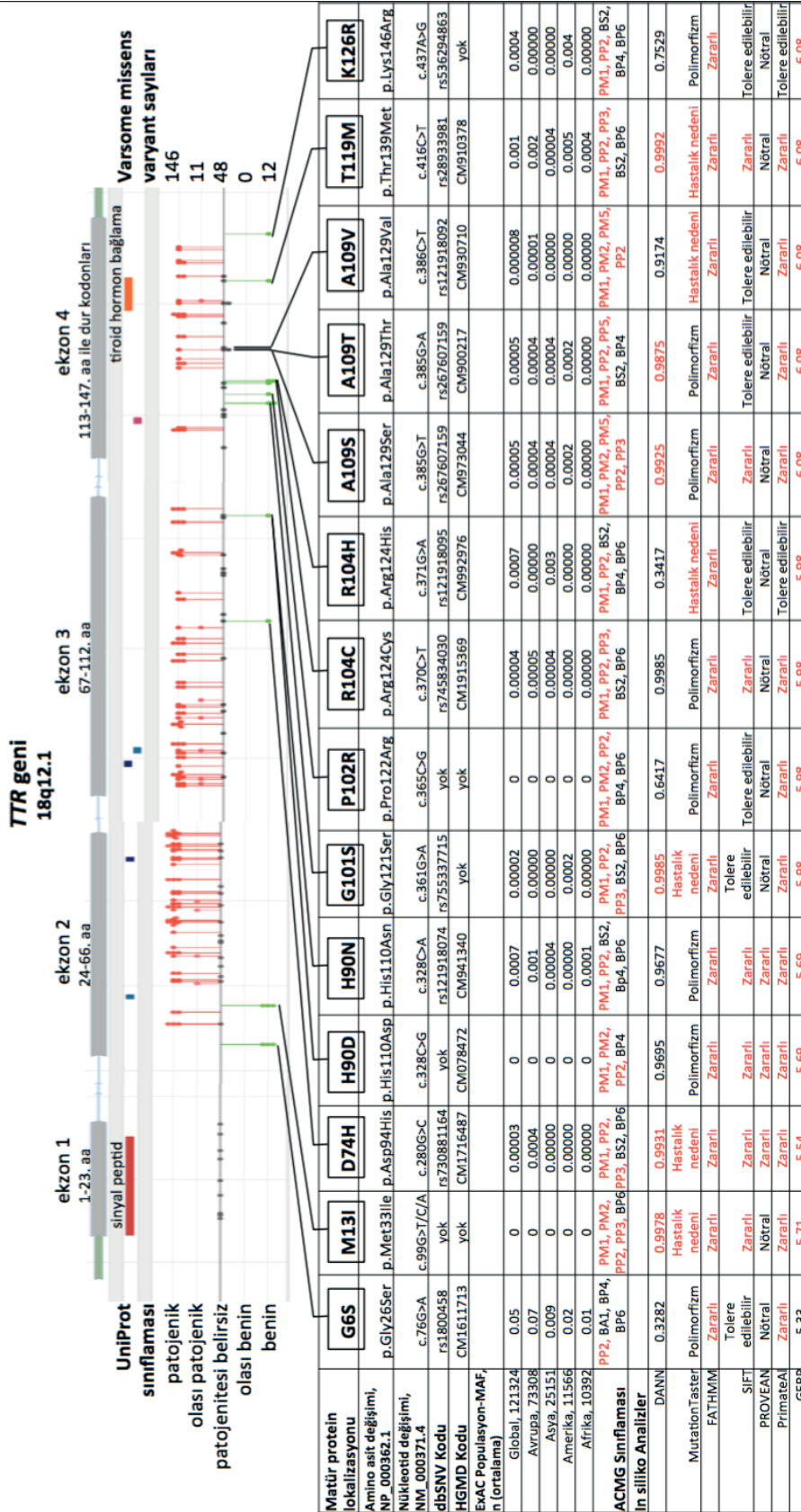
ri, popülasyonlardaki sıklıkları ile *in silico* analizlere göre verilen varsayım sonuçları kıyaslandı. Buna göre, H90N varyantı dahil 10 varyantın popülasyon gruplarında 1/1000'den daha nadir bulunduğu belirlendi. *In silico* analizlerde, H90N varyantı, FATHMM, SIFT, PROVEAN, PrimateAI ve GERP araçlarında zararlı veya riskli skor olarak öngörülürken DANN ve MutationTaster araçlarında ise polimorfik olarak öngörüldüğü belirlendi. Diğer varyantların analiz sonuçları, Şekil 5'de karşılaştırılmaktadır.

TARTIŞMA

Bu çalışmada, yaklaşık 18 yıl takip edilen biventriküler konsantrik hipertrofi erkek hastada TTR geninde saptanan H90N varyantı ile birlikte diğer non-amiloidojenik varyantlar, biyoinformatik analizler ile karşılaştırılarak klinik önemleri ve hastalık patogenezindeki olası etkileri araştırıldı.

Kardiyak amiloidozda EKG'de düşük voltaj ve ekokardiyografide artmış duvar kalınlığının görülmesi tipik bulgulardır (6). Vakamızda AV blok nedeni ile kalıcı pil ritmi olduğundan EKG'de düşük voltaj değerlendirilemezken amiloidoz ile uyumlu biventriküler duvar kalınlığı izlendi. Ayrıca kardiyak amiloidozda atrioventriküler blok, hastaların %22'sinde görülebilmektedir (6). Vakamızda AV tam blok nedeni ile 21 yaşında kalıcı kalp pili implantasyonu yapıldı. Kardiyak amiloidozda, global sol ventrikül sistolik fonksiyonları ve ejeksiyon fraksiyonu hastalığın ileri safhalarına kadar korunmakta, sistolik fonksiyonda zamanla ilerleyici bozulma izlenmektedir (6). Benzer olarak, vakamızda da yıllar içerisinde sol ventrikül sistolik fonksiyonunda ilerleyici azalma meydana gelmiştir.

H90N varyantının klinik önemi belirsiz olup non-amiloidojenik olarak tanımlanmaktadır (7, 10). Bu varyantla ilgili ilk araştırma, 1989 yılında, ailesel amiloidotik polinöropati olan bir vakada (İtalyan kökenli Amerikalı, 39 yaş, kadın, 34 yaş başlangıçlı sensör nöropati, tek gözde vitroz opasite, muhtemelen nöropati sebebi ile eksitus olmuş anne, amca ve teyzesinde periferik nöropati, kardiyomyopati ve vitroz opasite, hastanın vitroz sıvısında amiloid fibrilleri immunohistokimya ile gösterilen) TTR geninin



Şekil 5. TTR geninde non-amiloidojenik olarak tanımlanmış aminoasit değişimine neden olan varyantların biyoinformatik analizler ile kıyaslanması.

MAF minimum allel frekansı. Tablodaki kırmızı olarak belirtilenler, patojenite ihtimali olanları göstermektedir. ACMG kılavuzuna göre yapılan kısaltmalar (Richards ve diğeri 2015). PM1; mutasyon açısından sıcak nokta ve/veya kritik fonksiyonel alanda bulunması, PM2; kontrol veri bankalarında bulunması, PM5; yeni yanlış anlamlı varyant, BA1; alel frekansı %5'ten fazla olması, PP2; hastalık mekanizması ile ilişkili yanlış anlamlı varyant, PP3; çok sayıda hesaplamalar ile zararlı bir etkiyi desteklemesi, BP4; hesaplamalı analizde gen üzerindeki etkinin olması, BP6; son zamanlarda iyi huylu (benin) varyant olarak raporlanması, BS2; sağlıklı yetişkin bir bireyde erken yaşta beklenen tam penetrant bir hastalıkta gözlemlenmesi

3. ekzonunda SphI restriksiyon enzim kesim bölgesinde 3 amino asitin değişimine sebep olabilecek (glu89, his90 veya ala91) bir değişim belirlenmiş, isoelektrik fokuslama (HIEF, "Hybrid isoelectric focusing in immobilized pH gradient") tekniği ile plazma transtiretin PI değerleri ile daha asidik bir aminoasite değişim olabileceği (ki 90 ve 91 kodonlardaki aminoasitler) öne sürülmüş ancak nükleotid değişimi o dönemdeki moleküler teknikler ile belirlenememiştir (13). Araştırmacılar, 1991 yılında bu vakadaki varyantı tanımlamak için 3. ekzonun PCR fragmentini farklı restriksiyon enzimleri kullanarak incelemişler ancak yine H90N değişimini kanıtlayamamışlardır (14). 1994 yılında aynı indeks vakada, abdominal yağ aspiratında amiloid fibrilleri gösterilmiş, kardiyomyopatisinin ilerlediği ve 42 yaşında ortotopik karaciğer transplantasyonunun yapıldığı bildirilmiştir. Ayrıca, *TTR* genin dört ekzonik bölgesi dizilenerek ekzon 3'deki c.328C>A değişimi ile oluşan H90N varyantı tespit edilmiş aynı zamanda ekzon 2'de E42G (Glu42Gly) substitusyonuna sebep ikinci bir varyant belirlenmiştir (15). E42G varyantı, daha önce alt ekstremite nöropatisi ve kronik diare bulguları olan Japon bir ailede gösterilmiştir (16). Bu İtalyan ailenin aile ağacı sorgulamasında H90N ve E42G varyantlarının birlikte indeks vakanın ölen annesinden segregе olduğu, indeks vakanın 6 kardeşinden 2'sinde (biri 36 yaşında iken abdominal yağ dokusunda amiloid tespit edilmiş ve sensör nöropatisi meydana gelince 37 yaşında karaciğer transplantasyonu olmuş erkek kardeş ile dört yıl önceki klinik değerlendirmesinde 37 yaşında iken asemptomatik olan erkek kardeş) ve ayrıca semptomatik 3 kuzeninde de bu varyantların cis konfigürasyon ile birlikte bulunduğu belirlenmiştir (15). Sonuç olarak, H90N varyantı ilk kez bu çalışmada tespit edilmiş olsa da çalışmamızdaki vakadan farklı olarak nöropati ile seyri ve amiloid birikimi ile ilişkinin amiloidojenik olan ikinci varyantın birleşik heterozigotesinden kaynaklanmaktadır.

1991 yılında başka bir çalışmada (17), 1200 kişilik Portekiz popülasyonunda ki bunların 500'ü V30M (Val30Met) varyantlı FAP hastaları ile asemptomatik aile üyeleri ve FAP'ın sık görüldüğu bir bölgede (Po-

voa de Varzim) yaşayan 700 kişilik random popülasyonda HIEF tekniği (18) ile plazmada TTR protein varyantları taranmış ve bunlar içerisinde asidik TTR varyantı olan bir aile belirlenmiştir. Bu ailedeki FAP'lı indeks vaka, amiloidojenik olan V30M varyantı için heterozigot iken asemptomatik 31 yaşındaki oğlunun V30M ve H90N varyantları için bileşik heterozigot olduğu (plazmada normal TTR monomeri olmayıp H90N varyantı annesinden segregе olmuştur, trans konfigürasyonda) ve 28 yaşındaki kızının ise sadece H90N varyantı için taşıyıcı olduğu belirlenmiştir (17). Ayrıca bu çalışmaya deneysel karşılaştırma amacı ile, Altland ve arkadaşlarının 1987 yılındaki çalışmasında (19) aynı teknikle 4000 kişi taranarak non-patojenik asidik TTR varyantını taşıdığı saptanmış, akrabalıkları olmayan 2 Alman birey (klinik bilgileri mevcut değil) dahil edilmiştir (17). Ek olarak, 700 kişilik Portekiz popülasyonunda H90N varyantı 3 kişide (biri homozigot olarak) daha tespit edilmiş ve bu bireylerin (6-58 yaş) sağlıklı ve FAP bulgularına sahip olmadığı belirtilerek H90N varyantının hastalıkla ilişkili olmadığı ileri sürülmüştür (17). 1992 yılında Alves ve arkadaşları tarafından, İtalyan indeks vaka ve asemptomatik kardeşinde (13) ve Portekizli 3 bireyde (17) HIEF tekniği ile elde edilen asidik TTR varyant sonuçları, *TTR* ekzonları dizilenerek H90N substitusyonuna neden olan c.328C>A nükleotid değişimini ve genotiplerini konfirme edilmiştir (20). Bu asemptomatik ve sağlıklı olarak değerlendirilmiş H90N varyant taşıyıcılarının ileri yaşlardaki nörolojik ve kardiyak takipleri ile ilgili literatürde herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Dolayısıyla sağlıklı olarak incelenen Portekiz popülasyonu FAP'ın sık rastlandığı bir coğrafik bölgedendir ve bu araştımalarda H90N varyant taşıyıcılığının kardiyak amiloidoz açısından değerlendirilmemiştir. Bu sebeple, H90N gibi non-amiloidojenik olarak sınıflandırılan, nadir ve patojenite ihtimali bulunan varyant taşıyıcılarının kardiyolojik takipleri önem taşıyabilir.

1993 yılındaki bir çalışmada, Kuzey Portekiz'de V30M varyantını taşıyan FAP ailelerinde hasta ve etkilenmemiş aile bireylerinin serum örnekleri (n=100) HIEF yöntemi ve *TTR* ekzonları PCR-PFLP yöntemleri ile incelenmiştir (21). Bu ailede, 37 yaşın-

daki V30M taşıyıcısı FAP'lı hastanın (eksitus) 55 yaşındaki ablasının T119M (diğer bir non-amiloidojenik varyant) heterozigot taşıyıcı, eşinin H90N heterozigot taşıyıcı olduğu ve bu çiftin 24 yaşındaki oğlunda H90N ve T119M birleşik heterozigotluk tespit edilmiştir. Bu üç bireyde FAP semptomlarının olmadığı ancak T119M varyantına sahip bireyde T4 hormonunun taşınmasında TTR bağlanmasının arttığı, H90N taşıyıcılığının ise hormon bağlama özelliklerinde veya konsantrasyonlarına etkisinin olmadığı belirlenmiştir (21). Ancak bu çalışmada da, bu aile bireyleri kardiyolojik olarak incelenmemiştir ve izlemleri hakkında bilgi mevcut değildir.

2004 yılındaki başka bir çalışmada ise (22), 5 hastanın incelendiği Hollandalı bir FAP'lı ailede, indeks vaka, annesi (72 yaşında ciddi amiloidoz ile eksitus olmuş) ve 2 kız kardeşinde G47E (Gly47Glu) patojenik varyantı tespit edilmiş, ek olarak indeks vakanın yeğeni olan 33 yaşındaki karpal tünel sendromu tanısı alıp sonra 43 yaşında şiddetli amiloid kardiyomiyopatisi, sistemik ortostoz ve gastarointestinal mobilite bozukluğu ile duyu polinöropatisi ve böbrek yetmezliği tanısı alan bir kadın hastada, hem G47E varyantı (babası ile ilgili klinik ve genetik bilgi mevcut değildir) hem de H90N (muhtemelen klinik bilgisi mevcut olmayan annesinden kalıtılmış) varyantı saptanmıştır. Bileşik heterozigot olan bu hastanın kalbinde patolojik olarak ciddi amiloid birikimi tespit edilmiş, kalp ve karaciğer transplantasyonundan 4 ay sonra ani bir şekilde ölmüştür. Çalışmada, H90N varyantının olası etkisi tartışmada belirtilmemiştir (22). H90N varyantı, amiloidojenik G47E varyantı ile birlikte bu vakada klinik bulguların daha şiddetli oluşmasına sebep olmuş olabilir.

2009 yılındaki araştırmada, tekrarlayan serebral kanamaları olan, kardiyak ve periferik nöropati bulguları bulunmayan, abdominal yağ biyopsisinde amiloid belirlenmemiş 46 yaşında bir erkek hastada ve asemptomatik iki kız kardeşinde (40 ve 46 yaş) H90N varyantı tespit edilmiştir. Kız kardeşlerin serebral görüntülemesinde periventriküler beyaz cevherde çok az spesifik olmayan yüksek sinyal yoğunluğu lezyonları görülmüş ancak bulgular amiloidozu desteklememiştir. Diğer yandan, indeksin babasında serebral

hemoraji hikayesi olmasına rağmen bu varyantı taşımadığı belirlenmiştir, muhtemelen bu varyantı taşıyan ölmüş olan anne hakkında bilgi verilmemiştir (23). Bu çalışmada, H90N varyantının amiloidojenik bir potansiyele sahip olmadığı ileri sürülmüş olsa da vakanın annesi ve kız kardeşlerinde kardiyak amiloidoz durumu değerlendirilmemiştir.

2011 yılında, Rus kardiyomiyopati hastalarında (n=270) *TTR* gen varyantları araştırılmış ve 42 yaşında tanı almış H90N varyant taşıyıcısı hastada, majör bulgular olarak progresif kardiyopulmoner yetmezlik, akciğer arter dallarında tekrarlayan tromboemboli, periferik ödem ve asidemi tarif edilmiştir (24). Bu hastada, kardiyak amiloidozun klinik tanısı, sol ventrikülde miyokardiyal kitle indeksinde belirgin bir artış ve elektrokardiyografik dinamik voltajın azalmasıyla ortaya çıkan kardiyovasküler ve solunum sistemlerinin açık tutulumu sırasında hastalığın terminal aşamasında konulmuştur. Hastanın ölümü, aniden sinoatriyal blokaj nedeniyle olmuştur. Otopside, sistemik ve ağırlıklı kardiyopulmoner amiloidoz formunun hafif aterosklerozlu koroner arterlerde olduğunu belirlenmiştir. İmmünohistokimyasal çalışmalarda AL amiloidoz olmadığı belirlenmiştir. İndeks vaka hastalığın klinik bulgularına sahip olmayan annesinde (74 yaş) de H90N varyantı tespit edilmiştir (24). Bu vakanın klinik izlemi ve semptomatik olmadığı için sağlıklı olarak değerlendirilmiş bir ebeveyninden kalıtılması açısından çalışmamızdaki vaka ile benzerdir. Transtiretin (*TTR*) amiloidozu, otozomal dominant olarak kalıtıldığı ve değişken penetransa sahip olması sebebi ile H90N varyantına sahip vakalardaki klinik heterojenite, başka modifiye edici genetik ve epigenetik faktörlerden kaynaklanıyor olabilir.

2015 yılında, FAP hikayesi olan geniş bir İrlandalı ailede, *TTR* c.328C>G nükleotid değişimi sonucu ile oluşan H90D varyantı ilk kez tanımlanmıştır (10). 74 yaşındaki polinöropatili kadın indeks vakanın sinir biyopsisinde amiloid depozitleri gösterilmiş, 10 yıl öncesinde karpal tünel sendromu sonrasında alt bacak güçsüzlüğü gelişmiş hasta 80 yaşında konjestif kalp yetmezliği ile eksitus olmuştur. Probandın 54 yaşındaki H90D taşıyıcısı kızı, kardiyolojik açıdan da de-

ğlendirilmiş ve anormallik saptanmamıştır (10). Bu çalışmada, *in siliko* olarak H90D ve H90N varyantlarının PyMoL ile üç boyutlu yapıları karşılaştırılmış ve H90D varyantının H90N'ye göre bağları değiştireceği ve tetramer stabilitesini önemli ölçüde bozabileceği öngörülmüştür (10). H90D varyantı, eksitus olan vakada yapılan sinir biyopsisinde amiloid birikimi gösterilebildiği için amiloidojenik varyant olarak sınıflandırılmıştır (10). Ancak literatürde sadece H90N taşıyıcısı Rus vaka (24) otopsi dışında hiç bir vakada amiloid birikimi gösterilememiştir. Bu çalışmadaki en önemli kısıtlılık, vakamız hayattayken invaziv bir girişim olan kardiyak biyopsinin yapılmaması ve eksitus sonrası sosyopsikolojik nedenlerle dokularında histopatolojik değerlendirme yapılamamış olmasıdır. İleride benzer otopsi vakalarında, farklı dokularda amiloid birikimleri histopatolojik olarak belirlenebilir. Amiloidoz tanısında, görüntüleme yöntemlerindeki ilerlemelere rağmen doku biopsisi halen altın standart olarak değerlendirilse de (6) vakamızdan alınan rektal biyopside amiloid birikimi gösterilememiş olup birikim olabilecek diğer dokular incelenememiştir.

TTR ile ilişkili amiloidoz yaş, cinsiyet, coğrafi bölgeler, epigenetik değişiklikler ve çevresel faktörlere göre fenotipik varyasyonlarla birçok farklı formda ortaya çıkabilmektedir (6). Sonuç olarak, literatürde H90N varyantının kardiyak amiloidozdaki patojenik etkisi ile ilgili veri eksikliği mevcuttur. Bu çalışmada, özellikle nadir rastlanan ve *in siliko* analizlerle patojenik olarak tahmin edilen non-amiloidojenik varyantların amiloidoz patogenezinde rol oynayabileceği öne sürülmektedir. Ancak bu hipotezi destekleyecek daha fazla deneysel ve takipli klinik araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Teşekkür: PCR primerlerinin temininden Mehveş Poda'ya teşekkür ederiz.

Acknowledgements: Thanks to Mehveş Poda for providing PCR primers.

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

Ethics Committee Approval: This study was approved by the Ethical Committee of the Istanbul University Istanbul Faculty of Medicine.

Bilgilendirilmiş Onam: Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Informed Consent: Written consent was obtained from the participants.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım E.K.B, G.Ç.; Veri Toplama- E.K.B, E.E., G.K., F.B.; Veri Analizi/Yorumlama- E.K.B, E.E., G.K., F.B.; Yazı Taslağı- E.K.B, F.B.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- F.B.; Son Onay ve Sorumluluk- E.K.B, G.Ç., E.E., G.K., F.B.

Author Contributions: Conception/Design of Study- E.K.B, G.Ç.; Data Acquisition- E.K.B, E.E., G.K., F.B.; Data Analysis/Interpretation- E.K.B, E.E., G.K., F.B.; Drafting Manuscript- E.K.B, F.B.; Critical Revision of Manuscript- F.B.; Final Approval and Accountability- E.K.B, G.Ç., E.E., G.K., F.B.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Finansal Destek: Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 42173 ve TDP-2017-22581).

Financial Disclosure: This study was supported by Istanbul University Scientific Research Projects Unit. (Project No: 42173 and TDP-2017-22581).

KAYNAKLAR/REFERENCES

1. Riek R, Eisenberg DS. The activities of amyloids from a structural perspective. *Nature* 2016; 539(7628):227-35.
2. Angelini A, Zanco F, Castellani C, Di Francesco A, Barbera MD, Vescovo GM, et al. Cardiac amyloidosis: a review of the literature and a practical approach for the clinicians. *Italian Journal of Medicine* 2019; 13: 73-90.
3. Guan J, Mishra S, Falk RH, Liao R. Current perspectives on cardiac amyloidosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012; 302(3):H544-H552.
4. Ruberg FL, Berk JL. Transthyretin (TTR) cardiac amyloidosis. *Circulation* 2012; 126(10): 1286-300.
5. Park GY, Jamerlan A, Shim KH, An SSA. Diagnostic and Treatment Approaches Involving

- Transthyretin in Amyloidogenic Diseases. *Int J Mol Sci* 2019;20(12):2982.
6. Kocabaş GÜ, Kocabaş U, Gültekin N. Kardiyak Amiloidoz; Patofizyoloji, Teşhis ve Tedavi. Gültekin N, editör. İnfiltratif Kardiyomyopatiler, Lizozomal Depo Hastalıkları, Mitokondriyal ve Genetik Mutasyonlara Bağlı Kardiyomyopatiler. Ankara: Türkiye Klinikleri 2018; p.11-22.
 7. Saraiva MJ. Transthyretin mutations in hyperthyroxinemia and amyloid diseases. *Hum Mutat* 2001;17(6):493-503.
 8. Date Y, Nakazato M, Kangawa K, Shirieda K, Fujimoto T, Matsukura S. Detection of three transthyretin gene mutations in familial amyloidotic polyneuropathy by analysis of DNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *J Neurol Sci* 1997;150(2):143-8.
 9. Refetoff S, Marinov VS, Tunca H, Byrne MM, Sunthornthepvarakul T, Weiss RE. A new family with hyperthyroxinemia caused by transthyretin Val109 misdiagnosed as thyrotoxicosis and resistance to thyroid hormone--a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81(9):3335-40.
 10. Jimenez-Zepeda VH, Bahlis NJ, Gilbertson J, Rendell N, Porcari R, Lachmann HJ, et al. A novel transthyretin variant p.H110D (H90D) as a cause of familial amyloid polyneuropathy in a large Irish kindred. *Amyloid* 2015;22(1):26-30.
 11. Durmuş-Tekçe H, Matur Z, Mert Atmaca M, Poda M, Çakar A, Hıdır Ulaş Ü, et al. Genotypic and phenotypic presentation of transthyretin-related familial amyloid polyneuropathy (TTR-FAP) in Turkey. *Neuromuscul Disord* 2016; 26(7):441-6.
 12. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015; 17(5):405-24.
 13. Skare JC, Saraiva MJ, Alves IL, Skare IB, Milunsky A, Cohen AS, et al. A new mutation causing familial amyloidotic polyneuropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;164(3):1240-6.
 14. Skare JC, Milunsky JM, Milunsky A, Skare IB, Cohen AS, Skinner M. A new transthyretin variant from a patient with familial amyloidotic polyneuropathy has asparagine substituted for histidine at position 90. *Clin Genet* 1991;39(1):6-12.
 15. Skare J, Jones LA, Myles N, Kane K, Milunsky A, Cohen A, et al. Two transthyretin mutations (glu42gly, his90asn) in an Italian family with amyloidosis. *Clin Genet* 1994;45(6):281-4.
 16. Ueno S, Uemichi T, Takahashi N, Soga F, Yorifuji S, Tarui S. Two novel variants of transthyretin identified in Japanese cases with familial amyloidotic polyneuropathy: transthyretin (Glu42 to Gly) and transthyretin (Ser50 to Arg). *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 169(3):1117-21.
 17. Saraiva MJ, Almeida MR, Alves IL, Moreira P, Gawinowicz M, Costa PP, Rauh S, Banzhoff A, Altland K. Molecular analyses of an acidic transthyretin Asn 90 variant. *Am J Hum Genet* 1991;48(5):1004-8.
 18. Altland K, Banzhoff A. Separation by hybridisoelectric focusing of normal human plasma transthyretin (prealbumin) and a variant with a methionine for valine substitution associated with familial amyloidotic polyneuropathy. *Electrophoresis* 1986; 7(11):529-33.
 19. Altland K, Becher P, Banzhoff A. Paraffin oil protected high resolution hybridisoelectric focusing for the demonstration of substitutions of neutral amino acids in denatured proteins: the case off our human transthyretin (prealbumin) variants associated with familial amyloidotic polyneuropathy. *Electrophoresis* 1987;8(6): 293-7.
 20. Alves IL, Almeida MR, Skare J, Skinner M, Kurose K, Sakaki Y, Costa PP, Saraiva MJ. Amyloidogenic and non-amyloidogenic transthyretin Asn 90 variants. *Clin Genet* 1992;42(1):27-30.

21. Alves IL, Divino CM, Schussler GC, Altland K, Almeida MR, Palha JA, et al. Thyroxine binding in a TTR Met 119 kindred. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77(2):484-8.
22. Haagsma EB, Hawkins PN, Benson MD, Lachmann HJ, Bybee A, Hazenberg BP. Familial amyloidotic polyneuropathy with severe renal involvement in association with transthyretin Gly47Glu in Dutch, British and American-Finnish families. *Amyloid* 2004;11(1):44-9.
23. Bersano A, Del Bo R, Ballabio E, Cinnante C, Lanfranconi S, Comi GP, et al. Transthyretin Asn90 variant: amyloidogenic or non-amyloidogenic role. *J Neurol Sci.* 2009; 284(1-2):113-5.
24. Solov'ev KV, Grudinina NA, Semernin EN, Morozova IV, Smirnova SA, Poliakov DS, Aleĭnikova TD, Shliakhto EV, Gudkova AY, Shavlovskii MM. Transthyretin gene V30M, H90N, and del9 mutations in cardiomyopathy patients from St. Petersburg. *Genetika.* 2011;47(4):543-9.



Çocukluk Çağı T-ALL Hastalarında *PTEN* ve *AKT1* Gen Anlatım Düzeyleri

PTEN and *AKT1* Gene Expression Levels in Childhood T-ALL Patients

Fulya Küçükçankurt^{1,2}, Özden Hatırnaz Ng^{2,3}, Müge Sayitoğlu², Yücel Erbilgin²

ÖZ

Amaç: PI3K/AKT sinyal yolağının bozulmuş aktivasyonu tümör gelişimi ile ilişkilendirilmiştir. *PTEN*/*AKT* yolağı, hücre büyümesi ve sağ kalımında kritik role sahip olup, lösemilerde kemoterapi direnci ile ilişkilendirilmiştir. Bu çalışma kapsamında, çocukluk çağı T-ALL hastalarındaki *PTEN* ve *AKT1* gen anlatımları belirlendi ve hastalığın prognozuna olan etkisi araştırıldı.

Gereç ve Yöntem: Otuz dokuz çocukluk çağı T-ALL olgusunun, tanı zamanı kemik iliği örnekleri kantitatif gerçek zamanlı PZR ile *PTEN* ve *AKT1* genleri için tarandı. Gen anlatım düzeylerinin hastaların yaş, cinsiyet, immünofenotip, tedavi yanıtı, nüks ve sağ kalım gibi klinik verileri ile ilişkisi incelendi.

Bulgular: Çalışmamızda, T-ALL hastalarında *PTEN* gen anlatımında kontrollere göre bir farklılık gözlenmezken, *AKT1* gen anlatımının anlamlı düzeyde arttığı belirlendi ($p < 0,0001$). Hastaların klinik özellikleri, genel ve hastalısız sağ kalım oranları ve gen anlatım düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmazken, indüksiyon tedavisi ilişkili sağ kalım analizleri *PTEN* ve *AKT1* gen anlatımları ile genel sağ kalım oranları arasında (sırasıyla, $p = 0,026$ ve $p = 0,034$ Cox regresyon analizi) anlamlı bir ilişki ortaya koyuldu. Diğer klinik parametreler ile gen anlatım düzeyleri arasında anlamlı ilişki saptanmadı.

Sonuç: Çalışmamızda, T-ALL örneklerinde *PTEN* gen anlatımından bağımsız olarak artmış *AKT1* gen anlatımının varlığı ve sağ kalım sürelerini etkilediğine dair bulgular elde edildi. Gelecekteki çalışmalar, *AKT1*'in hedefe yönelik tedaviler için uygun bir aday olup olmayacağını ortaya çıkaracaktır.

Anahtar Kelimeler: T-hücreli akut lenfoblastik lösemi, gen anlatımı, *PTEN*, *AKT1*

ABSTRACT

Objective: Impaired activation of the PI3K/AKT signaling pathway has been associated with tumor development. The *PTEN*/*AKT* pathway plays a critical role in cell growth and survival and has been associated with chemotherapy resistance in leukemia. In this study, *PTEN* and *AKT1* gene expression were determined in childhood T-ALL patients, and the effect was investigated on the prognosis of the disease.

Materials and Methods: Bone marrow samples from 39 childhood cases were obtained at the time of diagnosis and screened with real-time quantitative PCR for *PTEN* and *AKT1* genes.

Results: In our study, no difference between T-ALL patients compared to controls was observed in *PTEN* gene expression whereas *AKT1* gene expression was significantly increased ($p < 0,0001$). There was no significant relationship between gene expression and clinical features of the patients, overall and disease-free survival rates while induction therapy-related survival analyzes revealed a significant relationship between *PTEN* and *AKT1* gene expression and overall survival rates ($p = 0,026$ and $p = 0,034$ Cox regression analysis, respectively).

Conclusion: In our study, the presence of increased *AKT1* gene expression was demonstrated in T-ALL patients independent of *PTEN* expression. Future studies will reveal whether it will be a suitable candidate for targeted therapies.

Keywords: T-cell acute lymphoblastic leukemia, gene expression, *PTEN*, *AKT1*

¹ İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye

² İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

³ Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ORCID: F.K. 0000-0002-5345-9072;

Ö.H.N. 0000-0001-7728-6527;

M.S. 0000-0002-8648-213X;

Y.E. 0000-0001-6969-6649

Corresponding author/Sorumlu yazar:

Yücel Erbilgin,

İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp

Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı,

İstanbul, Türkiye

E-mail: yucel.erbilgin@gmail.com

Submitted/Başvuru: 31.08.2020

Accepted/Kabul: 23.09.2020

Citation/Atf: Kucukcankurt F, Ng Hatırnaz O, Sayitoğlu M, Erbilgin Y. *PTEN* and *AKT1* Gene Expression Levels in Childhood T-ALL Patients. Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi 2020; 3(3): 114-121.

https://doi.org/10.26650/JARHS2020-788345



GİRİŞ

Lösemiler hematopoetik progenitör hücrelerin neoplastik transformasyonu sonucu gelişen malignitelere aittir. Akut lenfoblastik lösemilerin (ALL) bir alt grubu olan T hücreli ALL (T-ALL), pediatrik ALL'lerin %15'inde ve yetişkin ALL'lerin %25'inde görülen agresif ve heterojen bir hastalıktır. Güncel tedavi rejimleri ile B-hücreli ALL (B-ALL) hastalarının genel sağkalım oranları gelişmiş ülkelerde %90'lara ulaşmıştır. Ancak T-ALL hastalarının tedavi başarıları bu oranın altında kalmaktadır (1).

T-ALL patogenezi, T-hücre gelişiminde rol oynayan onkogenlerin aktivasyonu ve gelişim basamaklarındaki gen anlatım profili ile ilişkilidir. Sinyal iletili yollarında meydana gelen anormallikler, malign transformasyon, azalmış apoptozis ve kontrolsüz hücre proliferasyonu ile sonuçlanıp karsinogenezi indüklemektedir (2). Bu nedenle kanserlerde ilk etkilenen mekanizma genellikle hücre içindeki sinyal iletili yollarıdır (3,6).

PI3K/AKT sinyal yolağının bozulmuş aktivasyonu tümör gelişimi ile ilişkilendirilmekte ve birçok kanser türünde görülmektedir. PI3K/AKT yolağının aktivasyonu, büyüme faktörlerinin reseptör tirozin kinazlara bağlanması ve heterodimerlerin regülatör bölgelerinde çapraz fosforilasyonun gerçekleşmesi ile tetiklenir. Bu sinyalizasyon olayında aktive olan PI3K (Fosfatidilinositol 3-kinaz), PIP2'yi (Fosfatidilinositol bifosfat) fosforile eder, PIP2 ise PIP3'ü (Fosfatidilinositol trifosfat) fosforile eder. PIP3'ün fosforilasyonu ile AKT (AKT serin/treonin kinaz 1) aktive olur ve hedefinde bulunan hücre proliferasyonu, hücre büyümesi, hücre göçü gibi süreçlerin aktivasyonunu sağlar (7,8). Çift yönlü bir lipid fosfataz olan PTEN (Tensin benzeri tümör baskılayıcı fosfataz), PI3K'nın ürünü olan PIP2 ve PIP3'ü defosforile ederek AKT sinyalini durdurur ve bu yolda negatif düzenleyici olarak görev yapar (9). Fosforile AKT'nin aşırı anlatımı genomik ve kromozomal instabilite ile ilişkilidir ve AKT aktivasyonu lökogenезi tetikleyebilir (10).

Somatik mutasyonlar, epigenetik değişimler veya post-transkripsiyonel modifikasyonlar sonucu *PTEN*'in susturularak inaktif hale gelmesi çeşitli kan-

serlerin oluşumuna katkı sağlamaktadır (11,16). T-ALL hastalarında artmış PI3K/AKT sinyal aktivasyonu ve *PTEN* inaktivasyonu önceki çalışmalarda gösterilmiştir (17). Ayrıca PI3K/AKT yolağındaki bozukluklar akut lösemilerde tedavi yanıtı ile ilişkilendirilmiştir (18,20).

Bu çalışma kapsamında, çocukluk çağı T-ALL hasta grubunda *PTEN* ve *AKT1* gen anlatım seviyeleri kantitatif gerçek zamanlı PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile belirlenerek prognostik etkisi değerlendirilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma kapsamında, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi ve Cerrahpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde 2000-2013 yılları arasında T-ALL tanısı almış, 39 çocukluk çağı T-ALL hastasının tanı zamanı kemik iliği örneklerinden edilen arşiv materyal ile çalışılmıştır. Hastaların yasal vasilerinden onam yazılı ve sözlü onam alınmıştır. Çalışmamız İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu tarafından, 07.11.2013 tarih ve 283 sayısı ile onaylanmıştır.

T-ALL hücre gelişimini tamamlayamamış erken T-hücre öncüllerinin herhangi bir gelişim basamağında bloke olması ve kontrolsüz proliferasyonu ile sonuçlanan bir kanserdir. Bu hücre popülasyonunu temsil eden en uygun kontrol gurubu, T-lenfositlerinin gelişimlerini gerçekleştirdiği timüs dokusunda bulunmaktadır. Bu amaçla açık kalp ameliyatlarından atık opere materyal olarak elde edilen, 23.06.2011 tarih ve 183 sayısı ile etik kurul onayı alınmış timüs dokularından izole edilen (21,22) olgunlaşmamış T-lenfositleri kontrol örneği olarak kullanılmıştır.

Hastaların yedisi kız, otuz iki tanesi erkektir ve medyan yaş 8 (min: 9 ay; maks: 17 yıl) olup, immünofenotip raporlarına göre kemik iliği blast yükleri %80 ve üzeridir. T-ALL hastaları EGIL (European Group for the Immunological Characterization of Leukemia) sınıflandırması kullanılarak CD7, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8 pozitifliğine göre değerlendirilmiş ve immatür (CD1a- CD2+ CCD3+ CD3- CD5+ CD7+) (n=12), kortikal (CD1a+ CD2+ CCD3+ CD3+/- CD5+ CD7+) (n=13) ve matür (CD1a- CD2+ CCD3+ CD3+ CD5+ CD7+ ve CD4+/CD8+) (n=6) olarak ayrılmıştır (23) ancak sekiz hasta sınırlı im-

Tablo 1. Çocukluk çağı T-ALL hastalarının klinik özellikleri

| Klinik Özellikler | Olgu sayısı (%) (n=39) |
|--|---------------------------|
| Trombosit (10 ⁹ /L) Medyan (min-maks) | 124000 (5400-450000) |
| Beyaz kan hücresi (10 ⁹ /L) Medyan (min-maks) | 128000 (1300-417900) |
| Hemoglobin (g/dL) Medyan (min-maks) | 10 (1,2-14,7) |
| Merkezi Sinir Sistemi Tutulumu, n (%) | |
| Evet | 10 (25,6) |
| Hayır | 20 (51,3) |
| Bilinmiyor | 9 (23,1) |
| Risk grubu, n (%) | |
| Orta | 12 (30,8) |
| Yüksek | 12 (30,8) |
| Bilinmiyor | 15 (30,8) |
| 33. gün kemoterapi yanıtı, n (%) | |
| Evet | 24 (61,5) |
| Hayır | 6 (15,4) |
| Bilinmiyor | 9 (23,1) |
| Nüks, n (%) | |
| Evet | 8 (20,5) |
| Hayır | 31 (79,5) |
| Son durum, n (%) | |
| Yaşayan | 17 (43,6) |
| Yaşamayan | 14 (35,9) |
| Bilinmiyor | 8 (20,5) |

münolojik belirteç bilgisi nedeniyle sınıflandırılmamıştır. Hastalardan ancak altı tanesinin sitogenetik verisi mevcut olup; beşi hipodiploidi, bir tanesi hiperdiploididir. Bu hastaların *PTEN* (10q23.32) ve *AKT1* (14q32.33) gen bölgelerinde kromozomal bir değişim belirlenmemiştir.

Kantitatif Gerçek Zamanlı RT-PZR

Kemik iliği örneklerinden total RNA izolasyonu RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) protokolü kullanılarak gerçekleştirildi ve genetik analiz yapılabildiği kadar -80°C'de saklandı. RNA miktarı ve kalitesi spektrofotometre ölçümleri ile belirlendi. Bin nanogram total RNA, random heksamer (50 µM) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Amerika) ve Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) ters transkriptaz enzimi (200 U/µL) (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania) kullanılarak üretici protokolüne uygun olarak cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Çocukluk çağı T-ALL hastaları (n=39) ve kontrollerde *PTEN* ve *AKT1* gen anlatım profilleri gerçek

zamanlı kantitatif PZR ile tespit edildi ve referans gen olarak *SIKLOFILIN-A (CYPA)* kullanıldı. *CYPA* geni için, NM_021130.4 dizisi referans alınarak, 48 no'lu UPL (Roche, Life Science, Germany) prob ile ileri primer 5'TATCTGCACTGCCAAGACTGAGTG3' ve geri primer 5'CTTCTTGCTGGTCTTGCCAT-TCC3' dizileri kullanıldı. *PTEN* geni için NM_000314.4 dizisi referans alınarak, 60 no'lu UPL prob ile ileri primer 5'GCACAAGAGGCCCTA-GATTTC3' ve geri primer 5'CGCCTCTGACTGGGAATAGT3' dizileri, *AKT1* geni için, NM_005163.2 dizisi referans alınarak 69 no'lu UPL prob ile ileri primer 5'GGCTATTGTGAAGGAGGGTTG 3' ve geri primer 5'TCCTTGTAGCCAATGAAGGTG 3' dizileri kullanıldı. *PTEN* ve *AKT1* gen anlatımları, Light Cycler 480 Prob Master Mix (Roche) kullanılarak, Light Cycler 480 cihazında (Roche Applied Sciences, Mannheim, Germany) gerçekleştirildi. Daha önce yaptığımız çalışmada, T-ALL örnekleri için referans gen seçiminde GeNorm yazılımı (V3.4, Amel Belçika) kullanılmış ve en stabil genlerden biri olan *CYPA* referans gen olarak tercih edilmiştir (22). Bu doğrultuda çalışmamızda *CYPA* referans gen olarak çalışılmıştır. Referans ve hedef genlere yönelik primer-prob tasarımları ProbeFinder Assay Design yazılımı (Roche Molecular System) kullanılarak gerçekleştirildi. Hidroliz problemleri kullanılarak yapılan çalışmada, tüm örnekler referans gen ve hedef genler için duplike olarak çalışıldı. Duplike örneklerin ortalama Ct değerleri alındı ve hedef genlerin anlatım düzeyleri, ΔCt metoduna göre rölöatif olarak hesaplandı (24). Hedef genler ve referans genlerin PZR etkinliği seri dilüsyonlar yapılarak LightCycler (LightCycler software 4.1, Roche Life Science) yazılımı kullanılarak hesaplandı.

İstatistiksel Analiz

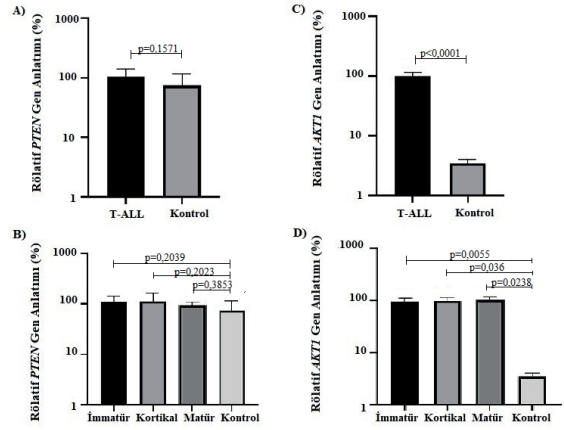
Örneklerin rölöatif mRNA düzeylerinin karşılaştırılması için Mann-Whitney U testi kullanıldı ve *P* değeri 0,05'in altındaki örnekler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Medyan üzerinde kalan değerler yüksek anlatım değerleri olarak belirlendi ve tüm analizler medyan altı ve medyan üstü olarak gerçekleştirildi. Pearson korelasyon testi ile *AKT1* ve *PTEN* gen anlatımları arasında

bir ilişki olup olmadığı incelendi. Sağkalım analizlerinde Kaplan-Meier metodu kullanıldı. Genel sağkalım (GS) süresi, hastanın tanı anından ölüm tarihine ya da son kontrol tarihine kadar olan süreyi ifade etmektedir. Hastalısız sağkalım (HS) ise, hastanın remisyona girdiği tarihten nüks görülme tarihine kadar veya nüks olmadan son kontrol tarihine kadar geçen süre olarak hesaplandı. Yaşam süresi üzerinde kemoterapi ve son durum değişkenlerinin etkisi Cox regresyon modeli ile gösterildi. Tüm istatistiksel analizler, SPSS 19.0 (IBM SPSS Data Editor Inc., Chicago, IL, USA) ve GraphPad Prism 8 yazılımları (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) kullanılarak yapıldı.

BULGULAR

T-ALL hastalardaki (n=39) *PTEN* gen anlatımının sağlıklı timosit örnekleri ile benzer gen anlatım düzeyine sahip olduğu (p=0,1571) saptanırken (Şekil 1A), *AKT1* gen anlatımının kontrollere göre anlamlı düzeyde arttığı belirlendi (p<0,0001) (Şekil 1C). T-ALL hastaları timosit farklılaşmasına göre immatür (n=12), kortikal (n=13) ve matür (n=6) olmak üzere üç gruba ayrılarak, *PTEN* ve *AKT1* anlatım düzeyleri kontrollere karşılaştırıldı. Tüm hastaların (n=39) %53,8'inde *AKT1* gen anlatım seviyesinin arttığı belirlendi. İmmatür fenotipteki hastaların %50'sinde (p=0,0055), kortikal fenotipteki hastaların %43,75'inde (p=0,0036) ve matür fenotipteki hastaların %50'sinde (p=0,0238) kontrollere oranla anlamlı olarak artmış *AKT1* gen anlatımı belirlendi (Şekil 1D). *PTEN* gen anlatımı açısından ise immunfenotip grupları ile kontrollere arasında anlamlı bir farklılık belirlenmedi (immatür (p=0,2039), kortikal (p=0,2023) ve matür (p=0,3853)) (Şekil 1B). Hastaların *PTEN* ve *AKT1* gen ifadesi değişimlerinin karşılıklı olarak incelenmesi için Pearson korelasyon testi yapıldı. %95 güven aralığı -0,5452 ile 0,05119 arasında olup, korelasyon katsayısı r=-0,2730, p=0,0972 olarak bulundu.

Çocukluk çağı T-ALL hastalarının klinik bulguları, tanı zamanı beyaz kan hücre sayısı (>100,000 ve <100,000 (10⁹/L)), trombosit sayısı (>100,000 ve <100,000 (10⁹/L)), hemoglobin düzeyi (>10 dL ve <10 dL), yaş (0-2 yıl, 2-10 yıl ve >10 yıl), cinsiyet (kız/erkek), organ tutulumu (var/yok), merkezi sinir sistemi tutu-



Şekil 1. Çocukluk çağı T-ALL hastalarında *PTEN* ve *AKT1* gen anlatım sonuçları. A) Çocukluk çağı T-ALL hastalardaki (n=39) *PTEN* gen anlatımının sağlıklı timosit örnekleri ile benzer gen anlatım düzeyine sahip olduğu (p=0,1571) belirlendi. B) Hastalar immunfenotiplerine göre ayrıldığında (immatür (n=12), kortikal (n=13), matür (n=6)) *PTEN* gen anlatımları kontrollere göre anlamlı farklılık göstermedi (immatür (p=0,2039), kortikal (p=0,2023), matür (p=0,3853)). C) Çocukluk çağı T-ALL hastalardaki (n=39) *AKT1* gen anlatımının ise kontrollere göre anlamlı düzeyde arttığı belirlendi (p<0,0001). D) Hastalar immunfenotiplerine göre ayrıldığında (immatür (n=12), kortikal (n=13), matür (n=6)) *AKT1* gen anlatımları kontrollere oranla arttığı belirlendi (immatür (p= 0,0055) ve kortikal (p= 0,0036), matür (p= 0,0238))

lumu (var/yok) ve risk grupları (orta/yüksek) için, *PTEN* ve *AKT1* gen anlatım seviyeleri incelendi ve istatistiksel olarak anlamlı bir değişim saptanmadı.

Yaşam analizi sonuçlarında, *PTEN* (GS p=0,47; HS p=0,63) ve *AKT1* (GS p=0,52; HS p=0,50) gen anlatımlarının genel sağ kalım ve hastalısız sağkalım üzerine anlamlı bir etkisinin olmadığı belirlendi. Bunun yanında, Cox regresyon analizleri sonucunda, azalmış *PTEN* gen anlatımı ile 33. gün kemoterapi yanıtının ilişkisi incelendiğinde, genel ve hastalısız sağ kalımın azaldığı belirlendi (GS p=0,026; HS p=0,048). Artmış *AKT1* gen anlatımı ile 33. gün kemoterapi yanıtının ilişkisi incelendiğinde, *AKT1* gen anlatımı artmış ve 33. gün yanıtı olmayan hastalarda genel sağkalımın azaldığı belirlendi (GS p=0,034) ancak hastalısız sağ kalım ile ilişki belirlenemedi (HS p=0,09).

TARTIŞMA

AKT1, hücre proliferasyonu, olgunlaşması, yaşam süresi ve hücre döngüsünün kontrolünde rol alan onkogenik bir serin/treonin kinazdır. Artmış *AKT1*

anlatımının karsinogenezi tetiklediği bilinmektedir. *AKT1*'in aşırı anlatımına özellikle mide, meme, kolon, over, pankreas, tiroid kanserlerinde ve glioblastomada rastlanmaktadır (25-29). Çalışmamızda, *AKT1* gen anlatımının immatür, kortikal ve matür T-ALL hastalarında kontrollere göre anlamlı derecede arttığı belirlenmiştir. AKT aktivasyonu pro-apoptotik protein olan BAD ve FOXO3'ü inhibe ederek apoptozun baskılanmasına neden olabilir (30). Ayrıca, *PTEN*/*AKT* yolağı, hızlı proliferen olan kanser hücrelerinin kullandığı aerobik glikoliz üzerinde önemli bir etkiye sahiptir ve AKT'nin aşırı anlatımı, glikozun hücre içine alınımını uyarmaktadır (31). *PTEN* inaktivasyonu sonucunda AKT yolağının ektopik aktivasyonu T-ALL hastalarında gösterilmiştir (17,20,32). Bu çalışmada, bir grup çocukluk çağı T-ALL hastasının %53,8'inde *PTEN* gen anlatımından bağımsız olarak *AKT1* gen anlatımı artışı saptanmıştır. T-ALL hastalarının %5-18'inde *PTEN*/*AKT1* aktivasyonuna yol açan mutasyonlar gösterilmiştir (17,33). Ancak, nadir *AKT1* gen mutasyonları hastaların çok büyük kısmında görülen yüksek gen anlatımını açıklayamamaktadır. Bu çalışmanın kısıtlılıklarından birisi kısıtlı proje bütçesi nedeni ile bulguların protein verisi ile desteklenememesidir. *AKT1* gen anlatımının *AKT1* protein anlatımı ile uyum gösterdiği bildirilmiştir (34). Kanserde anormal Akt sinyal aktivasyonunu kontrol eden çok sayıda mekanizma ortaya çıkartılmıştır. PI3K/*AKT* yolağı, tüm genom DNA metilasyonunu azaltarak transkripsiyonel aktivasyonu tetiklediği ve lokusa özgü DNA hipometilasyonu da düzenlediği bildirilmiştir. Fosforilasyon ve defosforilasyon, Akt sinyal aktivasyonunu yönlendiren birincil mekanizma olarak kabul edilmektedir. Bunun yanı sıra ubiquitinasyon ve sumolasyon gibi diğer posttranslasyonel değişikliklerin de Akt sinyal aktivasyonu için fosforilasyon kadar önemli olduğu gösterilmiştir (35).

PTEN/*AKT* sinyal transdüksiyon kaskadının aşırı aktivasyonu birçok tümör hücresinde görülmekte ve çoklu ilaç direncinin gelişmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda artmış *AKT1* anlatımı, farklı kemoterapi ajanlarına ve tirozin kinaz inhibitörlerine karşı direnç ile ilişkilendirilmiştir (36,37). *AKT* inhibitörlerinin kullanıldığı deneysel çalışmalarda,

sinyal yolağının baskılanması ile çoklu ilaç direncinin üstesinden gelinerek, kemoterapötik ajanlara karşı sasiyetin arttığı bildirilmiştir (38). Çalışmamızda, medyanın üzerinde *AKT1* gen anlatımı gösteren hastalar ile düşük *AKT1* gen anlatımı gösteren hastalar arasında tedavi yanıtı ile ilişkili olarak bir farklılık belirlenmemiştir. T-ALL hastalarının tedavi yanıtlarının B-ALL alt grubuna nazaran daha kötü olduğu bilinmektedir (39,40). Bu doğrultuda, kohortumuzdaki hastaların %53,8 'inde artmış *AKT1* gen anlatımı gösterdiği göz önünde bulundurulduğunda hastaların tedavi yanıtı açısından *AKT1* düzeylerinde farklılık göstermemeleri çok da şaşırtıcı değildir. Ancak yine de T-ALL örnekleri içerisinde, daha kötü ve daha iyi prognoza sahip olan örneklerin ayrıştırılmasında *AKT1* gen anlatımının bir belirteç olarak kullanılıp kullanılmayacağına yönelik daha geniş sayıdaki kohortlarda analizlerin gerçekleştirilmesine ihtiyaç vardır. Genel ve hastalısız sağkalım analizleri ile gen anlatım düzeyleri arasında bir ilişki belirlenmemiştir. Ancak hastaların indüksiyon tedavisine verdikleri cevaplar ile sağkalım oranları arasında bir ilişki olduğu saptanmıştır. *AKT1* gen anlatımı düşük olan hastaların indüksiyon tedavisine yanıt verdikleri ve genel sağkalımın arttığı belirlenmiştir.

Tümör baskılayıcı özelliği nedeniyle *PTEN* gen anlatımı hücrelerin malign transformasyonunun baskılanması için kritiktir. *PTEN* gen anlatım seviyesi kanser türlerine göre değişkenlik göstermektedir. Bizim çalışma grubumuzda *PTEN* gen anlatımı kontrol örneklerinden farklılık bulunmamıştır. Silva A. ve arkadaşlarının yaptığı çalışma gen anlatım profili bakımından bizim bulgularımızı desteklemekle birlikte, T-ALL hastalarında, *PTEN* protein anlatımlarının arttığını ve post-translasyonel değişimlere bağlı olarak PI3K/Akt yolağının artmış aktivasyonu da göstermiştir (17). Gen anlatım düzeyinde anlamlı değişim olmamasına karşın, *PTEN*'in post translasyonel değişimleri ve mutasyonları, *PTEN*'in fonksiyonel olarak baskılanmasına neden olabilmektedir.

Hastaların indüksiyon tedavi yanıtları ve sağkalım oranları bakımından ele alındığında daha yüksek (medyan üzeri) *PTEN* gen anlatımı gösteren hastaların tedavi yanıtlarının daha iyi olduğu görülmüştür.

PTEN gen anlatımı yokluğunda T-ALL hücre hatlarının γ -sekretaz inhibitörlerine karşı dirençli olduğu gösterilmiştir (41). Ayrıca, T-ALL'de glukokortikoid direnci ile ilişkili transkripsiyonel süreçleri modüle eden sinyalizasyon faktörlerinin in-siliko analizinde, AKT1'in glukokortikoid direncinin sürücü olarak potansiyel bir rolüne işaret ettiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar, *PTEN* kaybı ile artmış AKT1 fosforilasyonunun klinikte primer glukokortikoid direncine neden olduğu gösterilmiştir (36,19,42).

SONUÇ

PTEN/AKT sinyal ileti yolağı, tümörögenез ile bağlantılı olduğu için, çeşitli anti-neoplastik ajanlarla bu yolağın inaktivasyonu sağlanmaya çalışılmaktadır. Çok sayıda çalışma, AKT'nin hücre proliferasyon aracısı olduğunu ve ilaç geliştirmek için etkili bir hedef olabileceği yönünde bulgular sunmaktadır. Çalışmamızda, T-ALL örneklerinde *PTEN* gen anlatımından bağımsız olarak artmış *AKT1* gen anlatımının varlığı ve indüksiyon tedavisi yanıtları ile ilişkisi gösterilmiştir. T-ALL'lerdeki tedavi başarısızlığının üstesinden gelinebilmesi için alternatif tedavi protokolleri ya da yeni hedeflenmiş tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Özgün ve geniş hasta gruplarında gerçekleştirilecek çalışmalar ve saptanan prognostik ilişkiler bahsi geçen yukarıda söz edilen alternatif tedavilere ışık tutacaktır. Son yıllarda geliştirilen AKT yolağı spesifik inhibitörleri de kanser tedavisi için umut vaat etmektedir.

Teşekkür: Hasta materyallerinin sağlanmasındaki katkılarından dolayı Prof. Dr. Zeynep Karakaş ve Prof. Dr. Tiraje Çelkan'a teşekkür ederiz.

Acknowledgements: We would like to thank Prof. Dr. Zeynep Karakaş and Prof. Dr. Tiraje Çelkan for their contribution in providing patient materials.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan alınmıştır. (tarih 07.11.2013 ve no 283).

Ethics Committee Approval: This study was approved by the Ethical Committee of the Istanbul University İstanbul Faculty of Medicine. (date 07.11.2013 and number 283).

Bilgilendirilmiş Onam: Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Informed Consent: Written consent was obtained from the participants.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Yazarlık Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- M.S., Ö.H.N., Y.E.; Veri Toplama- F.K., M.S., Ö.H.N., Y.E.; Veri Analizi/Yorumlama-F.K., Y.E., M.S.; Yazı Taslağı- F.K., Y.E., M.S.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- Y.E., M.S., Ö.H.N.; Son Onay ve Sorumluluk- F.K., Ö.H.N., M.S., Y.E.; Malzeme ve Teknik Destek- F.K., M.S., Ö.H.N., Y.E.; Süpervizyon- M.S.

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

Finansal Destek: Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: 48185) ve İstanbul Kalkınma Ajansı, Geleceğe Yatırım: BİYOBANKA projesi (Proje No: TR10/15/YNK/0093) tarafından desteklenmiştir.

Financial Disclosure: This study was supported by Istanbul University Scientific Research Projects Unit (Project No: 48185) and Istanbul Development Agency, Investment in the Future: BİYOBANKA project (Project No: TR10 / 15 / YNK / 0093).

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

KAYNAKLAR/REFERENCES

- Liu Y, Easton J, Shao Y, Maciaszek J, Wang Z, Wilkinson MR et al. The genomic landscape of pediatric and young adult T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2017;49:1211–8.
- Ferrando A. Can one target T-cell ALL? *Best Pract Res. Clin Haematol.* 2018;31(4);361–6.

3. Okumura N, Yoshida H, Kitagishi Y, Murakami M, Nishimura Y, Matsuda S. *PI3K/AKT/PTEN* signaling as a molecular target in leukemia angiogenesis. *Advances in Hematology*. 2012.
4. Mayer IA, Arteaga CL. The PI3K/AKT Pathway as a Target for Cancer Treatment. *Annu Rev Med*. 2016;67:11–28.
5. Worby CA, Dixon JE. *PTEN*. *Annu Rev Biochem*. 2014; 83(1):641–69.
6. Milella M, Falcone I, Conciatori F, Cesta Incani U, Del Curatolo A, Inzerilli N et al. *PTEN*: Multiple functions in human malignant tumors. *Front Oncol*. 2015;16(5):24.
7. Wickremasinghe RG, Prentice AG, Steele AJ. Aberrantly activated anti-apoptotic signalling mechanisms in chronic lymphocytic leukaemia cells: clues to the identification of novel therapeutic targets. *Br J Haematol*. 2011;153(5):545–56.
8. Shi Y, Paluch BE, Wang X, Jiang X. *PTEN* at a glance. *J Cell Sci*. 2012;125(20):4687–92.
9. Chalhoub N, Baker SJ. *PTEN* and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:127–50.
10. Kharas GM, Okabe R, JJ. Ganis, Gozo M, Khandan T, Paktinat M, Gilliland GD et al. Constitutively active AKT depletes hematopoietic stem cells and induces leukemia in mice. *Blood*. 2010;115(7):1406–15.
11. Cai J, Xu L, Tang H, Yang Q, Yi X, Fang Y et al. The Role of the *PTEN/PI3K/Akt* Pathway on Prognosis in Epithelial Ovarian Cancer: A Meta-Analysis. *Oncologist*. 2014;19(5):528–35.
12. Dubrovskaya A, Kim S, Salamone RJ, Walker JR, Maira S-M, Garcia-Echeverria C et al. The role of *PTEN/Akt/PI3K* signaling in the maintenance and viability of prostate cancer stem-like cell populations. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106(1):268–73.
13. Panuzzo C, Crivellaro S, Carrà G, Guerrasio A, Saglio G, Morotti A. BCR-ABL promotes *PTEN* downregulation in chronic myeloid leukemia. *PLoS One*. 2014;9(10):e110682.
14. Podsypnina K, Ellenson LH, Nemes A, Gu J, Tamura M, Yamada KM et al. Mutation of *Pten/Mmac1* in mice causes neoplasia in multiple organ systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(4):1563–8.
15. Philip C-A, Laskov I, Beauchamp M-C, Marques M, Amin O, Bitharas J et al. Inhibition of PI3K-AKT-mTOR pathway sensitizes endometrial cancer cell lines to PARP inhibitors. *BMC Cancer*. 2017;17(1):638.
16. Khan S, Kumagai T, Vora J, Bose N, Sehgal I, Koeffler PH, Bose S. *PTEN* promoter is methylated in a proportion of invasive breast cancers. *Int J Cancer*. 2004;112(3):407–10.
17. Silva A, Yunes JA, Cardoso BA, Martins LR, Jotta PY, Abecasis M et al. *PTEN* posttranslational inactivation and hyperactivation of the PI3K/Akt pathway sustain primary T cell leukemia viability. *J Clin Invest*. 2008;118(11):3762–74.
18. Mendes RD, Canté-Barrett K, Pieters R, Meijerink JPP. The relevance of *PTEN-AKT* in relation to NOTCH1-directed treatment strategies in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2016;101(9):1010–7.
19. Bandapalli OR, Zimmermann M, Kox C, Stanulla M, Schrappe M, Ludwig WD et al. NOTCH1 activation clinically antagonizes the unfavorable effect of *PTEN* inactivation in BFM-treated children with precursor T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2013;98(6):928–36.
20. Paganin M, Grillo MF, Silvestri D, Scapinello G, Buldini B, Cazzaniga G et al. The presence of mutated and deleted *PTEN* is associated with an increased risk of relapse in childhood T cell acute lymphoblastic leukaemia treated with AIEOP-BFM ALL protocols. *Br J Haematol*. 2018;182(5):705–11.
21. Weerkamp F, Baert MR, Naber BA, Koster EE, de Haas EF, Atkuri KR et al. Wnt signaling in the thymus is regulated by differential expression of intracellular signaling molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(9):3322–6.
22. Ng OH, Erbilgin Y, Firtina S, Celkan T, Karakas Z, Aydogan G et al. Deregulated WNT signaling in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Cancer J*. 2014;4(3):e192.

23. Hoelzer D, Gökbuğet N. Diagnostik und therapie der akuten lymphatischen leukämie des erwachsenen. *Der Onkologe*. 2002;8:672-85.
24. Livak KJ, Schmittgen, TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4): 402-8.
25. Hisamatsu Y, Oki E, Otsu H, Ando K, Saeki H, Tokunaga E et al. Effect of EGFR and p-AKT Overexpression on Chromosomal Instability in Gastric Cancer. *Annals of Surgical Oncology*. 2016;23:1986-92.
26. Altomare DA, Testa JR. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene*. 2005;24(50):7455-64.
27. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell*. 2007 Jun 29;129(7):1261-74.
28. Knobbe CB, Reifenberger G. Genetic Alterations and Aberrant Expression of Genes Related to the Phosphatidylinositol-3'-Kinase/Protein Kinase B (Akt) Signal Transduction Pathway in Glioblastomas. *Brain Pathology*. 2006;13(4):507-18.
29. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: A play in three acts. *Genes Dev*. 1999;13(22):2905-27.
30. Sandhöfer N, Metzeler KH, Rothenberg M, Herold T, Tiedt S, Groß V et al. Dual PI3K/mTOR inhibition shows antileukemic activity in MLL-rearranged acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2015;29(4):828-38
31. Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem*. 1996;271(49):31372-8.
32. Blackburn JS, Liu S, Wilder JL, Dobrinski KP, Lobbardi R, Moore FE et al. Clonal evolution enhances leukemia-propagating cell frequency in T cell acute lymphoblastic leukemia through Akt/mTORC1 pathway activation. *Cancer Cell*. 2014;25(3):366-78.
33. Küçükçankurt F, Erbilgin Y, Fırtına S, Ng ÖH, Karakaş Z, Çelkan T, et al. *PTEN* and *AKT1* variations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Turk J Hematol*. 2020;37(2):98-103.
34. Naderali E, Valipour B, Khaki AA, Rad JS, Alihemmati A, Rahmati M, et al. Positive effects of PI3K/Akt signaling inhibition on *PTEN* and P53 in prevention of acute lymphoblastic leukemia tumor cells. *Adv Pharm Bull*. 2019; 9(3):470-80.
35. Chan CH, Jo U, Kohrman A, Rezaeian AH, Chou PC, Logothetis C, et al. Posttranslational regulation of Akt in human cancer. *Cell Biosci*. 2014;4(1):59.
36. Piovan E, Yu J, Tosello V, Herranz D, Ambesi-Impimato A, DaSilva AC et al. Direct Reversal of Glucocorticoid Resistance by AKT Inhibition in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell*. 2013;24(6):766-76.
37. Mao Z, Zhou J, Luan J, Sheng W, Shen X, Dong X. Tamoxifen reduces P-gp-mediated multidrug resistance via inhibiting the PI3K/Akt signaling pathway in ER-negative human gastric cancer cells. *Biomed Pharmacother*. 2013;68(2):179-83.
38. Neri LM, Cani A, Martelli AM, Simioni C, Junghanss C, Tabellini G et al. Targeting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in B-precursor acute lymphoblastic leukemia and its therapeutic potential. *Leukemia*. 2014;28(4):739-48.
39. Pui CH, Yang JJ, Hunger SP, Pieters R, Schrappe M, Biondi A et al. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress Through Collaboration. *J Clin Oncol*. 2015 Sep 20;33(27):2938-48.
40. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2013; 381(9881):1943-55.
41. Palomero T, Sulis ML, Cortina M, Real PJ, Barnes K, Ciofani M, et al. Mutational loss of *PTEN* induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukemia. *Nat Med*. 2007;13(10):1203-10
42. Morishita N, Tsukahara H, Chayama K, Ishida T, Washio K, Miyamura T, et al. Activation of Akt is associated with poor prognosis and chemotherapeutic resistance in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2012;59(1):83-9.



Miyelodisplastik Sendromlu Olguların Kan ve Kemik İliği Örneklerinin Konvansiyonel Sitogenetik ve Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) Yöntemiyle İncelenmesi

Investigation of Blood and Bone Marrow Samples of Patients with Myelodysplastic Syndrome by Conventional Cytogenetic and Fluorescent In Situ Hybridization Methods

Selin Coşkun¹, Şükriye Yılmaz², Ayşe Çırakoğlu², R. Dilhan Kuru²,
Yelda Tarkan Argüden², Şeniz Öngören³, Seniha Hacıhanefioğlu²

¹ İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp araştırmaları Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

² İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

³ İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ORCID: S.C. 0000-0001-8200-7633;
Ş.Y. 0000-0001-8076-3080;
A.Ç. 0000-0003-0330-2277;
R.D.K. 0000-0001-8088-5336;
Y.T.A. 0000-0002-5405-3365;
Ş.Ö. 0000-0002-2809-5510;
S.H. 0000-0002-1817-0994

Corresponding author/Sorumlu yazar:

Ayşe Çırakoğlu,
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye
E-mail: aysecirakoglu@yahoo.com

Submitted/Geliş tarihi: 10.09.2020

First Revision Received/İlk revizyon: 11.09.2020

Last Revision Received/Son revizyon: 01.10.2020

Accepted/Kabul Tarihi: 07.10.2020

Citation/Atf: Coşkun S, Yılmaz S, Çırakoğlu A, Kuru RD, Tarkan Argüden Y, Ongoren S, et al. Investigation of blood and bone marrow samples of patients with myelodysplastic syndrome by conventional cytogenetic and fluorescent in situ hybridization methods. Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi 2020; 3(3): 122-129. <https://doi.org/10.26650/JARHS2020-793043>

ÖZ

Amaç: Miyelodisplastik sendrom (MDS) olgularının %30-50'sinde kromozom anomalileri gözlenmektedir. En sık gözlenen anomaliler trizomi 8, monozomi 7/7q-, monozomi 5/5q- ve 20q- olarak belirlenmiştir. Bu anomalilerin saptanmasında konvansiyonel sitogenetik ve interfaz FISH (iFISH) yöntemleri kullanılmaktadır. Her iki yöntem için tercih edilen materyal kemik iliği olmakla birlikte, perifer kanının kullanılmasının uygunluğu da araştırılmaktadır. Bu çalışmada, laboratuvarımıza başvuran MDS hastalarının perifer kanı ve kemik iliği örneklerindeki anomalilerin sitogenetik ve iFISH yöntemleri ile karşılaştırılarak mevcut veri havuzuna katkı sağlanması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: MDS tanılı 19 olgunun perifer kanı ve kemik iliği örnekleri konvansiyonel sitogenetik ve 5q31, 7q22 ve 7q31 bölgelerine özgü delesyon problemlerinin kullanıldığı iFISH yöntemleriyle incelenerek, elde edilen veriler örnek tipi ve kullanılan yöntemlere göre karşılaştırılmıştır.

Bulgular: Konvansiyonel sitogenetik yöntemiyle olguların 5'inde periferik kan ve kemik iliği örneklerinde elde edilen sonuçlar arasında (iki olguda normal, üç olguda anormal karyotip) konkordans, 12 olguda diskordans gözlenmiş, iki olguda kemik iliğinde metafaz elde edilemezken, perifer kanında klonal sayı anomalileri saptanmıştır. iFISH yöntemiyle incelemede ise, olguların perifer kanı ve kemik iliği örnekleri arasında, -5/del(5q) incelemesinde 13 olguda (iki olguda pozitif, 11 olguda negatif), -7/del(7q) için 10 olguda (bir olguda pozitif, 9 olguda negatif) konkordans gözlenmiştir. Sitogenetik olarak tek olgunun kemik iliği örneğinde birlikte gözlenen del(5q) ve del(7q) bulguları, hem perifer kanı hem de kemik iliği örneklerinde uygulanan iFISH analizinde de pozitif olarak saptanmıştır.

Sonuç: Elde ettiğimiz sonuçlar daha önce bildirilen çalışmalarla birlikte değerlendirildiğinde, her iki yöntem ve her iki örnek tipinin kendilerine özgü avantajlara ve dezavantajlara sahip oldukları gözlenmiştir. Bu durum bu iki yöntem ve örneğin birbirlerinin yerini almak yerine, paralel olarak kullanılmasının yararlı olacağını düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Miyelodisplastik Sendrom, Sitogenetik, interfaz FISH

ABSTRACT

Objective: Chromosome abnormalities are observed in 30-50% of myelodysplastic syndrome (MDS) cases. The most common anomalies are trisomy 8, monosomy 7 / 7q-, monosomy 5 / 5q- and 20q-. Conventional cytogenetic and interphase FISH methods are used to detect these anomalies. Although bone marrow is the preferred material for both methods, the suitability of using peripheral blood is also being investigated. The aim of this study is to contribute to the data pool in this area by presenting comparative cytogenetic and interphase FISH examination results in peripheral blood and bone marrow samples of MDS patients who applied to our laboratory.

Materials and Methods: Peripheral blood and bone marrow samples of 19 patients with MDS were examined with conventional cytogenetic and iFISH methods using deletion probes specific to the 5q31, 7q22 and 7q31 regions. The data obtained were used to compare the materials and techniques.



Results: Conventional cytogenetics: In this technique, the results of peripheral blood and bone marrow samples were concordant in 5 cases (normal karyotypes in 2, and abnormal in 3 cases), and discordant in 12 cases, and in two cases, there was no metaphase in bone marrow samples, while abnormal karyotypes were observed in blood samples. iFISH: Between the results of peripheral blood and bone marrow; for -5/del(5q) there was concordance in 13 cases (positive in two, and negative in three cases), and for -7/del(7q), 10 cases were concordant (positive in one, and negative in 9 cases). The one case that del(5q) and del(7q) were observed together in conventional cytogenetic examination, was positive in iFISH analysis for both anomalies, too.

Conclusion: When we evaluate our results together with previous reports, it seems that both methods and both materials have their own advantages and disadvantages. Therefore, we suggest that it would be beneficial to use these two methods and materials in parallel instead of replacing each other.

Keywords: Myelodysplastic syndrome, Cytogenetics, interphase FISH

GİRİŞ

Miyelodisplastik sendrom (MDS) yetersiz ve displastik hematopoez ile karakterize, klonal bir hematolojik hastalıktır. Kemik iliğinde hiperselülarite ve blast hücre artışı olmasına karşın, perifer kanında sitopeni gözlenir (1). MDS'li hastaların klinik fenotipi çok çeşitlidir. Bu çeşitlilik, sitopenilerin ağırlığı, kemik iliğindeki hücre zenginliği ve blast sayısı, Akut miyeloid lösemiye (AML) dönüşme oranı, sağkalım ve tedaviye yanıt gibi durumlarla ilişkilidir. Fenotipik heterojenitenin sebebi, hastalığın patogenezinde büyük bir rol oynayan genetik değişimlerin çeşitliliğidir (1,2).

Kromozomal değişimler MDS'nin %30-50'sinde görülür. Bu değişimler dengeli translokasyonlar, sayısal veya yapısal artış ya da kayıplara sahip dengesiz karyotipler olabileceği gibi kompleks karyotipler de olabilir (3). Trizomi 8, monozomi 7/7q-, monozomi 5/5q- ve 20q- MDS'de en sık gözlenen anomalilerdir (4).

Konvansiyonel sitogenetik yöntemler, MDS kliniğinin sitogenetik değerlendirilmesinde altın standart olarak değerlendirilse de bazı sınırlamaları vardır. Bu incelemeler için neoplastik klonun bölünebilen hücrelerine ihtiyaç vardır ve bazı durumlarda metafaz hücrelerinin azlığı nedeniyle sonuçları yorumlamak kolay değildir. İnterfaz flüoresan in situ hibridizasyon (iFISH) yöntemi ise mitotik indeksin düşük olduğu durumlarda, bölünen hücrelere ihtiyaç duymadan interfaz hücrelerinde spesifik anomalilerin tanımlanmasını sağlar. iFISH'in başka bir avantajı, konvansiyonel sitogenetiğe göre daha fazla hücre analiz edilmesinden dolayı, yüksek hassasiyete sahip olmasıdır (5).

MDS'de gözlenen kromozom anomalilerinden bazıları tedavi seçiminde etkili olmaktadır. Bunlardan en önemlisi 5q delesyonudur. İzole 5q delesyonuna sahip MDS hastalarında uygulanan Lenalidomide tedavisi hastaların %20-45'inde tam sitogenetik yanıt sağlamaktadır. Diğer bir önemli anomali olan 7q delesyonunun ise hastalığın kötü prognozu ile ilişkili olduğu bilinmektedir (6,7).

MDS hastalarında sitogenetik ve iFISH incelemeleri için çoğunlukla kemik iliği örneği kullanılmaktadır. Ancak, kemik iliği aspirasyonu hasta için zor ve acı veren bir işlem olup, hiposelüler veya myelo-

fibroz gelişen hastalarda da sıkıntılı olmaktadır. Perifer kanının kemik iliği yerine kullanılmasının uygun olup olmadığının, hem konvansiyonel sitogenetik hem de iFISH yöntemleri kullanılarak araştırıldığı, sınırlı sayıdaki çalışmaların (8,9,10) bazılarında kemik iliği ve perifer kan sonuçlarının iyi korelasyon gösterdiği bildirilmişse de (8) perifer kanının sitogenetik ve iFISH için tam güvenilir bir örnek olmayabileceği, fakat kemik iliği aspirasyonu gerçekleştirilemediği veya yeterli hücre elde edilemediği durumlarda yararlı olabileceği görüşünde birleşilmektedir (8, 9, 10).

Bu çalışmayla, laboratuvarımıza başvuran MDS hastalarının perifer kanı ve kemik iliği örneklerinde karşılaştırmalı sitogenetik ve iFISH inceleme sonuçlarını sunarak bu alandaki sınırlı veri havuzuna katkıda bulunmayı amaçladık. Çalışmamızda, MDS hastalarından alınan perifer kanı ve kemik iliği aspirasyonu örneklerinde konvansiyonel sitogenetik analizleri yapıldı ve MDS'de sık gözlenen -5/del5q ve -7/del7q delesyonlarını belirlemek için 5q31, 7q22 ve 7q31 bölgelerine özgü problemleri kullanılarak iFISH yöntemi uygulandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda, 2012-2014 yılları arasında hematoloji servisine başvuran, MDS tanılı 19 olgunun perifer kanı ve kemik iliği örnekleri konvansiyonel sitogenetik ve iFISH yöntemleriyle incelendi. Sekiz kadın ve 11 erkek hastadan oluşan olgu grubuna ait klinik özellikler Tablo 1'de özetlenmiştir. Bu çalışma için kurumumuz Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan etik kurul onayı ve olgulardan bilgilendirilmiş onam formu alınmıştır.

Sitogenetik inceleme için, perifer kanında 72 saatlik, kemik iliğinde 24 ve 48 saatlik kültür ve G-bantlama yöntemleri uygulandı. Elde edilen metafazlar "International System for Human Cytogenomic Nomenclature (ISCN) 2016" kurallarına göre değerlendirildi (11). Sitogenetik incelemede, perifer kan örneğinde en az 20, kemik iliğinde en az 10 metafaz değerlendirildi.

Olguların perifer kan ve kemik iliklerine, 5q31 bölgesine özgü del(5q) Delesyon Probu (Cytocell Aquarius) ve, 7q22 ve 7q31 bölgelerine özgü del(7q) De-

Tablo 1. Olgulara ait yaş, cinsiyet, öntanı, tanı ve tedavi bilgileri

| Olgular No | Yaş | Cinsiyet | Tanı | Tedavi |
|------------|-----|----------|--------------------|---|
| 1 | 66 | E | MDS | |
| 2 | 80 | K | * | * |
| 3 | 60 | E | MDS/ KMPH | EPO kullanımı AML'ye dönüşüm var. Steradin-İdarubisin |
| 4 | 62 | E | MDS | Tedavisiz takip edilen hasta |
| 5 | 65 | E | MDS-RA | * |
| 6 | 64 | E | MDS-RA- EB-I-II | Azasitidin Transplantasyon planlanıyor. |
| 7 | 66 | K | MDS | Tedavisiz takip edilen hasta |
| 8 | 56 | K | * | * |
| 9 | 77 | K | MDS | * |
| 10 | 54 | E | MDS | Transfüzyon Azasitidin Steradin-İdarubisin Kemik iliği nakli Remisyon |
| 11 | 52 | K | MDS | Tedavisiz takip edilen hasta |
| 12 | 75 | E | MDS | Tedavisiz takip edilen hasta |
| 13 | 78 | E | MDS | * |
| 14 | 47 | E | MDS | * |
| 15 | 69 | K | MDS-RA- EB-I | Transfüzyon Azasitidin |
| 16 | 61 | E | MDS/ KMPH | * |
| 17 | 66 | K | * | * |
| 18 | 43 | E | MDS | B-vit Folik asit |
| 19 | 59 | K | MDS | * |

* Tanı ve tedaviyle ilgili bilgiye ulaşılamadı. MDS: Miyelodisplastik Sendrom, AML: Akut Miyeloid Lösemi, KMPH: Kronik Myeloproliferatif Hastalık, RA: Refrakter Anemi, RAEB: Aşırı Blastlı Refrakter Anemi, EPO: Eritropoetin

lesyon Problemleri (Cytocell Aquarius) kullanılarak iFISH tekniği uygulandı ve 100-300 interfaz nükleusu incelendi. Problemlere ait eşik ("cut off") değerlerini belirlemek için 20 sağlıklı bireyin perifer kan örneklerine de iFISH yöntemi uygulandı ve elde edilen sonuçlardan eşik değeri BETA.INV yöntemiyle hesaplandı (12).

BULGULAR

MDS tanısı alan ve yaşları 43-80 arasında değişen 8 (%42) kadın ve 11 (%58) erkek hastada medyan yaş

64 olarak saptandı. Olgulara ait 19 kemik iliği, 19 perifer kanı olmak üzere toplam 38 örnekte yapılan sitogenetik incelemede iki kemik iliği örneğinde yeterli sayı ve kalitede metafaz elde edilemezken, perifer kan örneklerinin tümünde sonuç elde edildi. Olguların konvansiyonel sitogenetik ve iFISH analiz sonuçları Tablo 2'de yer almaktadır. Bu sonuçlara göre perifer kan örneklerinin 4'ünde, kemik iliği örneklerinin 8'inde normal karyotip bulundu. Olguların ikisinde hem kan hem de kemik iliğinde normal karyotip saptanırken, diğer olgularda en az bir örnek tipinde klonal anomaliler gözlemlendi. Üç olguda (Olgular 6, 13, 15) aynı kromozom anomalileri hem kan hem kemik iliğinde gözlenirken, 4 olguda (Olgular 5, 9, 10, 17) iki örnekte farklı klonal anomaliler saptandı. Kemik iliğinde yeterli metafaz elde edilemeyen iki olguda (Olgular 1 ve 16) perifer kanda klonal anomaliler gözlemlendi.

Sitogenetik analiz sonucunda perifer kanında gözlenen klonal kromozom sayı anomalileri -X, -18 (4'er olguda), -19 (3 olguda), -21, -22 (2'şer olguda), -Y, -7, -12, -17 (biri olguda); yapı anomalileri ise 2 olguda del(6)(q11q14), birer olguda del(2)(p21p23?), add(4)(q35), del(4)(q31q33?) ve add(5)(q31) iken, kemik iliğinde saptanan sayı anomalileri; -Y (2 olguda), birer olguda -X, +8, -17, -18; yapı anomalileri, del(6)(q11q14) (2 olguda), idic(X), add(4)(q35), add(5)(q31), del(5)(q23), del(7)(q22), del(15)(q21), del(18)(p11.2) ve del(20)(q11) (biri olguda) olarak tespit edildi.

5q31, 7q22 ve 7q31 bölgelerine özgü problemler ile 20 sağlıklı bireyin perifer kan örneklerinde yapılan iFISH analizleri sonucunda, hem -5/del(5q) için, hem de -7/del(7q) için eşik değeri %7 olarak belirlendi. Olguların perifer kanlarında yapılan iFISH incelemeleri sonucunda, 8 olguda -5/del(5q), 7 olguda -7/del(7q) sonuçları eşik değerinin üzerinde bulundu. Kemik iliği örneklerinde, -5/del(5q) için eşik değerini iki, -7/del(7q) için 4 olgunun aştığı gözlemlendi. İki olguda, her iki örnekte de -5/del(5q) saptanırken -7/del(7q) için bu durum sadece bir olguda gözlemlendi (Tablo 2).

Sitogenetik olarak tek olgunun (Olgular 19) kemik iliği örneğinde kompleks karyotip içinde birlikte gözlenen del(5q) ve del(7q) bulguları, hem perifer kanı

Tablo 2. Olgulara ait konvansiyonel sitogenetik ve FISH sonuçları

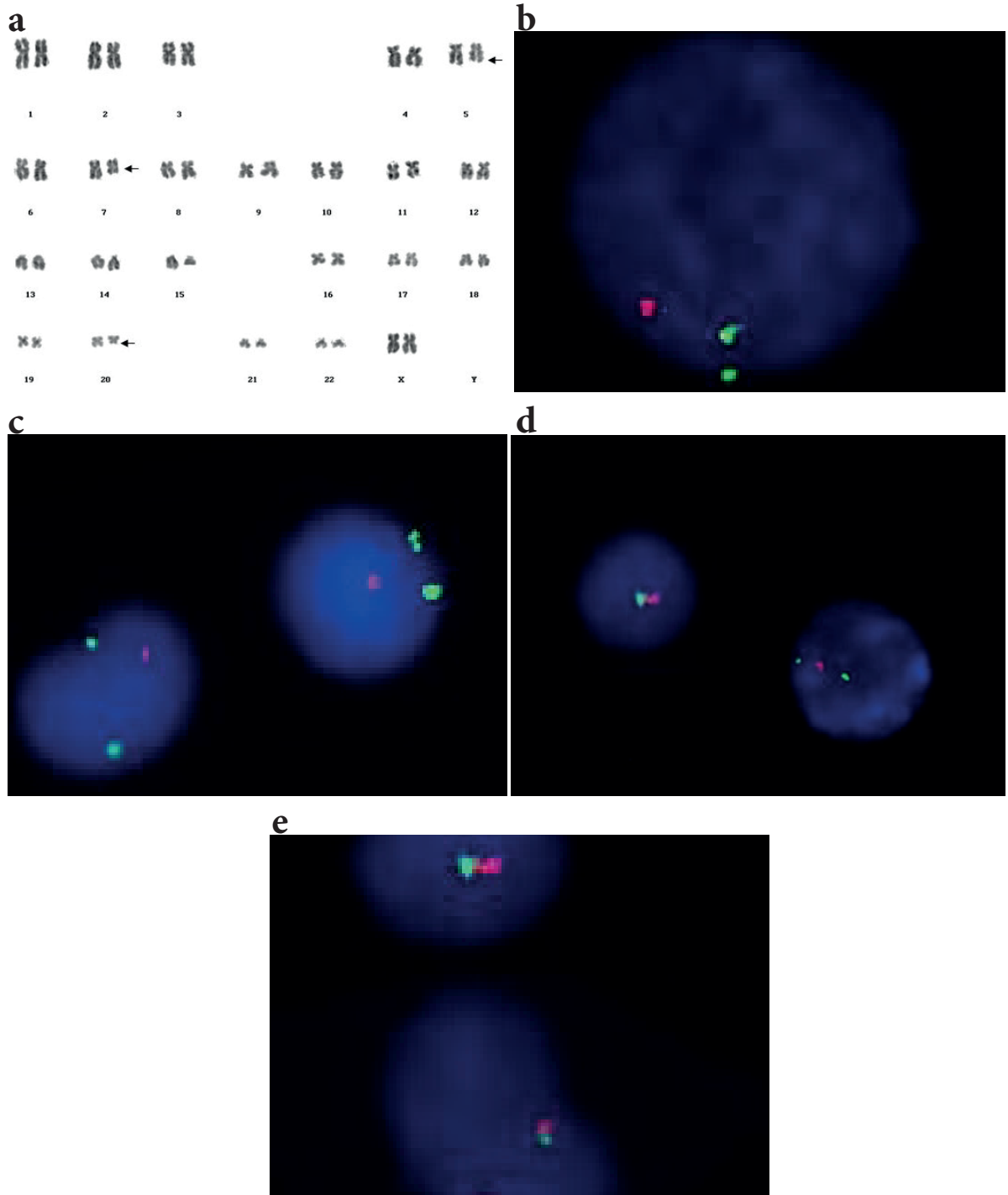
| Olgu no | Perifer kanı | | | Kemik iliği | | |
|---------|---|------------|----------|---|------------|----------|
| | Karyotip | FISH | | Karyotip | FISH | |
| | | -5/del(5q) | -7/del7q | | -5/del(5q) | -7/del7q |
| 1 | 45,X,-Y[3]/46,XY[18] | - | - | * | - | - |
| 2 | 44~45,X,-X[cp4]/46,XX[6] | - | - | 46,XX[12] | - | - |
| 3 | 45~46,XY,del(4)(q31q33?) [cp3]/43~44,XY,-7[cp3]/46,XY[15] | - | + | 46,XY[8] | - | - |
| 4 | 45~46,XY,del(2)(p21p23?) [cp3]/46,XY[18] | - | - | 46,XY[13] | - | - |
| 5 | 30~45<2n>,XY,-17[3],-18[4],-19[4],-21[5],-22[3][cp10]/46,XY[14] | - | - | 45,X,-Y[4]/47,XY,+8[3]/46,XY[3] | - | - |
| 6 | 46,XY,del(6)(q11q14)[3]/46,XY[22] | + | + | 44~46,XY,del(6)(q11q14) [cp6]/46,XY[13] | - | - |
| 7 | 39~44,XX,-19[cp3]/46,XX[13] | - | + | 46,XX[5] | - | - |
| 8 | 38~45,XX,-X[3],-21[4],-22[3] [cp7]/46,XX[18] | + | + | 46,XX[14] | - | - |
| 9 | 42~45,X,-X[cp5]/46,XX[15] | - | - | 42~43,XX,-18[cp3]/46,XX[6] | - | + |
| 10 | 43~45,XY,-18[cp5]/42~45,XY,-19[cp4]/46,XY[9] | + | - | 45~46,XY,del(18)(p11.2) [cp4]/46,XY[9] | - | - |
| 11 | 46,XX[28] | + | - | 38~44,XX,-17[cp3]/46,XX[4] | - | + |
| 12 | 46,XY[21] | - | - | 44~45,X,-Y[cp12] | - | - |
| 13 | 46,XY,add(4)(q35),add(5)(q31)[4]/46,XY[19] | - | - | 44~46,XY,add(4)(q35) [cp3]/46,XY,add(5)(q31) [2]/46,XY[11] | - | + |
| 14 | 46,XY[21] | - | - | 46,XY[9] | - | - |
| 15 | 39~46,XX,-18[-cp3]/44~45,XX,del(6)(q?q?) [cp2]/46,XX[16] | + | + | 46,X,idel(X)(q13)[4]/47,idel,+X[2]/46,XX,del(6)(q?q?) [2]/46,XX[2] | + | - |
| 16 | 42~45,XY,-18[cp3]/46,XY[20] | + | + | * | - | - |
| 17 | 41~45,XX,-X[5],-20[3],-21[3] [cp11]/46,XX[21] | - | - | 46,XX[15] | - | - |
| 18 | 46,XY[13] | + | - | 46,XY[16] | - | - |
| 19 | 44~46,XX,-12[-cp3]/46,XX[19] | + | + | 44~46,XX,del(5)(q23)[3],del(7)(q22)[2],del(15)(q21)[6],del(20)(q11.2)[6] [cp6]/46,XX[2] | + | + |

hem de kemik iliği örneklerinde uygulanan iFISH analizinde de pozitif olarak saptandı (Resim 1).

TARTIŞMA

MDS olgularında konvansiyonel sitogenetik, kromozom anomalilerini belirlemede en sık kullanılan inceleme yöntemidir (13). Ancak, yeterli sayı ve kaliteli metafaz elde etmenin güç olduğu durumlarda, sık görülen anomalilerin saptanmasında iFISH yöntemi de etkili olarak kullanılmaktadır. Her iki yöntem

için tercih edilen örnek materyali genellikle kemik iliği olmakla birlikte, daha kolay elde edilen perifer kanı örneklerinin bu amaçla kullanılabilirliği araştırma konusudur. Bu çalışmalarda, kemik iliği örneğinin, özellikle tanı aşamasında konvansiyonel sitogenetikle çalışılmasının önemi üzerinde durulmakta, perifer kanının ise, hastalığın izleminde bilinen anomalilerin iFISH yöntemiyle taranarak, tekrarlayan kemik iliği aspirasyonlarından kaçınmakta yardımcı olabileceği öne sürülmektedir (8,9,10).



Resim 1. Olgu 19'a ait karyogram ve iFISH görüntüleri. a) Kemik iliği örneğine ait 46,XX,del(5)(q31),del(7)(q22),del(15)(q21),del(20)(q11.2) karyotipini gösteren karyogram. b) Perifer kan örneğine ait del(5q) gösteren interfaz nükleusu (Yeşil sinyal: Kontrol bölgesi; 5p15, Kırmızı sinyal: Delesyon bölgesi; 5q31 (EGR1 geni)). c) Kemik iliği örneğine ait del(5q) gösteren interfaz nükleusları. d) Perifer kan örneğine ait del(7q22) gösteren interfaz nükleusları (soldaki terminal, sağdaki ara delesyon) (Yeşil sinyal: 7q31 (MET geni), Kırmızı sinyal: 7q22 (RELN geni)). e) Kemik iliği örneğine ait biri normal (alttaki), biri del(7q22) gösteren (üstteki) interfaz nükleusları.

Çalışmamızda, MDS tanısı alan hastalardan alınan perifer kanı ve kemik iliği aspirasyon örnekleri, konvansiyonel sitogenetik ve 5q31, 7q22 ve 7q31 bölgelerine özgü FISH problemleri ile incelenmiş ve her iki yöntemle elde edilen sonuçların, perifer kanı ve kemik iliği arasında gösterdiği diskordans oranları (konvansiyonel sitogenetik incelemesinde 12/17 olgu (%70), iFISH incelemesinde -5/del5q için 6/19 (%32), -7/del7q için 9/19 olgu (%47)) literatürde bildirilen oranlardan daha yüksek olarak saptanmıştır (8,9,10). Cherry ve ark. (8) 100 olgu içeren serilerinde kemik iliği ve perifer kanı arasındaki diskordans oranlarını konvansiyonel sitogenetik incelemesinde %6,6 ve FISH çalışmalarında %3 olarak bildirmişlerdir. Coleman ve ark. (9) toplam 433 olgunun katılımıyla yaptıkları çalışmalarında, konvansiyonel sitogenetik ve FISH sonuçları arasında %4-7, kemik iliği ve perifer kanı FISH sonuçları arasında ise %31 oranında diskordans gözlemişlerdir. Fakhr ve ark. (10) ise, 35 olguyu kapsayan çalışmalarında kemik iliği ve perifer kanı arasında sitogenetik incelemede %26 diskordans gözlenirken, FISH analizinde hiç diskordans saptanmadığını bildirmişlerdir. Bu durumun, çalışmamızın en önemli limitasyonu olan olgu sayısının azlığına bağlı olabileceğini ve daha fazla sayıda hasta üzerinde çalışmanın gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

SONUÇ

Sonuç olarak, daha önce yapılan çalışmalarla bizim sonuçlarımız birlikte değerlendirildiğinde, her iki yöntem ve her iki örneğin kendilerine özgü avantajlara ve dezavantajlara sahip oldukları ve birbirlerinin yerini almak yerine, paralel olarak kullanılmalarının MDS'nin klinik izleminde yarar sağlayacağı öngörülmektedir.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Bilgilendirilmiş Onam: Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Informed Consent: Written consent was obtained from the participants.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan alınmıştır.

Ethics Committee Approval: This study was approved by the Ethical Committee of the Istanbul University-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Faculty of Medicine.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- S.H., S.C.; Veri Toplama- S.C., S.Ö.; Veri Analizi/Yorumlama-S.C., Ş.Y., R.D.K., A.Ç., Y.T.A.; Yazı Taslağı- S.C., A.Ç.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- Y.T.A., Ş.Y., R.D.K.; Son Onay ve Sorumluluk- S.C., Ş.Y., A.Ç., R.D.K., Y.T.A., Ş.Ö., S.H.

Author Contributions: Conception/Design of Study- S.H., S.C.; Data Acquisition- S.C., S.Ö.; Data Analysis/Interpretation- S.C., Ş.Y., R.D.K., A.Ç., Y.T.A.; Drafting Manuscript- S.C., A.Ç.; Critical Revision of Manuscript- Y.T.A., Ş.Y., R.D.K.; Final Approval and Accountability- S.C., Ş.Y., A.Ç., R.D.K., Y.T.A., Ş.Ö., S.H.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Finansal Destek: Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından desteklenmiştir. (Proje No: 33364)

Financial Disclosure: This study was supported by Istanbul University Scientific Research Projects Unit (BAP). (Project No: 33364).

KAYNAKLAR/REFERENCES

1. Haferlach T. The Molecular Pathology of Myelodysplastic Syndrome. *Pathobiology* 2019;86(1):24-9.
2. Bejar R, Levine R, Ebert B.L. Unraveling the Molecular Pathophysiology of Myelodysplastic Syndromes. *J Clin Oncol* 2011;29(5): 504-15.
3. Neaim F, Rao P.N, Grody W. Hematopathology, 1st ed., Academic Press. Published by Elsevier Science & Technology 2008.
4. Saitoh K, Miura I. Fluorescence in situ hybridization of progenitor cells obtained by Fluorescence-Activated Cell sorting for the detection of cells affected by chromosome abnormality trisomy 8 in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood* 1998; 92(8): 2886-92.

5. Adema V, Hernandez J, Abáigar M, et al. Application of FISH 7q in MDS patients without monosomy 7 or 7q deletion by conventional G-banding cytogenetics: Does -7/7q- detection by FISH have prognostic value? *Leuk Res* 2013; 37(4): 416-21.
6. Pellagatti A, Boulwood J. The molecular pathogenesis of the myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol* 2015;95(1):3-15.
7. Sebaa A, Ades L, Penther D, et al. Incidence of 17p Deletions and TP53 Mutation in Myelodysplastic Syndrome and Acute Myeloid Leukemia with 5q Deletion. *Genes Chromosomes Cancer* 2012; 51(12):1086-92.
8. Cherry A, Slovak M, Campbell L, et al. Will a peripheral blood (PB) sample yield the same diagnostic and prognostic cytogenetic data as the concomitant bone marrow (BM) in myelodysplasia? *Leukemia Research* 2012; 36(7): 832-40.
9. Coleman J, Theil K, et al. Diagnostic yield of bone marrow and peripheral blood FISH panel testing in clinically suspected myelodysplastic syndromes and/or acute myeloid leukemia. *Am J Clin Pathol* 2011;135(6):915-20.
10. Fakhr ZA, Mehrzad V, İzaditabar A, Salehi M. Evaluation of the utility of peripheral blood vs bone marrow in karyotype and fluorescence in situ hybridization for myelodysplastic syndrome diagnosis. *J Clin Lab Anal* 2018;32:e22586.
11. McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M (Eds).: *An International System for Human Cytogenomic Nomenclature* (2016). Basel: Karger; 2016.
12. Dowling PK. Mathematics for the cytogenetic technologist. In: *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2017. p. 937-64.
13. Lai Y, Huang X ve ark. Standardized fluorescence in situ hybridization testing based on an appropriate panel of probes more effectively identifies common cytogenetic abnormalities in myelodysplastic syndromes than conventional cytogenetic analysis: A multicenter prospective study of 2302 patients in China. *Leukemia Research* 2013; 39(5): 530-5.



Role of *CYP3A4*1B* Gene Variant In Substance Use Disorder

*Madde Kullanım Bozukluğunda CYP3A4*1B Gen Varyantının Rolü*

Gazi Çapar¹, Hayriye Şentürk Çiftçi², Sacide Pehlivan²

ABSTRACT

Objective: This study aims to find out the possible association between the *CYP3A4*1B* gene variant (rs2740574) and substance use disorder susceptibility in the Turkish population.

Materials and Methods: 158 patients with substance use disorder and 100 healthy individuals matched for gender, age, and ethnicity were enrolled in the study. Genotyping was analyzed with the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method using the MboII restriction endonuclease. The association between the *CYP3A4*1B* variant and substance use disorder was analyzed using SPSS 21 and de-Finetti program.

Results: The *CYP3A4* gene (MboII gene variant in 5' promoter region) genotype distributions of substance use disorder patients were not significantly different from the healthy controls. When the substance use and control groups were compared in terms of allele frequency, increased G allele frequency was observed in *CYP3A4* variants in the substance use group (p: 0,042).

Conclusion: This is the first study that investigates the association between the MboII gene variant in *CYP3A4* gene 5' promoter region and substance use disorder in the literature. It was demonstrated that an increased G allele existed in Turkish substance use disorder patients. Plans have been made to research the other variants of the *CYP3A4* gene in the future.

Keywords: *CYP3A4*, substance abuse, MboII endonuclease, drug metabolism, addiction

ÖZ

Amaç: Bu çalışma, Türk popülasyonunda *CYP3A4*1B* gen varyantı (rs2740574) ile madde kullanım bozukluğuna yatkınlık arasındaki olası ilişkiyi bulmayı amaçlamaktadır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya madde kullanım bozukluğu olan cinsiyet, yaş ve etnik köken açısından eşleştirilmiş 158 hasta ile 100 sağlıklı birey alındı. Genotipleme, polimeraz zincir reaksiyonu restriksiyon parça uzunluğu polimorfizmi (PCR-RFLP) yöntemi MboII restriktif endonükleaz enzimi kullanılarak yapılmıştır. *CYP3A4*1B* varyantı ile madde kullanım bozukluğu arasındaki ilişki SPSS 21 ve de-Finetti programı kullanılarak analiz edilmiştir.

Bulgular: Madde kullanım bozukluğu hastalarının *CYP3A4* geni (5' promoter bölgesindeki MboII gen varyantı) genotip dağılımları, sağlıklı kontrollerden anlamlı olarak farklı değildi. Allel sıklığı açısından madde kullanım ve kontrol grupları karşılaştırıldığında, madde kullanım grubunda *CYP3A4* varyantlarında G allel sıklığında artış gözlemlendi (p: 0,042).

Sonuç: Bu çalışma literatürde *CYP3A4* geni 5' promoter bölgesindeki MboII gen varyantı ile madde kullanım bozukluğu arasındaki ilişkiyi araştıran ilk çalışmadır. Türk popülasyonunda madde kullanım bozukluğu hastalarında artmış bir G allelinin mevcut olduğu gösterilmiştir. Gelecekte, *CYP3A4* geninin diğer varyantlarının araştırılacağı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: *CYP3A4*1B*, madde bağımlılığı, MboII endonükleaz, ilaç metabolizması, bağımlılık

¹ Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Istanbul, Turkey

² Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Istanbul, Turkey

ORCID: G.Ç. 0000-0002-9857-0962;
H.Ş.Ç. 0000-0001-5160-5227;
S.P. 0000-0003-1272-5845

Corresponding author/Sorumlu yazar:

Sacide Pehlivan,
Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine,
Department of Medical Biology, Istanbul, Turkey
E-mail: sacide.pehlivan@istanbul.edu.tr,
psacide@hotmail.com

Submitted/Geliş tarihi: 03.09.2020

Accepted/Kabul Tarihi: 08.10.2020

Citation/Atf: Çapar G, Şentürk Çiftçi H, Pehlivan S. Role of *CYP3A4*1B* gene variant in substance use disorder. Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi 2020; 3(3): 130-134.
<https://doi.org/10.26650/JARHS2020-789794>



INTRODUCTION

Substance use refers to harmful or dangerous uses of alcohol and psychoactive substances that includes illicit drugs (1). According to the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5) criteria; substance use disorder causes important clinical and functional disorders such as health problems, disability and failure to fulfill the main responsibilities at school or at home (2). In the World Drug Report (2018) it is stated that approximately 275 million people in the world had used drugs at least once in 2016, corresponding to about 5.6 percent of the population aged 15-64. 31 million people who use drugs have substance use disorder (3). Substance use disorder (addiction) is a complex process with physical, spiritual, and social dimensions. It can be said the factors that affect the structure of addiction are genetic and environmental factors in both genders. Factors such as the rate and sensitivity of metabolism in the body are genetic factors, but factors such as the desire for love and respect in society constitute environmental factors (4).

Drug metabolism concerns many parts of the body, including the liver, intestinal wall, lungs, kidneys, and plasma. As the main site of drug metabolism, the liver enzymatically converts fat-soluble compounds into more water-soluble compounds to remove and detoxify xenobiotics (foreign drugs or chemicals). Drug metabolism is achieved by phase I reactions, phase II reactions, or both. The most common phase I reaction, oxidation, is catalyzed by the CYP system (5). Cytochrome P450 (CYP) enzymes metabolize about 70% of drugs in clinical use (4). There are many different subfamilies in the cytochrome P450 family. One of them is the CYP3A subfamily with isoenzymes CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, and CYP3A43 (6). CYP3A4 is the most common P450 enzyme in the human liver (6,7). It constitutes 30% of the total P450 protein content and is also expressed in the prostate, breast, intestine, colon, small intestine, and brain (7,8). It shows a broad substrate specificity and is responsible for the oxidation of various non-structurally related compounds, including many therapeutic drugs, steroids, fatty acids, and xenobiotics (8). The *CYP3A4* gene on chromosome 7q21.3-q22.1 has 27.592 base pairs and

13 exons (9). The promoter region includes a basal transcription element (-35 to -50). Also, there is an AP-3 binding site in the 5' untranslated region (UTR), a p53 binding motif (a specific DNA sequence in which protein p53 can bind), a hepatocyte nuclear factor-4 element, two hepatocyte nuclear factors- 5 elements, a glucocorticoid which is associated with the response element and an estrogen response element (8). Changes in the activity of the CYP3A4 enzyme alter the blood concentrations of the drugs which are metabolized and affect the form of treatment and toxicity of the drug that is taken to the body. Genetic polymorphisms that occur or exist in the gene encoding the CYP3A4 enzyme affect the expression of the gene (10). The Adenine-Guanine (A → G) transition in the 5' promoter of the *CYP3A4* gene was reported by Rebbeck et al in 1998 (10). This functional variant, also known as *CYP3A4*1B* (rs2740574), is known to alter the gene's transcriptional activity and thus the overall activity of CYP3A4. It has been reported to reduce its activity (11). It has been reported that this activity change can lead to serious toxicity or therapeutic failure by altering the relationship between dose and blood concentration of the pharmacologically active drug by affecting the metabolic rate of drugs (10).

The aim of this study is to determine whether there is a relationship between the *CYP3A4* gene (MboII gene variant in 5'promotor region) and substance use disorder sensitivity in the Turkish population.

MATERIALS AND METHODS

A total of 158 patients with substance use disorder and 100 people as a healthy control group were included in the study. The individuals in the control group were chosen from those who had a similar ethnic origin and had no relationship with each other in the same geographical region. In addition, people who had substance use disorders in family history and/or personal history were excluded. This study was approved by Istanbul University Local Ethics Committee (2015/1374). Blood samples were taken into EDTA tubes and stored at -20 °C. DNAs were isolated from the collected blood by using the Genemark isolation kit. The forward and reverse primers (rs2740574) were prepared for PCR

amplification of the *CYP3A4* gene 5' promoter region. Then the *CYP3A4* genes were amplified with PCR from isolated genomic DNAs. The replication material (PCR product) contained the polymorphic region for MbolI (270 bp). Cutting products were analyzed by using uncut PCR products and DNA ladder in 3% agarose gel electrophoresis. Homozygous wild type DNA (genotype: M+/M+) produced 175 bp and 169 bp alleles, the homozygous variant type (genotype: M-/M-) produced 210 bp and 175 bp alleles and heterozygote genotype (genotype M+/M-) was recognized by showing 210 bp, 175 bp, 169 bp fragments in electrophoresis. The comparisons between the control and patient groups were performed using the chi-square test. The deviation of the groups from Hardy-Weinberg equilibrium and the results of the substance use disorder group were analyzed in terms of clinical parameters (12).

RESULTS

The *CYP3A4* genotypes and allele frequencies of 158 patients and 100 healthy control subjects were determined with the PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) method (Table 1). There was no significant difference in genotype frequencies between the control and

substance use disorder groups, but there was a significant difference in allele frequency (p=0.042) (Table 1). While there was a deviation in both patient and healthy controls according to Hardy Weinberg equilibrium, no significant difference was found between the clinical parameters and genotypes in the substance use disorder group (Table 2).

DISCUSSION

It is necessary to concentrate on the field of scientific studies related to substance use and substance use disorder, which is an increasing problem nowadays. Factors that affect the process, which leads to substance use and substance use disorder, can be classified in many titles. *CYP3A4*, one of the P450 enzymes, is quantitatively the most important. (4,6,7). The expression and function of *CYP3A4* vary greatly both among different individuals and within individuals. There are numerous environmental, genetic, and physiological factors that affect *CYP3A4* expression and activity. (13). Functional variants of the gene encoding the *CYP3A4* protein alter enzyme activity by affecting the expression at the gene level (10). Genetic variations of drug-metabolizing enzymes can significantly change the pharmacokinetic features of a drug. Thus, these

Table 1. *CYP3A4* gene MbolI variant results

| <i>CYP3A4</i> | Patient | Control | OR | CI 95% | p |
|---------------|-------------|-------------|-------|-------------|-------|
| Genotype | n=158 | n=100 | | | |
| AA | (72.9%) 115 | (83.0%) 83 | 0.547 | 0.292-1.027 | 0.081 |
| AG | (19.6%) 31 | (13.0%) 13 | 1.634 | 0.808-3.299 | 0.227 |
| GG | (7.6%) 12 | (4.0%) 4 | 1.973 | 0.617-6.298 | 0.367 |
| Allel | | | | | |
| A | (82.6%) 261 | (89.5%) 179 | 0.556 | 0.325-0.953 | 0.042 |
| G | (17.4%) 55 | (10.5%) 21 | | | |
| HWEp | 0.000 | 0.002 | | | |

HWEp: Hardy Weinberg Equilibrium; OR: Odds ratio; Fisher's exact test P value is significant p>0.05

Table 2. Comparison of genotypes in Substance Use Disorder and control group with clinical parameters

| <i>CYP3A4</i> | Normal (AA) | Mutant (AG+GG) | OR | CI 95% | p |
|---------------------|-------------|----------------|-------|--------------|-------|
| | n=115 | n=43 | | | |
| Sex Man/Woman | 104/11 | 39/4 | 2.667 | 0.362-19.646 | 0.311 |
| Age | 29.31±7.9 | 28.09±6.8 | - | - | 0.433 |
| Synthetic use | 72/43 | 25/18 | 0.766 | 0.361-1.628 | 0.488 |
| Psychotic condition | 70/45 | 26/17 | 0.926 | 0.436-1.970 | 0.843 |
| Smoke Yes/No | 100/15 | 36/2 | 0.833 | 0.681-1.109 | 0.243 |

HWEp: Hardy Weinberg Equilibrium; OR: Odds ratio; Fisher's exact test P value is significant p>0.05

genetic variants are considered to be the main source of drug metabolism and drug response (efficacy and/or safety) differences between individuals (14). The A → G transition in the 5' promoter of the *CYP3A4* gene, one of the phenotypes affected by genetic variants, was reported by Rebbeck et al in 1998 and it is known that it changes the transcriptional activity and therefore the overall activity of *CYP3A4* (9,10). This difference changes the drug metabolism, drug's blood levels, and drug dose adjustments that are used during treatment. It also changes the duration and effect of the drugs in the body, thus it widely affects the process that leads to substance use disorder in individuals (10). As of today, the *CYP3A4* gene (10 January 2019) is placed in the 13690 Pubmed article. There are only 44 articles that investigate the association between addiction and *CYP3A4*. These were published between 1999-2018. In previous studies, the association of the *CYP3A4*1B* variant with prostate cancer and ovarian cancer was investigated (15,16). It has been found that this functional variant may be associated with high tumor degrees in prostate cancer (13). There are studies about the *CYP3A4*1B* variant in atorvastatin users and tacrolimus users in the literature. (17,18). However, there has been no large-scale research on cannabinoid and synthetic cannabinoid users in the literature. We performed this study with 258 individuals, 158 of them had substance use disorder and 100 of them were healthy controls. For the first time, this study showed that there is a significant relationship in allele frequency and substance use disorder. In this study, the genetic differences of individuals with and without substance use disorder were investigated and it was shown whether or not there was a significant relationship between genotypes and alleles compared with clinical parameters (age, gender, marital status, cigarette smoking and quantity, psychotic state, history of the prison, etc).

CONCLUSION

The relation of the *CYP3A4* gene with the MboII gene variant was investigated in the literature for the first time in this study and it was shown for the first time that the frequency of G allele in individuals with Substance Use Disorder may have a predisposition

role in Substance Use Disorder. Plans have been made to study the functional variants of the *CYP3A4* gene, which may be clinically relevant to diseases and which may guide the development of new diagnostic and therapeutic principles.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan alınmıştır. (2015/1374)

Ethics Committee Approval: This study was approved by the Ethical Committee of the Istanbul University Istanbul Faculty of Medicine. (2015/1374)

Bilgilendirilmiş Onam: Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Informed Consent: Written consent was obtained from the participants.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- G.Ç., S.P.; Veri Toplama-S.P.; Veri Analizi/Yorumlama- G.Ç., H.Ş.Ç., S.P.; Yazı Taslağı- G.Ç., H.Ş.Ç.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- S.P., H.Ş.Ç.; Son Onay ve Sorumluluk- G.Ç., H.Ş.Ç., S.P.; Malzeme ve Teknik Destek- S.P.; Süpervizyon- G.Ç., H.Ş.Ç., S.P.

Author Contributions: Conception/Design of Study- G.Ç., S.P.; Data Acquisition- S.P.; Data Analysis/Interpretation- G.Ç., H.Ş.Ç., S.P.; Drafting Manuscript- G.Ç., H.Ş.Ç.; Critical Revision of Manuscript- S.P., H.Ş.Ç.; Final Approval and Accountability- G.Ç., H.Ş.Ç., S.P.; Technical or Material Support- S.P.; Supervision- G.Ç., H.Ş.Ç., S.P.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Finansal Destek: Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından desteklenmiştir. (Proje No: TLLO-2018-28001)

Financial Disclosure: This study was supported by Istanbul University Scientific Research Projects Unit (BAP). (Project No: TLLO-2018-28001)

REFERENCES

1. Substance abuse. World Health Organization. https://www.who.int/topics/substance_abuse/en/ (Accessed January 17, 2019)
2. Volkow ND, Koob GF, McLellan AT. Neurobiologic Advances from the Brain Disease Model of Addiction. *N Engl J Med* 2016;374(4):363-71.
3. World Drug Report 2018 http://www.unodc.org/wdr2018/prelaunch/WDR18_Booklet_1_EXSUM.pdf (Accessed January 17, 2019)
4. Werk AN, Cascorbi I. Functional Gene Variants of *CYP3A4*. *Clin Pharmacol Ther* 2014;96(3):340-8.
5. McDonnell AM, Dang CH. Basic review of the cytochrome p450 system. *J Adv Pract Oncol* 2013;4(4):263-8.
6. Chen L, Prasad GVR. *CYP3A5* polymorphisms in renal transplant recipients: influence on tacrolimus treatment. *Curr Pharmacogenomics Person Med* 2018;11:23-33.
7. Qin S, Liu D, Kohli M, Wang L, Vedell PT et al. TSPYL Family Regulates *CYP17A1* and *CYP3A4* Expression: Potential Mechanism Contributing to Abiraterone Response in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clin Pharmacol Ther.* 2017;104(1):201-10.
8. Keshava C. *CYP3A4* Polymorphisms--Potential Risk Factors for Breast and Prostate Cancer: A HuGE Review. *Am J Epidemiol.* 2004;160(9):825-41.
9. Uçkun Z, Baskak B, Özdemir H, Özel-Kızıl E, Devrimci-Özgülven H et al. Genotype and Allele Frequency of *CYP3A4* -392A>G in Turkish Patients with Major Depressive Disorder. *Turk J of Pharm Sci* 2018;15(2):200-06.
10. Cavalli SA, Hirata MH, Hirata RD. Detection of MboII polymorphism at the 5' promoter region of *CYP3A4*. *Clin Chem* 2001;47:348-51.
11. Veiga MG, Felizi RT, Reis DG, Carelli Filho I, Fernandes CE et al. The Influence of *CYP3A4* Polymorphism in Sex Steroids as a Risk Factor for Breast Cancer. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2018;40(11):699-704.
12. Mitoprot. <https://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl> (Accessed January 17, 2019)
13. Klein K, Zanger UM. Pharmacogenomics of Cytochrome P450 3A4: Recent Progress Toward the "Missing Heritability" Problem. *Front Genet* 2013;4:12.
14. Kiss Á, Menus Á, Tóth K, Déri M, Sirok D et al. Phenoconversion of *CYP2D6* by inhibitors modifies aripiprazole exposure. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2019. 2020;270(1):71-82.
15. Pearce CL, Near AM, Van Den Berg DJ, Ramus SJ, Gentry-Maharaj A et al. Validating genetic risk associations for ovarian cancer through the international Ovarian Cancer Association Consortium. *Br J Cancer.* 2009;100(2):412-20.
16. Bangsi D, Zhou J, Sun Y, Patel NP, Darga LL et al. Impact of a genetic variant in *CYP3A4* on risk and clinical presentation of prostate cancer among white and African-American men. *Urol Oncol* 2006;24(1):21-7.
17. Rosales A, Alvear M, Cuevas A, Saavedra N, Zambrano T et al. Identification of pharmacogenetic predictors of lipid-lowering response to atorvastatin in Chilean subjects with hypercholesterolemia. *Clinica Chimica Acta.* 2012;413(3-4):495-501.
18. Tavira B, Coto E, Díaz-Corte C, Ortega F, Arias M et al. Pharmacogenetics of tacrolimus after renal transplantation: analysis of polymorphisms in genes encoding 16 drug metabolizing enzymes. *Clin Chem Lab Med* 2011;49(5):825-33.

Miyeloproliferatif Neoplazilerde *JAK2V617F* Mutasyonunun Endotel Hücrelerine Etkisi ve *SOCS1-4* Gen Anlatımlarına Yansıması

The effect of JAK2V617F Mutation to the Endothelial Cells and the Expression Profiles of SOCS1-4 Genes in Myeloproliferative Neoplasms

Ahmet Göksu¹, Hilal Hekimoğlu², Selçuk Sözer Tokdemir³

¹ Fatih Sultan Mehmet Vakıf Üniversitesi, Edebiyat Fakültesi, Bilim Tarihi, İstanbul, Türkiye

² İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik Doktora Programı, İstanbul, Türkiye

³ İstanbul Üniversitesi Aziz Sançar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ORCID: A.G. 0000-0002-2035-4050;
H.H. 0000-0002-6234-3469;
S.S.T. 0000-0002-5035-4048

Corresponding author/Sorumlu yazar:

Selçuk Sözer Tokdemir,
İstanbul Üniversitesi Aziz Sançar Deneysel Tıp
Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı,
İstanbul, Türkiye
E-mail: ssozer@istanbul.edu.tr

Submitted/Geliş tarihi: 06.09.2020

First Revision Received/İlk revizyon: 10.09.2020

Last Revision Received/Son revizyon: 06.10.2020

Accepted/Kabul Tarihi: 06.10.2020

Citation/Atf: Goksu A, Hekimoğlu H, Tokdemir SS. The effect of *JAK2V617F* mutation to the endothelial cells and the expression profiles of *SOCS1-4* genes in myeloproliferative neoplasms. Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi 2020; 3(3): 135-147.
<https://doi.org/10.26650/JARHS2020-790117>

ÖZ

Amaç: Miyeloproliferatif neoplazi (MPN)'li hastalar morbidite ve mortalitesi yüksek tromboz riski taşırlar. Tromboza olan bu yatkınlık, artmış kan hücre sayısı ile bağdaştırılmış olsa da, endotel hücre (EH) fonksiyon bozukluğu gibi faktörler de önemli rol oynamaktadır. EH'nin miyeloproliferatif bozukluklarla olan bağlantısını göstermek üzere yapılan önceki çalışmalarda EH'nin MPN kan hücrelerinde %50-95 oranında mevcut olan *JAK2V617F* mutasyonunu taşıdığı gösterilmiş, ancak sitozolik tirozin kinaz olan Janus kinase 2 (*JAK2*) de meydana gelen bu mutasyonun EH üzerinde göstermiş olduğu morfolojik ve fonksiyonel değişiklik gösterilmemiştir. Ayrıca epigenetik faktörlerden Sitokin Sinyal Süpresör (*SOCS*) proteinleri'nin MPN'deki etkisi de tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışma ile *JAK2V617F* mutasyonunun EH'de yapmış olduğu etkileri epigenetik açıdan önemli olan, *SOCS 1-4* gen anlatımları ve metilasyon durumları incelenmiştir.

Gereç ve Yöntem: *In vitro* yeşil floresan proteini (GFP) ile işaretlenmiş *JAK2* (yabanil formu) veya *JAK2V617F* mutasyonu taşıyan lentivirüsün insan kordon veni endotel hücreleri (HUEVC) içine transdüksiyon metodu kullanılmıştır. Genetik olarak modifiye edilmiş EH popülasyonunda, akımlöçer cihazı ile GFP tespit edilmiş ve analizleri yapılmıştır. Ardından hücre ayırıcı ile seçilmiş olan GFP+ hücrelerde DNA ve RNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. *SOCS1-4* genlerinin anlatım değerleri gerçek zamanlı RT-PZR tespit edilmiş ve bisülfid modifikasyona maruz bırakılan DNA yardımıyla metilasyona özgü PZR yapılmıştır.

Bulgular: *JAK2*, *JAK2V617F* ve *GFP* taşıyan lentiviral vektörlerle başarılı bir şekilde EH enfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Genetiği modifiye edilmiş EH'ler birbirleri ile kıyaslandığında morfolojik bir farklılık saptanmamıştır. *SOCS1-4* genlerinde, mutant EH de *JAK2* ve *GFP*'e göre gen anlatım düzeyinde anlamlı artış tespit edilmiştir. *GFP* ve *JAK2* de tespit edilen *SOCS1-4* gen anlatım baskılanmasında bu genlerde oluşması muhtemel bir metilasyon olmadığı tespit edilmiştir.

Sonuç: Bu konuda gelecekte yapılacak çalışmalar, *JAK2V617F*'in EH'ler üzerindeki etkilerini ve trombotik olaylarla bağlantısını açıklamamıza yardımcı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Miyeloproliferatif Neoplazi (MPN), *JAK2V617F*, Endotel Hücre, Lentivirüs, *SOCS*

ABSTRACT

Objective: Patients with myeloproliferative neoplasms (MPN) are at an increased risk of developing thrombosis which leads to significant levels of morbidity and mortality. Although this propensity for thrombosis has been attributed to increased blood counts, other factors such as endothelial cell (EC) dysfunction likely play an important role. Previous studies have provided evidence of EC involvement by *JAK2V617F* which is known to be present in blood cells of 50-95% of patients with MPN. Furthermore, the morphological and functional changes of this mutation, a single nucleotide mutation in the cytosolic tyrosine kinase, Janus kinase 2 (*JAK2*) has not been shown in EC. In addition, the role of epigenetic factors including suppressors of cytokine signaling (*SOCS*) proteins is also unknown for MPN. In

this study, the effects of the *JAK2V617F* mutation on EC and the *SOCS 1-4* genes expression and their methylation profiles were investigated.

Materials and Methods: The *in vitro* transduction method of green fluorescent protein (GFP) labeled lentivirus carrying the *JAK2* (wild form) or *JAK2V617F* mutation into human cord vein endothelial cell (HUVEC) was applied. GFP was determined and analyzed with the flow cytometer. Afterwards, the genetically modified EC population was isolated, gating for GFP signal by cell sorter and then DNA and RNA isolations were performed. Gene expressional changes of *SOCS1-4* genes were determined in real time RT-PCR and methylation specific PCR was performed with bisulfite modification of DNA.

Results: The successful infection of *JAK2*, *JAK2V617F* and *GFP* vectors into EC were achieved. The comparison of the genetically modified EC revealed no morphological differences. A significant increase in the expressions of *SOCS1-4* were detected in mutant EH compared to *JAK2* and *GFP*. It was determined that methylation had no effect on suppression of *SOCS1-4* expression detected in *GFP* and *JAK2* EC.

Conclusion: Future studies will further enlighten the effects of *JAK2V617F* on EC and its role in thrombotic events.

Keywords: Myeloroliferative Neoplasm (MPN), *JAK2V617F*, Endothelial Cells, Lentivirus, SOCS

GİRİŞ

Philadelphia kromozom negatif (Ph⁻) olan miyeloproliferatif neoplaziler (MPN) polistemia vera, esaslıy trombositemi ve Primer miyelofibrozis'den oluşur. Ph⁻ MPN'ler, sitozolik tirozin kinaz olan Janus kinaz 2 (JAK2) de meydana gelen mutasyonlar ile bağdaştırılmıştır. Oluşan bu mutasyon, eritroid, miyeloid ve megakaryosit progenitorlerin büyüme hormonuna karşı hassaslaşmasına neden olur. Bu kazanılmış mutasyonlar içerisinde en sık görüleni *JAK2V617F* ise PV' de >95%, ET'de ~50% ve PMF ~50% oranlarında görülür (1-3). MPN'li hastalarda görülen çok sayıda komplikasyon artmış trombotik olaylar neticesindedir(4,5). Yakın bir tarihte yüksek *JAK2V617F* allel yoğunluğuna bağlı artmış trombotik olaylar bildirilmiştir(6). Mevcut olan bu trombotik olaylar etiolojisinde kesin bir etmen saptanamamış olmasına rağmen artmış kan hücreleri düşünülmektedir (7-12). Endotel hücre (EH) fonksiyon bozukluğu ise trombotik olaylarda büyük rol oynayan bir etmendir (13-15). Bu konuda yapılan önceki çalışmalarda MPN endotel hücresinde MPN hastalarının kan hücrelerinde mevcut olan *JAK2V617F* mutasyonunu taşıdığı tespit edilmiştir (16). EH'nin MPN'deki rolü ile ilgili çalışmalarda farklı bir grup tarafından doğrulanmış ve MPN de EH'nin önemi bir kez daha kanıtlanmıştır (17).

MPN' de *JAK2V617F* gibi genetik mutasyonların önemli hastalık başlatıcı etkileri olsa da primer deoksiribonükleik asit (DNA) dizisini değiştirmeden gen anlatımını değiştiren epigenetik değişimler de mevcuttur. Bu epigenetik değişimler kromatinin yeniden şekillendirilmesi ve DNA'nın metilasyonunu içeren temel iki yoldan etkinlik gösterirler (18).

Sitokin Sinyal Süpresör (SOCS) proteinleri sitokin sinyalinin inhibitörleridir, JAK-STAT yolağı ile indüklenirler ve JAK-STAT yolağının negatif regülasyonunda rol alırlar. Sekiz CIS/SOCS proteini mevcuttur: CIS, SOCS 1, SOCS 2, SOCS 3, SOCS 4, SOCS 5, SOCS 6 ve SOCS 7. SOCS 1 ve SOCS 3' te diğerlerinden farklı olarak SH2- domaine bitişik kinaz inhibitör bölgesi (Kinase inhibitory Region; KIR) bulunmaktadır. SH2 bölgesi JAK'larla etkileşerek tirozin kinaz aktivitesini inhibe eder (19). SOCS'lar aynı zamanda proliferasyon, farklılaşma ve hemato-

poz'de de görevlidir. SOCS proteinlerinin kanser gelişiminde rol oynayabilecekleri birçok merkez tarafından bildirilmiştir. Büyüme faktörlerine aşırı duyarlılık göstermeleri ve onkogeneizde rol alan çeşitli sitokinler tarafından modüle edilmeleri sonucu kansere neden oldukları düşünülmektedir. SOCS'ların anlatımının susturulması sitokin sinyalinin bozulmasına yol açan epigenetik bir düzenlemedir (20). SOCS1 ve SOCS3' ün SH2 bölgeleri direkt JAK'ların aynı bölgesi ile etkişime girerek onları inhibe ettikleri bilinmektedir. Bu direkt bağlantıdan dolayı metilasyon çalışmaları daha çok bu iki protein üzerine yoğunlaşmıştır. Birçok Ph⁻ MPN vakasında değişen oranlarda SOCS metilasyonları tesbit edilmiştir (21-24). SOCS4-7' nin fonksiyonları hakkında diğer SOCS' lara nazaran daha az bilgi ve çalışma vardır. Fakat bu grup içinden SOCS4' ün JAK/STAT yolağı ile ve metilasyonunun gastrik kanserle ilişkisine dair çalışmalar mevcuttur (25,26).

Bu çalışmada lentiviral vektörler aracılığıyla JAK2 geninin yabanil formu (WT) ve mutasyon taşıyan *JAK2V617F* formunun EH' ye enfeksiyonu sağlanarak EH'de genetik değişiklik hedeflenmiş ve bu aktarım sonucu oluşan epigenetik etki araştırılmıştır. Bu amaçla başarılı bir şekilde genetiği değiştirilmiş EH üzerinde, *SOCS1* ve *SOCS3* 'ün yanında, benzer özellikler taşıyan *SOCS2* ve *SOCS4* 'ün gen anlatım değişimleri ve metilasyon profili incelenmiştir. *JAK2V617F* mutasyonu homozigot olarak taşıyan HEL (Human Erythroleukemia Cell Line) hücre hattı ile kıyaslanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Plazmit DNA'larının Çoğaltılması

Daha önceden tasarlanarak istenilen genler içerisinde sokulmuş olan FIV tabanlı lentiviral plazmitler pCDF1-GFP, pCDF1-JAK2wt-GFP, pCDF1-JAK2V617F-GFP ve yardımcı vektörler pCI-VSVG, pCPRDEnv Dr. C. Iancu-Rubin (Mount Sinai School of Medicine, New York, ABD) tarafından bu çalışmayı yapmak üzere hediye edildi.

Transformasyon (Aktarım)

Bakteriyel transformasyonda, önceden hazırlanmış olan kompetan hücreler olan *E.coli* DH5a trans-

formasyon için kullanıldı. Öncelikle, kompetan hücreler -80°C'den alınarak buz üzerinde erimeye bırakıldı. Lentiviral vektörler (1-2 µl) ile kompetan hücreler (100 µl) karıştırılarak 30 dakika buz üzerinde tutuldu. Hücreler 1-1,5 dakika (dak) kadar 42°C'de bekletildikten sonra tekrar 2 dak buzda bekletildi. Bakteri hücreleri ile transforme olmuş ligasyon ürünlerini içeren tüpler oda sıcaklığında 900 µl' lik SOC besiyeri ile karıştırılarak 60 dakika 37°C'deki çalkalayıcıda 200 rpm' de tutuldu. Önceden hazırlanmış olan Ampisilinli LB Agar petrilere yayma yapıldı. Petriler 37°C'de gece boyu inkübe edildi. Ertesi sabah petrilere koloni seçilip LB sıvı besiyerine ekim yapıldı. 8-10 saat sonra 1 ml alınarak 1 ml %60' lık gliserol ile karıştırıldı ve örnekler -80°C saklandı.

Plazmit DNA İzolasyonu

Ampisilinli 5ml LB içine petrilere seçmiş olduğumuz bir koloni eklendi ve yaklaşık 10 saat çalkalamalı inkübatörde 37°C'de (220 rpm) çoğaltılması için bekletildi. Çoğalan bu hücrelerden 1 ml alınıp 250 ml ampisilinli LB içerisine konularak gece boyu çalkalamalı inkübatörde 37°C'de (220 rpm) çoğaltılması sağlandı. Ardından, elde edilen kültürden plazmit izolasyon kiti (Endofree Maxiprep Plasmid Mini Kit, QIAGEN) kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı. Kısaca, çalkalamalı inkübatörden alınan örnekler 10 dak 3200 rpm'de santrifüj edildi. Çöken hücrelerden kit içerisindeki buffer'lar kullanılarak DNA elde edildi ve en son 1/5 ml %70 etanol ile yıkanarak TE tamponunda çözünmeye bırakıldı.

Enzim Kesimi

Elde edilen plazmit DNA sının doğruluğunu test etmek için enzim kesimi yapıldı. XbaI 10 U/ul (Thermo Fisher) , NotI-HF 3000U/ul (NEB), BamHI 10 U/ul (Thermo Fisher), EcoRI 10 U/ul (Thermo Fisher) enzimler kullanıldı ve her bir enzimin uygulama protokolü tatbik edildi.

Hücre Transfeksiyonları

Transfeksiyondan 3 gün önce 293T hücreleri 100 mm tabaklara 3x10⁶ hücre olacak şekilde ekim gerçekleştirildi. Transfeksiyon esnasında hücre yoğun-

luğu %90-95 civarında olmasına özen gösterildi. Steril bir tüpte 60 µl Lipofectamine 2000 (Invitrogen) kullanılarak transfeksiyon protokolü uygulandı. Kısaca, 12 µg yapısal vektör (CPRD), 7 µg transfer vektörü (GFP, JAK2wt, JAK2mut), 5 µg zarf vektörü (VSVG) 1.5 ml serum-free, DMEM içerisinde 5 dak inkübe edildi. Dilüe edilmiş DNA ve Lipofectamine karıştırıldı ve 30 dak oda ısısında bekletildi. Ardından bu karışım tabaklardaki hücrelerin üzerine eklendi ve hücre yüzeyine eşit oranda dağılmasına özen gösterilerek kültüre edildi. Kontrol tabakları vektör eklenilmemiş olarak bırakıldı veya sadece transfer ve envelope vektörleri transfekte edildi. Hücreler 6-7 saat 37 °C' de inkübe edildi. Analizden 6-8 saat önce tabaklar 32°C'ye alındı. Transfeksiyondan sonra 48-72 saat içerisinde kültüre edilmiş hücrelerden supernatant toplandı. Lentivirüsleri içeren supernatant toplandıktan sonra 5 dak 1500 rpm'de santrifüj edilerek hücre kalıntıları ve debristen arındırılma işlemi gerçekleştirildi. Ardından, 0,45 um filtreden geçirildi ve kullanıma kadar -80°C saklandı.

Endotel Hücre Enfeksiyonu

Enfeksiyon için Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) hücre hattı (ATCC Firması) kullanıldı. Enfeksiyon için kısaca; 12 kuyucuklu tabaklara kuyu başına 1,8x10⁵ hücre olacak şekilde %10 FBS, DMEM, %1 Penisilin/Streptomisin(Pen/Strep) besiyeri kullanılarak ekim yapıldı. Ekim enfeksiyon işleminden en az 24 saat önce yapılmış olmalıdır. Enfeksiyon ajanı olan 5 mg Polybrene (Sigma-Aldrich) 1 ml distile suda iyice çözündürüldü ve 0,45 um filtre ile filtrelendi. 24 saat önce ekilmiş olan hücrelere bu çözeltiden 1 µl polybrene eklendi. Önceden elde edilmiş olan 200 µl hacimdeki lentivirüsler sırası ile kuyulara eklendi. 2500 rpm'de 90 dk 30°C'de santrifüjlendi. Santrifüj sonrası 32°C'ye alındı ve 12-13 saat sonrası medyası %10 FBS-DMEM, %1 Pen/Strep içeren medya ile değiştirildi. Hücreler 32°C'de 6-36 saat bekletildi.

Genomik Entegrasyon Kontrolü

Virüs DNA'sının HUVEC genomuna entegre olup olmadığını tespit etmek amacı ile primerler tasarlandı; JAK2 ve JAK2V617F için tasarlanan primerler

Forward 5'CGA AGA GAA GTA GGA GAC TAC G3', Reverse 5' TCT CCT GAA GAA TGT CCT TTG GC3', GFP için ise, Forward 5'GAC GCC ACC ATG GAG AG3'; Reverse 5'GAT TGT CGA CTT AGC GAG ATC3' primerleri kullanılarak PZR reaksiyonu hazırlandı. Reaksiyon bileşenleri AccuPrime Taq DNA Polimeraz (High Fidelity) (Invitrogen) tavsiye edilen protokol kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PZR reaksiyonunun koşulları ise 94°C 3 dak , 30 Siklus, (94°C 30 saniye, 57°C 60 saniye, 72°C 50 saniye) ve 72°C 2 dak' dir. MUT ve WT için V671F mutasyonunu da içeren 454 baz çifti (bç), GFP için ise 800 bç uzunluğunda bir alan çoğaltıldı. Yapılan PZR ile istenen bantın görüldüğü örneklerin (WT, MUT, GFP) PZR ürünlerinin dizilenmesi için Sentromer (İstanbul) firmasından dizileme hizmeti satın alındı. Dizileme sonuçları CLC Genomic Workbench analiz programında incelendi.

Akım Ölçer ve Hücre Ayırımı

Tripsin ile muamele edilen hücreler kültür tabağından kaldırıldı ve PBS ile yıkandı. Analize hazır hale getirilen hücreler Akım Ölçer (FACS Calibur, BD BioScience) cihazına okutuldu. Hücrelerdeki ana popülasyon belirlendi ve bu popülasyon üzerinden PI ile canlı/ölü hücre ayırımı sağlandı. Canlı hücreler GFP pozitif ve GFP negatif olarak incelendi. İlgili deneylerde kullanılmak üzere ayrıca hücre ayırıcı (FACS Aria, BD BioScience) kullanılarak GFP⁺ hücreler izole edildi.

Enfekte Hücrelerde Morfolojik Analiz

GFP anlatımına göre enfeksiyon sonrası hücreler ışık mikroskopunda (10X, Olympus CKX41) ve immüno Floresans (Olympus, U-RFLT50) altında gözlenerek morfolojik olarak incelendi.

Gerçek zamanlı RT-PZR

Yukarda belirtilen yöntemlerle izole edilen saf *JAK2V617F*, *JAK2* ve *GFP* içeren EH grupları RNA izolasyonuna tabi tutuldu ve RNA Purification Kit (Jena Bioscience) yardımıyla izole edildi. cDNA sentezi SCRIPT cDNA Synthesis Kit (Jena Bioscience) yardımıyla gerçekleştirildi. *SOCS1-4* genlerinin trans-

kript değişimlerini görmek amacıyla SYBR Green (RT² SYBR Green qPCR Mastermix, Qiagen) kullanılarak gerçek zamanlı RT-PZR ile karşılaştırmalı ölçümler LightCycler 480 (Roche) cihazında yapıldı. Bu metot kullanılarak tüm bu genlerin anlatımlarının *JAK2* ve *JAK2V617F* etkisiyle EH'de oluşturdukları değişimler tespit edildi. Bunun sonucunda birer Ct değeri elde edildi. Bu Ct değerleri kullanılarak, mutant ve yabanil tip gen anlatım oranları *GAPDH* referans geni kullanılarak araştırıldı. Yapılan gerçek zamanlı kantitatif PZR deneyi 2 kez tekrarlandı ve Ct değerlerinin aritmetik ortalaması alındı.

Metilasyon Spesifik PZR (MSP)

Metilasyon spesifik polimeraz zincir reaksiyonu (MSP) epitect fast DNA bisülfidit kit (Qiagen) ile tavsiye edilen koşullar sağlanarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma kapsamında *SOCS1*, *SOCS2*, *SOCS3* ve *SOCS4* genlerinin metilasyon profilleri MSP yöntemi ile tespit edilmesi için kullanılan primer dizileri ve verdikleri bant uzunlukları şu şekildedir: *SOCS-1* metile için: 5'-TTC GCG TGT ATT TTA GGT CGG TC- 3' ve 5'-CGA CAC AAC TCC TAC AAC GAC CG-3' (160 bç); *SOCS-1* unmetile için: 5'-TTA TGA GTA TTT GTG TGT ATT TTA GGT TGG TTC-3' ve 5' -ACT AAC AAC ACA ACT CCT ACA ACA ACC A-3' için (175 bç); *SOCS-2* metile için: 5'-TTT TAG GAT TTG ATT AAG GGG ATC-3' ve 5'-TAC GAA AAA TAA ACG TAC AAA AAC G-3'(147 bç); *SOCS-2* unmetile için: 5'-TTT TTT AGG ATT TGA TTA AGG GGA TT-3' ve 5'-CAA AAA ATA AAC ATA CAA AAA CAA-3' (148 bç); *SOCS-3* metile için: 5'-TAT ATA TTC GCG AGC GCG GTT T-3' ve 5' CGC TGC GCC CAG ATG TT-3'(268 bç); *SOCS-3* unmetile için: 5'TG TGG TGG TTG TTT ATA T-3' ve 5'-ATT TGT GAG TGT GGT T-3' ve 5'CAA CCA ACA ATA ACC CAC ACT ACA CCC A-3' (298 bç); *SOCS-4* metile için: 5'TCG GGT GAT CGA GTT TTC GT-3' ve 5'-ACG AAT CGA CGC AAA CAC AA-3' (90 bç); *SOCS-4* unmetile için: 5'-GTG GAT GTG GGT AGT TGG AT-3' ve 5'AAC ACC ACC ACC CAA CAA CC-3' (166 bç) primerler kullanıldı.

PZR' de kalıp materyal olarak genomik DNA'ları izole edilen enfekte HUVEC kullanıldı. Transdükte

olmayan HUVEC dahili kontrol olarak kullanıldı. İkinci bir kontrol olarak H2O kullanıldı. *JAK2V617F* mutasyonunu homozigot olarak taşıyan HEL hücre hattı (Human Erythroleukemia), DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)' den temin edildi ve diğer örneklerle kıyasa tabi tutulmak için kullanıldı.

DATA Analizi

JAK2, *JAK2V617F* ve *GFP* taşıyan lentiviral vektörler ile genetiği değiştirilmiş EH RNA'larına uygulanan gerçek zamanlı kantitatif PZR ve SOCS gen amplifikasyonları neticesinde elde edilen Ct değerleri ile hesaplamalar yapıldı. Bu amaçla ΔCt hesaplama yöntemi kullanıldı. $2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct_{Deney} - Ct_{Referans})}$ yöntemi ile hesaplandı (27) ve her bir anlatım içerisinde en düşük anlatıma göre normalize edilerek HeatMap haritası oluşturuldu. Grafikleri oluşturma ve istatistiksel analizler için by *GraphPad Prism v.8* (*GraphPad Prism Inc.*) yazılımı kullanıldı.

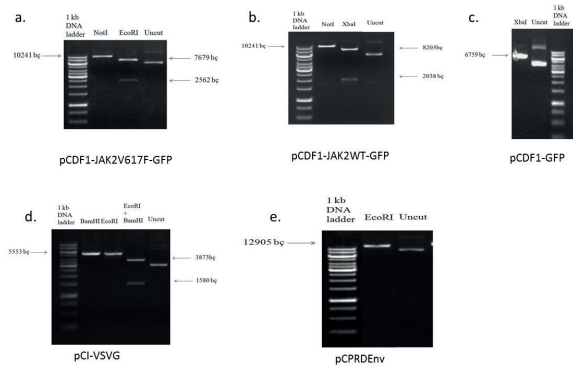
BULGULAR

Horizontal transfer için kullanılan *JAK2*-Yabanıl Tip ve *JAK2V617F* Plazmitler'in doğruluğu tespit edildi

Tüm deneylerde kullanılmak üzere beş farklı plazmit, *E. coli* temelli DH5 α ırkına ait hücrelere ısı şoku metodu kullanılarak transforme edildi ve çoğaltıldı. Akabinde her bir plazmit için gerçekleştirilen DNA izolasyonu ve bunu takiben elde edilen plazmit DNA'larının doğrulanması için enzim kesim işlemi uygulandı (Şekil 1).

JAK2V617F-mutant, NotI, EcoRI enzimleri ile muamele edildi (Şekil 1a). *JAK2* – yabanıl tip ' e ise, NotI, XbaI ve NotI ve XbaI ile ikili kesim uygulandı. Sonuçta, 6720-2038-1483 bç uzunluğunda bantlar elde edildi (Şekil 1b). GFP plazmiti ise XbaI enzime tabii tutularak lineer plazmit elde edildi (Şekil 1c). VSVG ve pCPRD plazmitlerine EcoRI ile lineer, BamHI ve XbaI enzimleri ile çoklu kesimler yapıldı ve beklenen bant uzunlukları elde edildi (Şekil 1d ve e).

Enzim kesimleri neticesinde, bundan sonra yapılacak tüm deneylerde kullanılacak olan GFP-Kontrol, *JAK2*- yabanıl tip ve *JAK2V617F* ve VSVG ve pCPRD kontrol plazmitlerin doğruluğu tespit edildi. Enfek-

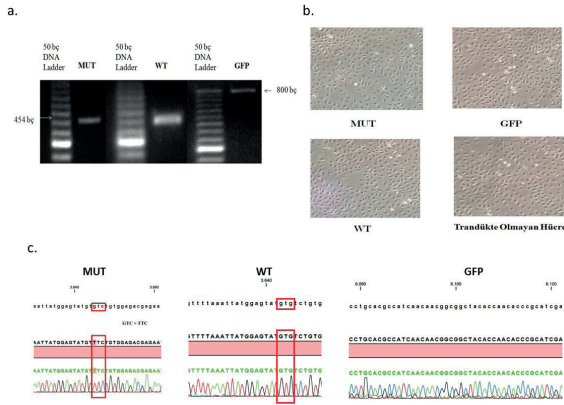


Şekil 1. Plazmitlerin doğruluğunun Tespiti. DNA izolasyonları sonucunda elde edilen *GFP*, *JAK2*-yabanıl tip, *JAK2V617F*- mutant, VSVG ve pCPRD plazmitlerine spesifik enzimler kullanılarak kesimleri yapıldı ve %1'lik Etidium Bromid'li jel üzerinde yürütülüp UV ışığı altında görüntüsünün alındı. Resimlerde görülen her bir kolon da yürütülen resmin sağ alt köşesinde adı yazılı plazmit DNA'sı kolonların üzerinde belirtilmiş enzimlerle muamele edilmiştir. Görülmesi beklenen plazmit parçaları ise şöyledir: Sırasıyla; a. *JAK2V617F*-mutant (10241 bp): (1) NotI: lineer,(2) EcoRI:2562-7679 , (3) Uncut; b. *JAK2* – yabanıl tip (10241 bp) : NotI: lineer, XbaI: 8203-2038, NotI ve XbaI (İkili kesim): 6720-2038-1483, (3)Uncut; c. GFP : (1) Uncut, (2) XbaI: lineer; d. VSVG (12905 bp): (1) EcoRI: lineer, (2)BamHI: 7313-4889-703, (2) XbaI 6727-2577-1801,(3) Uncut. M: Marker; e. pCPRD (5553 bp): (1): EcoRI: lineer, (2): BamHI: lineer, (3)EcoRI ve BamHI (ikili kesim): 1580-3973, (4) Uncut.

siyon sonrası *JAK2*-yabanıl tip ve *JAK2V617F* taşıyan lentivirüslerin endotel hücrelerine genomik entegrasyonu gerçekleştirdi

Endotel hücre (EH) 'lerine uygulanan *GFP*-Kontrol, *JAK2* yabanıl tip ve *JAK2V617F* mutant lentiviral süpernatantlar kullanılarak EH enfeksiyona maruz bırakıldı. Ardından enfeksiyon sonrası genomik entegrasyonun kontrolü için farklı yaklaşımlar uygulandı. Her bir enfeksiyona karşı EH' nin göstermiş olduğu enfeksiyon başarısı ve tepkisi PZR, akım ölçer ve ışık mikroskobu yardımıyla gözlemlendi. Öncelikle enfekte EH'sinde *JAK2* geni için tasarlanmış primerler ile PZR gerçekleştirildi. Bu PZR sonucu oluşan ürünlerin agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri Şekil 2a' de gösterildi. Burada *JAK2* geni ile uyumlu bant görüntüsü görülmektedir. *JAK2V617F* mutasyonu nokta mutasyon olduğu için tek aşamalı PZR da bu mutasyonun tespiti beklenmemektedir.

Işık mikroskobu ile gerçekleştirilen analizler neticesinde, fenotipik ve morfolojik değişim tespitleri yapıldı. Bu gözlemler sonucunda, hücreler sağlıklı



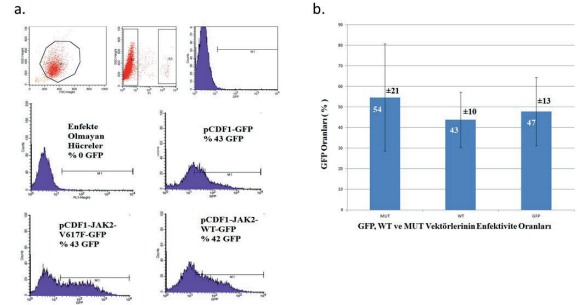
Şekil 2. Genomik entegrasyonun tespiti: a. Enfeksiyon sonucu genetiği değiştirilmiş endotel hücre DNA ları ile yapılan PZR' nin ürünlerinin agaroz jel görüntüsü, JAK2wt ve JAKV617F bant uzunluğu: 454 bç. ve GFP bant uzunluğu 800bç 'dir. b. Transfekte endotel hücrelerin ışık mikroskobu altındaki(10X) morfolojik analizi. MUT: JAK2V617F plazmi ile; WT: JAK2-wt ile ve GFP: vektör kontrol transfekte edilmiş endotel hücreler. Olympus CKX41 ile mikroskopik analiz gerçekleştirilmiştir. c. Dizileme sonuçları. CLC Genomic Workbench analiz programında incelenmiştir.

bulundu, kopma veya şekil değişikliği tespit edilmedi. Üç farklı lentiviral vektörün enfeksiyonları neticesinde oluşturdukları morfolojik etki, enfekte olmayan hücrelerle kıyaslandığında, ne kendi aralarında ne de kontrol grubunda fark gözlenmedi (Şekil 2b). Enfeksiyon sonrası genomik entegrasyon kontrolü, genetiği değiştirilmiş EH DNA'sının dizilenmesi ile gerçekleştirildi ve mutant lentivirus süpernatantıyla enfekte EH 'de mutasyon tespit edildi (Şekil 2c).

Endotel Hücre Genom Entegrasyon Başarısının Değerlendirilmesi

Lentiviral aktarım sonucu enfekte olan EH'nin GFP anlatımı yapması beklenir. Bu parametreye bağlı olarak aktarmak istenilen ilgili genin enfeksiyon oranları ölçülebilir ve analiz edilebilir. Şekil 3'de farklı zamanlarda yapılan transfeksiyonlar sonucu elde edilen MUT, WT ve GFP lentivirüslerin, EH enfeksiyonları sonucunda akımölçer yardımıyla elde edilen GFP analiz stratejisi gösterilmiştir (Şekil 3a). Farklı zamanlarda yapılan bu enfeksiyonların GFP oranları Şekil 3b'de gösterilmiştir. Hata barları standart sapmayı göstermektedir. Grafiği oluşturan veriler Lipofektamin ile toplamda 16 transfeksiyondan üretilen lentivirüslerle yapılan enfeksiyonları kapsamaktadır.

Şekil 3'de görüldüğü gibi üç lentivirüs tipi için de GFP'ye bağlı enfeksiyon oranları MUT için ortalama % 54 ±21, WT için % 43 ±10 ve GFP için % 47±13.



Şekil 3. Endotel Hücrelere entegre olmuş Lentiviral vektörlerin enfeksiyon oranları.a. Akım ölçerlerde kullanılan hücre canlılığı ve enfeksiyon başarısını gösteren GFP pozitif temelli kapılama stratejileri b. Lentivirus vektörlerinin endotel hücre enfeksiyon sonucu 5 ayrı deneyden elde edilen endotel hücre entegrasyonu gerçekleşmiş GFP+ hücre yüzdelikleri (%). Hata barları standart sapmayı göstermektedir.

Her bir enfeksiyon grupları arasında istatistiksel bir fark görünmedi (MUT- WT arasında p=0.3, WT-GFP arasında p=0.6, MUT-GFP p=0.5' tir).

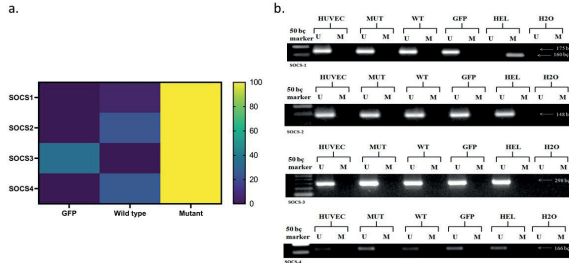
Endotel Hücrelerinde SOCS1-4 genlerinin Gen Anlatımlarının Değerlendirilmesi

JAK2, JAK2V617F ve GFP içeren EH'ler enfeksiyondan 72 saat sonra hücre ayırıcı yardımıyla EH içerisinde GFP pozitif olanlar seçildi ve her bir durum için hücre RNA izolasyonu yapılarak RT-PCR reaksiyonu ile SOCS genlerinin anlatımlarına bakıldı.

Elde edilen sonuçlarda özellikle JAK2V617F EH' inde SOCS1-2 ve SOCS4 gen anlatım ifadelerinde JAK2 ve GFP 'ye göre anlamlı bir artış olduğu tespit edildi. JAK2V617F EH ile GFP-EH arasında tespit edilen kat farkı SOCS1 için 4.5, SOCS3 için 3.2 ve SOCS4 için 3.3 'tür. SOCS3 te ise GFP entegre olmuş EH' de JAK2'ye göre daha fazla anlatım tespit edildi (Şekil 4a).

JAK2, JAK2V617F ve GFP entegre olmuş EH 'inde SOCS1-4 genlerinde bulunan epigenetik modifikasyonların tespiti amacıyla epigenetik metilasyon spesifik pZR metilasyon profilleri (MSP) yapılmış ve her reaksiyonda HUVEC (enfekte olmayan), MUT, WT, GFP ve HEL birlikte incelendi. Sonuçlar iki kez tekrarlandı. Jel görüntüleri aşağıdaki şekillerde belirtil-

miştir (Şekil 4b). SOCS2-4 analizinde enfekte olan hücre hatları ve enfekte olmayan HUVEC HEL unmetile bant verdi. SOCS1 de ise, hücre hatları ve enfekte olmayan HUVEC unmetile çıkarken, HEL metile bant verdi (Şekil 4b).



Şekil 4. SOCS1-4 Gen anlatımı ve metilasyon profili. a. Genetiği değiştirilmiş EH'de gerçek zamanlı RT-PCR ile yapılan SOCS1-4 genlerinin anlatım karşılaştırması, b. Genetiği değiştirilmiş EH'de SOCS1-4 genlerinin metilasyon profilleri.

TARTIŞMA

MPN' ler klonal hematopoietik kök hücre hastalığıdır. 2005 yılında keşfedilen JAK2V617F mutasyonu MPN' ler ile ilişki kurulabilen ve şu ana kadar tanımlanan ilk genetik markerdir. Hastalığın patolojisinin izinin sürülmesinde önemli bir yeri vardır. Oluşturulan hayvan modellerinde JAKV617F mutasyonunun bariz bir şekilde MPN karakterini oluşturduğu gösterilmiştir. MPN' ler aynı zamanda trombotik olaylar ve bunun sonucu meydana gelen ölümlerin sıkça yaşandığı bir hastalık grubudur. Bunun sebebi olarak artan kan hücresi sayısı düşünülse de MPN hastalarının endotel hücrelerinde tespit edilen V617F mutasyonu bizi bu hücrelerin tromboz ve MPN ile olan ilişkisini daha detaylı bir biçimde araştırmaya yöneltmiştir. Bu çalışma iki aşamadan oluşur: (1) in vitro kültür ortamında mutasyonun EH'leri üzerindeki etkilerini tespit etmek ve (2) JAK2V617F mutasyonunun endotel hücresi üzerinde yapmış olduğu değişimleri SOCS1-4 genlerin anlatım analizlerini yaparak incelemek.

İlk aşama olan (1) in vitro kültür ortamında mutasyonun EH'leri üzerindeki etkilerini tespit etmek amacıyla yaptığımız çalışmalarda, V617F mutasyonun taşıyan formu, yabancı formu ve JAK2 genini taşımayan lentiviral vektörler kullanılarak HUVEC' e enfeksiyon yapıldı.

Lipofektamin transfeksiyon ajanı kullanılarak elde edilen lentivirüslerle gerçekleştirilen enfeksiyonların sonucunda gözlenen GFP yüzdeleri sonucunda Lipofektamin' in yeterli enfeksiyon kabiliyetini sağladığını gösterdik. Lipofektamin deneylerde kullandığımız üç lentivirüs tipi için de GFP' ye bağlı enfeksiyon oranları MUT için ortalama %54 ±21, WT için %43 ±10 ve GFP için %47 ±13 oranında enfekte olabilen lentivirüsler üretilmesini sağladı.

Enfeksiyon sonrasında ışık mikroskobu altında morfolojik gözlem yapıldı. Lentiviral vektörlerin birbirleri ile ve kontrol olarak kullanılan enfekte olmayan hücreler ile kıyaslanması sonucu herhangi bir farklılık saptanmadı.

Morfolojik gözlem sonrası akım ölçer cihazında PI ile canlı olduğu tespit edilen hücreler GFP anlatımı yapması özelliğine göre enfeksiyon oranları ölçüldü. Bu deneylerde yaklaşık % 40 hedeflenerek gerçekleştirilen enfeksiyonlarda MUT için %43 ±21, WT için %42 ±10 ve GFP için %43 ±13 oranında enfeksiyon yüzdesine sahip hücreler elde edilmiştir. Bu hücrelerin genomik DNA' ları izole edildi. Lentiviral entegrasyonun başarısını test etmek için spesifik olarak tasarlanan primerler ile PZR yapıldı. Jel görüntüsü üzerinden çalışılacak materyal doğrulandı. Akabinde enfekte edilerek genetiği GFP, JAK2 ve JAK2V617F vektörleriyle modifiye edilen endotel hücrelerle yapılan fonksiyonel deneylere geçildi.

Mikroskop altında görsel olarak yapılan analizlerde ise her bir vektör enfeksiyonları arası büyüme ve çoğalmalarda farklılık bulunmaması mutasyonun morfolojik olarak endotel hücresini pek etkilemediğini belki de belli süre sonunda hücrelerde morfolojik tahribata yol açtığı fikrini akla getirmektedir. Nitekim hastalığın prognozu dikkate alındığında uzun ve yavaş ilerleyerek ileri yaş düzeyinde semptomatik olduğu bilinmektedir. Bu nedenle elde edilen sonuçlar kliniği destekler niteliktedir. Deneysel çalışmalarımızda enfeksiyon protokolünde kullandığımız 72 saat hücre genomuna entegre edilmek istenen genin stabil entegrasyonunu sağlaması için gerekli süredir. Başarılı enfeksiyon sonucunda kültür süresinin uzatılarak belli zaman aralıklarında hücre morfolojisini yeniden tespit etmek bu soruya açıklık getirebilir. İleriki çalışmalarımızda bu konuyu dikkate alacağız.

Birçok farklı araştırma grubu da EH fonksiyon bozukluğunun MPN'li hastalarda görülen artmış trombotik olaylara neden olduğu hipotezini savunmuştur (13-15). JAK2 aktivasyonu ateroskleroz (28), anjiojeneze(29) ve oksidatif strese bağlı aortik endotel hücre (30), vasküler düz kas hücreleri ve astrosit apoptozuna neden olduğu geçmiş yıllarda gösterilmiştir (30-32). Neria ve arkadaşları, JAK2 inhibitörlerinin, kültür endotel hücrelerinin serum eksikliğine bağlı yapışma özelliklerini kaybetmesi ile oluşan hücre ölümine karşı endotel hücrelerini koruduklarını ve yeniden yapışıp çoğalabilme özelliklerini artırdığını bildirmiştir (33). Ayrıca, renal endotel hücrelerinin oksidatif strese bağlı hücre ölümünden JAK2 inhibisyonu ile kurtuldukları bulunmuştur (34). Tawfik ve arkadaşları aortik endotel hücrelerde hiperglisemi ve reaktif oksijen species aracılı apoptozun JAK2 inhibitörü ile korunduğunu göstermiştir(30). Günümüzde de birçok araştırmacı JAK2 ve *JAK2V617F* nin tromboz oluşumundaki rolü hakkında araştırmalarını sürdürmektedir (14,35,36). Bunun yanında, yapılan bir çalışmada, kullandığımız model sistem kullanılarak HUVEC hücreleri JAK2wt ve *JAK2V617F* mutant içeren lentivirus ile enfekte edilmiş ve gen ekspresyonları incelenmiştir. Elde ettikleri sonuçlara göre JAK2V617F mutant enfekte hücrelerde JAK2, *STAT3* and *STAT1* genlerinin JAK2 yabanil tip'e göre daha fazla arttığı yönündedir. Ardından yapılan RNAseq analizinde ise serine protease inhibitor B2 (*SERPINB2*), early growth response protein 1 (*EGR1*), ve chemokine ligand 2 (*CCL2*) artış bulunmuş ancak bu çalışmada *SOCS1-4* genleri hakkında bilgi verilmemiştir (37).

SOCS lar JAK/STAT yolğunun negatif regülasyonunda rol oynarlar. *SOCS* metilasyonu değişimleri bu yolağı etkiler. Yapılan çalışmalar MPN vakalarının bir kısmının aynı zamanda *SOCS* metilasyon farklılıklarına sahip olduğunu göstermiştir. Bu çalışmalar daha çok *SOCS-1* ve *SOCS-3* üzerine odaklanmış hatta *SOCS-3* için terapötik stratejiler geliştirilmeye başlanmıştır (38). *SOCS-2* üzerine kısmen eğilinmiş fakat belirgin ve anlamlı metilasyon profilinine rastlanılmamıştır (39). Bu şartlar göz önüne alınarak, epigenetik bir farklılığın fonksiyonel bozukluk da yapabileceği düşüncesiyle elde edilen hücreler epige-

netik açıdan incelendi. İnceleme *SOCS 1,2,3,4* genlerinin metilasyonları üzerinden yapıldı.

Bulgularımıza göre *SOCS-1* metilasyon profili enfekte olmuş hücreler ile olmamış hücreler arasında fark yok iken *JAK2V617F* mutasyonunu homozigot olarak barındıran HEL hücre hattında metile olarak tespit edilmiştir. Bu durum *JAK2V617F* mutasyonunun hücreler üzerinde oluşturduğu farklı etki mekanizmalarından kaynaklanabilir. HUVEC'lerin tamamında enfekte olsun olmasın, metilasyon görülmemesine rağmen HEL' de görülmesi hücrelerin kökensel farklılığına işaret ediyor olabilir. HEL bir kan, HUVEC endotel hücre hattıdır. EH'de mutasyonun etkilediği farklı yolların ve/veya farklı etkileşimlerin sonucu etkisini gösteriyor olabilir. Aynı zamanda HEL' in *V617F* mutasyonunu homozigot olarak bulundurması da bu farklılıkta rol oynayan nedenlerden bir diğeri olabilir. Zira hastalığın patogenezinde allel yükü ve patolojinin şiddeti ilişkisine dair birçok yayın mevcuttur. Bunun yanında bazı çevresel uyarılar, bu deney platformunda kullanılmamıştır ve bunlar *SOCS* metilasyon profillerini etkileyebilir. Sonucu etkileyen nedenler arasında, *JAK2* ve *JAK2V617F* geni enfekte olmuş hücrelerin hücre ayırıcı ile seçilmesi sonucu elde edilen *JAK2V617F* mutasyonunu % 90' dan fazla taşıyan hücreler üzerinden analiz yapılmış olması da olabilir. Diğer bir açıdan lentivirüslerin genoma rastgele bir biçimde entegre olması da bu sonuca neden olmuş olabilir. Zinc-finger rekombinaz gibi farklı plasmidleri daha spesifik şekilde hedefe yönlendiren metotlar kullanılarak daha etkili sonuçlar alınabilir. Nitekim son dönemlerde bu çeşit çalışmalar artmaktadır. Tüm bunlara ek olarak unutulmamalıdır ki, kısa süreli enfeksiyon neticesinde yapılan bu analizler hastalığın uzun süreli oluşum tablosunu tam yansıtmıyor olabilir. Enfekte EH'ni daha uzun süreler kültüre ederek göstermiş oldukları değişime bakabilecek bir platform oluşturmak daha sağlıklı sonuçlar elde etmemizi sağlayabilir.

SOCS-2,3 ve 4 genleri için tüm örnekler unmetile bir tablo çizmesi yorum yapmamızı zorlaştırırsa da farklı grupların yapmış olduğu tüm genom düzeyinde yapılan çalışmalarda kontrol bireylerde bu sonuca benzer bir sonuç bulunmuş, belirgin ve ayırt edici bir farklılık kaydedilememiştir (40) Ayrıca NF-κB gibi

bazı yollarla ilişki saptanmıştır. NF-Kb' nin inflamasyonla tetiklenen karsinogenezde anahtar rolü vardır ve ileri miyeloproliferatif hastalık gelişiminde etkindir (41). Bu durum göz önüne alındığında SOCS' ların böyle bir sonuç vermesinde farklı yollarında olası rolü hesaba katılmalıdır (42).

Bu çalışmada literatürde pek bilgi içermeyen JAK-2V617F mutasyonun EH' i üzerinde yapmış olduğu etki ile SOCS gen anlatımlarına etkisini irdelemiştir. Daha önce yapılmış EH metilasyon çalışmaları vardır (43,44). Fakat bu çalışmalarda JAK2V617F mutasyonunun SOCS metilasyonu üzerindeki etkisi incelenmemiştir. Çalışmamız bu açıdan özgündür.

SONUÇ

Sonuç olarak, EH üzerinde JAK2V617 mutasyon etkisi ile meydana gelen SOCS1-4 gen anlatım artış bağlantısı henüz bilinmemektedir. Burada SOCS genleri metilasyon rolü olmadığı anlaşılmıştır. Bu çalışmalara ek olarak gelecekte SOCS benzeri, kanserogenezde rolü olan birçok genin ve mutasyonun varlığından hareketle bu genlerin metilasyon profillerinin incelenmesi MPN patogenezine ışık tutacaktır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- S.S.T.; Veri Toplama- A.G., H.H.; Veri Analizi/Yorumlama- S.S.T, A.G., H.H.; Yazı Taslağı- S.S.T.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- S.S.T, A.G.,H.H.; Son Onay ve Sorumluluk- S.S.T, A.G.,H.H.; Malzeme ve Teknik Destek- S.S.T.; Süpervizyon- S.S.T

Author Contributions: Conception/Design of Study- S.S.T.; Data Acquisition- A.G., H.H.; Data Analysis/Interpretation- S.S.T, A.G., H.H.; Drafting Manuscript- S.S.T.; Critical Revision of Manuscript- S.S.T, A.G., H.H.; Final Approval and Accountability- S.S.T, A.G., H.H.; Technical or Material Support- S.S.T.; Supervision- S.S.T

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Finansal Destek: Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi

tesisi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından desteklenmiştir. (Proje No: 27570)

Financial Disclosure: This study was supported by Istanbul University Scientific Research Projects Unit (BAP). (Project No: 27570)

KAYNAKLAR/REFERENCES

1. Levine RL, Wadleigh M, Cools J. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005;7(4):387-97.
2. James C, Ugo V, Le Couedic JP. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005; 434(7037):1144-8.
3. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS.. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005;352(17):1779-90.
4. Tefferi A, Elliott M. Thrombosis in myeloproliferative disorders: prevalence, prognostic factors, and the role of leukocytes and JAK2V617F. *Semin Thromb Hemost* 2007;33:313-20.
5. Wolanskyj AP, Schwager SM, McClure RF, Larson DR, Tefferi A. Essential thrombocythemia beyond the first decade: life expectancy, long-term complication rates, and prognostic factors. *Mayo Clin Proc* 2006;81(2):159-66.
6. Tefferi A, Thiele J, Orazi A, Kvasnicka HM, Barbui T, Hanson CA, Barosi G, Verstovsek S, Birgegard G, Mesa R, Reilly JT, Gisslinger H, Vannucchi AM, Cervantes F, Finazzi G, Hoffman R, Gilliland DG, Bloomfield CD, Vardiman JW. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood* 2007;110(4):1092-7.
7. Wehmeier A, Daum I, Jamin H, Schneider W. Incidence and clinical risk factors for bleeding and thrombotic complications in myeloproliferative disorders. A retrospective analysis of 260 patients. *Ann Hematol* 1991;63:101-6.

8. Craig MK. Propensity for hemorrhage and thrombosis in chronic myeloproliferative disorders. *Seminars in hematology* 2004;41(2 Suppl3):10-4.
9. Falanga A, Marchetti M, Barbui T, Smith CW. Pathogenesis of thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera: the role of neutrophils. *Semin Hematol* 2005;42(4):239-47.
10. Falanga A, Marchetti M, Evangelista V. Polymorphonuclear leukocyte activation and hemostasis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* 2000; 96(13):4261-6.
11. Blann A, Caine G, Bareford D. Abnormal vascular, platelet and coagulation markers in primary thrombocythaemia are not reversed by treatments that reduce the platelet count. *Platelets* 2004;15(7): 447-9.
12. Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larran A, Reverter JC, Villamor N, Colomer D, Cervantes F. Increased platelet and leukocyte activation as contributing mechanisms for thrombosis in essential thrombocythemia and correlation with the JAK2 mutational status. *Haematologica* 2006; 91(2):169-75.
13. Robertson B, Urquhart C, Ford I, Townend J, Watson HG, Vickers MA, Greaves M. Platelet and coagulation activation markers in myeloproliferative diseases: relationships with JAK2 V617 F status, clonality, and antiphospholipid antibodies. *J Thromb Haemost* 2007;5(8):1679-85.
14. Bellucci S, Michiels JJ. The role of JAK2 V617F mutation, spontaneous erythropoiesis and megakaryocytopoiesis, hypersensitive platelets, activated leukocytes, and endothelial cells in the etiology of thrombotic manifestations in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Semin Thromb Hemost* 2006; 32(4 Pt 2):381-98.
15. Duda DG, Fukumura D, Jain RK. Role of eNOS in neovascularization: NO for endothelial progenitor cells. *Trends Mol Med* 2004;10(4):143-5.
16. Sozer S, Fiel MI, Schiano T, Xu M, Mascarenhas J, Hoffman R. The presence of *JAK2V617F* mutation in the liver endothelial cells of patients with Budd-Chiari syndrome. *Blood* 2009;113(21): 5246-9.
17. Teofili L, Martini M, Iachininoto MG, Capodimonti S, Nuzzolo ER, Torti L, Cenci T, Larocca LM, Leone G. Endothelial progenitor cells are clonal and exhibit *JAK2V617F* mutation in a subset of thrombotic patients with Ph-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2011;117(9):2700-7.
18. Mascarenhas J, Roper N, Chaurasia P, Hoffman R. Epigenetic abnormalities in myeloproliferative neoplasms: a target for novel therapeutic strategies. *Clin Epigenetics* 2011;2(2): 197-212.
19. Kazi JU, Kabir NN, Flores-Morales A, Rönstrand L. SOCS proteins in regulation of receptor tyrosine kinase signaling. *Cell Mol Life Sci* 2014;71(17): 3297-310.
20. Cooney RN. Suppressors of cytokine signaling (SOCS): inhibitors of the JAK/STAT pathway. *Shock* 2002;17(2): 83-90.
21. Qin W, Li LL, Lu HN, Huang BB, Xiu B, Bo LJ, Gao QM, Zhang WJ, Fu JF. [Study of hypermethylation of SOCS gene in typical myeloproliferative disease]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2011;32(11):772-6.
22. Quentmeier H, Geffers R, Jost E, Macleod RA, Nagel S, Röhrs S, Romani J, Scherr M, Zaborski M, Drexler HG. SOCS2: inhibitor of *JAK2V617F*-mediated signal transduction. *Leukemia* 2008;22(12):2169-75.
23. Haan S, Wüller S, Kaczor J, Rolving C, Nöcker T, Behrmann I, Haan C. SOCS-mediated downregulation of mutant Jak2 (V617F, T875N and K539L) counteracts cytokine-independent signaling. *Oncogene* 2009;28(34):3069-80.
24. Jost E, do ON, Dahl E, Maintz CE, Jousten P, Habets L, Wilop S, Herman JG, Osieka R, Galm O. Epigenetic alterations complement mutation of JAK2 tyrosine kinase in patients with BCR/ABL-negative myeloproliferative disorders. *Leukemia* 2007;21(3): 505-10.
25. Guo W, Li W, Yuan L, Mei X, Hu W. MicroRNA-106a-3p Induces Apatinib Resistance and Activates Janus-Activated Kinase 2 (JAK2)/Signal Transducer and Activator of Transcription

- 3 (STAT3) by Targeting the SOCS System in Gastric Cancer. *Med Sci Monit* 2019;25:10122-8.
26. Bullock AN, Rodriguez MC, Debreczeni JE, Songyang Z, Knapp S. Structure of the SOCS4-ElonginB/C complex reveals a distinct SOCS box interface and the molecular basis for SOCS-dependent EGFR degradation. *Structure* 2007;15(11):1493-504.
27. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ ΔΔCT method. *methods* 2001;25(4):402-8.
28. Gharavi NM, Alva JA, Mouillesseaux KP, Lai C, Yeh M, Yeung W, Johnson J, Szeto WL, Hong L, Fishbein M, Wei L, Pfeiffer LM, Berliner JA. 2007. Role of the JAK/STAT Pathway in the Regulation of Interleukin-8 Transcription by Oxidized Phospholipids in Vitro and in Atherosclerosis in Vivo. *J. Biol. Chem.* 282: 31460-8.
29. Huang SP, Wu MS, Shun CT, Wang HP, Lin MT, Kuo ML, Lin JT. 2004. Interleukin-6 increases vascular endothelial growth factor and angiogenesis in gastric carcinoma. *J Biomed Sci* 11: 517-27.
30. Tawfik A, Jin L, Banas-Berceli AKL, Caldwell RB, Ogbi S, Shirley A, Barber D, Catravas JD, Stern DM, Fulton D, Caldwell RW, Marrero MB. Hyperglycemia and reactive oxygen species mediate apoptosis in aortic endothelial cells through Janus kinase 2. *Vascular Pharmacology* 2005;43(5):320-6.
31. Sandberg EM, Sayeski PP. Jak2 tyrosine kinase mediates oxidative stress-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2004;279(13):34547-52.
32. Gorina R, Petegnief V, Chamorro A, Planas AM. AG490 prevents cell death after exposure of rat astrocytes to hydrogen peroxide or proinflammatory cytokines: involvement of the Jak2/STAT pathway. *J Neurochem* 2005;92(3):505-18.
33. Neria F, Caramelo C, Peinado H, Gonzalez-Pacheco FR, Deudero JJ, de Solis AJ, Fernandez-Sanchez R, Penate S, Cano A, Castilla MA. Mechanisms of endothelial cell protection by blockade of the JAK2 pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292(3): C1123-31.
34. Neria F, Castilla MA, Sanchez RF, Gonzalez Pacheco FR, Deudero JJ, Calabria O, Tejedor A, Manzarbeitia F, Ortiz A, Caramelo C. Inhibition of JAK2 protects renal endothelial and epithelial cells from oxidative stress and cyclosporin A toxicity. *Kidney Int* 2008;75(2):227-34.
35. Santilli F, Romano M, Recchiuti A, Dragani A, Falco A, Lessiani G, Fioritoni F, Lattanzio S, Mattoscio D, De Cristofaro R, Rocca B, Davi G. Circulating endothelial progenitor cells and residual in vivo thromboxane biosynthesis in low-dose aspirin-treated polycythemia vera patients. *Blood* 2008;112(4):1085-90.
36. Cucuianu A, Stoia M, Farcas A, Dima D, Zdrenghea M, Patiu M, Olinic D, Petrov L. Arterial stenosis and atherothrombotic events in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Rom J Intern Med* 2006;44(4):397-406.
37. Cosgrove ME, Suman R, Harrison HJ, Jackson GE, Howard MR, Hitchcock IS. Endothelial JAK2V617F Expression Drives Inflammation and Cellular Senescence; New Evidence for the Roles of Endothelial Cells in MPN-Related Clotting Abnormalities? *Blood* 2016;128(22):3134-3134.
38. Pedroso JAB, Ramos-Lobo AM, Donato J, Jr. SOCS3 as a future target to treat metabolic disorders. *Hormones (Athens)* 2019;18(2):127-36.
39. Kim WS, Kim MJ, Kim DO, Byun JE, Huy H, Song HY, Park YJ, Kim TD, Yoon SR, Choi EJ, Jung H, Choi I. Suppressor of Cytokine Signaling 2 Negatively Regulates NK Cell Differentiation by Inhibiting JAK2 Activity. *Sci Rep* 2017;7:46153.
40. Nischal S, Bhattacharyya S, Christopheit M, Yu Y, Zhou L, Bhagat TD, Sohal D, Will B, Mo Y, Suzuki M, Pardanani A, McDevitt M, Maciejewski JP, Melnick AM, Grealley JM, Steidl U, Moliterno A, Verma A. Methylome Profiling Reveals Distinct Alterations in Phenotypic and Mutational Subgroups of Myeloproliferative Neoplasms. *Cancer Research* 2013;73(3):1076-85.
41. Brasier AR. The NF-kappaB regulatory network. *Cardiovasc Toxicol* 2006;6(2):111-30.

42. Pérez C, Pascual M, Martín-Subero JI, Bellosillo B, Segura V, Delabesse E, Álvarez S, Larrayoz MJ, Rifón J, Cigudosa JC, Besses C, Calasanz MJ, Cross NCP, Prósper F, Agirre X. Aberrant DNA methylation profile of chronic and transformed classic Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. *Haematologica* 2013;98(9):1414-20.
43. Izzi B, Noro F, Cludts K, Freson K, Hoylaerts MF. Cell-Specific PEAR1 Methylation Studies Reveal a Locus that Coordinates Expression of Multiple Genes. *Int J Mol Sci* 2018;19(4):1069.
44. Han S, Tan C, Ding J, Wang J, Ma'ayan A, Gouon-Evans V. Endothelial cells instruct liver specification of embryonic stem cell-derived endoderm through endothelial VEGFR2 signaling and endoderm epigenetic modifications. *Stem Cell Res* 2018;30: 163-70.



Akraba Dışı Kordon Kanı Kaynaklı Kök Hücre Transplantasyonu Retrospektif Analizi A Retrospective Analysis of Unrelated Cord Blood Derived Stem Cell Transplantation

Ayşe Erol^{1,2} , Demet Kıvanç¹ , Mediha Süleymanoğlu¹ , Fatma Savran Oğuz^{1,2} 

ÖZ

Amaç: Hematolojik malign ve malign olmayan hastalıkların tedavisinde hematopoietik kök hücre transplantasyonu (HKHT) için özellikle çocuk hastalarda kordon kanı kök hücreleri uygulanmaktadır. Çalışmamızda İstanbul Tıp Fakültesi Kemik İliği Bankası aracılığı ile kordon kanı transplantasyonu uygulanan alıcı ve vericilerin HLA uyumu ve hastaların sağ kalım açısından retrospektif analizlerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada 2008 ve 2014 yılları arasında göbük kordon kanı hematopoietik kök hücre kaynağı kullanılarak transplantasyonu gerçekleştirilen 102 vaka, retrospektif olarak analiz edilmiştir. Kordon kanı tarama başvuruları İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Kemik İliği Bankası aracılığı ile gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: Kordon kanı taramasından transplantasyon işlemine kadar geçen süre ortalama 45 gün (11-113 gün) olmuştur. Hastaların ortalama yaşları 42,48±2,8 ay (1-192 ay), erkek-kadın oranı 64/38'dir. Bu grup içindeki vakaların tanıları SCID (n=23), AML (n=13), osteopetroz (n=10), ALL (n=10) ve diğer hastalıklardır (n=46). Kordon kanı transplantasyonu gerçekleştirilen 102 vakadan (%53), HLA-A veya -B antijen uyumsuzluğu; 9 vakada (%9) HLA-DR uyumsuzluğu, 1 vakada (%1) HLA-B veya -DR antijen uyumsuzluğu varken 38 vakada (%37) HLA -A, -B, -DR lokusları tam uyumlu idi. HKHT'den sonra kordon kanı ile tam uyumlu hastaların genel sağ kalım oranı %81,5 (n=31/38) iken Sınıf-I HLA antijen uyumsuzluğu olan hastaların genel sağ kalım oranı %48,1 (26/54), Sınıf-II HLA antijen uyumsuzluğu olan hastalarınki ise %22,2 (2/9) idi.

Sonuç: Çalışmamızda 6/6 HLA uyumlu kordon kanından gerçekleştirilen transplantasyonların hastaların genel sağ kalımı üzerinde önemli etkisi olduğu tespit edilmiştir. Bu bağlamda, özel kordon bankaları dışında, akraba dışı kordon kanı transplantasyonları için resmi kordon kanı bankaları kurulması suretiyle Türkiye'deki kordon kanı transplantasyonu sayısı artırılabilir.

Anahtar Kelimeler: Hematopoietik Kök Hücre, Kordon Kanı, HLA, Transplantasyon

ABSTRACT

Objective: Cord blood stem cells are used for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in the treatment of hematological malignant and non-malignant diseases, especially in pediatric patients. In this present study, we aimed to evaluate the retrospective analysis of HLA match and survival between donor and patients who underwent cord blood transplantation through the Istanbul University Faculty of Medicine Bone Marrow Bank.

Materials and Methods: In order to research the related factors of umbilical cord blood transplantation in Turkey, 102 cases of umbilical cord blood transplantation performed between 2008 and 2014 were analyzed retrospectively. Cord blood unit search applications were performed through Istanbul University, Istanbul Medical Faculty, Bone Marrow Bank.

Results: It was, on average, 45 days between the search request and transplantation (range: 11-113 days). Average age of the patients was 42.48±2.8 (1-192 months), male-to-female ratio was 64/38. The most frequent diseases resulting in transplantation were SCID (n=23), AML (n=13), osteopetrosis (n=10), ALL (n=10) and other diseases. There were 38 (37%)

¹ İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

² İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Kemik İliği Bankası, İstanbul, Türkiye

ORCID: A.E. 0000-0003-4196-1791;

D.K. 0000-0002-2451-5709;

M.S. 0000-0002-1401-4863;

F.S.O. 0000-0002-6018-8936

Corresponding author/Sorumlu yazar:

Fatma Savran Oğuz,
İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, *Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, **Kemik İliği Bankası, İstanbul, Türkiye
E-mail: oguzsf@gmail.com; oguzsf@istanbul.edu.tr

Geliş tarihi/Submitted: 18.09.2020

İlk revizyon/First revision received: 30.09.2020

Son revizyon/Last revision received: 07.10.2020

Kabul Tarihi/Accepted: 14.10.2020

Citation/Atf: Erol A, Kıvanç D, Süleymanoğlu M, Savran Oğuz F. A retrospective analysis

of unrelated cord blood derived stem cell

transplantation. Sağlık Bilimlerinde İleri

Araştırmalar Dergisi 2020; 3(3): 148-156.

https://doi.org/10.26650/JARHS2020-796846



cord blood transplantations with matched HLA-A,-B,-DR; 54 (52%) mismatched for HLA-A or -B antigens; 9 (9%) mismatched for HLA-DR only and 1 (1%) mismatched for HLA-B and -DR antigens. The overall survival rate after HSCT with cord blood was 81.5% (n=31/39). The overall survival rate of the patients with HLA class-I antigens mismatch is 48.1% (26/54), the patients with HLA class-II antigens mismatch was 22.2% (2/9) after the HSCT.

Conclusion: In conclusion, we found a significant effect in patients undergoing cord blood transplantation with 6/6 HLA matching on overall survival.

Keywords: Hematopoietic stem cell transplantation, cord blood transplantation, HLA, Transplantation

GİRİŞ

Hematopoietik kök hücre transplantasyonu (HKHT), bir dizi malign ve malign olmayan hastalık için iyileştirici bir tedavidir. Hematopoietik kök hücre kaynakları kemik iliği, periferik kan ve göbek kordon kanıdır (1).

Doğum sonrası genellikle atılan göbek kordon kanı oldukça zengin bir kök hücre kaynağıdır ve invaziv olmayan yöntemle toplanması herhangi bir bulaş ihtimalini de ortadan kaldırmaktadır. Kemik iliğine alternatif olan kordon kanı kullanımının, bebeğin immün sisteminin henüz gelişmemiş olması dolayısıyla transplantasyon sonrası graft versus host hastalığı (GVHH) görülme riskinin azalması yönünde bir avantaj sağlayacağı düşünülmektedir. Bu nedenle İnsan Lökosit Antijeni (HLA) uyumu için çok katı kriterler gerektirmediği ve eşleşen vericinin aranması için daha kısa sürenin yeterli olduğu bilinmektedir (2).

HLA uyumu, alıcı ve verici arasındaki cinsiyet uyumu, HKHT'den sonra sağ kalım ve nüksü etkileyen önemli belirleyicilerdendir. Etnik gruplar için kısa sürede tam uyumlu kök hücrelerin bulunması ve getirilmesi zordur ve acil transplantasyon endikasyonları olan hastalar için ciddi engeller bulunmaktadır. HKHT'de kordon kanı kullanılan alıcı ile verici arasında HLA tam uyumu aranmamakla birlikte tam uyumlu transplantasyonlar kadar başarı sağlanabileceği düşünülmektedir (3,4).

HKHT ihtiyacı olan hastaların yalnızca %30'nun tam uyumlu akraba vericisi bulunmaktadır. HLA uyumlu akraba dışı kök hücre vericisinin bulunması zor ve bunun için gerekli olan süre uzundur (5). Dolayısıyla bu hasta grubu için kordon kanı kullanımı iyi bir alternatif olabilmektedir. Ayrıca kordon kanı, kök hücre rezervi olarak da klinikte kullanım alanı bulmaktadır. HKHT'de kordon kanı kullanımı kilo başına gerekli hücre sayısının sağlanabilmesi yönünden çoğunlukla çocuk hastalarda uygulama alanı bulmakta iken özellikle çift ünite kordon kanının kullanılmaya başlanması ile erişkin hasta grubunda da yeterli hücre sayısına ulaşılabilmekte ve ayrıca doz azaltılmış kemoterapi protokolleri ile hazırlama rejimlerinin uygulanması sayesinde tedavi ilişkili mortaliteyi de azaltmaktadır (6).

İstanbul Tıp Fakültesi Kemik İliği Bankası 1999 yılında, hiçbir kar amacı gütmeyen bağımsız bir organizasyon olarak kurulmuştur ve çalışma amacı hayati tehdit eden bir hastalığı olan ve genetik olarak uygun bir kan kök hücre vericisi bulunması halinde uzun dönem sağ kalımı, iyileştirilebilme ihtimali olan her hastaya kan kök hücre transplantasyonu olanağını sağlamak olmuştur. İstanbul Tıp Fakültesi Kemik İliği Bankası 2008 yılı Nisan ayında yeniden yapılanmasından itibaren 11 senelik hizmet süresi içerisinde 1271 hastanın (766 periferik, 129 kordon kanı, 376 kemik iliği/kök hücre kaynakları kullanılarak) transplantasyon işleminin gerçekleşmesine ve ayrıca 27 hasta için donör lenfosit infüzyonu katkıda bulunmuştur. Transplantasyon organizasyonu işlem akış süresi açısından, kordon kanı kök hücre kaynağının bulunması, getirilmesi ve transplantasyon işleminin gerçekleştirilmesi, diğer kök hücre kaynaklarına göre daha kısadır. İTF Kemik İliği Bankası tecrübelerine göre kordon kanı kök hücre kaynağının bulunmasından transplantasyon işleminin gerçekleşmesine kadar geçen ortalama süre 30 günken, diğer kök hücre kaynakları için bu süre ortalama 90 gündür (Şekil 1). Hastalar için verici bulunması sürecinde kemik iliği ve periferik kan kök hücre bağışlayan kişilerin donasyondan vazgeçme olasılığı, vericinin yurt dışına gitmiş olması veya herhangi bir hastalık taşıyor olması, verici olması için gerekli sağlık koşullarını taşıyor olması, vericinin sosyal veya ekonomik durumunun değişmesinden dolayı donasyondan vazgeçmesi, vericilere ulaşılamaması ve gebelik durumları gibi nedenlerden bu kök hücre kaynaklarından transplantasyon sağlama işlemi daha uzun ve zahmetlidir. Kordon kanının kök hücre kaynağı olarak kullanılmasında ise vericinin vazgeçme durumu söz konusu değildir.

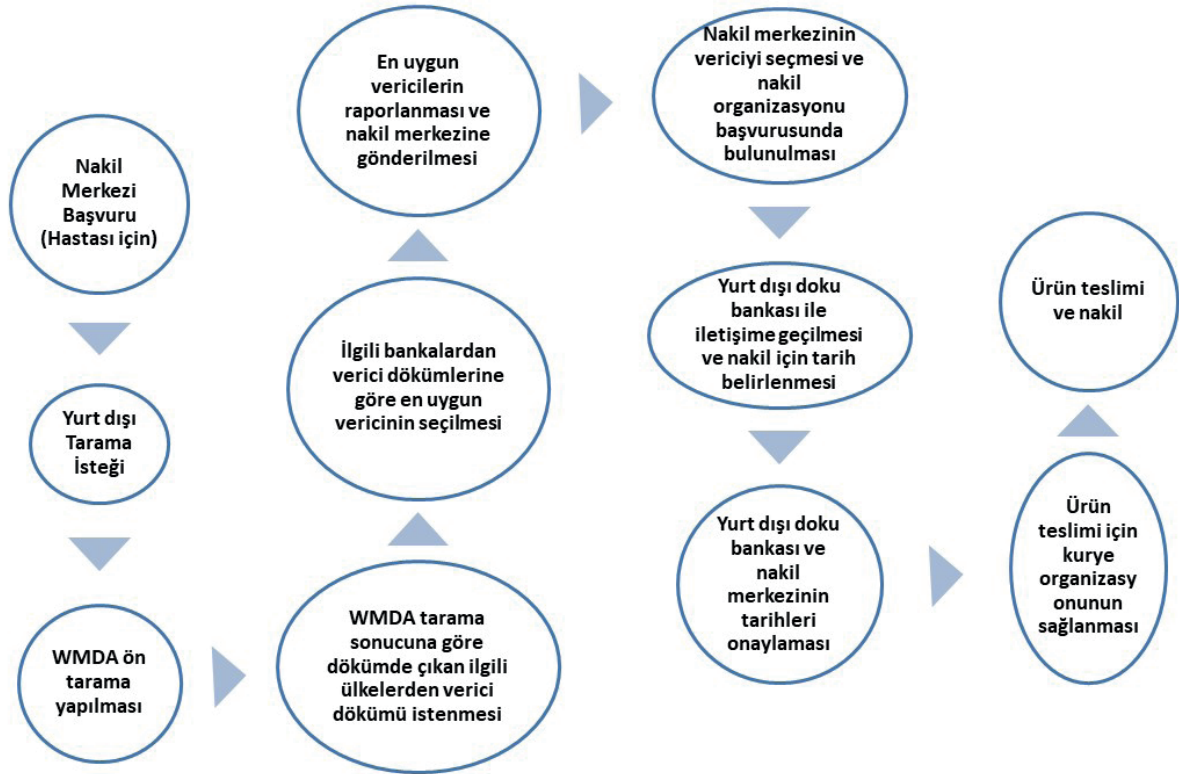
İlk kordon kanı nakli 1989 yılında Paris'teki Saint Louis hastanesinde Gluckman ve ekibi tarafından Fanconi anemisi olan çocuklarda gerçekleştirilmiştir (7,8). Bu tarihten sonra kordon kanı çekici bir HKHT kaynağı haline gelmiş ve Türkiye'de ilk "kordon kanı transplantasyonu" 1995 yılında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde bir talasemi hastasına uygulanmıştır (9,10,11,12).

Dünya'da 36 ülkenin 61 kordon kanı bankasında yer alan toplam 1.042.224 kordon kanı ünitesi (Tablo 1) bulunmakta olup bu kordon kanı ünitelerinden

800.087 tanesi Dünya Kemik İliği Donör Derneği (WM-DA-World Marrow Donor Association) veri tabanına kayıtlıdır. WMDA adı verilen uluslararası gönüllü verici havuzu, bir hasta için uygun olabilecek vericilerin kendi ülkesindeki gönüllü vericiler arasından değil, dünyadaki tüm gönüllü vericiler arasından taranması olanağını sağlar. İstanbul Tıp Fakültesi Kemik iliği Bankası da WMDA üyesidir ve 2008-2014 yılları arasında

102 hastaya HLA tam uyumlu/1 antijen uyumsuz kordon kanı kök hücresi bulularak transplantasyonlarının gerçekleştirilmesine katkı sağlamıştır.

Bu çalışmada, kordon kanı transplantasyonu gerçekleştirilen 102 vakanın demografik verileri, HLA uyumları, tanıları, transplantasyonların kordon kanı bankalarına göre dağılımları ve HLA uyumunun sağ kalım üzerindeki etkisini karşılaştırmayı amaçladık.



Şekil 1. Kemik iliği bankası yurt dışı tarama genel işlem akış şeması.

Tablo 1. Kordon kanı bankalarında saklanan kordon kanı üniteleri

| Ülke | Kordon Kanı sayısı | Ülke | Kordon Kanı sayısı | Ülke | Kordon Kanı sayısı | Ülke | Kordon Kanı sayısı |
|-----------|--------------------|------------|--------------------|-----------------|--------------------|-----------------|--------------------|
| Türkiye** | 1537 | Avustralya | 37428 | İsviçre | 5013 | Kıbrıs | 3283 |
| Amerika | 263271 | İngiltere | 27523 | Hollanda | 4693 | Slovenya | 2016 |
| İsrail | 259111 | Belçika | 22058 | Yunanistan | 4600 | Tayland | 1515 |
| Tayvan | 78678 | Brezilya | 17079 | İsveç | 4395 | Avusturya | 1424 |
| İspanya | 64234 | Kanada | 15274 | Çek Cumhuriyeti | 4137 | Şili | 1227 |
| Kore | 55076 | Hindistan | 12012 | Arjantin | 3929 | Suudi Arabistan | 575 |
| İtalya | 38508 | Singapur | 11519 | Hırvatistan | 3614 | Hong Kong | 506 |
| Almanya | 38422 | İran | 8521 | Finlandiya | 3338 | Meksika | 382 |
| Fransa | 37608 | Rusya | 6095 | Polonya | 3294 | Bulgaristan | 329 |
| | | | | | | TOPLAM | 1.042.224 |

* <https://statistics.wmda.info/> ; **Türkiye: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kordon Kanı Bankası (TRAN)

GEREÇ VE YÖNTEM

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Kemik İliği Bankası aracılığıyla ile 2008-2014 yılları arasında kordon kanı transplantasyonu gerçekleştirilen 102 hastaya ait veriler retrospektif olarak incelenmiş ve güncel verilerle tartışılmıştır.

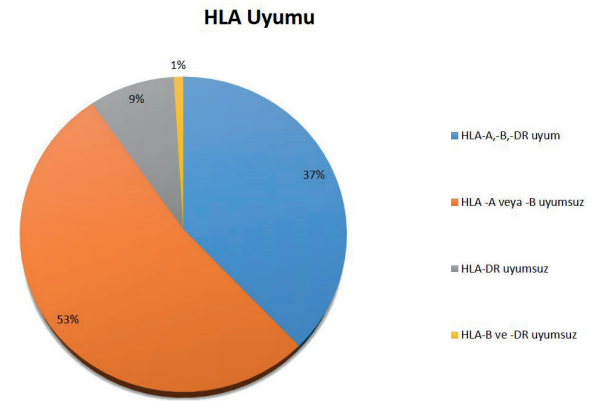
BULGULAR

Bu çalışmaya dahil edilen hastaların demografik verileri aşağıdaki tabloda özetlenmiştir (Tablo 2).

Hastaların yaş ortalaması $42,48 \pm 2,8$ (1-192 ay) erkek/kadın oranı 64/38'dir. Transplantasyonla sonuçlanan en sık görülen hastalıklar SCID (n=23), AML (n=13), Osteopetroz (n=10) ve ALL (n=10)'dir. HLA-A, -B, -DR uyumlu kordon kanı ünitesinden transplantasyonu gerçekleştirilen 38 (%37) vaka; HLA-A veya -B lokusları için 1 antijen uyumsuz 54 (%53) vaka; yalnızca HLA-DR lokusu için 1 antijen uyumsuz 9 (%9) vaka; HLA-B ve -DR lokusları için 2 antijen uyumsuz 1 (%1) kordon kanı transplantasyonu vardır (Şekil 2). Hastalar için akraba dışı kordon kanı kök hücre tarama talebinin yapılması ile hastanın transplantasyon

işleminin gerçekleştirilmesi arasında geçen süre ortalama 45 gün (11-113 gün)'dür.

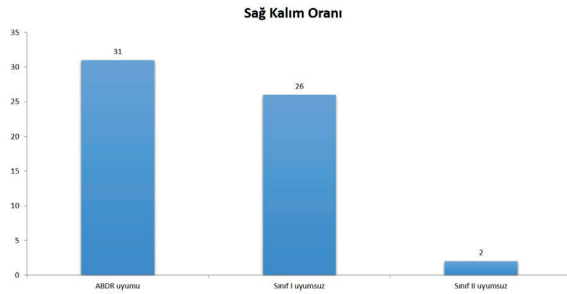
HLA tam uyumlu kordon kanından transplantasyonu gerçekleştirilen hastaların genel sağ kalım oranı %81,5 (n=31/38) dir. Sınıf-I HLA antijen uyumsuzluğu olan hastaların genel sağ kalım oranı HKHT'den sonra %48,1 (26/54), Sınıf-II HLA antijen uyumsuzluğu olan hastaların ise %22,2 (2/9) 'dur (Şekil 3).



Şekil 2. Kordon Kanı transplantasyonu olan hasta-vericilerin HLA uyum verileri.

Tablo 2. Demografik veriler

| | Yaş (ay) | Cinsiyet | Akut Lösemi | Diğer Hastalıklar | Kordon Merkezi | Uygun kordon araştırılmasından transplantasyona kadar geçen süre |
|----------------------------------|-------------------------|----------------|------------------|--|---|--|
| Hasta Popülasyonu (n=102) | 42,48±2,8 (1-192 ay) | 38/64 (K/E) | AML:13 ALL:10 | SCID: 23 Osteopetroz:10 HLH:8 JMML:6 Diğerleri: 32 | NMDP-National Marrow Donor Program/Be The Match (CORD) : 25 Registro de Donantes de Médula Ósea (REDMO) (CORD) : 20 Italian Bone Marrow Donor Registry (CORD) : 13 ZKRD - Zentrales Knochenmarkspender-Register Deutschland (CORD) : 12 France Greffe de Moelle Registry - FGM (CORD) : 9 Ankara University Faculty of Medicine/TRAN Ankara (CORD) : 3 Diğerleri : 20 | Toplam : 45 gün (11-113) |



Şekil 3. Hasta-verici HLA uyumlarının sağ kalım oranları.

Mortalite oranları tüm tanıları açısından değerlendirildiğinde yaklaşık %25'ini (9/40) AML/ALL tanılarının oluşturduğu, AML/ALL tanısı olan hastalarda da transplantasyon sonrası mortalite oranının %39 (9/23) olduğu saptanmıştır.

TARTIŞMA

Kök hücre kaynağı olarak kordon kanı kullanımı; kemik iliği ve periferik kan kök hücre kaynağına göre pek çok yönden daha avantajlıdır. Kordon kanının kullanılması diğer kaynaklara göre daha ucuzdur ve transplantasyon sonrası izlemde daha iyi klinik sonuçlar gösterilmiştir. Üstelik transplantasyon işleminin gecikmesi ve diğer komplikasyonların oluşma potansiyeli ya da kardeş ve akraba dışı kemik iliği/periferik kan kök hücre kaynağı için vericinin, ihtiyaç duyulduğunda uygun olmaması ihtimali de dikkate alınmalıdır. Kordon kanının toplanması bebek ve anne için zararsızdır ve herhangi bir etik kaygı taşımaz. Ayrıca lösemi, aplastik anemi veya şiddetli kombine immün yetmezlik, osteopetroz veya mukopolisakkaridoz gibi kalıtsal bozukluklar için vericiden kemik iliğinin güvenli bir şekilde toplanması için geçen süre transplantasyon işlemi için dezavantajdır (13,14).

NMDP/CIBMTR (Amerikan Ulusal Kemik İliği Donör Programı/Uluslararası Kan ve Kemik İliği Transplant Arama Merkezi) tarafından 2019'da yayınlanan rehber göre, akraba dışı kordon kanı arama kriterlerinde HLA uyumu, düşük çözünürlük HLA-A, HLA-B antijenleri ve yüksek çözünürlük HLA-DRB1 allelleri için minimum $\geq 4/6$ ve yüksek çözünürlük HLA-A,-B,-C,DR allelleri için $\geq 4/8$ uyumu olmalıdır (15). Bu standart kriterlere ek olarak, HLA-C antijen uyumunun da mortalite riskini minimize ettiği bulunmuştur (16). Çalışmamızda yaş ortalaması 42,48

ay olan 102 olgu değerlendirildiğinde, hastalar ile transplante edilen kordon kanına ait HLA grupları moleküler düzeyde düşük çözünürlük olarak çalışılmış olup, HLA-A lokusunda 1 antijen uyumsuzluğu olan 30 vaka, HLA-B lokusunda 1 antijen uyumsuzluğu olan 24 vaka, HLA-DR lokusunda 1 antijen uyumsuzluğu olan 9 vaka, hem HLA-B hem de HLA-DR lokuslarında 1'er antijen uyumsuzluğu olan 1 vaka tespit edilmiştir. Literatürde yer alan diğer bazı çalışmalar da, malign ve malign olmayan hastalıkların tedavisinde kullanılan kordon kanı ünitelerinde yüksek çözünürlük HLA-A, HLA-B, HLA-C ve HLA-DRB1 uyumunun önemini teyit etmiştir (17,18). Alıcı ve kordon kanı ünitesi arasındaki HLA yüksek çözünürlüklü uyumsuzluk ≥ 2 olduğunda nötrofil iyileşme insidansı daha düşük, greft başarısızlığı ve ölüm oranları daha yüksek olmaktadır. Çift ünite kordon kanı transplantasyonlarında da aynı HLA uyum kriterleri göz önünde bulundurulmalıdır (15). Başka bir çalışmada çoğu (%57'si) 1 HLA uyumsuzluğu olan greftten nakil olmuş 252 akut lösemi tanılı çocuk hastada %55 oranında tam remisyona sağlandığı bildirilmiştir. Söz konusu çalışmada bu hastaların %21'i ≥ 2 'inde HLA uyumsuzluğu ve %22'sinde identik HLA uyumu mevcut olduğu, nötrofil engraftman oluşma yüzdesinin 0-1 HLA uyumsuz olanlarda %91; 2 HLA uyumsuzluğu olanlarda %88 olduğu bildirilmiştir (19). Buna benzer başka bir çalışmada, 504 akut lösemi tanılı erişkin ve genç erişkin vaka HLA uyumu açısından değerlendirildiğinde 0-1 HLA uyumsuzluğu olan hasta oranı %38,1; 2 veya 2'den fazla HLA uyumsuzluğu olan hasta oranı ise %61,9 olarak bildirilmiştir (20). Çalışmamızda, HLA tam uyumlu kordon kanından gerçekleştirilmiş 38 transplantasyondan 31'i, Sınıf-I HLA antijen uyumsuzluğu olan 54 transplantasyondan 26'sı, Sınıf-II HLA antijen uyumsuzluğu olan 9 transplantasyondan 2'si ortalama 1 yıllık sağ kalım açısından başarılı olarak saptanmıştır. HLA tam uyumlu kordon kanı transplantasyonlarında genel sağ kalımın alel/antijen uyumsuz kordon kanı transplantasyonlarına göre daha yüksek olduğu gösterilmiş ve 6/6 HLA uyumunun transplantasyon gerçekleştirilen hastaların genel sağ kalımı üzerinde önemli etkisi olduğu bulunmuştur. Gelecekte verile-

rimize hastalara ait engrafman, nüks, greft başarısı ve takip süreleri gibi klinik bilgiler de eklenerek HLA uyumu açısından değerlendirmesi düşünülmektedir. Gluckman ve ark.larının çalışmalarında (21) 514 kordon kanı transplantasyonu yapılan AML/ALL tanıli hastada mortalite oranı yaklaşık %45 olarak bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda bu verileri destekler nitelikte olup tanılar açısından mortalite oranları değerlendirildiğinde yaklaşık %25'ini (9/40) AML/ALL tanılarının oluşturduğu, AML/ALL tanısı olan hastalarda da transplantasyon sonrası mortalite oranının %39 (9/23) olduğu saptanmıştır.

Hematopoitik kök hücre kaynağı olarak kordon kanının kullanılması düşük kiloda olmaları dolayısıyla özellikle pediatrik hastalar için iyi bir seçenektir. Bununla birlikte erişkin hastalar için çift ünite kordon kanı transplantasyonlarının yapılabilmesi ve kordon kanı kök hücrelerinin *in vitro*'da çoğaltılabiliyor olması bu kısıtlamayı ortadan kaldıran stratejilerdir (22). Yüksek hücresel içeriğe sahip kordon kanı birimlerinin artan kullanılabilirliği, hücre dozunu artırmak için çift kordon kanı grefti kullanımı ve çok sayıda *ex vivo* ekspansiyon yöntemleri dahil olmak üzere kordon kanı transplantasyonundaki gelişmeler, potansiyel uygulama alanını daha da artırmıştır (23). Tek kordon kanı koleksiyonlarında hematopoetik kök hücre sayılarını artırmak için yapılan, fonksiyonel HKH'leri *ex vivo* ekspansiyon işlemi kordon kanı HKH'lerin homing ve engrafman iyileştirmesi için yapılır (24). Hem tam HLA uyumu aranmaması (25) hem de son zamanlarda kordon kanı üniteleri sayısındaki artış dolayısıyla kordon kanı taraması yapılan hastalarda bekleme süresinin diğer kaynaklardan (periferik kan ve kemik iliği) nakil bekleyen hastalara göre daha kısa olması kordon kanı transplantasyonlarının avantajları arasındadır. HKHT'de kök hücre kaynağı olarak kordon kanı kullanımının umut verici bir yöntem olduğu ve kök hücreye kısa sürede ulaşma avantajı olduğu da (15) verilerimizle desteklenmektedir.

SONUÇ

Allojenik HKHT için kordon kanı birimlerinin kullanılması, tüm dünyada birçok hayatı kurtarmıştır ve çok daha fazlasına fayda sağlamayı vaat etmektedir.

Türkiye'de HKHT merkez sayılarında artış olmasına rağmen, bu artış henüz kordon kanı kullanımına önemli derecede yansımamıştır. Sağlık Bakanlığı 2019 güncel verilerine (organ.saglik.gov.tr) göre Türkiye'de toplamda 3289 hastanın kemik iliği transplantasyonu için beklediği göz önüne alınır; kordon kanının kök hücre kaynağı olarak bu hastalarda kullanılması avantaj sayılabilir.

Sonuç olarak, ülkemizde kordon kanı transplantasyonları için ihtiyacı karşılayacak kök hücre ve kordon kanı bankalarının sayıları artırılmalıdır. Kök hücre ve kordon kanı bankasının ağı ülkemizi uluslararası bir merkez haline getirme potansiyeli çok yüksektir. Tüm gelişmiş ülkelerin Kordon Kanı Bankaları mevcut olup, ülkemizdeki kordon kanı nakillerinin %90'ı yurtdışından temin edilmektedir. Kordon kanı veri tabanları yurt içi ve yurt dışındaki vatandaşlarımız ve diğer genetik yakınlığı olan insanlar için kullanılabilir. Bu durum ithal eden değil, ihraç eden konumu ile ekonomik olarak da ülkeye katkı sağlayacaktır.

Bu bağlamda, özel kordon bankaları dışında, akraba dışı kordon kanı transplantasyonları için resmi kordon kanı bankaları kurulması suretiyle Türkiye'deki kordon kanı transplantasyon sayısı artırılabilir.

Teşekkür: Çalışmamızda yer alan vakaların transplantasyonlarını gerçekleştiren; Göztepe Medikal Park Pediatrik Kemik İliği Nakil Ünitesi, Ege Tıp Fakültesi Pediatrik Kemik İliği Nakil Ünitesi, Antalya Medikal Park Pediatrik Kemik İliği Nakil Ünitesi, Bahçelievler Medikal Park Pediatrik Kemik İliği Nakil Ünitesi, Akdeniz Tıp Fakültesi Pediatrik Kemik İliği Nakil Ünitesi, Erciyes Tıp Fakültesi Pediatrik Kemik İliği Nakil Ünitesi, Acıbadem Atakent Pediatrik Kemik İliği Nakil Ünitesi, Samsun Medikal Park Pediatrik Kemik İliği Nakil Ünitesi, Medipol Tıp Fakültesi Pediatrik Kemik İliği Nakil Ünitesi merkezlerine teşekkürlerimizi sunarız.

Acknowledgements: We would like to thank the bone marrow transplant units for performing the transplants of the cases indicated in our study with their names Göztepe Medikal Park Pediatric Bone Marrow Unit , Ege Medical Faculty Pediatric Bone Marrow Unit , Antalya Medikal Park Pediatric Bone

Marrow Unit , Bahçelievler Medikal Park Pediatric Bone Marrow Unit , Akdeniz Medical Faculty Pediatric Bone Marrow Unit , Erciyes T Medical Faculty Pediatric Bone Marrow Unit , Acıbadem Atakent Pediatric Bone Marrow Unit , Samsun Medikal Park Pediatric Bone Marrow Unit, Medipol Medical Faculty Pediatric Bone Marrow Unit.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- A.E., D.K., M.S., F.S.O.; Veri Toplama- A.E., D.K., M.S., F.S.O.; Veri Analizi/Yorumlama- A.E., D.K., M.S., F.S.O.; Yazı Taslağı- A.E., D.K., M.S., F.S.O.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- A.E., D.K., M.S., F.S.O.; Son Onay ve Sorumluluk- A.E., D.K., M.S., F.S.O

Author Contributions: Conception/Design of Study- A.E., D.K., M.S., F.S.O.; Data Acquisition- A.E., D.K., M.S., F.S.O.; Data Analysis/Interpretation- A.E., D.K., M.S., F.S.O.; Drafting Manuscript- A.E., D.K., M.S., F.S.O.; Critical Revision of Manuscript- A.E., D.K., M.S., F.S.O.; Final Approval and Accountability- A.E., D.K., M.S., F.S.O

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

Financial Disclosure: Authors declared no financial support.

KAYNAKLAR/REFERENCES

1. Wright-Kanuth M, Smith L. Hematopoietic stem cell transplantation. Clin Lab Sci 2001; 14(2):112-117.
2. Munoz J, Shah N, Rezvani K, Hosing C, Bollard CM, Oran B, et al. Concise Review: Umbilical Cord Blood Transplantation: Past, Present, and Future. Stem Cells Transl Med. 2014;3:1435-43.
3. Gluckman E, Koegler G, Rocha V. Human leukocyte antigen matching in cord blood transplantation. Semin Hematol 2005;42: 85-90.
4. Purtill D, Cooney J, Cannel P, Hermann R, Trimboli F, Carter T, et al. Cord blood transplantation in Western Australia. Internal Medicine Journal Royal Australasian College of Physicians 2011;1008-13.
5. Barker JN, Byam C, Scaradavou A. How I treat: the selection and acquisition of unrelated cord blood grafts. Blood 2011;117(8):2332-9.
6. Keklik F, Üstün, C. Akriba dışı Kordon Kanı Nakilleri: Erişkin Deneyimi. İçinde: Beksaç M, (editör). Hematolog. 6. Ankara: Türk Hematoloji Derneği, 2016:77-90.
7. Gluckman E, Devergie A, Bourdeau-Esperou H, Thierry D, Traineau R, Auerbach A, Broxmeyer HE. Transplantation of umbilical cord blood in Fanconi's anemia. Nouv Rev Fr Hematol 1990;32(6):423-5.
8. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Fiedman HS, Douglas GW, Devergie A, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling. N Engl J Med. 1989;321(17):1174-8.
9. Karasu G, Yeşilipek MA. Akriba Dışı Kordon Kanı Nakilleri: Pediatri Deneyimi. Hematolog 2016;6:65-71.
10. Topçuoğlu P. Türkiye'de Erişkin Akriba Dışı Kordon Kanı Nakli Deneyimi Erişkin Kordon Kanı Nakli. Hematolog 2016;6:91-100.
11. Keklik-Karadağ F, Yurdakul P, Beksaç M. Kordon kanı bankacılığı ve nakli. Hematolog 2019; 236-45.
12. Yurdakul P, Karadağ Keklik F, Beksaç M. Kordon Kanı Bankacılığı ve Kordon Kanı Nakilleri. Türkiye Klinikleri J Hematol-Special Topics 2018;11(1):60-7.
13. Petrini C. Umbilical cord blood collection, storage and use: ethical issues. Blood Transfus 2010;8(3):139-48.
14. Welte K, Foeken L, Gluckman E, Navarrete C. International exchange of cord blood units: the registry aspects. Bone Marrow Transplantation 2010;45(5): 825-31.
15. Dehn J, Spellman S, Hurley CK, Shaw BE, Barker JN, Burns LJ, et al. Selection of unrelated donors and cord blood units for hematopoietic cell

- transplantation: guidelines from the NMDP/CIBMTR. *Blood* 134(12):924-34.
16. Eapen M, Klein JP, Sanz GF, et al; Center for International Blood and Marrow Transplant Research. Effect of donor-recipient HLA matching at HLA A, B, C, and DRB1 on outcomes after umbilical-cord blood transplantation for leukaemia and myelodysplastic syndrome: a retrospective analysis. *Lancet Oncol.* 2011;12(13):1214-21.
 17. Eapen M, Klein JP, Ruggeri A, et al; Center for International Blood and Marrow Transplant Research, Netcord, Eurocord, and the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Impact of allele-level HLA matching on outcomes after myeloablative single unit umbilical cord blood transplantation for hematologic malignancy. *Blood.* 2014;123(1):133-40.
 18. Eapen M, Wang T, Veys PA, et al. Allele-level HLA matching for umbilical cord blood transplantation for non-malignant diseases in children: a retrospective analysis. *Lancet Haematol.* 2017;4(7):e325-e333.
 19. Ruggeri A, Volt F, Locatelli F, Michel G, Heredia CD, Abecasis M, et al. Unrelated Cord Blood Transplantation for Acute Leukemia Diagnosed in the First Year of Life: Outcomes and Risk Factor Analysis. *Biol Blood Marrow Transplant* 2017;23(1): 96–102.
 20. Hayashi H, Volt F, Sanz J, Petersen E, Dhedin N, Hough R, et al. Myeloablative Unrelated Cord Blood Transplantation in Adolescents and Young Adults with Acute Leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2019; 25(12):2438-46.
 21. Gluckman E, Ruggeri A, Rocha V, Baudoux E, Boo M, Kurtzberg J, et al. Family-directed umbilical cord blood banking. *Haematologica* 2011; 96(11):1700-07.
 22. Cunha R, Loiseau P, Ruggeri A, Sanz G, Michel G, Paolalori A, et al. Impact of HLA mismatch direction on outcomes after umbilical cord blood transplantation for hematological malignant disorders: a retrospective Eurocord-EBMT analysis. *Bone Marrow Transplantation* 2014;49: 24–29.
 23. Milano F, Gooley T, Wood B, Woolfrey A, Flowers ME, Doney K, et al. Cord-Blood Transplantation in Patients with Minimal Residual Disease. *N Engl J Med* 2016;375:944-53.
 24. Huang X, Guo B, Capitano M, Broxmeyer HE. Past, present, and future efforts to enhance the efficacy of cord blood hematopoietic cell transplantation. *F1000Research* 2019;8:F1000 Faculty Rev-1833.
 25. Taupin P, Transplantation of cord blood stem cells for treating hematologic diseases and strategies to improve engraftment. *Therapy* 2010;7(6): 703–15.



İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Nutrisyon ve Mikrobiyota Araştırma Laboratuvarı Bakteriyel Topluluk Analiz Algoritması

*İstanbul University, İstanbul Faculty of Medicine, Clinical Nutrition and Microbiota
Research Laboratory's Bacterial Community Analysis Algorithm*

Dilek Sever Kaya¹ , Bülent Saka² 

ÖZ

Amaç:Bu çalışmada, "Bakteriyel Topluluk Analiz Algoritması" oluşturularak 16S ribozomal RNA (rRNA) Amplicon Dizileme (AD) stratejisine dayalı Yeni Nesil Dizileme Teknolojisi kullanılarak gerçekleştirilen bakteriyel topluluk analizlerinden elde edilen verilerin daha verimli kullanılabilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem:Çalışmamızda, 96 insan bağırsak mikrobiyota örneğinin 16S rRNA genlerinin V3-V4 bölgeleri Illumina MiSeq sistemi kullanılarak çift-sonlu dizileme yöntemiyle dizilenmiştir. Biyoinformatik analizler QIIME 2 açık kaynaklı yazılımı ile gerçekleştirilmiştir.

Bulgular:16S rRNA AD koşumundaki 96 örneğin tamamının 16S rRNA V3-V4 bölgeleri başarıyla dizilenmiştir. Çalışmanın sonunda toplam okuma 23.42 M, kümelenme yoğunluğu 883 K/mm², filtreyi geçen küme yoğunluğu % 92.13, kalite skorları ise > Q30 = % 76,7 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada elde ettiğimiz veriler ve çalışma sürecinde oluşan tecrübe ve bilgi birikimimiz sonucunda laboratuvarımız tarafından bir Bakteriyel Topluluk Analiz Algoritması oluşturulmuştur.

Sonuç:"İstanbul Tıp Fakültesi, Klinik Nutrisyon ve Mikrobiyota Araştırma Laboratuvarı Bakteriyel Topluluk Analiz Algoritması" laboratuvarımızda gerçekleştirdiğimiz çalışmaların aynı standartlarda ve karşılaştırılabilir olması için kullanılacaktır. Bu algoritmanın ülkemizdeki araştırmacılar için bir referans niteliğinde olacağını düşünmekteyiz. Ayrıca farklı merkezlerin bu algoritmayı kullanmaları durumunda elde edilecek veriler laboratuvarımızın verileriyle ve bu protokolü kullanan ülkemizdeki veya Dünyadaki diğer merkezlerin verileriyle karşılaştırılabilir olacaktır. Bu şekilde ülkemizdeki insan bağırsak mikrobiyotası ile ilgili yapılan çalışmaların veriminin ve elde edilen verilerin değerinin artırılmasına katkıda bulunmayı hedefliyoruz.

Anahtar Kelimeler:16S rRNA, bağırsak mikrobiyotası, Yeni Nesil Dizileme

ABSTRACT

Objective:This study aims to more efficiently use the data obtained from a bacterial community analysis performed using next-generation sequencing based on the 16S ribosomal RNA (rRNA) amplicon sequencing (AS) strategy by creating a bacterial community analysis algorithm.

Materials and Methods:The V3-V4 16S rRNA hypervariable regions of 96 human gut microbiota samples were sequenced using the Illumina MiSeq system by the paired-end sequencing method. Bioinformatics analysis was performed by the QIIME 2 open-source software.

Results:The V3-V4 16S rRNA hypervariable regions of 96 gut samples were sequenced successfully using 16S rRNA AS. At the end of the study, the total reading was 23.42 M, the cluster density was 883 K/mm², the cluster density passing the filter was 92.13%, and the quality scores were >Q30 = 76.7%. Our laboratory created a bacterial community analysis algorithm from the data we have obtained in this study and based on our experience and knowledge during the study process.

¹ İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Klinik Nutrisyon ve Mikrobiyota Araştırma Laboratuvarı, İstanbul, Türkiye

² İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ORCID: D.S.K. 0000-0001-9155-935X;
B.S. 0000-0001-5404-5579

Corresponding author/Sorumlu yazar:

Dilek Sever Kaya,
İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Klinik
Nutrisyon ve Mikrobiyota Araştırma Laboratuvarı,
İstanbul, Türkiye
E-mail: dsever@istanbul.edu.tr

Submitted/Geliş tarihi: 18.09.2020

First Revision Received/İlk revizyon: 30.09.2020

Last Revision Received/Son revizyon: 07.10.2020

Accepted/Kabul Tarihi: 14.10.2020

Citation/Atf: Sever Kaya D, Saka B. İstanbul University, İstanbul Faculty of Medicine, Clinical Nutrition and Microbiota Research Laboratory's Bacterial Community Analysis Algorithm. Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi 2020;3(3):157-167.
<https://doi.org/10.26650/JARHS2020-792223>



Conclusion: Our bacterial community analysis algorithm will be used to carry out similar studies in our laboratory within the same, comparable standards. We believe that this algorithm will serve as a reference for researchers in Turkey. In addition, if different research centers will use this algorithm, their data will be comparable to those of our laboratory and other centers in our country and the world using the same protocol. In this way, we can help increase the efficiency of studies and the value of the data obtained from the human gut microbiota.

Keywords: 16S rRNA, gut microbiota, next-generation sequencing

GİRİŞ

Bilinen en eski canlı formu olan mikroorganizmalar, ekstrem koşullar dahil olmak üzere hemen hemen her koşulda ve çevrede yaşamlarını sürdürebilmektedir. Günümüzde tüm canlıların yaşamının devamlılığı mikroorganizmalara bağlıdır. İnsanlar da yaşamlarının her döneminde çevrelerinde ve vücutlarında bulunan mikroorganizmalarla etkileşimindedir. Bu etkileşim o kadar yüksektir ki insan, birçok organizmanın (memeli hücresi, bakteri, virus, mantar, parazit) birlikteliğinden oluşan bir supra-organizma olarak tanımlanmaktadır (1,2). Mikroorganizmalar çeşitli çevrelere uyum sağlayarak bu çevrelerin koşullarına özgü topluluklar oluştururlar. Bakteriler, arkealar, mantarlar, viruslar ve protistlerden oluşan ve sıcak su kaynaklarından insan bağırsağına kadar çok çeşitli özel çevrelerde yaşayan bu mikrobiyal topluluklar “Mikrobiyota” olarak adlandırılmaktadır (3,4). İnsan vücudunun oro-nazo-farengeal bölge, deri, gastrointestinal sistem gibi farklı bölgelerinde farklı mikrobiyal topluluklar bulunmaktadır. Bu mikrobiyal toplulukların her biri konakla etkileşim içindedir ve insan sağlığı üzerinde doğrudan etkilidir (5). Örneğin insan bağırsak mikrobiyotası, insan bağırsağının fizyolojik fonksiyonları ve normal anatomik gelişiminin yanı sıra beyin, metabolik ve immün sistem gibi diğer organ ve sistemler açısından anahtar rol oynamaktadır. Ayrıca insan bağırsak mikrobiyotasındaki bazı mikroorganizmalar insan sağlığı açısından önemli proteinleri kodlamakta, bazı vitaminleri ve kısa zincirli yağ asitlerini sentezlemekte, ilaçları ve çevresel toksinleri metabolize etmektedir (6). İnsan sağlığı mikrobiyotayla insan vücudu arasında kurulan homeostatik ve dengeli ilişkiyle yakından ilgilidir. Bu kompleks ilişki ve denge bozulduğunda yani mikrobiyal kompozisyon ve aktiviteler normal ve yararlı durumdan anormal ve insan sağlığı için potansiyel zararlı olabilecek duruma geldiğinde disbiyoz olarak adlandırılan durum ortaya çıkar (7). Disbiyozu neden olabilecek çok çeşitli faktörler bulunmaktadır. Örneğin insan bağırsak mikrobiyotasındaki disbiyozun gelişiminde kötü beslenme, antibiyotik kullanımı, stres gibi birçok faktörün etkili olduğu bilinmektedir. Bu

süreçte mikrobiyota kompozisyonunda değişiklikler meydana gelir ve bu değişimlerin alkol-dışı hepatit, tip 2 diyabet, obezite, atopi, astım, kanser, inflamatuvar bağırsak hastalığı, huzursuz bağırsak sendromu, Alzheimer gibi birçok hastalıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir (6,7,8,9).

Mikroorganizmaların birbirinden bağımsız olarak düşünemeyeceğimiz çevre, insan ve diğer canlıların sağlığı üzerindeki etkilerinin önemi anlaşıldıkça, özellikle mikrobiyota kompozisyonlarının sistematik ve fonksiyonel olarak tanımlanması bilim dünyasının en önemli ve ilgi çekici konularından biri haline gelmiştir. Mikrobiyal topluluklarda baskın olarak bulunan mikroorganizmalar bakterilerdir (4). Bu nedenle mikrobiyota çalışmaları bakteri toplulukları üzerinde yoğunlaşmaktadır. Bu çalışmalarda genel olarak mikrobiyal topluluklardaki bakterilerin tanımlanması, topluluklardaki zenginliklerinin ve yoğunluklarının belirlenmesi, yapısal özelliklerinin tanımlanması, ürettikleri metabolitlerin topluluk içindeki ve dışındaki etkilerinin incelenmesi, konakla veya bulunduğu cansız çevreyle etkileşimlerinin anlaşılması hedeflenmektedir. İnsan mikrobiyotasındaki bakteriyel topluluklarla ilgili de özellikle bağırsak mikrobiyotası üzerinde birçok çalışma yürütülmektedir. İnsanlarda gelişen bağırsak disbiyozunun tedavisi için mikrobiyotadaki zararlı türlerin öldürülmesi, yararlı türlerin aşılınması, immün cevabın uyarılması veya mikrobiyotanın zararlı metabolitlerinin ve aktivitelerinin ilaçlarla zayıflatılması gibi yolların etkili olacağı yönünde görüşler bulunmaktadır ve mikrobiyotanın hastalıkların tanı ve tedavisinde önemli bir rol oynayabileceği örneğin mikrobiyota odaklı terapiler geliştirilebileceği öngörülmektedir (10). Aynı zamanda insan mikrobiyotasının bakteriyel kompozisyonundaki değişimler hastalıklarla ilişkilendirildiği için bu değişimleri ve bakteriyel toplulukların normal yapısını doğru ve hassas şekilde tanımlamak oldukça önemli bir konudur. Dinamik bir yapıya sahip olan insan mikrobiyota kompozisyonunun tanımlanmasıyla bakteriyel toplulukların sağlıkta ve hastalıkta nasıl değiştiği, baskın bakteri gruplarının hangileri olduğu, biyobirliç olarak yararlanabilecek bakteri grupları veya

türleri belirlenebilir. Bu konularla ilgili yapılan çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen hala sağlıklı insan mikrobiyotası kavramı net değildir ve disbiyozisin hastalıkların nedeni mi yoksa sonucu mu olduğu yönünde araştırmacılar arasında görüş birliği bulunmamaktadır (11). Bakteriyel kompozisyonların tanımlanmasına yönelik yapılan çalışmalar bu konuların aydınlatılmasına da katkı sağlamaktadır.

Mikrobiyal toplulukların kültürden bağımsız tanımlanması, ilk kez 1997 yılında 16S ribozomal RNA (rRNA) geni kullanılarak Sanger dizileme teknolojisiyle gerçekleştirilmiştir. Bundan itibaren 16S rRNA gen dizileme bakteriyel topluluk analizleri için altın standart olarak kabul edilmektedir (12). 1997 yılından günümüze kadar 16S rRNA gen dizileme için kullanılan teknolojilerde büyük değişimler olmuştur. Birinci Nesil Dizileme olarak da adlandırılan Sanger Dizileme Teknolojisiyle yapılan 16S rRNA gen dizileme çalışmaları bakteriyel toplulukların analizinde devrim niteliğinde olsa da bu yöntemin klonlama adımına ihtiyaç duyması ve aynı anda birden fazla bakteri dizisinin çalışılmaması önemli sınırlayıcı faktörler arasında yer almaktadır (13). 2005 yılında İkinci Nesil Dizileme veya Yeni Nesil Dizileme (YND) olarak adlandırılan teknolojinin kullanılmaya başlanmasıyla bakteriyel topluluk analizlerinde yeni bir dönem başlamıştır ve karmaşık mikrobiyotaların mikrobiyal çeşitliliğinin analizi için büyük bir avantaj sağlanmıştır (5). Bu teknoloji ile çok sayıda örnekten binlerce dizi aynı anda dizilenebilmekte ve Sanger dizileme teknolojilerindeki sınırlandırmaları ortadan kaldırarak araştırmacılara zaman kazandırmakta, maliyetleri düşürmekte ve yüksek çıktılı veri sunmaktadır. 16S rRNA Amplikon Dizileme (AD) stratejisine dayanan YND teknolojileriyle gerçekleştirilen metagenomik analizler konvansiyonel yöntemlere göre çok daha hassas ve düşük maliyetli olarak bakteriyel toplulukların tanımlanmasını ve karşılaştırılmasını sağlamaktadır (14). 2011 yılında YND teknolojilerine göre daha uzun okuma yapan ve daha yüksek çıktısı olan Üçüncü Nesil Dizileme teknolojisi adı verilen bir dizileme teknolojisi kullanılmaya başlanmıştır. Başlarda maliyet ve okuma hata oranının yüksekliği nedeniyle YND teknolojilerinin

gerisinde kalan bu teknoloji yıllar içinde geliştirilerek bu dezavantajlar büyük oranda ortadan kaldırılmıştır. Bu yeni teknoloji ile 16S rRNA geninin tamamı dizilenebildiği için YND teknolojisine göre daha doğru taksonomik ve filogenetik çözünürlük elde edilebilmektedir. Ayrıca daha düşük maliyetle, daha hızlı ve daha yüksek veri çıktısı sağlanmaktadır. Ancak bu teknolojiyle elde edilen verilerin analizi için tasarlanan araçların azlığı, sınırlı kalitede 16S rRNA dizilerinin elde edilmesi (düşük okuma doğruluğu) nedeniyle YND teknolojileri için tasarlanan mevcut analiz araçlarıyla kısıtlı analiz gerçekleştirilebilmesi Üçüncü Nesil Dizileme teknolojisinin önemli sınırlayıcı faktörleridir (13,15). Günümüzde insan mikrobiyotasındaki bakteri topluluklarının analizinde en yaygın olarak 16S rRNA AD stratejisine dayanan YND teknolojileri kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, laboratuvarımızda insan bağırsak mikrobiyotasının 16S rRNA AD stratejisine dayalı YND teknolojisi kullanılarak gerçekleştirilen analizleri sonucunda insan bağırsak mikrobiyota çalışmaları için “Bakteriyel Topluluk Analiz Algoritması” oluşturulmuştur. Bu algoritma laboratuvarımızda gerçekleştirdiğimiz çalışmaların aynı standartlarda ve karşılaştırılabilir olması için kullanılacaktır. Ayrıca farklı merkezlerin bu algoritmayı kullanmaları durumunda elde edilecek veriler laboratuvarımızın verileriyle ve bu protokolü kullanan diğer merkezlerin verileriyle karşılaştırılabilir olacaktır. Bu şekilde ülkemizdeki insan bağırsak mikrobiyotası ile ilgili yapılan çalışmaların veriminin ve elde edilen verilerin değerinin artırılmasına katkıda bulunmayı hedefliyoruz.

GEREÇ VE YÖNTEM

Örneklerin Toplanması, Ön Hazırlığı ve Saklanması

Bu çalışma için İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan (Tarih:12.05.2017, Sayı:09) izin alındı. Tüm gönüllülerden yazılı bilgilendirilmiş onam alındı. Dışkı örneklerinin toplanması için uygun steril kaplar kullanıldı. Örnekler laboratuvara mobil soğutucu dolap ile nakledildi. Örnekler laboratuvar tarafından teslim alındıktan sonra etiketlendi ve hassas terazide tartıldı. Seward

Stomacher (Seward, İngiltere) cihazı ile homojenize edilen örnekler cryo tüplere aktarıldıktan sonra -80 °C soğutucuda DNA izolasyonları gerçekleştirilene kadar saklandı.

Bakteriyel Genomik DNA İzolasyonu

Homojenize dışkı örneklerinin bakteriyel genomik DNA (gDNA) izolasyonu “QIAamp PowerFecal DNA Isolation Kit (Qiagen, Almanya)” kullanılarak kit protokolünün yönergelerine göre gerçekleştirildi. Elde edilen gDNA örneklerinin jel elektroforez görüntüleri alınarak, spektrofotometrik ve florometrik yolla ölçümleri gerçekleştirildi. Çalışma için yeterli kalite ve miktarda olan DNA örnekleri -20 derece soğutucuda Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) analizleri için saklandı.

16S rRNA Amplikon Dizileme

Bu çalışmada 96 örneğin 16S rRNA genlerinin V3-V4 bölgeleri İllumina MiSeq sistemi (Illumina, Kaliforniya, ABD) kullanılarak çift-sonlu dizileme (2x.300 bp) yöntemiyle MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycle) (Illumina, Kaliforniya, ABD) kullanılarak dizilendi. Bu yöntemin sırasıyla Amplikon PZR, Amplikon PZR ürünlerinin saflaştırılması, İndeks PZR, İndeks PZR ürünlerinin saflaştırılması, Normalizasyon, Kütüphane Denatürasyonu ve Örnek Yükleme aşamaları “İllumina MiSeq sistemi için 16S örnek hazırlama rehberinin” yönergelerine göre gerçekleştirildi (16). Amplikon PZR’da 16S rRNA V3-V4 gen bölgelerinin çoğaltılması için universal primerler (341F-805R) kullanıldı (17). Saflaştırılan Amplikon PZR ürünlerine dizileme adaptörlerinin ve indekslerin (dual index) bağlanması için İndeks PZR işlemi “Nextera XT index primerleri (Illumina, Amerika)” kullanılarak gerçekleştirildi. Saflaştırılan İndeks PZR ürünlerinin çift zincirli DNA miktarı florometrik yöntemle ölçüldü (Qubit 3.0 florometre cihazı-Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit ((Life Technologies, İngiltere)). Ölçümleri yapılan örneklerin normalizasyonu gerçekleştirildikten sonra DNA kütüphanelerinden bir havuz (pool) oluşturuldu. 4 nM havuz, 0.2 N NaOH’le denatüre edildikten sonra elde edilen denatüre kütüphane 5 pmol konsantrasyona

dilüe edildi ve reagent kartuşa (MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycle)) yüklenerek İllumina Miseq sisteminde dizileme işlemi gerçekleştirildi.

Biyoinformatik Analizler

İllumina MiSeq ile gerçekleştirilen 16S rRNA AD koşumundan elde edilen verilerin biyoinformatik analizi “Illumina MiSeq Reporter Software (Illumina, Amerika)” ve “Quantitative Insights Into Microbial Ecology - QIIME 2” açık kaynaklı yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Taksonomik sınıflandırma için SILVA rRNA veri bankası (SILVA-138) kullanıldı. Alfa ve beta çeşitlilik analizleri QIIME 2 yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi.

Bakteriyel Topluluk Analiz Algoritmasının Oluşturulması

Laboratuvarımızda bakteriyel topluluk analizleri için kullanılan 16S rRNA AD yönteminin her aşamasının optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra asıl çalışmaya geçilerek 16S rRNA AD işlemi gerçekleştirildi. Bu çalışmada elde ettiğimiz tecrübe ve bilgi birikimi sonucunda “İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Nutrisyon ve Mikrobiyota Araştırma Laboratuvarı Bakteriyel Topluluk Analiz Algoritması” oluşturuldu.

BULGULAR

İllumina Miseq sisteminde gerçekleştirilen 16S rRNA AD koşumu “Sequence Analysis Viewer (Illumina, Amerika)” programı ile takip edildi. Koşumun sonunda toplam okumanın 23.42 M, kümelenme yoğunluğunun 883 K/mm², filtreyi geçen küme yoğunluğunun %92.13, kalite skorlarının ise > Q30 = %76,7 olduğu görüldü. Örnek başına en yüksek toplam okuma 474.572 iken en düşük toplam okuma 96.611’dir. Çalışmanın sonunda 16S rRNA AD koşumundaki 96 örneğin tamamının 16S rRNA V3-V4 bölgeleri başarıyla dizilendi. MiSeq Reporter tarafından oluşturulan fasta formatındaki fastq dosyaları QIIME 2 yazılımıyla gerçekleştirilen biyoinformatik analizlerde kullanıldı. İlk olarak okumaların kalite kontrolleri gerçekleştirildi. Q skoru 20’nin altında olan düşük kalitedeki okumalar filtrelendi. Çift son-

lu okumalar birleştirildikten sonra düşük kaliteli ve kimerik diziler uzaklaştırıldı. Ardından temsili İşlevsel Taksonomik Birimler (Operational Taxonomic Unit - OTU) belirlenerek SILVA veri bankasıyla karşılaştırıldı. Bu şekilde tamamlanan taksonomik analiz sonrasında alfa ve beta çeşitlilik ile istatistiksel analizler QIIME 2'nun alt programlarıyla belirlendi.

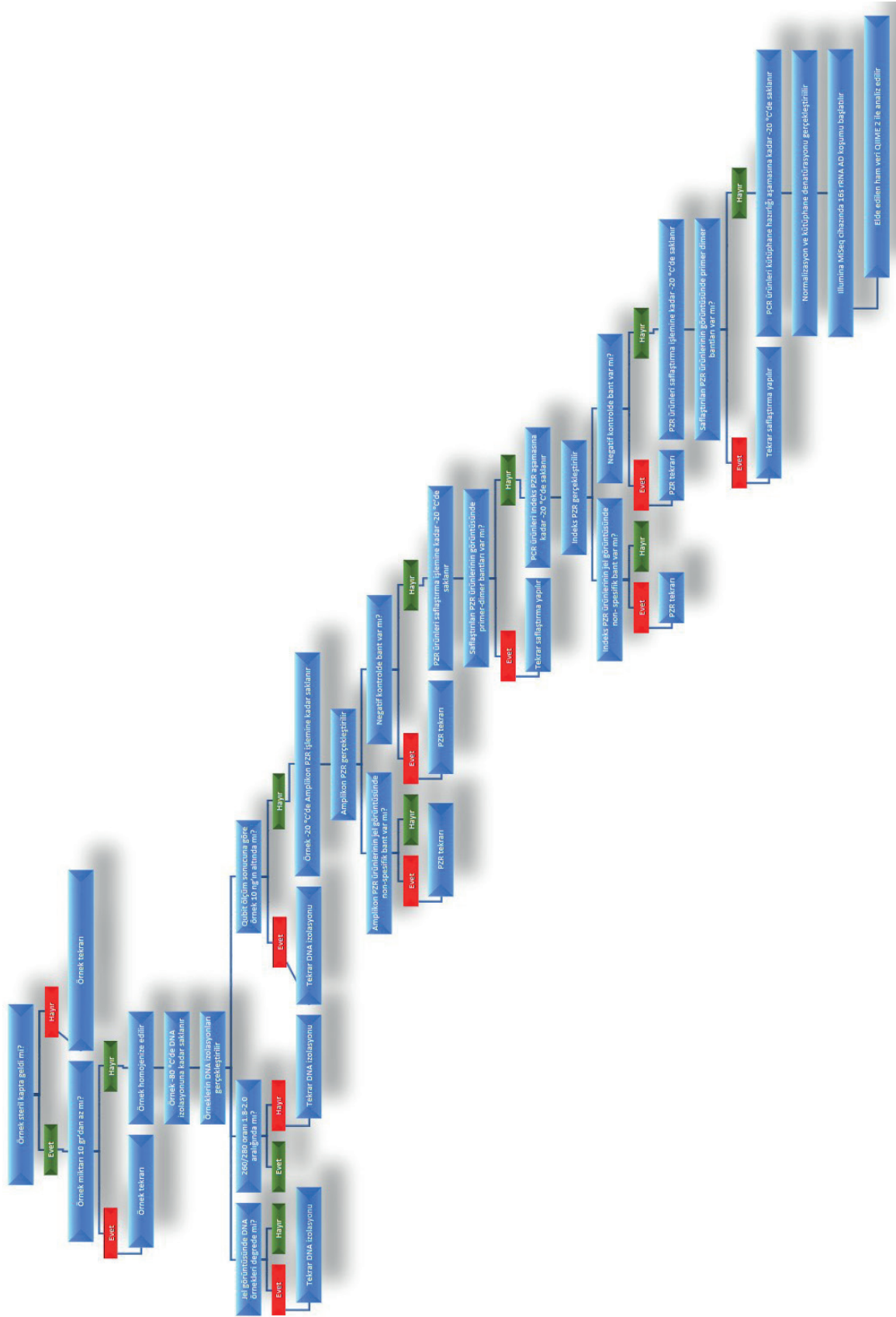
16S rRNA AD çalışmasının tamamlanmasının ardından bundan sonraki çalışmalarımızın birbiriyle karşılaştırılabilir olması ve farklı merkezlerde yapılan çalışmalara referans olarak birden fazla merkezin verilerinin karşılaştırılabilmesi amacıyla "İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Nutrisyon ve Mikrobiyota Araştırma Laboratuvarı Bakteriye Topluluk Analiz Algoritması" oluşturuldu (Şekil 1).

TARTIŞMA

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Nutrisyon ve Mikrobiyota Araştırma Laboratuvarı'nda yapılan insan bağırsak mikrobiyotası bakteriyel topluluk analizleri için 16S rRNA AD stratejisine dayalı YND teknolojisini kullanmaktayız ve bu yöntemin tüm aşamalarını hizmet alımı olmaksızın kendi bünyemizde gerçekleştirmekteyiz. 16S rRNA AD stratejisine dayalı YND yöntemi yurtdışında birçok laboratuvar da rutin olarak uygulanmakla birlikte ülkemizde bu konuda çalışan laboratuvar sayısı azdır. Özellikle yöntemin tüm aşamalarını kendi bünyesinde gerçekleştiren laboratuvar sayısı çok sınırlıdır. 16S rRNA AD çalışması için kullanılan sarfların ve cihazların yurt dışından gelmesi yöntemin ülkemizde uygulanmasının maliyetini arttırmaktadır. Ancak örneklerin daha az maliyet için yurt dışına gönderilmesi de güvenlik zafiyeti oluşturmakta ve bu alanda ülkemizde nitelikli personel yetişmesini zorlaştırmaktadır. Ayrıca ülkemizde insan mikrobiyotası ile ilgili yapılan çalışma sayısı oldukça azdır. Dünyada ise bu konunun çalışıldığı çok sayıda merkez birçok çalışma yürütmektedir. Ülkemizde insan mikrobiyota çalışmalarının sayısının artması, ülkemize özgü verilerin oluşturulmasını sağlarken, mikrobiyota odaklı tanı ve tedavi çalışmaları ile biyobelirteç ve probiyotik olarak kullanılabilen türlerin tespitine yönelik çalışmalar için de veri sağlayarak literatüre önemli katkılarda bulunacaktır. Bu

nedenlerle ülkemizde yapılan insan mikrobiyota çalışmaları hem ekonomik hem de nitelik açısından oldukça değerlidir. İnsan mikrobiyota çalışmalarında bir başka önemli husus da yüksek emek gerektiren ve mali yükü olan bu çalışmaların verilerinin karşılaştırılabilir olmasıdır. Elde edilen verilerin başka bir çalışmanın verileri ile karşılaştırılabilir olması için her iki çalışmanın da aynı protokolü kullanması gerekmektedir. 16S rRNA AD çalışmalarının hemen hemen her aşaması farklı yaklaşımlarla çalışılabilir. Bu yaklaşımların herhangi birine doğru veya yanlış kavramlarıyla bakmamakla birlikte her yaklaşımın diğerine göre avantajları veya dezavantajları bulunduğunu bilmek gerekir. Bu nedenle özellikle bu alanda yeni çalışmaya başlayan araştırmacıların literatür verilerini esas alarak en güncel ve en çok tercih edilen yöntemleri uygulamaları en doğru karar olacaktır. 16S rRNA AD stratejilerine dayalı YND teknolojisi ile gerçekleştirilen bakteriyel topluluk çalışmalarında kullanılan yöntemlerin tamamı analiz sonuçlarını doğrudan etkilemektedir. Bu nedenle laboratuvarlar kendi içlerinde de verilerin karşılaştırılabilir olması için tüm çalışmalarını aynı standartlarda ve aynı protokolleri uygulayarak gerçekleştirmelidir. Bir başka sorun da bu çalışmaların hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmesidir. Yine çalışma verilerinin karşılaştırılabilir olması için hizmet alımı şeklinin değişmemesi gerekmekte, ek olarak laboratuvar dışındaki uygulamalar kontrol edilemeyeceği için olası hatalar ve yöntem değişiklikleri araştırmacı tarafından kabul edilmiş olmaktadır. Tüm bu nedenlerle laboratuvarımızda yürüttüğümüz çalışmalar doğrultusunda insan bağırsak mikrobiyota çalışmaları için bir "Bakteriyel Topluluk Analiz Algoritması" oluşturduk. Bu algoritmayı hazırlarken kullandığımız yöntemlerin literatürde en çok kullanılan ve refere edilen yöntemler olmasına özen gösterdik. Bu şekilde verilerimizi literatürdeki çalışmalarla karşılaştırma şansımızı arttırmayı hedefledik.

Birçok insan bağırsak mikrobiyota çalışmasında örnekleme ve DNA izolasyon aşamaları en az dikkat edilen aşamalardır. Ancak bu aşamalarda seçilen yöntem ve prosedürler dizileme çıktılarını direkt etkilemektedir. Örnekleme aşamasında örneklerin işleme alınmadan önce ne kadar süre kaç derece sıcaklıkta



Şekil 1. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Nutrisyon ve Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı Bakteriye Topuluk Analiz Algoritması.

bekletildiği, örnekler dondurulduysa kaç derecede ne kadar süre bekletildiği ve birden fazla dondurma-çözme işleminin yapılıp yapılmadığı, örneklerin DNA izolasyonu veya dondurma işlemleri öncesinde homojenize edilip edilmediği, havayla ne kadar süre temas ettiği ve ne kadar örnek alındığı gibi çeşitli faktörler bakteriyel çeşitliliğinin tespiti ve 16S rRNA AD çıktıları açısından önemlidir (18,19,20). Bu nedenle araştırmacılar çalışmalarını laboratuvar kapasitelerini göz önünde bulundurarak planlamalı, örnekler için uygun saklama ortamını mutlaka sağlamalıdır. Bununla birlikte DNA izolasyon yönteminin seçimi de bakteriyel topluluk yapısının belirlenmesinde önemli bir yer tutar. Bakterilerin hücre yapılarındaki farklılıklar ve feçeste bulunan çeşitli PZR inhibitörleri nedeniyle DNA izolasyon yönteminin hem tüm bakterilerin DNA izolasyonu için uygun olması hem de inhibitörleri ortamdan uzaklaştırabilmesi gerekir. Seçilen DNA izolasyon yöntemi dizileme çıktıları üzerinde olumsuz etkilere ve dolayısıyla mikrobiyal çeşitliliğin hatalı temsiline neden olabilir (19,21). Yapılan çalışmalarda örneklerin saklanma şeklinin, örneğe uygulanan ön işlemlerin ve farklı DNA izolasyon yöntemlerinin metagenomik çalışmaların dizileme çıktılarındaki farklılıklara neden olduğu gösterilmiştir (18,19,20,21,22). Planlanan çalışmalarda örneklerin aynı yöntemle hazırlanması önemlidir ve özellikle karşılaştırmalı çalışmalarda farklı yöntemle hazırlanan örneklerin analizinde bu durumun göz önünde bulundurulması gereklidir (23). Bu nedenlerle algoritmamızın örnek toplama, ön hazırlık ve saklama adımlarını literatürde en çok tercih edilen yöntemlere göre tasarladık. DNA izolasyon yöntemi içinse yine literatürde en çok kullanılan ticari kitlerden olan QIAamp Power Fecal DNA Isolation Kiti kullanmayı tercih ettik (21).

16S rRNA AD yönteminin gerçekleştirildiği birden fazla YND teknolojisini kullanan platform bulunmaktadır ve her birinin kullandığı teknolojiye farklılıklar vardır. Bu platformlardan ilki Roche 454 dizileme sistemidir ve pirodizileme temellidir. Bu sistemin okuma hata oranlarının yüksek olması ve örnek hazırlama prosedürlerinin uzun olması nedeniyle 2013 yılında üretimi durdurulmuştur. Illumina, Ion Torrent, ve SOLiD çalışmalarda sıklıkla tercih edilen diğer

YND platformlarıdır. İon Torrent yarı iletken dizileme teknolojisini kullanırken SOLiD ligasyon yoluyla dizileme yöntemini kullanmaktadır. Illumina ise sentezle dizileme kimyasını katı bir yüzey üzerinde gerçekleşen köprü amplifikasyonu ile birleştirerek kullanır. Bu teknolojiler arasında Illumina platformu özellikle çift-sonlu (paired-end) okuma uzunluğunu arttırmasından sonra daha iyi çıktılar oluşturması ve daha düşük maliyetli olması nedeniyle araştırmacılar tarafından daha çok tercih edilir olmuştur. Dünyada YND çalışmalarının %90'ından fazlası Illumina platformuyla gerçekleştirilmiştir ve bu platform bir standart haline gelerek lider konuma geçmiştir (13,24,25,26). Bu nedenlerle çalışmalarımızda kullanılacak platformun Illumina olmasına karar verdik.

16S rRNA geninde korunmuş bölgeler içeren ve yüksek derece değişkenlik (hypervariable) gösteren 9 bölge bulunmaktadır. 16S rRNA AD yöntemi genellikle YND dizileme teknolojilerinin sınırlandırmalarından dolayı 16S rRNA geninin değişken bir veya birkaç bölgesinin çoğaltılmasına dayanır. Laboratuvarlar 16S rRNA geninin hedef bölge seçimini literatürde yayınlanan veriler doğrultusunda ve kullandıkları YND teknolojisinin sınırlandırmalarını göz önünde bulundurularak belirlerler. Bakteriye topluluk çalışmalarımız için bu bölgelerden hedef bölge olarak literatürde en çok tercih edilen, veri bankalarında en çok dizisi bulunan ve Illumina platformuyla gerçekleştirilecek 2x300 bp çift-sonlu okuma için en uygun hedef bölge olan V3-V4 aşırı değişken bölgeleri seçilmiştir (25,26,27,28).

Bakteriyel topluluk analiz algoritmamızda biyoinformatik analizler için literatürde en çok tercih edilen analiz araçlarından olan QIIME 2 yazılımını ve en güncel veri bankası olan SILVA veri bankasını tercih ettik. Biyoinformatik analizlerde tercih edilen analiz araçlarının ve veri bankalarının birbirleri arasında çeşitli avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır ve bu durum analiz sonuçlarını doğrudan etkilemektedir. Bunun yanında bu araçları kullanan araştırmacıların analizlerdeki yöntem tercihleri de analiz sonuçlarında farklılıklara neden olmaktadır (29,30). Bununla birlikte 16S rRNA AD koşumu gerçekleştirilip ham veri elde edildikten sonra araştırmacı bu verileri istediği kadar araçla analiz edip istediği veri bankalarıyla kar-

şılaştırma şansına sahiptir. Biyoinformatik analizler deneysel aşamalar gibi geri dönüşümsüz değildir. Birden fazla analiz yöntemi kullanıp kullanmamak araştırmacının elindedir. Ancak bu şekilde bir çalışma için harcanan zaman ve emek yanında farklı veri bankalarından elde edilen verilerin karşılaştırılmaması, farklı analiz araçlarının verilerinin karşılaştırılma güçlüğü düşünüldüğünde tek bir analiz stratejisi üzerinde yoğunlaşmak daha doğru bir yaklaşım olacaktır.

Sonuç olarak 16S rRNA AD çalışması için yöntemleri belirledikten sonra laboratuvarımızda bu yöntemlerin optimizasyon çalışmalarını tamamladık. Ardından 16S rRNA AD çalışmasını başarıyla tamamladık ve bu çalışma doğrultusunda "İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Nutrisyon ve Mikrobiyota Araştırma Laboratuvarı Bakteriye Topluluk Analiz Algoritmasını" oluşturduk. Bu algoritmanın ülkemizdeki araştırmacılar için bir referans niteliğinde olacağını düşünmekteyiz. Ayrıca araştırmacılar bu algoritmayı çalışmalarında uyguladıkları takdirde elde ettikleri verilerle laboratuvarımızdaki veriler karşılaştırılabileceği için ülkemizde az sayıda gerçekleştirilen insan bağırsak mikrobiyota çalışmalarının ve elde edilen verilerin daha değerli hale gelmesine katkıda bulunmayı hedefliyoruz. Bununla birlikte oluşturduğumuz 'Bakteriyel Topluluk Analiz Algoritması' dünyada en çok kullanılan yöntemler göz önünde bulundurularak hazırlandığı için bu algoritmayı kullanan araştırmacılar verilerini literatürdeki pek çok çalışmayla da karşılaştırma imkanına sahip olacaktır. Ek olarak bu çalışmada, YND teknolojisi kullanılarak gerçekleştirilen 16S rRNA ampikon dizileme yönteminin temelleri ile literatürde en çok tercih edilen uygulama şekli ve veri analiz yöntemleri hakkında bilgi verilmektedir. Bu şekilde ülkemizde daha fazla araştırmacının bu konuya ilgi duymasını sağlayarak, bu konuda yapılacak çalışmaların artmasına da katkıda bulunmayı hedefliyoruz.

Hakem Değerlendirmesi:Dış bağımsız.

Peer Review:Externally peer-reviewed.

Etik Komite Onayı:Bu çalışma için etik komite onayı İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır (tarih 12.05.2017 ve no 09).

Ethics Committee Approval:This study was approved by the Istanbul Medical Faculty Clinical Research Ethics Committee. (date 12.05.2017 and number 09).

Bilgilendirilmiş Onam:Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Informed Consent:Written consent was obtained from the participants.

Yazar Katkıları:Çalışma Konsepti/Tasarım- D.S.K, B.S.;Veri Toplama- D.S.K, B.S.;Veri Analizi/Yorumlama- D.S.K, B.S.;Yazı Taslağı- D.S.K, B.S.;İçeriğin Eleştirel İncelemesi- B.S.;Son Onay ve Sorumluluk- D.S.K, B.S.

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

Çıkar Çatışması:Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir

Conflict of Interest:Authors declared no conflict of interest.

Finansal Destek:Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından desteklenmiştir. (Proje No:25863)

Financial Disclosure:This study was supported by Istanbul University Scientific Research Projects Unit (BAP). (Project No:25863)

KAYNAKLAR/REFERENCES

1. Glendinning L, Free A. Supra-organismal interactions in the human intestine. *Front Cell Infect Microbiol* 2014;4(47):1-4.
2. Kramer P, Bressan P. Humans as Superorganisms:How Microbes, Viruses, Imprinted Genes, and Other Selfish Entities Shape Our Behavior. *Perspect Psychol Sci* 2015;10(4):464-81.
3. D'Argenio V, Salvatore F. The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clin Chim Acta* 2015;451:97-102.
4. Conrad R, Vlassov AV. The Human Microbiota:Composition, Functions, and Therapeutic Potential. *Med Sci Rev* 2015;2:92-103.
5. Sankar SA, Lagier JC, Pontarotti P, Raoult D, Fournier P. E. The human gut microbiome, a

- taxonomic conundrum. *Syst Appl Microbiol* 2015;38(4):276-86.
- Mandal RS, Saha S, Das S. Metagenomic surveys of gut microbiota. *Genom Proteom Bioinform* 2015;13:148-58.
 - Carding S, Verbeke K, Vipond DT, Corfe, B. M, Owen LJ. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb Ecol Health Dis* 2015;26:26191.
 - Alkasir R, Li J, Li X, Jin M, Zhu B. Human gut microbiota:the links with dementia development. *Protein Cell* 2017;8:90-102.
 - Baothman OA, Zamzami MA, Taher I, Abubaker J, Abu-Farha M. The role of gut microbiota in the development of obesity and diabetes. *Lipids Health Dis* 2016;15:108.
 - Walker AW, Lawley TD. Therapeutic modulation of intestinal dysbiosis. *Pharmacol Res* 2013;69(1):75-86.
 - Almeida C, Oliveira R, Soares R, Barata, P. Influence of gut microbiota dysbiosis on brain function:a systematic review. *Porto Biomed J* 2020;5:2.
 - Pace NR. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 1997;276:734-40.
 - Santos A, Aerie RV, Barrientos L, Martinez-Urtaza J. Computational methods for 16S metabarcoding studies using Nanopore sequencing data. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 2020;18:296-305.
 - Malla MA, Dubey A, Kumar A, Yadav S, Hashem A, Abd_Allah EF. Exploring the Human Microbiome:The Potential Future Role of Next Generation Sequencing in Disease Diagnosis and Treatment. *Front Immunol* 2018;9:2868.
 - Nygaard AB, Tunsjø HS, Meisal R, Charnock C. A preliminary study on the potential of Nanopore MinION and Illumina MiSeq 16S rRNA gene sequencing to characterize building-dust microbiomes. *Scientific Reports* 2020;10:3209.
 - 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation. Part # 15044223 Rev. B. Available from:[https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_](https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf)documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf
 - Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplles J, Quast C, Horn M, Glöckner FO. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res* 2013;7:41(1).
 - Hang J, Desai V, Zavaljevski N, Yang Y, Lin X, Satya RV, et al. 16S rRNA gene pyrosequencing of reference and clinical samples and investigation of the temperature stability of microbiome profiles. *Microbiome* 2014;2:31.
 - Wesolowska-Andersen A, Bahl MI, Carvalho V, Kristiansen K, Sicheritz-Pontén T, Gupta R, Licht TR. Choice of bacterial DNA extraction method from fecal material influences community structure as evaluated by metagenomic analysis. *Microbiome* 2014;2:19.
 - Wu GD, Lewis JD, Hoffmann C, Chen Y, Knight R, Bittinger K. Sampling and pyrosequencing methods for characterizing bacterial communities in the human gut using 16S sequence tags. *BMC Microbiology* 2010;10:206.
 - Hart ML, Meyer A, Johnson PJ, Ericsson AC. Comparative Evaluation of DNA Extraction Methods from Feces of Multiple Host Species for Downstream Next-Generation Sequencing. *PLoS One* 2015;10:e0143334.
 - Smith B, Li N, Andersen A. S, Slotved H. C, Krogfelt K. A. Optimising Bacterial DNA Extraction from Faecal Samples:Comparison of Three Methods. *The Open Microbiology Journal*. 2011;5:14-7.
 - Kennedy NA, Walker AW, Berry SH, Duncan SH, Farquarson FM, Louis P, et al. The Impact of Different DNA Extraction Kits and Laboratories upon the Assessment of Human Gut Microbiota Composition by 16S rRNA Gene Sequencing. *PLoS One* 2014;9(2):e88982.
 - Gatew H, Tarekegn GM. Next-generation sequencing platforms for latest livestock reference genome assemblies. *Afr J Biotechnol* 2018;17(39):1232-40.
 - Sinclair L, Osman O. A, Bertilsson S, Eiler A. Microbial community composition and diversity

- via 16S rRNA gene amplicons: Evaluating the illumina platform. *PLoS One* 2015;10 (2):1-18.
26. Mizrahi-Man O, Davenport ER, Gilad Y. Taxonomic Classification of Bacterial 16S rRNA Genes Using Short Sequencing Reads: Evaluation of Effective Study Designs. *PLoS One* 2013;8(1):18–23.
27. Petrosino JF, Highlander S, Luna RA, Gibbs RA, Versalovic J. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clin Chem* 2009;55(5):856–66.
28. García-López R, Cornejo-Granados F, Lopez-Zavala AA, Sánchez-López F, Cota-Huizar A, Sotelo-Mundo RR, et al. Doing More with Less: A Comparison of 16S Hypervariable Regions in Search of Defining the Shrimp Microbiota. *Microorganisms* 2020;8:134.
29. Marizzoni M, Gurry T, Provasi S, Greub G, Lopizzo N, Ribaldi F. Comparison of Bioinformatics Pipelines and Operating Systems for the Analyses of 16S rRNA Gene Amplicon Sequences in Human Fecal Samples. *Frontiers in Microbiology* 2020;11:1262.
30. López-García A, Pineda-Quiroga C, Atxaerandio R, Pérez A, Hernández I, García-Rodríguez A, González-Recio O. Comparison of Mothur and QIIME for the Analysis of Rumen Microbiota Composition Based on 16S rRNA Amplicon Sequences. *Frontiers in Microbiology* 2018;9:3010.

The Relationship Between the BCL1 Variant of the Glucocorticoid Receptor Gene and Non-Syndromic Microtia

Sendromik Olmayan Microtia ve Glucocorticoid Receptor Genindeki BCL1 Variantının İlişkisi

Ayşe Feyda Nursal¹ , Kürşat Özdiilli² , Mehmet Bekerecioğlu³ , Berker Büyükgürül⁴ ,
Sacide Pehlivan⁵ 

¹ Hitit University, Faculty of Medicine,
Department of Medical Genetics,
Çorum, Turkey

² Medipol University, Faculty of Medicine,
Department of Medical Biology,
Istanbul, Turkey

³ Kahramanmaraş Sütçü İmam University,
Faculty of Medicine, Department of Plastic,
Reconstructive & Aesthetic Surgery,
Kahramanmaraş, Turkey

⁴ Private Clinic for Plastic, Reconstructive &
Aesthetic Surgery, Istanbul, Turkey

⁵ Istanbul University, Istanbul Faculty of
Medicine, Department of Medical Biology,
Istanbul, Turkey

ORCID: A.F.N. 0000-0001-7639-1122;
K.Ö. 0000-0002-7129-5024;
B.B. 0000-0002-2422-7272;
B.B. 0000-0002-3308-8614;
S.P. 0000-0003-1272-5845

Corresponding author/Sorumlu yazar:

Sacide Pehlivan
Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine,
Department of Medical Biology, Istanbul, Turkey
E-mail: sacide.pehlivan@istanbul.edu.tr,
psacide@hotmail.com

Submitted/Geliş tarihi: 27.08.2020

Accepted/Kabul Tarihi: 14.10.2020

Citation/Atf: Nursal AF, Ozdiilli K, Bekerecioğlu M, Buyukgural B, Pehlivan S. The relationship between the BCL1 variant of the glucocorticoid receptor gene and non-syndromic microtia. Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi 2020; 3(3): 168-172.
<https://doi.org/10.26650/JARHS2020-786359>

ABSTRACT

Objective: Microtia is defined as a congenitally defective external ear which has different degrees of severity from a simple isolated reduced size to complete loss of the ear. Normal fetal development is affected by the Glucocorticoids (GCs), which are critical for the maturation and development of different fetal tissues. The glucocorticoid receptors (GR) influence the GCs' actions. Therefore, we aimed to evaluate the association between the NR3C1 (encoding GR) gene BCL1 variant and its role in the development of non-syndromic microtia.

Materials and Methods: Nineteen cases with microtia and forty healthy controls enrolled in the present study. We genotyped the NR3C1 BCL1 variant using the polymerase chain reaction (PCR) and PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) method. The patients and controls were compared in terms of allele and genotype distribution using the χ^2 test.

Results: No statistical association was found between the NR3C1 BCL1 genotype distribution and microtia risk. However, the NR3C1 BCL1 variant G allele was lower in patients than in the healthy controls ($p=0.034$, OR:2.411, 95%CI: 1.115-5.212). In the current study, our results suggested that the subjects carrying the G allele in the NR3C1 gene BCL1 variant had a lower risk of microtia.

Conclusion: Further studies are needed to determine whether this gene variant has a role in the risk of developing the disorder.

Keywords: Microtia, DNA, glucocorticoid receptor, BCL1, variant

ÖZ

Amaç: Microtia, basit izole küçük boyuttan tamamen kulak kaybına kadar farklı şiddet derecelerine sahip, kongenital kusurlu bir dış kulak olarak tanımlanır. Normal fetal gelişim, farklı fetal dokuların olgunlaşması ve gelişimi için kritik olan Glukokortikoidlerden (GK) etkilenir. Glukokortikoid reseptörleri (GR), GC'lerin fonksiyonlarını etkiler. Bu nedenle NR3C1 gen (GR kodlayan) BCL1 varyantı ile sendromik olmayan mikrotia gelişmesindeki rolü arasındaki ilişkiyi değerlendirmeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmaya ondokuz mikrotia olgusu ve kırk sağlıklı kontrol dahil edildi. NR3C1 BCL1 varyantı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve sınırlayıcı parça uzunluk poliorfizmi (RFLP) yöntemini kullanarak genotipleedik. Hastalar ve kontroller χ^2 testi kullanılarak alel ve genotip dağılımı açısından karşılaştırıldı.

Bulgular: NR3C1 BCL1 genotip dağılımı ve mikrotia arasında istatistiksel bir ilişki bulunmadı. Bununla birlikte, NR3C1 BCL1 varyant G aleli hastalarda sağlıklı kontrollere göre daha düşüktü ($p=0.034$, OR:2.411, 95%CI: 1.115-5.212). Bu çalışmada, sonuçlarımız NR3C1 gen BCL1 varyantı G aleli taşıyan kişilerin daha düşük bir mikrotia riskine sahip olduğunu gösterdi.

Sonuç: Bu gen varyantının, bozukluk riskinin gelişmesinde bir rolü olup olmadığını belirlemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Microtia, DNA, glukokortikoid reseptör, BCL1, varyant

INTRODUCTION

Microtia is a congenitally defective external ear which has different degrees of severity from a single isolated reduced size to complete loss of the ear (1). In microtia, there are disorganized remnants of cartilage that are attached to a varying amount of lobule tissue, which is often moved from a symmetrical position with the contralateral ear (1). The reason for microtia is part of a spectrum of a syndrome or anomalies or an isolated condition. According to the population-based studies which were conducted on microtia prevalence in France, Sweden, Italy, United States, and Finland, it was shown that prevalence rates ranged from 0.83 to 4.34 for every 10,000 births (2). There are different genetic causes for microtia in both humans and animal models, helping us understand the condition and leading to the identification of a common cause for the condition.

Stress responses are mediated by Glucocorticoids (GCs), which are the steroid hormones produced mainly by the adrenal glands. Pharmacological GC excess plays a more nuanced role in the biology of the response to stress. It has balanced homeostatic effects facilitating short-time recovery and survival from the challenge while their chronic and acute effects are recognized well (3). GCs are also effective in the development of normal fetuses leading to the maturation and development of different fetal tissues such as the gut, skeletal muscle, adipous tissue, the liver, and lungs and preparedness for extrauterine life (4). The nuclear receptor protein, known as glucocorticoid receptors (GR), is due to the actions of GCs. The *NR3C1* (nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1) gene, which is located on chromosome 5, is used to encode GRs. There are three domains for the structure of this gene: DNA-binding domain, carboxy-terminal ligand binding, and amino transactivation domain. When the form of the GR is unliganded, it is located in the cytoplasm as large complex protein, and its binding to cortisol causes its dissociation and a conformational change, translocating the GR receptor to the nucleus in which it regulates the transcription of GR gene as a transcription factor through several mechanisms (5). There was a biallelic polymorphism identifiable

downstream of the exon 2–intron 2 junction *NR3C1* gene. The processing of GCR primary transcripts might be affected by the polymorphism, increasing the sensitivity of GC (6).

Therefore, we performed a case-control analysis of the association between the *NR3C1* BCL1 variant and non-syndromic microtia.

MATERIAL AND METHODS

Study Population

The study group consisted of 19 subjects with microtia and 40 unrelated healthy control subjects. The subjects with microtia were recruited from those who were treated and followed-up in the Plastic, Reconstructive, and Aesthetic Surgery Department, Kahraman Sutcu Imam University, Kahramanmaraş, Turkey. Syndromic patients were excluded from the study. The healthy control group was recruited from the patients living in the same geographical areas, and they were well-matched with the patient group in terms of gender and age. The controls had no personal or family history of dysmorphic disorders. All subjects, patients, and controls were of Turkish origin. Informed written consent was obtained from all patients and subjects before enrollment to the study, according to the ethical guidelines of the 2008 Declaration of Helsinki. Ethical approval was obtained from the Local Human Research Ethics Committee.

Genotyping

Blood samples were obtained from all subjects. Genomic DNA was extracted from mononuclear cells obtained from ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)- treated peripheral venous blood using the salting-out method (7). The distribution of the *NR3C1* BCL1 variant in the intron 2 was evaluated in the non-syndromic microtia patients and healthy controls by using the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method as described previously (8).

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the software SPSS version 20.0 for Windows (SPSS Inc., Chi-

ago, IL, USA). The statistical significance of the differences among the groups was estimated using logistic regression analysis. Odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) were also calculated. Differences in the genotype distribution between the two groups were compared with the chi-square test and, when needed, Fisher's exact test was used. The level of significance was set at $p \leq 0.05$.

RESULTS

Genotype distributions and allele frequencies of the NR3C1 BCL1 variant are presented in Table 1. There was no significant difference between the patients and controls in terms of the genotype distribution of the NR3C1 BCL1 variant ($p > 0.05$). The NR3C1 BCL1 variant G allele was lower in patients compared to healthy controls ($p = 0.034$, OR:2.411, 95%CI: 1.115-5.212). The genotype distribution of the NR3C1 BCL1 variant in the patients and controls was compatible with HWE.

DISCUSSION

Microtia may be exhibited alone, or alongside other abnormalities, mainly occurring in bilateral cases. Eyelid defects, renal abnormalities, cardiac defects, facial asymmetry, oral clefts, vertebral deformities, and polydactyly are among the most common associated malformations (9). Despite the causes of microtia and the related syndromes being poorly understood, there is strong evidence that shows that environmental and genetic components are effective. There have been different familial cases with Mendelian modes of inheritance (9). Several studies on animal models suggest that microtia is caused by

particular genetic pathways. Microtia is caused by the mouse models, which demonstrate that mutations in eyes have absent (EYA), IRF6, TBX1, and CHUK and specific genes HOXA2, SIX (10).

The placenta is a source of gas exchange, excretion, fetal nutrients, water, and immune regulation. Growth factors, simultaneous production of several hormones related to pregnancy, proteins, and also an array of neuropeptide hormones, analogous to those which are produced by the pituitary of the brain, and hypothalamus including, CRH, TRH, GHRH, GnRH, and oxytocin cause these effects (11). GCs as the steroid hormones are secreted from the adrenal glands, which are necessary for maintaining the stress-related and basal homeostasis as the end products of the stress-responsive HPA axis (12). There are several physiological processes in which they are involved, including electrolyte and water balance, growth, the immune response, cardiovascular function, cognitive and mood functions, metabolism, reproduction, and development (12). Actions of GCs at the cellular level are mediated by the NR3C1 which is an intracellular receptor protein belonging to the orphan/sterol/ thyroid/ receptor/ steroidretinoid superfamily of nuclear transactivating factors which generally have more than 200 members and more than 40 members in mammals which are presently characterized and cloned among the species (13). According to Bromer et al., neurodevelopment with a lifelong effect on mental health and neurobehavioral outcomes is affected by epigenetic alteration of the NR3C1 gene in the placentas of infants, which are genetically susceptible (11). There are several polymorphic sites in the NR3C1 gene. Intron 2 of the NR3C1 gene is the place where the polymorphism BCL1 (rs41423247) is

Table 1. Genotype and allele distribution of NR3C1 BCL1 variant

| NR3C1 BCL1 | Patients | Controls | OR Exp (B) | 95% CI | p |
|------------|-----------|------------|--------------------|--------------------------|--------------------|
| Genotypes | n= 18 (%) | n=70 (%) | | | |
| GG | 4 (22.2) | 4 (5.7) | 4.714* | 1.051-21.151* | 0.052* |
| GC | 7 (38.9) | 24 (34.3) | 1.220* | 0.419-3.550* | 0.785* |
| CC | 7 (38.9) | 42 (60) | 0.424 [§] | 0.147-1.126 [§] | 0.120 [§] |
| Alleles | | | | | |
| G | 15 (58.3) | 32 (77.1) | 2.411 [§] | 1.115-5.212 [§] | 0.034 [§] |
| C | 21 (76.7) | 108 (80.8) | | | |
| HWE | 0.396 | 0.816 | | | |

[§]Fisher's Exact Test.

located. It is localized in its transcript at position 1184+646. Exons 2 and 3 of the *NR3C1* gene are the places where intron 2 (B) is situated. The result is the substitution of C>G in the promoter region. The BCL1 variant is located at 646 nucleotides, which are above exon 2 of the *NR3C1* gene, which is correlated with the enhanced sensitivity of glucocorticoid and higher levels of cortisol (6). It has been observed that BCL1 high-function (G) allele carriers show a reduction of cortisol responses after the psychosocial stressors (14). The single-nucleotide polymorphism (SNP) directly affects the *NR3C1* gene expression as the mechanism for the *NR3C1* BCL1 variant, which enhances the sensitivity of GCs ' negative feedback mechanism. The polymorphism may be in linkage disequilibrium, altering the transcriptional activity of target genes involved in the homeostasis of insulin and glucose (15). It was reported that the *NR3C1* BCL1 variant was associated with increased abdominal fat mass, and low bone mineral density (16,17).

In this study, we investigated the association between the *NR3C1* BCL1 variant and microtia risk. To our knowledge, this is the first study to evaluate the *NR3C1* BCL1 variant in Turkish patients with microtia. We found no association between the patients and controls in our samples in terms of the genotype distribution of *NRC3C1* BCL1. However, the subjects carrying the G allele in the *NR3C1* gene BCL1 variant had a lower risk of microtia. Our study had some limitations. One limitation was the relatively small sample size. Another limitation was that we tested only the BCL1 variant for the *NR3C1* gene.

CONCLUSION

In conclusion, this case-control study revealed no statistically significant association between the *NR3C1* BCL1 variant and microtia in a Turkish cohort. However, the *NR3C1* BCL1 variant G allele may have a protective role against microtia. Further studies are needed to determine whether this gene variant is effective in the development of the risk of disorder.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı Yerel İnsan Araştırmaları Etik Kurulu'ndan alınmıştır.

Ethics Committee Approval: This study was approved by the Local Human Research Ethics Committee.

Bilgilendirilmiş Onam: Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Informed Consent: Written consent was obtained from the participants.

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

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

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

Financial Disclosure: Authors declared no financial support.

REFERENCES

1. Alasti F, Van Camp G. Genetics of Microtia and Associated Syndromes. *J Med Genet.* 2009;46(6): 361-69 .
2. Luquetti DV, Heike CL, Hing AV, Cunningham ML, Cox TC. Microtia: *Epidemiology & Genetics.* *Am J Med Genet A.* 2012;158A(1): 124-39.
3. McEwen BS. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev.* 2007;87(3):873-904.
4. Korgun ET, Ozmen A, Unek G, Mendilcioglu I. The Effects of Glucocorticoids on Fetal

- and Placental Development. X Qian (Ed.), Glucocorticoids – New Recognition of Our Familiar Friend, InTech, Croatia 2012; 305-36.
5. El-Fayoumi R, Hagraas M, Abozenadaha A, Bawazir W, Shinawi T. Association Between NR3C1 Gene Polymorphisms and Toxicity Induced by Glucocorticoids Therapy in Saudi Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018; 19(5): 1415-23.
 6. Fleury I, Beaulieu P, Primeau M, Labuda D, Sinnott D, Krajinovic M. Characterization of the BclI polymorphism in the glucocorticoid receptor gene. *Clin Chem*. 2003;49:1528-31.
 7. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16:1215.
 8. Aydeniz A, Sever T, Pehlivan S, Pehlivan M, Altındag O, Budeyri S, Gursoy S. Investigation of Glucocorticoid Receptor Gene Bcl-1 Polymorphism in Rheumatoid Arthritis. *Turk J Rheumatol* 2011;26(3):199-203.
 9. Ruimin Qiao, Yuyong He, Bo Pan, Shijun Xiao, Xufei Zhang, Jing Li, Zhiyan Zhang, Yuan Hong, Understanding the molecular mechanisms of human microtia via a pig model of HOXA1 syndrom. *Disease Models & Mechanisms* 2015;8:611-22.
 10. Gendron C, Schwentker A, van Aalst JA. Genetic Advances in the Understanding of Microtia. *J Pediatr Genet*. 2016; 5(4):189-97.
 11. Bromer C, Marsit CJ, Armstrong DA, Padbury JF, Lester B. Genetic and epigenetic variation of the glucocorticoid receptor (NR3C1) in placenta and infant neurobehavior. *Developmental Psychobiology* 2013;55(7):673-83.
 12. Timmermans S, Souffriau J, Libert C. A General Introduction to Glucocorticoid Biology. *Front Immunol*. 2019;10:1545.
 13. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. 1995; 83:835-39.
 14. Wust S, Federenko IS, van Rossum EF, Koper JW, Kumsta R, Entringer S, Hellhammer DH. A psychobiological perspective on genetic determinants of hypothalamus-pituitary-adrenal axis activity. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1032:52-62.
 15. Srivastava N, Prakash J, Lakhan R, Agarwal CG, Pant DC, Mittal B. Influence of Bcl-1 Gene Polymorphism of Glucocorticoid Receptor Gene (NR3C1, rs41423247) on Blood Pressure, Glucose in Northern Indians. *Indian J Clin Biochem*. 2011;26(2):125-30.
 16. van Rossum EF, Koper JW, van den Beld AW, Uitterlinden AG, Arp P, Ester W, et al. Identification of the BclI polymorphism in the glucocorticoid receptor gene: association with sensitivity to glucocorticoids in vivo and body mass index. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003;59(5):585-92.
 17. Szappanos A, Patócs A, Töke J, Boyle B, Sereg M, Majnik J, Borgulya G, Varga I, Likó I, Rác K, Tóth M. BclI polymorphism of the glucocorticoid receptor gene is associated with decreased bone mineral density in patients with endogenous hypercortisolism. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009;71(5):636-43.

Statik Manyetik Alanın Trombosit Agregasyonuna Etkisi*

The Effect of Static Magnetic Field on Platelet Aggregation

Çiğdem Bayram Gürel¹ , Gülsel Ayaz¹ , Handan Tuncel² , Tunaya Kalkan³ ,
Nazmiye Kurşun⁴ , Turgut Ulutin¹ 

ÖZ

Amaç: Trombositler, salgıladıkları maddeler ve membran proteinleri ile birlikte koagülasyon ve inflamasyonda önemli rol oynayan 4-7 Mikron çapında kan hücreleridir. Manyetik alanın günümüzde, canlılara ve kan hücrelerine etkilerini araştırarak birçok çalışma olmakla birlikte henüz etki mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Özellikle düşük sabit manyetik alanın lökositleri aktive ettiği ve sayılarını arttırdığı tespit edilmiştir fakat trombositler üzerindeki etkileri ile ilgili tartışılabilir veriler mevcuttur. Bu çalışmada sabit manyetik alanın trombosit fonksiyonları üzerindeki etkilerini incelemeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Trombositler farklı şiddetlerdeki (2mT, 5mT, 40mT) manyetik alana, farklı sürelerde (5, 15 ve 30 dakika) maruz bırakıldı ve trombosit agregasyonları farklı zaman aralıklarında (0, 24, 40, 48 saat) agregometre kullanılarak tespit edildi. ADP uyarımı kullanılarak trombosit agregasyonu eğim ve % amplitüd olarak belirlendi.

Bulgular: 5mT'da 15dk ve 30dk inkübasyondan sonra 24. saatteki trombosit agregasyonları, kontrole göre daha yüksek bulundu (eğim p=0,008, amplitüd p=0,026). 15 ve 30 dakika arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. 2mT'da 15 ve 30 dakika inkübasyondan sonra 48. saatteki agregasyonları kontrole göre anlamlı olarak yüksek bulundu (p=0,038). 2mT'daki trombosit agregasyonu, 5mT'daki trombosit agregasyonundan istatistiksel olarak daha yüksek bulundu (p=0,032).

Sonuç: Manyetik alana maruz kalan trombositlerde agregasyon artışı olduğu tespit edildi. 2mT'lık statik manyetik alan maruziyetinin 48 saat sonra bile trombosit agregasyonu yanıtını olumlu etkilemesi, bu etkinin trombositlerin vücut dışında daha uzun süre aktivitelerini korumalarını sağlayacağını düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Statik manyetik alan, trombosit agregasyonu, ADP

ABSTRACT

Objective: Platelets are 4-7 Micron diameter blood cells that play an important role in coagulation and inflammation with the substances they secrete and the membrane proteins. Although there are many studies investigating the effect of a magnetic field on living organisms and blood cells, its mechanism has not been clarified yet. It has been demonstrated that the low-intensity magnetic field activates the leukocytes and increases their number, but there are controversial data regarding its effect on platelets. In this study, we aimed to examine the effects of a magnetic field on platelet functions.

Materials and Methods: Platelets were exposed to different intensities of magnetic field (2mT, 5mT, 40mT) at different times (5, 15 and 30 minutes) and the aggregation of platelets was detected at different time intervals (0, 24, 40, 48 hours) using the aggregometer. The platelet aggregation curve was determined as slope and amplitude (%).

Results: After a 15' and 30' incubation at 5mT, platelet aggregation at the 24th hour was found to be higher than the control (Slope p=0.008, Amplitude p=0.026). There was no statistical difference between 15 and 30 minutes. The 48th hour aggregation was found to be significantly higher than the control after a 15' and 30' incubation at 2mT (p=0.038). Platelet aggregation at 2mT was higher than platelet aggregation at 5mT (p=0.032).

Conclusion: It was determined that there was an increase in aggregation of platelets exposed to a magnetic field. The fact that 2mT static magnetic field exposure positively affects the platelet aggregation even after 48 hours, suggests that this effect will enable the platelets to maintain their activities outside of the body for a longer time.

Key words: Static magnetic field, platelet aggregation, ADP

* Bu çalışma daha önce 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (ICHC) "From Molecules to Diseases" 10.5505/2017ichc.PP-70 [Structure and function of the cell] May 18 - 21, 2017. Antalya/Türkiye'de poster olarak sunulmuştur.

¹ İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

² İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

³ İstanbul Aydın Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

⁴ Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ORCID: Ç.B.G. 0000-0001-9407-7735;
G.A. 0000-0003-3085-232X;
H.T. 0000-0002-1926-9566;
M.T.K. 0000-0001-9783-8835;
N.K. 0000-0001-7424-9835;
T.U. 0000-0002-0406-1746

Corresponding author/Sorumlu yazar:

Çiğdem Bayram Gürel,
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa, Cerrahpaşa
Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı,
İstanbul, Türkiye
E-mail: bayram@istanbul.edu.tr;
cigdembayramgurel@gmail.com

Submitted/Başvuru: 18.09.2020

Accepted/Kabul: 12.10.2020

Citation/Atf: Bayram Gürel C, Ayaz G, Tuncel H, Kalkan T, Kursun N, Ulutin T. The Effect of Static Magnetic Field on Platelet Aggregation. Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi 2020; 3(3): 173-178.
<https://doi.org/10.26650/JARHS2020-796725>

GİRİŞ

Trombositler; çok işlevli, karmaşık, çekirdeksiz hücrelerdir ve salgıladıkları ajanlar ve membran glikoproteinleri sayesinde hemostazda, trombozda ve inflamasyonda rol oynarlar. Vasküler endotel yüzeyinde hasar oluştuğunda, trombositler subendotelial matrikste bulunan; kolajen, fibronektin, von Willebrand Faktör (vWF), trombospondin-1, lamininler, mikrofibriller ve fibrinojen gibi matriks bileşenlerine bağlanırlar. Bu bağlanmayı trombosit membranında integrin ailesinin üyelerinden olan, glikoprotein (Gp) Ia/IIa ve Gp VI aracılığı ile gerçekleştirirler. Aktive olan trombositler şekil değiştirerek yapışkan özellikte olan vWF ile daha sağlam bir tıkaç oluştururlar. vWF trombosit yüzey reseptörü olan Gp Ib/IX ile kolajen lifleri arasında bir köprü görevi görür (1,2). Böylece hasar bölgesine trombosit adezyonu olur. Trombosit adezyonundan saniyeler sonra şekil değişikliği gösteren trombositler ince uzun psödopodlar oluştururlar. Trombositler içindeki mikrofibrillerin kasılması sonucunda trombositlerdeki granüller hücre yüzeyine göç eder ve hücre dışına salgılanır. Salgılanan bu maddeler; adenozin difosfat (ADP), trombospodin, vWF, fibronektin, fibrinojen, heparinaz, tromboksan A₂ (TXA₂) ve faktör Va'dır. Adezyondan sonra gerçekleşen bu aşama sekresyon aşamasıdır. Sekresyon aşamasında; trombositlerin yüzeyi ile bağlantılı kanaliküler sistem ve tubuler sistem rol oynar. Bu aşamadan sonra ise üçüncü aşama; agregasyon aşamasıdır. ADP ve TXA₂; hasar bölgesinde trombosit agregasyonunu uyaran maddelerdir. Trombosit membranındaki GpIIb/IIIa aktive olarak fibrinojene bağlanır ve trombosit agregasyonu gerçekleşir. Sonuç, hasar yerinde bir trombosit tıkaçıdır. Trombositlerin aktivasyonu, yüzeylerindeki fosfolipidlerde değişikliklere yol açar. Bu fosfolipidler ayrıca bazı pıhtılaşma faktörlerini aktive ederek trombosit prokoagulanını da aktive eder. Trombositlerin herhangi bir fonksiyonundaki kusur, birincil hemostatik tıkaçın bozulması nedeniyle kanamaya neden olur. Trombosit disfonksiyonu kalıtsal veya edinilmiş olabilir. Kalıtsal bozukluklar nadir olmakla birlikte, kazanılmış olanlarla sık karşılaşılır (3,4,5).

İnsan yapımı statik manyetik alanlar (SMA), beynin ve diğer yumuşak dokuların üç boyutlu gö-

rüntülerini sağlayan manyetik rezonans görüntüleme (MR) gibi tıbbi uygulamalarda kullanılmaktadır. Taranan hastalar ve makine operatörleri bu nedenle çok yüksek mukavemetli SMA' a maruz kalabilirler. Yüksek mukavemetli SMA' a maruz kaldıktan sonraki biyolojik tepki, son zamanlarda, olası sağlık yararlarının yanı sıra potansiyel yan etkiler açısından da geniş ölçüde tartışılmaktadır. Şu anda, araştırma uygulamalarında daha yüksek çözünürlüklü görüntüleme elde etmek için tüm vücut taramasında 9,4 T'ye kadar güçlü SMA kullanılmaktadır (6). Yüksek mukavemetli SMA'nın neden olduğu biyolojik etkiler araştırılmaktadır ve bu tür maruziyet ile ilgili hala önemli güvenlik sorunları vardır. Hastanın MA'a maruz kalmasına ilişkin yönergeler; ABD Gıda ve İlaç Yönetimi, Uluslararası Elektroteknik Komisyonu, Ulusal Radyolojik Koruma Kurulu ve İyonlaştırıcı Olmayan Radyasyondan Korunma Uluslararası Komisyonu gibi çeşitli dünya örgütleri tarafından verilmektedir (6).

Yüksek mukavemetli SMA'nın yanı sıra düşük SMA'nın da hücreler üzerindeki etkilerini araştıran çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda düşük sabit manyetik alanın lökositleri aktive ettiği ve sayılarını arttırdığı gösterilmiştir. Ancak düşük SMA'nın trombositlere etkisinin hangi yönde olduğu ile ilgili veriler tartışmalıdır (7,8). Biz bu çalışmada sabit manyetik alanın trombosit fonksiyonları üzerindeki etkilerini incelemeyi amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Gönüllü sağlıklı kişilerden 09:00-11:00 saatleri arasında kan örnekleri alındı. %3,2'lik sitratlı vakumlu tüplere alınan kanlar önce 300G'de oda sıcaklığında 20dk santrifüj edildi. Tüpün en üst kısmında kalan trombosit zengin plazma (TZP) toplanarak plastik bir tüpün içerisine aktarıldı. Elde edilen TZP farklı şiddetlerde (40mT, 5mT, 2mT) statik manyetik alana, farklı sürelerde (5dk, 15dk ve 30dk) maruz bırakıldı. Manyetik alan maruziyetinden sonra farklı zaman aralıklarında (0. saat, 24. saat, 40. saat ve 48. saat) trombosit agregasyonları ölçüldü. Trombosit agregasyon testi agregometre cihazı (Chrono-Log 500-CA, 500CA Whole Blood

Lumi Aggregometer, CHRONO-LOG CORP., Havertown, PA, USA) ile gerçekleştirildi. Bunun için; 500 µL TZP agregometre cihazında 37C°de 3dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında trombosit agregasyonunun tetiklenmesi için TZP içine son konsantrasyon 1 µM olacak şekilde ADP (CHRONO-LOG CORP., Havertown, PA, USA) eklendi. 3dk boyunca agregasyon kurbanunun oluşması beklendi ve trombositlerin agregasyon hızları ölçüldü. Oluşan agregasyon kurbu eğim (ohm Ω) ve % amplitüd olarak hesaplandı (9,10,11).

İstatistiksel analiz: Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi SPSS 11.0 kullanılarak yapıldı. Gruplar arası kıyaslamalar için Friedman Testi kullanıldı ve istatistiksel anlamlılık düzeyi p<0,05 olarak kabul edildi.

BULGULAR

Farklı sürelerde ve farklı şiddetlerde statik sabit manyetik alana maruz kalan trombositler şöyle yanıt vermiştir: 5mT manyetik alana 15dk ve 30dk maruziyetten sonra, 24. saatteki agregasyon, kontrole göre istatistiksel olarak daha yüksek bulundu (Aplitud p=0,026, Eğim p=0,008, Tablo 1). 15dk ve 30dk inkübasyon arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. 2mT manyetik alana 15dk ve 30dk maruziyetten sonra 48. saatte ölçülen trombosit agregasyonu kontrole göre istatistiksel olarak daha yüksek bulundu (p=0,038, Tablo 2). 15dk ve 30dk inkübasyon arasında ise istatistiksel olarak anlamlı

bir fark tespit edilmedi. 30 dakika süre ile 2mT ve 5mT manyetik alana maruz kalan trombositlerin 48. saatte yapılan agregasyon ölçümleri karşılaştırıldığında, 2mT'deki agregasyonun 5mT'dekinden istatistiksel olarak daha yüksek olduğu saptandı (p<0,05, Tablo 3). 40mT'ya maruz bırakılmış trombositlerin agregasyonunda herhangi bir değişiklik tespit edilmedi (p>0,05, Tablo 3).

TARTIŞMA

Trombosit agregasyon testi, trombosit fonksiyonlarını tespit edebilmek açısından altın standart olarak kritik bir yere sahiptir (9, 11). Diğer kan hücreleri gibi trombositler de dış etkenlerden, oksidan ve iyonojen ajanlardan (manyetik alan) etkilenirler. Teknolojinin günlük hayatımıza fazlaca girmesi ile manyetik alanların hücrelere olan etkisi gittikçe artmıştır. Tıp ve biyoloji alanında manyetik alanın etkilerinin neler olduğu konusunda yapılmış birçok çalışma olmakla birlikte kan hücreleri üzerine nasıl etki ettiği henüz tam olarak açıklanamamıştır. Sağdilek E. ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 1mT ve 5mT SMA'da 1 saat maruziyet sonrasında trombosit agregasyonunun etkilenmediği bildirilmiştir (12). Bir başka çalışmada ise 6mT statik manyetik alana maruz bırakılan hücrelerin manyetik alandan etkilendiği gösterilmiştir. Özellikle, statik manyetik alanın hem apoptozu hem de mitozu etkilediği belirtil-

Tablo 1. 5mT şiddetinde sabit manyetik alana maruz kalan trombositlerin agregasyon değişimleri

| 5mT şiddette | Kontrol | | 15 dakika maruziyet | | 30 dakika maruziyet | | p* |
|---|------------|-------------------|---------------------|-------------------|---------------------|-------------------|-------|
| | Ort±SS | Medyan (Min-maks) | Ort±SS | Medyan (Min-maks) | Ort±SS | Medyan (Min-maks) | |
| 24 saat sonra trombosit agregasyon ölçümü | | | | | | | |
| % Amplitüd (n=7) | 7,28±7,20 | 9 (0-16) | 14,71±11,37 | 14 (0-32) | 16,57±9,47 | 14 (6-35) | 0,026 |
| Ω Eğim (n=7) | 13,0±1,2,5 | 19 (0-28) | 26,14±18,14 | 25 (0-50) | 28,29±9,46 | 30 (10-39) | 0,008 |

Ort; Ortalama, SS: Standart Sapma, Min; Minimum, Maks; Maksimum, *Friedman Testi

Tablo 2. 2mT şiddetinde sabit manyetik alana maruz kalan trombositlerin agregasyon değişimleri

| 2mT şiddette | Kontrol | | 15 dakika maruziyet | | 30 dakika maruziyet | | p* |
|---|-----------|-------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|-------|
| | Ort±SS | Medyan (Min-maks) | Ort±SS | Medyan (Min- maks) | Ort±SS | Medyan (Min- maks) | |
| 48 saat sonra trombosit agregasyon ölçümü | | | | | | | |
| % Amplitüd (n=5) | 5,6±7,67 | 0 (0-14) | 9,8±12,26 | 9 (0-30) | 13,20±11,28 | 15 (0-29) | 0,127 |
| Ω Eğim (n=5) | 9,0±12,57 | 0 (0-26) | 16,20±21,28 | 14 (0-52) | 25,20±19,68 | 27 (0-53) | 0,038 |

Ort; Ortalama, SS: Standart Sapma, Min; Minimum, Maks; Maksimum, *Friedman Testi

Tablo 3. 2mT, 5mT ve 40mT sabit manyetik alana 30 dakika süre ile maruz kalan trombositlerin 48 saat sonrasında ölçülen agregasyon değişimleri

| İnkübasyon durumu 30 dk maruziyet | 48 saat sonra trombosit agregasyon ölçümü | |
|--------------------------------------|---|---------------------------|
| | % Amplitüd (n=5) Ort±SS | Ω Eğim (n=5) Ort±SS |
| Kontrol | 5,60±7,67 | 9,0±12,57 |
| 2mT | 13,20±11,28* | 25,2±19,68 |
| 5mT | 2,80±6,26* | 5,6±12,52 |
| 40mT | 12,6±12,99 | 21,6±21,68 |

Ort; Ortalama, SS:Standart Sapma, *Friedman Testi p<0,05

miştir. Apoptozun artışının veya azalışının hücre tipine ve SMA'nın maruziyet süresine bağlı olduğu belirtilen çalışmada bu etkinin hücre içi Ca^{+2} iyon konsantrasyonu üzerinden olabileceği vurgulanmıştır. Hücre içerisinde Ca^{+2} iyon konsantrasyonunun artmasının hücre sinyal mekanizmalarını etkileyerek apoptozu tetikleyen mekanizmalar arasında yer aldığı belirtilmiştir (13). Plazma membranı; biyoelektrik özellikleri nedeniyle, hücre içi ve hücre dışı farklı iyon konsantrasyonlarına sahiptir. Bu özellik hücrenin polarizasyon ve depolarizasyon mekanizmasının temelini oluşturur. Plazma membranının sahip olduğu biyoelektrik yük, manyetik alanın etkisini gösterdiği ilk yerdir. Bu nedenle, plazma membranının yapısal ve biyofiziksel değişiklikleri, reseptör bağlanması veya aktivasyonunu etkileyerek genel olarak hücre fonksiyonunu etkileyecektir. Özellikle, statik manyetik alanların çeşitli deneysel modellerde organizmanın hücre içine Ca^{+2} salınımını değiştirdiği öne sürülmüştür. Ancak bu etkinin hücre tiplerine göre artış ya da azalış olarak farklılık gösterdiği de belirtilerek hücrenin manyetik alana olan cevabının sadece bu mekanizma ile açıklanamayacağı bildirilmiştir (13,14,15,16).

Çalışmamızı trombositlerin aktivitesini belirleyen testlerden biri olan, membran glikoproteinleri üzerinden gerçekleşen agregasyon testi ile gerçekleştirdik. Trombosit agregasyonu üzerine etkili manyetik alan şiddetinin 2mT olduğunu tespit ettik. Bu etki 5mT'da da istatistiksel olarak anlamlı fark yaratmasına rağmen 2mT kadar güçlü değildi. 2mT'nın trombosit agregasyonuna etkisi

sadece 15 ve 30 dakikalık kısa süreli maruziyette bile ortaya çıkabiliyordu.

SONUÇ

Çalışmamızda elde ettiğimiz bir başka sonuç ise 2mT ve 5mT'ya 15dk ve 30dk boyunca maruz kalan trombositlerin 24 ve 48 saat sonra bile, manyetik alana maruz kalmayan (yani kontrol) trombositlerden daha aktif olduklarıydı. Bu gözlem bize trombositlerin vücut dışına alındıktan sonra 2mT statik manyetik alana maruz bırakılarak daha uzun süre canlı kalabilecekleri fikrini verdi. Bir sonraki çalışmamızda bu verinin kuvvetlenmesi için örnek sayısını arttırmayı ve hücre içi ve hücre dışı Ca^{+2} iyon konsantrasyonlarını tespit ederek verileri analiz etmeyi planlamaktayız.

Düşük dozlu statik manyetik alan çalışmalarının yanı sıra yüksek dozlu statik manyetik alan çalışmaları da yapılmaktadır. Görüntüleme teknolojileri arasında yüksek dozlu manyetik alanların teşhis amaçlı kullanımı gittikçe artmaktadır. Yüksek dozda manyetik alanın hücrelerin farklılaşma veya proliferasyonuna da neden olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Yapılan bir çalışmada CD34 hücreleri, 4 ile 16 saat boyunca en güçlü manyetik alan gradyanına (41,7 T/dakika) sahip 5 T SMA'ya veya manyetik alan gradyanı içermeyen 10T SMA'ya maruz bırakılmıştır. Toplanan hücrelerde, 16 saat süreyle 10T SMA'ya maruz bırakıldıktan sonra, toplam artış oluşturan birim eritroid ve megakaryosit progenitor hücrelerden üretilmiş koloni oluşumunda hematopoetik öncüllerde önemli bir artış gözlenmiş, böylece kontrolden 1,72 ve 1,77 kat daha fazla çoğaldıkları tespit edilmiştir. Ayrıca, erken hematopoez ve hücre döngüsü ile ilgili genlerin, SMA'ya maruz kalma ile önemli ölçüde arttığı bulunmuştur. Bu sonuçlar, 10T SMA maruziyetinin gen ekspresyonlarını değiştirebileceğini ve pluripotent hematopoietik kök hücrelerden megakaryositik/eritroid progenitor (MEP) farklılaşmasında ve/veya bipotent MEP proliferasyonunda spesifik bir artışa neden olabileceğini göstermektedir (6).

Sonuçta 2mT ve 5mT şiddetinde statik manyetik alan trombosit fonksiyonlarının vücut dışına çıktıktan 48 saat sonra bile devam etmesini sağlayabiliyor.

SMA trombosit agregasyonunu arttırarak etkisini gösteriyor. Ancak mekanizmanın aydınlatılması için daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır. 2mT ve 5mT şiddetindeki SMA maruziyetinin trombositlerin (kan alındıktan sonra) daha verimli daha uzun süre kullanılmasına yardımcı olabileceği kanaatindeyiz.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan alınmıştır. (tarih 17/10/2006 ve no 26527).

Ethics Committee Approval: This study was approved by the Ethical Committee of the Istanbul University Cerrahpaşa Faculty of Medicine. (date 17/10/2006 ve no 26527).

Bilgilendirilmiş Onam: Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Informed Consent: Written consent was obtained from the participants.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım Ç.B.G., T.K.; Veri Toplama- G.A., Ç.B.G.; Veri Analizi/Yorumlama- Ç.B.G., H.T., T.K., N.K., T.U.; Yazı Taslağı- Ç.B.G., G.A., N.K.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- T.U., Ç.B.G., H.T., T.K.; Son Onay ve Sorumluluk- Ç.B.G., H.T., G.A., T.K., N.K., T.U.; Malzeme ve Teknik Destek- Ç.G.B., T.K.; Süpervizyon- H.T., T.U., T.K.

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

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

Financial Disclosure: Authors declared no financial support.

KAYNAKLAR/REFERENCES

1. Borges I, Sena I, Azevedo P, Andreotti J, Almeida V, Paiva A, et al. Lung as a Niche for Hematopoietic Progenitors. *Stem Cell Rev Rep* 2017;13(5):567-74.
2. Lefrançais E, Looney MR. Platelet Biogenesis in the Lung Circulation. *Physiology (Bethesda)* 2019;34(6):392-401.
3. Choi JL, Li S, Han JY. Platelet function tests: a review of progresses in clinical application. *Biomed Res Int* 2014;456569.
4. Yardımcı TU, Ulutin ON. Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in human platelets and its secretion. *New Istanbul Contrib Clin Sci* 1976;11(3):142-7.
5. Ulutin ON, Akman N, Özcan E. [THROMBOSIS, ARTERIOSCLEROSIS AND HYPERCOAGULABILITY] [Article in Turkish] *Türk Tıp Cemiy Mecm* 1963;29:428-32.
6. Monzen S, Takahashi K, Toki T, Ito E, Sakurai T, Miyakoshi J, et al. Exposure to a MRI-Type High-Strength Static Magnetic Field Stimulates Megakaryocytic/Erythroid Hematopoiesis in CD34+ Cells From Human Placental and Umbilical Cord Blood. *Bioelectromagnetics* 2009;30:280-5.
7. Tenuzzo B, Vergallo C, Dini L. Effect of 6mT static magnetic field on the bcl-2, bax, p53 and hsp70 expression in freshly isolated and in vitro aged human lymphocytes. *Tissue Cell* 2009;41(3):169-79.
8. Dini L, Abbro L. Bioeffects of moderate-intensity static magnetic fields on cell cultures. *Micron* 2005;36(3):195-217.
9. Tutluoğlu B, Gürel CB, Özdas SB, Musellim B, Erturan S, Anakkaya AN. et al. Platelet function and fibrinolytic activity in patients with bronchial asthma. *Clin Appl Thromb Hemost* 2005;11:77-81.
10. Melanie M, White BA. Platelet protocol research and clinical laboratory procedures printed in the United States of America. Academic Press March 12, 1999.
11. Gungor ZB, Sipahioğlu N, Sonmez H, Ekmekçi H, Toprak S, Ayaz G, et al. Endothelial

- Dysfunction Markers in Low Cardiovascular Risk Individuals: Comparison of Males and Females *J Med Biochem* 2017; 36(1): 62-72.
12. Sağdilek E, Sebik O, Çelebi G. 1mT ve 5mT statik manyetik alanların trombosit agregasyonuna etkisi. *Ege Tıp Dergisi* 2009; 48 (2), 71-6.
13. Tenuzzo B , Chionna A, Panzarini E, Lanubile R, Tarantino P, Di Jeso B, et al. Biological effects of 6mT static magnetic fields: a comparative study in different cell types. *Bioelectromagnetics* 2006;27(7):560-77.
14. Luciana D, Luigi A. Bioeffects of moderate-intensity static magnetic fields on cell cultures. *Micron* 2005;36(3):195-217.
15. Miyakoshi J. Effects of static magnetic fields at the cellular level. *Prog Biophys Mol Biol* 2005;87(2-3):213-23.
16. Teodori L, Göhde W, Maria GV, Fausto T, Dario C, Barbara P, et al. Static magnetic fields affect calcium fluxes and inhibit stress-induced apoptosis in human glioblastoma cells. *Cytometry* 2002;49(4):143-9.



Cytokine Gene Polymorphisms and Chromosome 13 Deletion in Multiple Myeloma Patients

Multiple Myeloma Hastalarında Sitokin Gen Polimorfizmleri ve Kromozom 13 Delesyonu

Çiğdem Kekik Çınar¹ , Gonca Karahan¹ , Sonay Temurhan¹ , Sevgi Kalayoğlu Beşişik¹ ,
Fatma Savran Oğuz¹ , Filiz Aydın¹ 

ABSTRACT

Objective: Multiple myeloma (MM) is a clonal enlargement of plasma cells. The most common cytogenetic anomaly in MM is monosomy 13 and appears approximately 40%–50% in multiple myeloma. Studies have shown that in the majority of patients, 80%–90% of chromosomal anomalies are monosomy 13, and 10%–20% are regional deletions. Monosomy 13 is the most powerful predictor of survival in MM. Cytokines are proteins that regulate many functions of these cells and are secreted by cells of the immune system. Plasma cell stimulates angiogenesis by increasing the release of cytokines such as IL-1 β , IL-6, and IL-10. Single nucleotide polymorphisms (SNP) of cytokine genes can affect their secretion rate or biological activity. Two of the important factors for MM disease are cytokines and chromosome 13 deletion (del13). We investigate chromosome 13 deletion and cytokine gene polymorphisms (IFN- γ , TGF- β , TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-1R, IL-1Ra, IL-4Ra) in patients with MM.

Materials and Methods: EDTA blood was collected from 38 patients with MM included in the study, and DNA was isolated. PCR-SSP method was used for cytokine gene polymorphism typing (Protrans). FISH method was applied using LSI D13S25 SO DNA probe for deletion 13.

Results: 13q deletion was detected in 15 of the 38 of the patients. Statistical analysis of 13q deletion and cytokine gene polymorphisms was not statistically significant ($p>0.05$) by patient age, sex, disease stage, and β 2-microglobulin levels. There is a statistical significance between level of LDH and TGF- β TG/TG haplotype ($p=0.002$). No significant results were obtained in the relationship between cytokine polymorphisms and del13 ($p>0.05$).

Conclusion: Cytokines, which are associated with the function and viability of plasma cells, have a major role in the etiology and prognosis of the disease. Moreover, similar effects were observed with the 13q deletion. In our study, we did not find a statistical significance between cytokine gene polymorphisms and 13q deletion. Although both parameters independently have great importance on the effects of the disease, combining them together does not yield the same effect.

Keywords: Cytokine, polymorphism, multiple myeloma, chromosome 13, deletion

ÖZ

Amaç: Multiple myeloma (MM), plazma hücrelerinin kemik iliği, lenfoid dokular ve çevre kanında birikmesidir. MM’de görülen en sık anomalilerden biri 13/13q delesyonudur ve yaklaşık %40-50 oranında görülür. Yapılan çalışmalar, hastaların çoğunda kromozom anomalisinin %80-90’ının monozomi 13 şeklinde iken %10-20’sinin bölgesel delesyonlar şeklinde olduğunu göstermiştir. Monozomi 13, sağkalımı belirleyen en önemli belirteçlerden biridir. Sitokinler, immün sistem hücrelerince salınan ve bu hücrelerin birçok fonksiyonunu düzenleyen proteinlerdir. Plazma hücresi, immünglobin üretiminde IL-1 β , IL-6, IL-10 ve TNF- α gibi sitokinleri üretirler. Tek nükleotid polimorfizmleri de tek amino asit değişikliği ile sitokin fonksiyonunda ve üretiminde farklılıklar oluştururlar. Sitokinler ve kromozom 13 delesyonu (del13), MM hastalığı için önemli olan faktörlerden ikisidir. Biz de çalışmamızda MM ile del13 ve 10 sitokin (IL-1 α , IL-1 β , IL-12, IFN- γ , TGF- β , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10), 2 reseptör (IL-1R, IL-4Ra) ve 1 reseptör antagonisinin (IL-1RA) gen polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi incelemeyi amaçladık.

¹ Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Istanbul, Turkey

ORCID: Ç.K.Ç. 0000-0003-2098-381X;
G.K. 0000-0001-5339-7126;
S.T. 0000-0001-9889-9330;
S.K.B. 0000-0002-9310-1278;
F.S.O. 0000-0002-6018-8936;
F.A. 0000-0001-5984-7538

Corresponding author/Sorumlu yazar:

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

Submitted/Geliş tarihi: 29.09.2020

Accepted/Kabul Tarihi: 23.10.2020

Citation/Atf: Kekik Çınar C, Karahan G, Temurhan S, Kalayoglu Besisik S, Savran Oguz F, Aydın F . Cytokine gene polymorphisms and chromosome 13 deletion in Multiple myeloma patients. Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi 2020; 3(3): 179-185.
<https://doi.org/10.26650/JARHS2020-653043>



Gereç ve Yöntem: Çalışmaya multiple myeloma tanısı konmuş 38 hasta dahil edildi. Sitokin gen polimorfizm tiplemesi için PCR-SSP yöntemi kullanıldı (Protrans). Delesyon 13 için LSI D13S25 SO DNA probu kullanılarak FISH yöntemi uygulandı.

Bulgular: Hastaların %40'ında del 13 saptandı. 13q delesyonu ve sitokin gen polimorfizmlerinin ayrı ayrı hasta yaşı, cinsiyeti, hastalık evresi ve β 2-mikroglobulin seviyeleri ile istatistiksel analizi sonucu anlamlı bir değer gözlenmedi. LDH düzeyi ile TGF- β TG/TG haplotipi arasında istatistiksel anlamlılık saptandı ($p:0.002$). Sitokin polimorfizmleri ve del13 arasındaki ilişkiye bakıldığında anlamlı bir sonuç elde edilmedi ($p>0.05$).

Sonuç: Sitokin polimorfizmi ve del13 varlığının hastalığın prognozu üzerine ayrı ayrı etkisi olsa da iki parametrenin birlikte prognoz üzerine etkisi saptanamadı.

Anahtar Kelimeler: Sitokin, polimorfizm, multiple myeloma, kromozom 13, delesyon

INTRODUCTION

Multiple myeloma (MM) is a clonal enlargement of plasma cells. This characteristic feature is observed in the bone marrow, lymphoid tissues, and peripheral blood (1). MM is responsible for 15% of hematological malignancies (2). Factors such as genetic factors, inflammation, and oxidative stress play a role in MM etiology (3).

MM cells are predominantly localized in the bone marrow (BM), and their interaction with bone marrow stromal cells (BMSCs) stimulates the transcription and secretion of cytokines from BMSCs. Although cytokines have a negative effect on MM cells, it is effective as a treatment when applied (4).

Plasma cells increase the release of cytokines such as IL-1 β , IL-6, and IL-10 (5). IL-6 supports the growth and survival of normal and myeloma plasma cells. IL-10 is a growth factor of malignant plasma cells (4). TGF-1 β is an important cytokine in immune regulation (6). Genes of cytokines and their receptors are highly polymorphic. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) can affect the expression and/or biological activity of the protein occurring in the gene (4,7,8).

Monosomy 13 is the most common cytogenetic abnormality (approximately 40%–50%) observed in MM (9–14).

Therefore, cytokines and chromosome 13 deletion (del13) are important prognostic factors for MM. We investigate chromosome 13 deletion and cytokine gene polymorphism in patients with MM.

MATERIALS AND METHODS

Thirty-eight patients (F/M: 17/21) with MM from İstanbul Faculty of Medicine Hematology were included in the study. Mean age of the patient was 57 years (min:max: 40:78). Analysis of cytokine gene polymorphisms and chromosome 13 abnormality was performed in İstanbul Faculty of Medicine, Department of Medical Biology.

Cytokine gene polymorphism genotyping

DNA was extracted from the whole peripheral blood with EDTA (15). Cytokine genotyping was

performed using the PCR-SSP method (16) with Protrans kit that was designed to detect polymorphisms of thirteen cytokine genes (IL-1 α , IL-1 β , IL-1R, IL-1RA, IL2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , INF- γ , TGF- β and IL-4Ra).

Detection chromosome 13 deletion

Following the FISH procedure, BM or peripheral blood samples were studied. Target DNA was attached to glass slides. The slide containing DNA and probe was denatured in 70% formamide (pH 7.0) for 5 minutes at 73°C. The slides were passed through a cold ethanol batch and allowed to dry. The denatured probe was placed on the target DNA, and the slides were incubated at 37°C overnight. After hybridization, it was washed for 2 minutes at 0.5XSSC at 72°C and twice for 3 minutes in phosphate buffered detergent at room temperature. Finally, the slides were stained with DAPI. Thereafter, the slides were viewed with a fluorescence microscope (Nikon E800) with the appropriate set of filters (17).

RESULTS

Fifteen (40%) of the 38 patients were detected with chromosome 13q deletion. No statistical significance between chromosome 13q deletion and age, gender, stage of disease, level of LDH, and β_2 -microglobulin ($p>0.005$) was found.

There was a statistical significance between level of LDH and TGF- β TG/TG haplotype ($p=0.002$). No statistical significance between cytokine gene polymorphisms and age, gender, stage of disease, and level of β_2 -microglobulin ($p>0.005$) was found.

Patients' cytokine gene polymorphisms and chromosome 13q deletion results are shown in Table 1. There was no statistical significance between cytokine gene polymorphisms and 13q deletion ($p>0.05$).

DISCUSSION

MM is a malignancy of the plasma cell. The chromosomal abnormalities of MM were detected such as del13 (40%–50%) and the $t(11; 14)$ (9). Deletion of chromosome 13 has been associated with a poor prognosis in MM (18). In this study, we detected

Table 1. Results of the cytokine gene polymorphisms and 13q deletion

| | 13q del | IL-1 α | IL-1 β | IL-1R | IL-1RA | IL-4RA | IL-12 | IFN- γ | TGF- β 1 | TNF- α | IL-2 | IL-4 | IL-6 | IL-10 |
|----|---------|---------------|--------------|-------|--------|--------|-------|---------------|----------------|---------------|-------|----------|-------|----------|
| 1 | del- | C-C | C-T / C-C | C-C | T-C | A-A | A-A | A-T | TG-CG | AG-GG | GG-GG | TC-C-TCC | GG-GG | ATA-ACC |
| 2 | del- | C-C | C-C / T-C | C-T | T-C | A-A | A-A | T-T | TG-CG | GG-GG | GG-TG | TC-C-TCC | CA-CA | GC-C-GCC |
| 3 | del- | C-C | C-C / C-C | C-C | T-T | G-A | C-A | A-A | TG-CG | AG-GG | GG-GG | GC-C-TCC | CG-GG | GC-C-ACC |
| 4 | del- | C-C | T-T / C-C | C-C | T-T | G-A | C-C | T-T | CG-CC | GG-AA | GG-TT | TC-C-TTC | CA-GG | GC-C-GCC |
| 5 | del- | C-C | C-T / C-C | C-T | T-T | A-A | A-A | A-T | CG-CC | AG-AA | GG-TG | GC-C-TCC | GG-GG | GC-C-ACC |
| 6 | del+ | T-C | C-T / C-C | C-C | T-C | A-A | A-A | A-A | TG-CC | GA-GG | GG-TG | TC-C-TTT | GG-GG | AC-C-ACC |
| 7 | del+ | C-C | C-C / C-C | C-T | T-T | A-A | A-A | A-A | CG-CC | AG-AA | TG-TG | TC-C-TTT | GG-GG | GC-C-ACC |
| 8 | del- | T-T | C-C / T-C | C-T | T-C | G-A | A-A | A-T | CG-CC | GG-GG | TG-TT | GC-C-TCC | GG-GG | ATA-A-TA |
| 9 | del- | C-C | T-T / C-C | C-C | T-C | A-A | C-A | A-T | CG-CC | AG-AA | TT-GT | TC-C-TTT | CG-GG | ATA-GCC |
| 10 | del- | T-C | C-T / C-C | C-C | T-C | A-A | C-A | T-T | CG-CG | AG-AA | GG-TT | TC-C-TCT | CA-GG | ATA-ACC |
| 11 | del+ | T-C | C-T / C-C | T-T | T-C | A-A | C-A | T-T | TG-CG | AG-GG | GG-TG | TC-C-TCC | CA-GG | GC-C-ACC |
| 12 | del+ | C-C | C-T / C-C | C-T | T-T | A-A | C-A | A-T | TG-CC | AG-GG | TG-TG | TC-C-TCC | CA-GG | GC-C-GCC |
| 13 | del+ | C-C | C-C / C-C | C-T | T-T | A-A | C-A | A-T | CG-CC | AG-AA | TT-TT | GC-C-TCC | GG-GG | ATA-GCC |
| 14 | del- | C-C | C-T / C-C | C-T | T-T | G-A | A-A | A-T | TG-CG | GG-GG | GG-GG | TC-C-TCC | CA-GG | GC-C-ACC |
| 15 | del- | T-C | C-T / T-C | C-C | T-C | A-A | A-A | T-T | TG-CC | GA-GG | TG-TT | TC-C-TTT | GG-GG | ATA-GCC |
| 16 | del+ | C-C | C-T / C-C | C-C | T-T | A-A | C-A | T-T | CG-CG | GG-GG | TG-TT | TC-C-TCC | CA-GG | ATA-GCC |
| 17 | del- | T-C | C-T / C-C | C-T | T-T | A-A | C-A | A-T | CG-CC | AG-AA | GG-TG | GC-C-TCC | CA-GG | GC-C-GCC |
| 18 | del+ | C-C | C-C / C-C | C-T | T-T | A-A | C-A | A-T | TG-CG | AG-GG | GG-GG | GC-C-GCC | GG-GG | ATA-GCC |
| 19 | del+ | T-C | C-C / T-C | T-T | T-T | G-A | C-A | A-T | CG-CG | AG-GG | GG-TG | TC-C-TCC | CA-GG | ATA-GCC |
| 20 | del- | C-C | C-C / C-C | C-T | T-T | A-A | C-A | A-T | TG-TG | GG-GG | GG-TG | TC-C-TCC | CA-GG | ATA-GCC |
| 21 | del+ | C-C | C-T / C-C | C-C | T-T | A-A | C-A | A-T | TG-CG | GG-GG | GG-GG | GC-C-TCC | GG-GG | AC-C-ACC |
| 22 | del- | C-C | C-T / C-C | C-T | T-T | A-A | A-A | A-T | CC-CC | AG-AA | TG-TG | TTT-GTT | CA-GG | ATA-ACC |
| 23 | del- | C-C | T-T / C-C | C-C | T-T | A-A | A-A | A-A | TG-CG | GG-GG | GG-GG | TC-C-TCC | CA-CA | ATA-ACC |
| 24 | del- | T-C | C-T / C-C | C-C | T-T | A-A | A-A | A-A | TG-CG | GA-GG | GG-TT | GC-C-TCC | CA-GG | ATA-ACC |
| 25 | del+ | C-C | C-C / C-C | C-T | T-T | G-A | C-C | A-T | TG-CG | GG-GG | GG-TG | TC-C-TCC | CA-GG | ATA-GCC |
| 26 | del- | T-C | C-C / C-C | C-C | T-T | A-A | C-A | A-T | CG-CC | AG-AA | TG-TG | TC-C-TTT | GG-GG | GC-C-ACC |
| 27 | del+ | T-T | C-C / T-C | C-T | T-C | G-A | C-A | A-A | CG-CC | AG-AA | GG-TT | GC-C-TCC | CA-GG | ATA-A-TA |

Table 1. Continued

| | | | | | | | | | | | | | | |
|----|------|-----|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-------|-----------|-----------|--------------|-----------|---------------|
| 28 | del- | T-C | C-T/ T-C | C-C | T-C | A-A | A-A | A-T | CG-CG | GG- GG | GG- GG | TC- C-TCC | CA- GG | GC- C-GCC |
| 29 | del- | T-C | C-T/ T-C | C-T | T-T | G-A | C-A | T-T | TG-CG | GG- GG | GG- TG | TC- C-TCC | CA- GG | ATA- GCC |
| 30 | del- | C-C | T-T/ C-C | C-T | T-T | A-A | C-A | T-T | TG-CG | GG- GG | TG- TG | TC- C-TCC | GG- GG | GC- C-ACC |
| 31 | del+ | T-C | C-T/ C-C | C-C | T-C | A-A | A-A | A-T | TG-CG | AG- GG | TG- TG | GC- C-GCC | CA- CA | GC- G-CGCC |
| 32 | del- | C-C | T-T/ C-C | C-C | T-T | A-A | A-A | A-A | CG-CG | GA- GG | GG- TG | GC- C-TTT | CG- GG | ATA- ACC |
| 33 | del+ | C-C | C-T/ C-C | C-C | T-T | G-A | C-A | T-T | CG-CC | GG- GG | GG- TT | TC- C-GCT | CG- GG | ATA- GCC |
| 34 | del- | C-C | T-T/ C-C | C-C | C-C | A-A | A-A | A-A | CG-CC | AG- AA | GG- TG | GC- C-TCC | GG- GG | ATA- ACC |
| 35 | del- | T-C | C-T/ C-C | T-T | T-C | A-A | A-A | A-T | TG-CG | GG- GG | GG- GG | GC- C-TCC | CG- GG | GC- C-ACC |
| 36 | del+ | C-C | C-C/ C-C | T-T | C-C | A-A | C-A | T-T | CG-CC | AG- AA | GG- GG | GC- C-TCC | CA- GG | GC- C-ACC |
| 37 | del- | T-C | C-T/ T-C | C-C | C-C | G-A | A-A | A-T | TG-TG | GG- GG | GG- TG | TC- C-TTT | CA- GG | GC- C-ACC |
| 38 | del+ | T-C | C-T/ C-C | C-T | T-C | G-A | A-A | A-A | CG-CC | AG- AA | TG- TT | GC- C-TCC | CG- GG | GC- C-GCC |

chromosome 13 deletion rate at 40%, which did not demonstrate statistical significance between chromosome 13q deletion and age, gender, stage of disease, level of LDH, and β_2 -microglobulin.

Cytokines are crucial in the regulation of key pathways of immunity. SNPs alter the expression or function of the gene product. Some studies have shown an association between polymorphisms in cytokine genes and MM (4,5,19); however, other studies have not detected it (6,20,21). No statistical significance was found between cytokine gene polymorphisms and age, gender, stage of disease, and level of β_2 -microglobulin. However, a statistical significance was observed between high levels of LDH, which is the indicator of a poor prognosis and TGF- β TG/TG haplotype. Furthermore, TG/TG haplotype associates with high level production of TGF- β . We considered that TGF- β triggers conversion to plasma cells from B cells by elevating LDH levels, and therefore, cause to a poor prognosis for the disease.

Cytokines, which is related the function and survival of plasma cells and 13q deletion, have a major role in the etiology and prognosis of diseases. In our study, a statistical significance between cytokine gene polymorphisms and 13q deletion was observed. Al-

though both parameters independently have great importance on the effects of the disease, it seems that combining them together is not favorable.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Author Contributions: Conception/Design of Study- Ç.K.Ç., G.K., S.T.; Data Acquisition- Ç.K.Ç., G.K., S.T.; Data Analysis/Interpretation- Ç.K.Ç., G.K., S.T., S.K.B., F.S.O., F.A.; Drafting Manuscript- Ç.K.Ç., G.K., S.T.; Critical Revision of Manuscript- Ç.K.Ç., S.K.B., F.S.O., F.A.; Final Approval and Accountability- Ç.K.Ç., G.K., S.T., S.K.B., F.S.O., F.A.; Technical or Material Support- Ç.K.Ç., G.K., S.T.; Supervision- Ç.K.Ç., S.K.B., F.S.O., F.A.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- Ç.K.Ç., G.K., S.T.; Veri Toplama- Ç.K.Ç., G.K., S.T.; Veri Analizi/Yorumlama- Ç.K.Ç., G.K., S.T., S.K.B., F.S.O., F.A.; Yazı Taslağı- Ç.K.Ç., G.K., S.T.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- Ç.K.Ç., S.K.B., F.S.O., F.A.; Son Onay ve Sorumluluk- Ç.K.Ç., G.K., S.T., S.K.B., F.S.O., F.A.; Malzeme ve Teknik Destek- Ç.K.Ç., G.K., S.T.; Süpervizyon- Ç.K.Ç., S.K.B., F.S.O., F.A.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir

Financial Disclosure: Authors declared no financial support.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

REFERENCES

- Caligaris CF, Gregoret MG, Merico F, Gottardi D, Ghia P, Parvis G, et al. Bone marrow microenvironment and the progression of multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 1992;8(1-2):15-22.
- Angtuago EJ, Fassas AB, Walker R, Sethi R, Barlogie B. Multiple myeloma: clinical review and diagnostic imaging. *Radiology* 2004;231(1):11-23.
- Stellrecht CM, Gandhi V. Myeloma antioxidant status: the good, the bad and reactive. *Leuk Lymphoma* 2009;50(5):691-3.
- Banu C, Moise A, Arion CR, Coriu D, Tanase A, Constantinescu I. Cytokine gene polymorphisms support diagnostic monitoring of Romanian multiple myeloma patients. *J Med Life* 2011;4(3):264-8.
- Vangsted AJ, Klausen TW, Ruminiski W, Gimsing P, Andersen NF, Gang AO, et al. The polymorphism IL-1 beta T-31C is associated with a longer overall survival in patients with multiple myeloma undergoing auto-SCT. *Bone Marrow Transp* 2009;43(7):539-45.
- Wang H, Gao C, Xu L, Yang Z, Zhao W, Kong X. Laboratory characterizations on 2007 cases of monoclonal gammopathies in east china. *Cell Mol Immunol* 2008;5(4):293-8.
- Leigh JK. The extent and analysis of cytokine and cytokine receptor gene polymorphism. *Transplan Immunol* 2002;10:143-6.
- Ollier WE. Cytokine genes and disease susceptibility. *Cytokine* 2004;28(4-5):174-8.
- Ho PJ. Chromosomal and genetic abnormalities in myeloma. *Clin Lab Haem* 2002;24(5):259-69
- Liebisch P, Wendl C, Wellmann A, Kröber A, Schilling G, Goldschmidt H, et al. High incidence of trisomies 1q, 9q, and 11q in multiple myeloma: results from a comprehensive molecular cytogenetic analysis. *Leukemia* 2003;17:2535-7.
- Perez-Simon JA, Garcia-Sanz R, Tabernero MD, Bladé J, Moro MJ, Fernández-Calvo J, et al. Prognostic value of numerical chromosome aberrations in multiple myeloma: A FISH analysis of 15 different chromosomes. *Blood* 1998;91(9):3366-71.
- Zozer N, Königsberg R, Ackermann J, Fritz E, Dallinger S, Krömer E, et al. Deletion of 13q14 remains an independent adverse prognostic variable in multiple myeloma despite its frequent detection by interphase fluorescence in situ hybridization. *Blood* 2000;95(6):1925-30.
- Facon T, Avet-Loiseau H, Guillermin G, Moreau P, Geneviève F, Zandecki M, et al. Chromosome 13 abnormalities identified by FISH analysis and serum β -2-microglobulin produce a powerful myeloma staging system for patients receiving high-dose therapy. *Blood* 2001;97(6):1566-71.
- Fonseca R, Harrington D, Oken M, Dewald GW, Bailey RJ, Van Wier SA, et al. Biologic and prognostic significance of interphase FISH detection of chromosome 13 abnormalities (D13) in multiple myeloma: an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Study. *Cancer Res* 2002;62(3):715-20.
- Gustincich S, Manfioletti G, Del Sal G, Schneider C, Carninci P. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Bio Techniques* 1991;11(3):298-302.
- Olerup O, Zetterquist H. DR low resolution PCR-SSP typing –a correction and an up-date. *Tissue Antigens* 1993;41(1):55-6.
- Özdilli K, Aydın F, Beşışık SK, Oğuz F, Temurhan S, Çako Ö, et al. Detection of chromosomal abnormalities on interface cells from myeloid leukemias by FISH. *Nobel Med* 2010; 6(3): 84-89.
- Fonseca R, Oken MM, Harrington D, Bailey RJ, Van Wier SA, Henderson KJ, et al. Deletions of chromosome 13 in multiple myeloma identified by interphase FISH usually denote large deletions of the q arm or monosomy. *Leukemia* 2001;15(6):981-6.

19. Chakraborty B, Vishnoi G, Gowda SH, Goswami B. Interleukin-6 gene-174 G/C promoter polymorphism and its association with clinical profile of patients with multiple myeloma. *Asia-Pac J Clin Oncol* 2014;13(5):e402-e407.
20. G Mazur, K Bogunia-Kubik, T Wróbel, L Karabon, M Polak, K Kuliczkowski, et al. IL-6 and IL-10 promoter gene polymorphisms do not associate with the susceptibility for multiple myeloma. *Immunol Lett* 2005;96(2):241-6.
21. Iakupova EV, Grinchuk OV, Kalimullina D, Bakirov B, Galimova RR, Makarova OV, et al. Molecular genetic analysis of the Interleukin 6 and Tumor Necrosis Factor a gene polymorphisms in multiple myeloma. *Mol Biol (Mosk)* 2003;37:420-4.



The Prognostic Significance of the Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Patients with Multiple Myeloma: A Pilot Study

Multiple Miyelom Hastalarında Nötrofil Lenfosit Oranının Prognostik Önemi

Alpay Medetalibeyoğlu¹ , Nur Akyüz² , Sena Bayraktar¹ , Mustafa Altunkaynak¹ ,
Timur Selçuk Akpınar³ , Cemil Taşçıoğlu¹

¹ Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Department of Internal Medicine, Istanbul, Turkey

² University of Vienna, Vienna Faculty of Medicine, Vienna, Austria

³ Koç Üniversitesi, Faculty of Medicine, Department of Internal Medicine, Istanbul, Turkey

ORCID: A.M. 0000-0002-5829-9186;
N.A. 0000-0001-6462-6828;
S.B. 0000-0002-4675-185X;
M.A. 0000-0002-7768-2746;
T.S.A. 0000-0002-9591-4475;
C.T. 0000-0003-3808-6957

Corresponding author/Sorumlu yazar:

Alpay Medetalibeyoğlu,
Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine,
Department of Internal Medicine, Istanbul, Turkey
E-mail: alibeyogluapay@gmail.com

Submitted/Geliş tarihi: 22.09.2020

First Revision Received/İlk revizyon: 20.10.2020

Last Revision Received/Son revizyon: 22.10.2020

Accepted/Kabul Tarihi: 26.10.2020

Citation/Atf: Medetalibeyoğlu A, Akyüz N, Bayraktar S, Altunkaynak M, Akpınar TS, Taşçıoğlu C. The prognostic significance of the neutrophil-to-lymphocyte ratio in patients with multiple myeloma: a pilot study. Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi 2020; 3(3): 186-194.

https://doi.org/10.26650/JARHS2020-796997

ABSTRACT

Objective: The neutrophil-to-lymphocyte ratio(NLR) is a biomarker for systematic inflammation. It is also thought that the NLR can be used as a new biomarker by clinicians in predicting the prognosis of patients with multiple myeloma(MM). This study, aimed to retrospectively investigate the prognostic significance of pretreatment NLR in patients with MM, based on the hypothesis that elevated pretreatment NLR is a biomarker indicating worse survival in patients with MM.

Materials and Methods: Patients aged >18 years with MM diagnosed, follow-up, and treated between January 2011 and December 2017 in the department of internal and geriatric medicine at Istanbul Faculty of Medicine were enrolled into this study. We retrospectively collected the data of 40 patients from the medical records. The relationship between NLR and baseline characteristics, laboratory parameters, prognosis, and survival outcome was analyzed.

Results: The study showed that the mean NLR was 2.84 ± 2.62 (0.1-14.8) in the whole blood count. No significant correlation was found between NLR and mortality ($p=0.965$). A significant relationship was found between higher stage and mortality ($p=0.035$). In addition, anemia, low albumin level, and elevated lactate dehydrogenase (LDH) level indicated poor survival time in patients with MM ($p=0.022$; $p=0.031$; $p=0.023$).

Conclusion: Our study showed no relationship between NLR and both mortality and overall survival (OS). The above result can be explained by the fact that our study had some limitations such as the use of retrospective data from a single-center and the small sample size.

Keywords: Multiple myeloma, neutrophil-lymphocyte ratio, overall survival

ÖZ

Amaç: Nötrofil-lenfosit oranı (NLR), bir sistematik inflamasyon biyobelirtecidir. Multipl miyelomlu (MM) hastalar için de NLR'nin prognozu öngörmeye yeni bir biyobelirteç olarak klinisyene yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada, tedavi öncesi NLR'nin MM hastalarında daha kötü bir sağkalm biyobelirteci olduğu hipotezine dayanarak, MM'lu hastalarda tedavi öncesi NLR'nin prognostik önemini retrospektif olarak araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya, İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları ve Geriatri Anabilim Dalı'nda Ocak 2011 - Aralık 2017 tarihleri arasında tanı, takip ve tedavi gören 18 yaş üstü MM hastaları alındı. 40 hastanın verileri tıbbi kayıtlardan retrospektif olarak toplandı. NLR ile temel özellikler, laboratuvar parametreleri, prognoz ve sağkalm arasındaki ilişki analiz edildi.

Bulgular: Mevcut çalışma, tam kan sayımında ortalama NLR'nin $2,84 \pm 2,62$ (0,1-14,8) olduğunu gösterdi. NLR ile mortalite arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı ($p=0,965$). Yüksek evre ile ölüm arasında anlamlı bir ilişki vardı ($p=0,035$). Ayrıca anemi, düşük albümin düzeyi ve yüksek laktat dehidrogenaz (LDH) düzeyi MM'lu hastalarda kötü sağkalm süresine işaret ediyordu ($p=0,022$; $p=0,031$; $p=0,023$).

Sonuç: Çalışmamız NLR ile mortalite ve genel sağkalm (OS) arasında bir ilişki olmadığını gösterdi. Çalışmamızda NLR ile mortalite ve OS arasında bir ilişkinin olmamasının nedeni, çalışmamızın tek merkezden geriye dönük verilerin toplanması ve küçük örneklem büyüklüğü gibi bazı sınırlılıklara sahip olması olabilir.

Anahtar Kelimeler: Multipl miyelom, nötrofil-lenfosit oranı, genel sağkalm



INTRODUCTION

Multiple myeloma (MM) is a plasma cell cancer characterized by the accumulation of neoplastic plasma cells in the bone marrow, which produce excess immunoglobulin. MM is the second most common hematological malignancy that accounts for 1% of all tumors in adults and approximately 15% of all hematological malignancies (1). Patients with MM may present clinical manifestations during the course of the disease, including bone pain, renal insufficiency, hypercalcemia, anemia, and recurrent infections (2).

Several researchers have described the absolute lymphocyte count as a surrogate biomarker of tumor-infiltrating lymphocyte, reflecting systemic host immunity, and absolute neutrophil count as the host inflammatory response to cancer. In addition, the absolute counts of inflammation parameters and the NLR have been proposed as a simple and inexpensive marker to assess clinical outcomes in various types of cancers. Recently, the NLR has been shown to be a new independent prognostic factor in patients with MM, and a meaningful relationship has been found between NLR and the accepted prognostic markers (4-6). Further, an elevated NLR may predict worse clinical outcomes in patients with MM (4-7). In this study, we aimed to evaluate the possible association between NLR and clinical parameters, prognosis, and survival in patients with MM.

MATERIALS AND METHODS

Study Objectives

Recently, several investigators have suggested that the NLR is an easily available and inexpensive marker for assessing clinical outcomes in MM patients. However, the relationship between NLR and prognosis in patients with MM has not yet been clearly demonstrated. This study aimed to evaluate the prognostic significance of NLR in patients with MM (3-5,7).

Study Population

Male and female patients aged 26 to 87 years with MM, diagnosed, follow-up, and treated between January 2011 and December 2017 in the department of internal and geriatric medicine at Istanbul Faculty of Medicine were included in this study.

Inclusion and Exclusion Criteria

Male and female patients older than 18 years at the time of diagnosis with a definite MM were included in the study. Patients without sufficient data in the medical record and regular follow-up were excluded from the study.

Methods

Since this was a pilot study, no sample size/power calculation was performed. We enrolled 43 patients with MM by a retrospective review of the medical record of patients.

A total of 40 patients with MM were eligible, including 21 female and 19 male patients. The data of these patients were extracted from the hospital automation systems in the department of internal and geriatric medicine at the Istanbul Faculty of Medicine.

The patients were classified according to the International Staging System (ISS) criteria. Dates of death were obtained from the death notification system of the Turkish Statistical Institute. Overall survival (OS) was defined as the period between the date of diagnosis and date of death from any cause.

Statistical Considerations and Data Analysis

NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007 (Kaysville, Utah, USA) was used for data analysis. Descriptive statistical methods (mean, standard deviation, median, frequency, percentage, minimum and maximum) were used to evaluate the study data. Shapiro Wilk test and graphical analysis were used to determine if the quantitative data were normally distributed. The student t-test was used to make comparisons between two groups of normally distributed quantitative, while the Mann Whitney U test for comparison between two groups of non-normally distributed quantitative variables. Pearson chi-square test and Fisher Freeman Halton test were used to compare the qualitative data. OS was analyzed using Kaplan Meier curves. Comparisons of survival between the different groups were made using the log-rank test. Statistical significance was considered as $p < 0.05$. For visualization of the collected data and resulting prevalence values and relationships, pie charts, bar charts, and tables were used.

Data Protection

All patients were coded with a consecutive number and pseudonymized for further evaluation. Only authorized persons had access to the original data.

Risk-Benefit Assessment

The included patients had no direct benefit from the study. However, since this study was only a retrospective analysis of their data, no patient risk was expected. The only possible risk of the disclosure of sensitive patient data was minimized by the pseudonymization and access restriction.

RESULTS

Statistical Analysis

A total of 40 patients with MM, including 21 females (52.5%), and 19 males (47.5%) were included in the pilot study. The baseline characteristics of the MM patients in this study are shown in Table-1.

Regarding the type of multiple myeloma M protein, the largest group consisted of 7 (20.0%) with IgG lambda, followed by 5 (14.3%) patients IgG kappa. In addition, 4 (11.4%) patients had IgA lambda, 3 (8.6%) IgA kappa, 8 (22.9%) light chain kappa, and

Table 1. Distribution of demographic data of patients with MM

| Multiple Myeloma (n=40) | | Cases (n) | Percent (%) | Min-Max (Median) | Mean±SD |
|----------------------------------|-------------------------|-----------|-------------|------------------|-------------|
| Age (years) | | | | 26-87 (61) | 61.20±11.20 |
| | Female | | | 43-87 (64) | 63.4±11.0 |
| | Male | | | 26-75 (60) | 58.9±11.2 |
| Gender | Female | 21 | 52.5 | - | - |
| | Male | 19 | 47.5 | | |
| Subtype (n=35) | IGA kappa type | 3 | 8.6 | - | - |
| | IGA lambda type | 4 | 11.4 | | |
| | IGG kappa type | 5 | 14.3 | | |
| | IGG lambda type | 7 | 20.0 | | |
| | IGM kappa type | 1 | 2.9 | | |
| | IGM lambda type | 1 | 2.9 | | |
| | Kappa type | 8 | 22.9 | | |
| | Lambda type | 4 | 11.4 | | |
| | Smoldering type | 2 | 5.7 | | |
| ISS Staging (n=36) | Stage I | 9 | 25.0 | - | - |
| | Stage II | 7 | 19.4 | | |
| | Stage III | 20 | 55.6 | | |
| Symptoms | Weight loss | 11 | 27.5 | - | - |
| | Weakness | 22 | 55.0 | | |
| | Paleness | 10 | 25.0 | | |
| | Night sweats | 1 | 2.5 | | |
| | Fever | 9 | 22.5 | | |
| | Paresthesia | 2 | 5.0 | | |
| | Bone pain | 31 | 77.5 | | |
| | Shortness of breath | 2 | 5 | | |
| | Spinal cord compression | 1 | 2.5 | | |
| Organomegaly (n=39) | No | 29 | 74.4 | - | - |
| | Yes | 10 | 25.6 | | |
| | Hepatomegaly | 10 | 25.6 | | |
| | Splenomegaly | 4 | 10.3 | | |
| Palpable Lymphadenomegaly (n=39) | No | 37 | 94.9 | - | - |
| | Yes | 2 | 5.1 | | |
| Pleural Effusion (n=39) | No | 33 | 84.6 | - | - |
| | Yes | 6 | 15.4 | | |
| Extra Plasmacytoma (n=39) | No | 30 | 77.0 | - | - |
| | Yes | 9 | 23.0 | | |
| Lytic Lesions (n=37) | No | 16 | 43.2 | - | - |
| | Yes | 21 | 56.8 | | |

Table 1. Continued

| | | | | | |
|------------------------------|---------------|----|------|-----------------------|--------------------|
| Proteinuria (n=31) | No | 14 | 45.2 | - | - |
| | Yes | 17 | 54.8 | | |
| Renal Involvement (n=40) | No | 35 | 87.5 | - | - |
| | Yes | 5 | 12.5 | | |
| Hemoglobin (g/dl) | >10 | 15 | 37.5 | 5.4-13.9 (9.3) | 9.63±2.05 |
| | ≤10 | 25 | 62.5 | | |
| PLT (μL) | >375000 | 3 | 7.5 | 45400-512500 (192500) | 205482.50±94934.06 |
| | 155000-375000 | 25 | 62.5 | | |
| | <155000 | 12 | 30 | | |
| Beta 2 Microglobulin (mg/dl) | >2,2 | 31 | 91.2 | 1.7-80.1 (5.9) | 10.21±14.39 |
| | ≤2,2 | 3 | 8.8 | | |
| Albumin (g/dl) | >3,5 | 19 | 50 | 1.82-5.6 (3.54) | 3.45±0.80 |
| | ≤3,5 | 19 | 50 | | |
| ESR (mm/h) | >40 | 33 | 86.8 | 26-155 (92) | 89.45±34.78 |
| | ≤40 | 5 | 13.2 | | |
| CRP (mg/l) | >5 | 25 | 67.6 | 0-126 (8) | 18.51±30.07 |
| | ≤5 | 12 | 32.4 | | |
| LDH (U/L) | >250 | 25 | 62.5 | 113-998 (292.5) | 324.45±158.28 |
| | ≤250 | 15 | 37.5 | | |
| Neutrophil/lymphocytes ratio | | | | 0.1-14.8 (2) | 2.84±2.62 |
| Survival status | Alive | 21 | 52.5 | - | - |
| | Death | 19 | 47.5 | | |
| Survival time (months) | | | | 1-73 (13) | 22.9±22.0 |

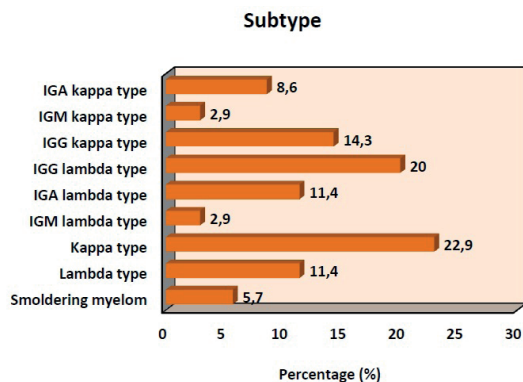
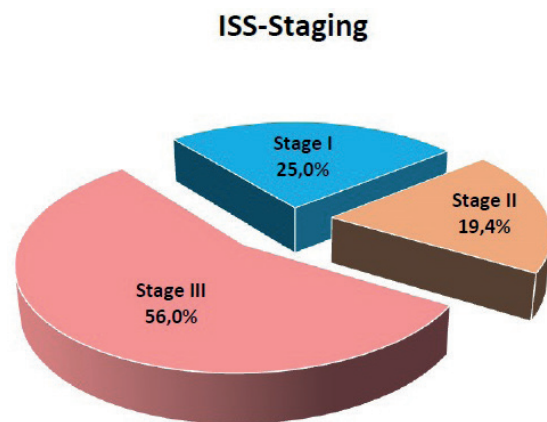
4 (11.4%) light chain lambda. Two patients (5.7%) had the smoldering type (*Figure 1*).

The mean age of the patients was 61.20±11.20 years, and the age range was between 26 (male) and 87 (female) years. According to sex, the mean age of the female patients was 63.4±11.0, and that of the males was 58.9±11.2.

Clinically, at the time of diagnosis, 9 (25.0%) patients were diagnosed as stage I, 7 (19.4%) patients as stage II, and 20 (55.6%) patients as stage III on the basis of the ISS- staging (*Figure 2*).

We found that 52.5% (n=21) of the patients were still alive. The median and mean survival times of the patients were obtained. The follow-up period ranged from 24 to 88 months, and mean survival was 22.9±22.0 months (*Figure 3*).

In the whole blood count, the mean HGB level was 9.63±2.05 (5.4-13.9) g/dL, mean PLT was 205482.50±94934.06 (45400-512500) μL, mean CRP was 18.51±30.07 (0-126) mg/L, mean ESR was 89.45±34.78 (26-155) mm/h, mean beta-2 micro-

**Figure 1.** MM population by subtype.**Figure 2.** MM patients by ISS-staging.

globulin was 10.21±14.39 (1.7-80.1) mg/L, mean LDH was 324.45±158.28 (113-998) U/L, mean NLR was 2.84±2.62 (0.1-14.8) and mean albumin was 3.45±0.80

(1.82-5.6) g/dL. Based on the laboratory reference range, 25 (62.5%) patients had low hemoglobin levels, 12 patients (30.0%) low PLT levels, and 19 patients (50%) low albumin levels; CRP was found high in 25 (67.6%) patients, ESR in 33 (86.8%) patients, LDH levels in 25 (62.5%) patients, and beta-2 microglobulin in 31 (91.2%) patients.

The demographic assessments of the MM patients by mortality are shown in Table 2.

Regarding the relationship between mortality and clinical parameters in the patients with MM, no significant correlation was found between age, gender, pathological subtype, and mortality (p=0.951, p=0.987, p=0.622, respectively).

There was a statistically significant relationship between ISS-staging and mortality (p=0.035; p<0.05).

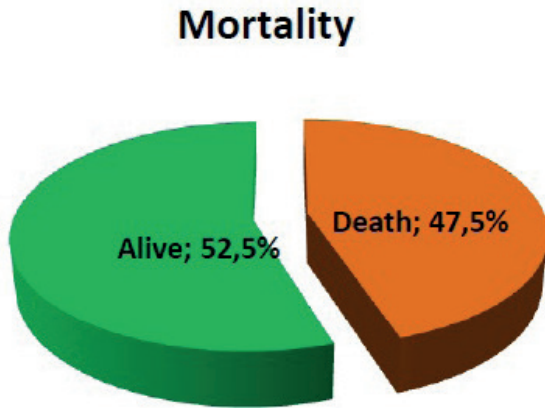


Figure 3. MM population by mortality.

Table 2. Demographic assessments of MM patients by mortality

| Multiple Myeloma (n=40) | | Mortality | | p values |
|------------------------------|---|---|--|---------------------|
| | | Death (n=19) | Alive (n=21) | |
| Age | Min-Max(Median) Mean±SD | 26-74 (63) 61.32±11.46 | 43-87 (60) 61.10±11.23 | ^a 0.951 |
| Gender | Female Male | 10 (47.1) 9 (47.4) | 11 (42.9) 10 (52.6) | ^b 0.987 |
| Subtype (n=35) | IGA kappa type IGA lambda type IGG kappa type IGG lambda type IGM kappa type IGM lambda type Kappa type Lambda type Smoldering type | 2 (66.7) 3 (75) 3 (60) 2 (28.6) 0 (0) 1 (100) 3 (37.5) 2 (50) 0 (0) | 1 (33.3) 1 (25) 2 (40) 5 (71.4) 1 (100) 0 (100) 5 (62.5) 2(50) 2 (100) | ^c 0.622 |
| ISS Staging (n=32) | Stage I Stage II Stage III | 1 (11.1) 4 (51.1) 12 (60.0) | 8 (88.9) 3 (42.9) 8 (40.0) | ^c 0.035* |
| Albumin g/dl | >3.5 ≤3.5 | 7 (35.0) 12 (66.7) | 13 (65.0) 6 (33.3) | ^b 0.023* |
| HGB (g/dl) | Min-Max(Median) Mean±SD | 6.1-12.6 (8.9) 8.9±1.55 | 5.4-13.9 (10.5) 10.33±2.23 | ^a 0.022* |
| PLT (µL) | Min-Max(Median) Mean±SD | 72000-512500 (189300) 200100±115483.4 | 45400-397000 (200000) 210352.4±74290.8 | ^d 0.336 |
| NLR | Min-Max(Median) Mean±SD | 0.4-14.8 (2.05) 3.06±3.2 | 0.1-9.5 (2) 2.64±2.04 | ^d 0.965 |
| LDH (U/L) | Min-Max(Median) Mean±SD | 163-998 (315) 378.4±185.9 | 113-509 (240) 275.6±111.7 | ^d 0.031* |
| Beta 2 Microglobulin (mg/dl) | Min-Max(Median) Mean±SD | 2-29 (6.7) 10.40±8.71 | 1.7-80.1 (4.5) 10.04±18.3 | ^d 0.129 |
| ESR (mm/h) | Min-Max(Median) Mean±SD | 26-155 (107.5) 95.8±38.6 | 26-133 (84) 81.0±32.6 | ^d 0.230 |
| CRP (mg/l) | Min-Max(Median) Mean±SD | 0-126 (9) 25.74±38.5 | 1-203 (5) 16.5±28.4 | ^d 0.378 |

^aStudent t Test, ^bPearson Chi-Square Test, ^cFisher Freeman Halton Test^dMann Whitney U Test, *p<0.05

In addition, the frequency of ISS-Stage III was higher in dead patients (60.0%) compared to patients who were still alive (40.0%) (Figure 4).

Regarding the relationship between mortality and laboratory parameters in the patients with MM, there was a statistically significant relationship between HGB, LDH, and albumin measurements and mortality (p=0.022, p<0.05; p=0.031, p<0.05; p=0.023, p<0.05).

The mean HGB concentration was 8.9±1.55 (6.1-12.6) g/dL in the death patients and 10.33±2.23 (5.4-13.9) g/dL in patients who are still alive; the HGB levels of the dead MM patients were found to be lower than those of the patients who were still alive (Figure 5).

The mean LDH level was 378.4±185.9 (163-998) U/L in the death patients and 275.6±111.7 (113-509) U/L in patients who were still alive; the LDH levels of the dead MM patients were higher than those of the patients who were still alive (Figure 6)

The patients were divided into two categories as ≥3.5 g/dL albumin level and <3.5 g/dL albumin level, and the mortality rate in patients with albumin <3.5 g/dL (66.7%) was found to be higher compared to patients with albumin ≥3.5 g/dL (35%) (Figure 7).

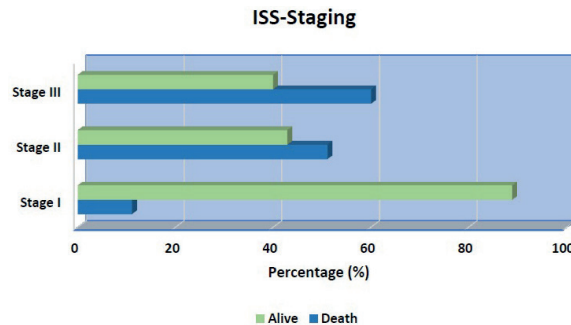


Figure 4. The ISS-Staging distributions of MM patients by mortality.

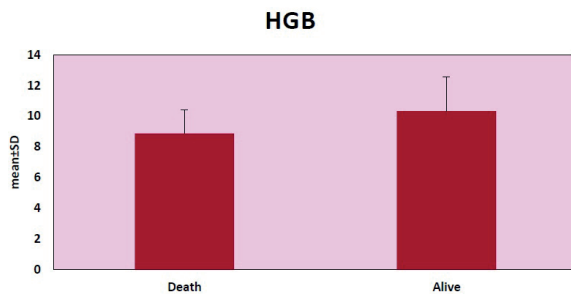


Figure 5. The HGB distributions of MM patients by mortality.

No significant correlation was found between PLT, beta-2 microglobulin, ESR, CRP levels, NLR, and mortality (p=0.336, p=0.129, p=0.230, p=0.378, p=0.965, respectively). It is noteworthy that the ESR measurements of the dead patients were higher than those of the patients who were still alive (p>0.05).

We found a higher OS in patients with albumin ≥3.5 g/dL compared to patients with albumin <3.5 g/dL (p=0.028, p<0.05) (Figure 8).

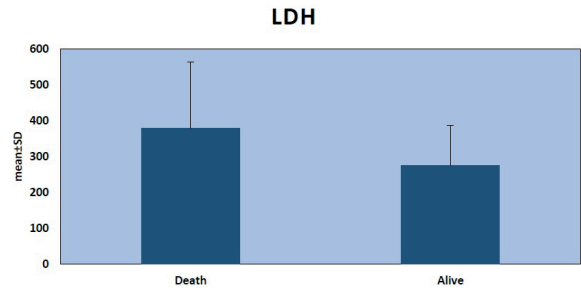


Figure 6. The LDH distributions of MM patients by mortality.

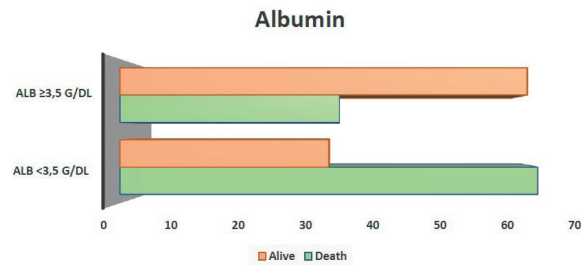


Figure 7. The albumin distributions of MM patients by mortality.

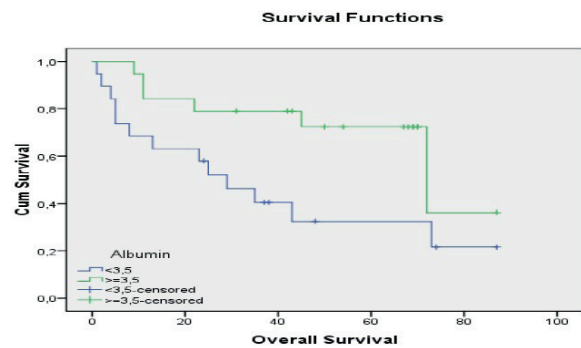


Figure 8. Survival rate correlation with albumin level.

DISCUSSION

MM accounts for 1% of all cancers and approximately 15% of hematological cancers. Thus, it is the second most common hematological cancer. MM

occurs more frequently in men than in women, and the cause is unknown (3). In our study, 47.5% males and 52.5% females were diagnosed with MM. The male-to-female ratio was found to be 0.90, and therefore, the ratio in our study was not consistent with the worldwide literature. The median age at diagnosis is 65 years in Europe, and 69 years in the USA, and it is rarely diagnosed under 40 years (3,10). The median age in our study was 61.2 yr. Accordingly, our population was still younger compared with the literature. We found no significant association between age and survival.

The previous studies reported that gender had no statistically significant effect on prognosis and OS in MM patients (8,13,16,17). In our study, similar to the literature, no significant correlation was found between gender and both mortality and OS.

Studies have demonstrated that higher stages of the disease tend to correlate with a poor prognosis (6,8,9,12). In our study, consistent with the previous results, there was a statistically significant correlation between the ISS stage and mortality.

According to the study by Zhou et al. the IgD subtype was shown to be an independent risk factor for prognosis, and it was associated with a poor OS (11). In our study, the majority of the study population also had IgG.

Pleural effusion (PE) is a poor prognosis factor in patients with MM. In our study, the incidence of PE was as high as 15.4%. The reason for the high incidence of PE in our study may due to the small number of cases.

Osteolytic lesions are one of the most common clinical manifestations of MM. In our study, more than half of the patients had bone lesions at the time of diagnosis.

Anemia is considered to be a poor prognostic factor in MM patients (14). In our study, the mean Hb concentration was 9.63, and 62.5% of patients had <10 mg/dL HGB level. Our findings were similar to those in the literature. Anemia in MM patients was associated with a worse outcome in the literature (13,14,20,21). In our study, similar to the literature, there was a statistically significant relationship between hemoglobin level and mortality.

Recent studies showed that a decreased PLT level predicts poor prognosis in MM patients (6,8,9,22). In our study, no significant correlation was found between PLT level and both mortality and OS in patients with MM. However, similar to our study, some studies reported no significant relationship between the PLT level and OS (5,15).

Recently, it has been suggested that the NLR can be used to predict prognosis in patients with MM. It has been reported in previous publications that an elevated NLR was associated with shortened OS in MM patients (4-6,23). In our study, there was no relationship between the NLR and both mortality and OS in patients with MM. However, similar to our study, no significant correlation between NLR and mortality and OS was demonstrated in other studies (9,15).

Serum beta-2 microglobulin and LDH are the most important markers for estimating the proliferative activity and invasive potential of MM (16). In our study, a high level of beta-2 microglobulin was found in 91.2% patients, while 62.5% of patients in our study had a high LDH level. We found no significant correlation between beta-2 microglobulin level and mortality and OS. The elevated LDH level has been frequently shown to indicate an unfavorable prognosis (8,17,18,19,23). Similar to previous studies, our study found a statistically significant relationship between LDH level and mortality.

A relationship between low albumin level and poor outcomes of MM patients has been demonstrated in the literature (8,24,25,26). In addition, similar to the literature, our study found a statistically significant relationship between albumin level and both mortality and OS, and the patients with low albumin levels had a poor survival.

CONCLUSION

Our study retrospectively evaluated the correlation between clinical and laboratory parameters and mortality and OS in patients with MM. The current study showed that there is a significant relationship between higher stages of the disease and mortality. In addition, anemia, low albumin levels, and elevated LDH levels indicated poor survival time in patients with MM.

In summary, our study showed no relation between NLR and both mortality and OS. The reason for this could be that our study had some limitations such as the use of retrospective data from a single-center and the small sample size.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan alınmıştır. (20.12.2018 tarihli, 1743 sayılı).

Ethics Committee Approval: This study was approved by the Ethical Committee of the Istanbul University Istanbul Faculty of Medicine (Date: 20.12.2018, Number: 1743).

Bilgilendirilmiş Onam: Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Informed Consent: Written consent was obtained from the participants.

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

Author Contributions: Conception/Design of Study- C.T., T.S.A., A.M., M.A.; Data Acquisition- N.A., S.B.; Data Analysis/Interpretation- A.M., M.A., N.A.; Drafting Manuscript- A.M., N.A., S.B.; Critical Revision of Manuscript- C.T., T.S.A., M.A.; Final Approval and Accountability- A.M., N.A., S.B., M.A., T.S.A., C.T.; Technical or Material Support- N.A., S.B.; Supervision- C.T., T.S.A.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

Financial Disclosure: Authors declared no financial support.

REFERENCES

- Spicka I. Advances in multiple myeloma therapy during two past decades. *Comput Struct Biotechnol J* 2014;10(16):38-40.
- Hameed A, Brady JJ, Dowling P, Clynes M, O'Gorman P. Bone disease in multiple myeloma: pathophysiology and management. *Cancer Growth Metastasis* 2014;7:33-42.
- Jameson JL, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Fauci AS, Loscalzo J, editors. *Harrison's principles of internal medicine 2018*. Published by McGraw Hill Medical Books.
- Kelkitli E, Atay H, Çilingir F, Güler N, Terzi Y, Özatlı D, et al. Predicting survival for multiple myeloma patients using baseline neutrophil/lymphocyte ratio. *Ann Hematol* 2014;93(5):841-6.
- Wongrakpanich S, George G, Chaiwatcharayut W, Biso S, Candelario N, Mittal V, et al. The Prognostic Significance of Neutrophil-to-Lymphocyte and Platelet-to-Lymphocyte Ratios in Patients With Multiple Myeloma. *J Clin Lab Anal* 2016;30(6):1208-13.
- Shi L, Qin X, Wang H, Xia Y, Li Y, Chen X, et al. Elevated neutrophil-to-lymphocyte ratio and monocyte-to-lymphocyte ratio and decreased platelet-to-lymphocyte ratio are associated with poor prognosis in multiple myeloma. *Oncotarget* 2017;8(12):18792-801.
- Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos M-V, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014;15(12):e538-e48.
- Greipp PR, Miguel JS, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J, et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005;23(15):3412-20.
- Solmaz S, Uzun O, Acar C, Sevindik O, Piskin O, Ozsan H, et al. Is the platelet-to-lymphocyte ratio a new prognostic marker in multiple myeloma?. *J Lab Physicians* 2018;10(4):363-9.
- Willenbacher E, Weger R, Rochau U, Siebert U, Willenbacher W. Real-World Use of 3rd Line Therapy for Multiple Myeloma in Austria: An Austrian Myeloma Registry (AMR) Analysis of the Therapeutic Landscape and Clinical Outcomes prior to the Use of Next

- Generation Myeloma Therapeutics. *PLoS One* 2016;11(3):e0147381.
11. Zhao Q, Li F, Song P, Zhou X, An Z, Mei J, et al. Poor outcomes of immunoglobulin D multiple myeloma patients in the era of novel agents: a single-center experience. *Cancer Commun (Lond)* 2019;39(1):51.
 12. Andriandi, Kamal AF. Survival rate of multiple myeloma patients in Indonesia: A retrospective study in multiple myeloma at a single institution. *Ann Med Surg (Lond.)* (2019). 2019;41:11-5.
 13. Acquah ME, Hsing AW, McGuire V, Wang S, Birmann B, Dei-Adomakoh Y. Presentation and survival of multiple myeloma patients in Ghana: a review of 169 cases. *Ghana Med J* 2019;53(1):52-8.
 14. Birgegard G, Gascon P, Ludwig H. Evaluation of Anaemia In Patients With Multiple Myeloma And Lymphoma: Findings of the European Cancer Anaemia Survey. *Eur J Haematol* 2006;77(5):378-86.
 15. Atallah JP, Azab B, Vivekanandarajah A, Naboush A, Sater HA, Farhan M, et al. Elevated Neutrophil: Lymphocyte Ratio Does Not Predict Survival In Multiple Myeloma Patients. *Blood* 2013;122(21):5336.
 16. Rossi D, Fangazio M, De Paoli L, Puma A, Riccomagno P, Pinto V, et al. Beta-2-microglobulin is an independent predictor of progression in asymptomatic multiple myeloma. *Cancer* 2010;116(9):2188-200.
 17. Gu Y, Yuan Y-H, Xu J, Shi Q-L, Qu X-Y, Guo R, et al. High serum lactate dehydrogenase predicts an unfavorable outcome in Chinese elderly patients with multiple myeloma. *Oncotarget* 2017;8(29):48350-61.
 18. Patel KK, Orlowski RZ, Weber DM, Wang M, Thomas SK, Shah JJ, et al. Prognostic value of serum lactate dehydrogenase in symptomatic multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2012.
 19. Gkotsamanidou M, Kastritis E, Gavriatopoulou MRMMM, Nikitas N, Gika D, Mparmparousi D, et al. Increased serum lactate dehydrogenase should be included among the variables that define very-high-risk multiple myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2011;11(5):409-13.
 20. Caro JJ, Salas M, Ward A, Goss GJC. Anemia as an independent prognostic factor for survival in patients with cancer: a systematic, quantitative review. *Cancer* 2001;91(12):2214-21.
 21. San Miguel JF, Sanchez J, Gonzalez MJBjoc. Prognostic factors and classification in multiple myeloma. *Br J Cancer* 1989;59(1):113.
 22. Jung S-H, Kim JS, Lee WS, Oh SJ, Ahn J-S, Yang D-H, et al. Prognostic value of the inverse platelet to lymphocyte ratio (iPLR) in patients with multiple myeloma who were treated up front with a novel agent-containing regimen. *Ann Hematol* 2016;95(1):55-61.
 23. Zhou X, Wang J, Xia J, Cheng F, Mao J, Zhu J, et al. Evaluation of neutrophil-to-lymphocyte ratio in newly diagnosed patients receiving bortezomib-based therapy for multiple myeloma. *Cancer Biomark* 2018;22(1):43-8.
 24. Mihou D, Katodritou E, Zervas KJH. Multiple myeloma staging based on the combination of beta-2-microglobulin and albumin: the role of albumin in the model. *Hematology* 2007;12(6):527-31.
 25. Scudla V, Budikova M, Fischerova E, Zadrazil J, Indrak K. Stratification of multiple myeloma according to serum beta 2-microglobulin and serum albumin levels. *Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med* 1991;130:201-12.
 26. Bataille R, Durie B, Grenier J, Sany JJoCO. Prognostic factors and staging in multiple myeloma: a reappraisal. *J Clin Oncol* 1986;4(1):80-7.



Cerrahi Kliniklerinde Yatan Hastaların Anksiyete ve Depresyon Düzeylerinin Belirlenmesi*

Determination of Level of Anxiety and Depression of Patients Hospitalized in Surgery Clinics

Fadime Gök¹ , Filiz Kabu Hergül¹ 

ÖZ

Amaç: Tanımlayıcı ve kesitsel tipteki bu araştırmanın amacı, cerrahi kliniklerinde yatan hastaların anksiyete ve depresyon düzeylerinin belirlenmesi ve ilişkili olabilecek faktörlerin incelenmesidir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmanın başlangıcında evren bilinmediği için örneklem sayısı “evreni bilinmeyen örneklem formülü” ile hesaplandı. Çalışmanın örnekleme bu yöntemle 740 hasta olarak hesaplanmış olup, çalışmanın planlandığı sürenin (Şubat 2015 – Eylül 2015) sonuna kadar çalışma sürdürüldü. Bu sürenin sonunda 774 hasta çalışmaya dahil edildi. Veriler hastaların sosyo-demografik verilerinin yer aldığı “Tanıtıcı Özellikler Formu” ve “Hastane Anksiyete Depresyon Ölçeği” aracılığıyla toplandı. Verilerin değerlendirilmesinde ortalama, standart sapma, sayı, yüzde, Kruskal-Wallis, Independent- Sample T Testi ve One- Way ANOVA testi kullanıldı.

Bulgular: Hastaların en genci 18, en büyüğü 95, ortalama 54,81±17,77 yaşında olup, en az 1 en çok 150, Medyan:8,31, 1R:6 gündür hastanede yatmaktadır. Hastaların %54,1'i erkek, %50,3'ü ilkökul mezunu, %35,3'ü ev hanımıdır. Hastaların Hastane Anksiyete Ölçeği'nden ortalama 7,96±4,27, Hastane Depresyon Ölçeği'nden ortalama 7,95±4,47 puan aldığı saptandı. İleri yaş grubunda olan, okur-yazar olmayan, hastanede uzun süre kalan, kronik hastalığı olan, hemşirelik bakımından memnun olmayan, ekonomik durumu kötü olan ve sosyal güvencesi olmayan hastaların hem anksiyete düzeyleri, hem de depresyon düzeyleri daha yüksek olarak bulundu. Hastaların medeni durumları, yaşadığı yer, tedavi gördüğü hastane/klinik, hastanede yatma ve ameliyat olma deneyimi, kanser tanısı alma durumu, ameliyat öncesi /sonrası dönem, sağlık personeli ile iletişim kurabilme, hastalığı hakkında bilgi alma, destek alma ve gereksinimlerinin karşılanması durumu ile anksiyete ve depresyon düzeyi puan ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı saptandı ($p>0.05$).

Sonuç: Hastaların anksiyete puan ortalaması ölçek kesme puanının altında, depresyon puan ortalaması ise ölçek kesme puanının üstündedir. Sonuç olarak çalışmamızda cerrahi hastaların depresyon açısından risk altında olduğu belirlenmiştir. Cerrahi birimlerde çalışan hemşirelerin bu riskleri göz önünde bulundurarak bakımlarını planlamaları ile hasta bakım kalitesinin artacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Cerrahi hasta, depresyon, anksiyete, hemşirelik

ABSTRACT

Objective: The objective of this descriptive and cross-sectional study is the determination of level of anxiety and depression of the patients hospitalized in surgery clinics and the factors which may be associated.

Materials and Methods: The population was unknown at the beginning of the study and therefore the sample size was calculated to be 740 by using the "sample formula of unknown universe". The study continued until the end of the planned period (February 2015 - September 2015). By the end of this period, 774 patients were included in the study. The data were collected through the "Participant Information Form" containing the socio-

* Bu çalışma 10-12 Temmuz 2017 tarihinde Berlinde "23rd World Nursing and Healthcare Conference"nda sözel bildiri olarak sunulmuştur.

¹ Pamukkale Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Hemşirelik Bölümü, Denizli, Türkiye

ORCID: E.G. 0000-0003-0415-4229;
E.K.H. 0000-0002-9171-7546

Corresponding author/Sorumlu yazar:

Filiz Kabu Hergül,
Pamukkale Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi,
Hemşirelik Bölümü, Denizli, Türkiye
E-mail: filizhergul35@gmail.com

Submitted/Geliş tarihi: 03.07.2020

First Revision Received/İlk revizyon: 28.07.2020

Last Revision Received/Son revizyon: 09.10.2020

Accepted/Kabul Tarihi: 19.10.2020

Citation/Atf: Gök F, Kabu Hergül F.
Determination of level of anxiety and depression
of patients hospitalized in surgery clinics. Sağlık
Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi 2020; 3(3):
195-206.
<https://doi.org/10.26650/JARHS2020-763519>



demographic data of the patients and the "Hospital Anxiety Depression Scale". For evaluation of the data; mean, standard deviation, count, percentage, Kruskal-Wallis, Independent-Sample T test and One-Way ANOVA test were used.

Results: Of the patients, the youngest was 18, the oldest was 95 and the mean age was 54.81 ± 17.77 ; they were hospitalized for at least 1, at most 150, Median: 8.31, IR: 6 days. Of the patients, 54.1% were male, 50.3% were primary school graduate and 35.3% were housewives. The patients were determined to score a mean of 7.96 ± 4.27 points on the Hospital Anxiety Scale and a mean of 7.95 ± 4.47 points on the Hospital Depression Scale. Both anxiety and depression levels were higher in patients of the advanced age group, who were illiterate, had been hospitalized for a long period, had a chronic disease, were unsatisfied with their nursing care, of poor economic status and without social security. There was no statistically significant difference between "Hospital Anxiety Depression Scale" mean scores ($p > 0.05$) and patients' marital status, their place of residence, the hospital / clinic where they received treatment, their experience of hospitalization and surgery, their status of being diagnosed with cancer, their pre / post-operative period, their communication with healthcare personnel and getting information and getting support about the disease and meeting their needs.

Conclusion: The mean anxiety score of the patients was below the cut-off score and the mean depression score was above the cut-off score. As a result, the study concluded that surgical patients were at risk for depression. The quality of patient care will increase when nurses working in surgical units plan their care by taking these risks into consideration.

Keywords: Surgical patient, depression, anxiety, nursing

GİRİŞ

Hastalığa ilişkin tanı ne olursa olsun bireyi biyolojik, duygusal ve sosyal olarak olumsuz etkilemektedir (1,2). Hastaneye yatan hastalar hastalıklarının yanı sıra tedavi sürecinde ve tedaviden sonraki süreçte birtakım zorluklar yaşayabilirler ve tüm bunların sonucunda endişeye kapılabilirler (3,4). Hastalarda görülen anksiyete ve depresyonun nedeni, hastaneye olan uyum zorluğu ya da tanı ve tedavi sürecindeki belirsizlik olabilir (5). Bu süreçte hastalar tanıda belirsizlik, ölüm korkusu gibi stresli deneyimlerle karşılaşabilirler. Bunların dışında hastalar, beden imajında meydana gelen değişiklikler, öz bakım ihtiyaçlarını karşılamada yetersizlik nedeniyle psikolojik sıkıntılar yaşayabilmektedirler (4). Literatürde hastaların yaşadığı emosyonel problemlerin başında anksiyete ile depresyonun geldiği (2) ve prevalansının %20 ile %60 arasında değiştiği belirtilmektedir (4).

Cerrahi hastalarda tüm bunların yanı sıra ameliyat öncesi dönemde kontrol kaybı, ameliyat sonrası ağrı, ameliyat gününde belirsizlik ve ölüm korkusuyla sık karşılaşmaktadır (4,6). Ayrıca bu süreçte hastalar uyanamama, vücut bütünlüğünün bozulması, organ ve doku kaybı, cinsel yaşamla ilgili problem yaşama gibi konularda da korku ve kaygılara sahip olabilirler (6,7,8,9,10). Literatürde bu tür tepkilerin anksiyete, depresyon, geri çekilme ve inkar olarak karşımıza çıkabileceği vurgulanmakta (9) ve ameliyat sonrasında daha fazla tıbbi komplikasyona neden olacağı bildirilmektedir (6). Hastalar cerrahi travma nedeniyle korku ve endişe duyabilirler. Bu sebeplerle bu gruptaki hastalar, anksiyete ve depresyon açısından risk altındadırlar (3,7,11). Cerrahi hastalarda depresyon ve anksiyete özellikle ameliyat öncesi dönemde ve tedavisi zor kronik hastalıkları olan hastalarda yaygın olarak görülmektedir (4,5,7,8).

Cerrahi hastalarda karşımıza çıkabilecek psikolojik bozuklukların ve fiziksel hastalıkların tanı ve tedavisini kolaylaştırmak için, risk faktörlerinin yanı sıra ilişkili faktörler de bilinmelidir (4). Hastanede kalış süresi uzayan hastaların, postoperatif komplikasyon gelişen hastaların, ailevi destek eksikliği olan hastaların ve yeniden işleme ihtiyaç duyulan hastaların anksiyete ve depresyon risklerinin diğer cerrahi hastalara

göre daha yüksek olduğu belirtilmektedir (5). Anksiyete ve depresyonun ameliyat sürecindeki olumsuz etkilerinden dolayı, ameliyat öncesi dönemde kaygının kontrolü güvenli ve sorunsuz bir operasyon için çok önemlidir (9). Ameliyat öncesi ve ameliyat sürecinin yanı sıra anksiyete ve depresyon ameliyat sonrası süreçte de karşımıza çıkabilmektedir. Anksiyete ve depresyonun ameliyat sonrası dönemde işlev bozukluğuna neden olduğu, intihar oranını arttırdığı, yaşam kalitesini düşürdüğü, hastalıkların iyileşmesini olumsuz yönde etkilediği, hastanede kalış süresini uzattığı ve sağlık hizmetleri maliyetlerini artırdığı vurgulanmaktadır (2,4,9). Tüm bunların yanı sıra hastalarda anksiyete ve depresyon oranları arttıkça cerrahi ile ilişkili risklerin arttığı ortaya konulmakta, anksiyete ve depresyonun taburculuk sonrası psikiyatrik bozukluklara neden olduğu, mortalite ve morbidite oranlarının arttırdığı belirtilmektedir (2,3,5).

Hastalarda anksiyete ve depresyon düzeylerinin belirlenmesi kaliteli sağlık hizmeti verilebilmesi açısından oldukça önemlidir (1,3,12). Hastaların duyu durum bozuklukları ile ilgili risk düzeylerinin saptanması, anksiyete ve depresyon düzeylerinin tespiti kolaylaştırır (5). Bu nedenle sağlık profesyonellerinin anksiyete ve depresyon düzeylerinin belirlenmesi ve psikososyal yaklaşımlar konusunda yeterli donanıma sahip olması gerekmektedir (1,3,12). Literatürde psikososyal yaklaşımların hastada güven duygusunu arttırdığı, fiziksel şikayetlerini azalttığı, hastalıkla ilişkili oluşan olumsuz duygusal tepkilerle baş etme yeteneğini ve yaşam kalitesini arttırdığı bildirilmektedir (1). Hastaların endişelerinin kaynaklarını tanımlamak ve bu konuyla ilgili rahatlamalarını sağlamak cerrahi süreçte oldukça önemlidir (9).

Cerrahi hastalarda anksiyete ve depresyonu tanıyabilmenin ameliyat öncesi ve ameliyat sonrası dönemde hasta bakım kalitesinin artırılmasında önemli rol oynayacağı düşünülmektedir. Bu nedenle bu çalışma cerrahi kliniklerinde yatan hastaların anksiyete, depresyon düzeyleri ve etkileyen faktörlerin belirlenmesi amacıyla tanımlayıcı ve kesitsel olarak yapıldı.

Araştırma soruları;

- Cerrahi kliniklerinde yatan hastaların anksiyete ve depresyon görülme riski nedir?

- Cerrahi kliniklerinde yatan hastaların anksiyete ve depresyon düzeylerini etkileyen faktörler nelerdir?

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmanın başlangıcında evren bilinmediği için örneklem sayısı “evreni bilinmeyen örneklem formülü” ile hesaplandı. Çalışmanın örnekleme bu yöntemle 740 hasta olarak hesaplanmış olup, çalışmanın planlandığı sürenin (Şubat 2015 – Eylül 2015) sonuna kadar çalışma sürdürüldü. Bu sürenin sonunda 774 hasta çalışmaya dahil edildi. Gerekli yazılı izinler (etik kurul, kurum izni) alındıktan sonra gönüllülük ilkesine bağlı kalınarak, dahil olma kriterlerine uygun, araştırmaya katılmaya kabul eden tüm hastalar araştırma örnekleme dahil edildi.

Dahil Olma Kriterleri; Çalışmanın amacı ve yöntemi açıklandıktan sonra, çalışmaya katılmayı kabul eden, Türkçe konuşan, okuyup yazabilen, 18 yaş üzeri, görme, işitme engeli olmayan, rahat iletişim kurulabilen, aynı ortamda en az iki gün kalmış olan, anket formunu doldurabilen cerrahi kliniklerde yatmakta olan tüm hastalar çalışmaya dahil edildi (n=774).

Dışlama Kriterleri; 18 yaşını doldurmamış olan, okuma yazması olmayan, iletişimi engelleyecek herhangi bir fizyolojik ve psikiyatrik (görme-ışitme) problemi olan, aynı ortamda iki günden az kalan ve anket formunu dolduramayacak olan hastalar çalışmadan dışlandı. Verilerin toplanmasında; Hastaların sosyo-demografik verilerinin yer aldığı “Tanıtıcı özellikler formu” ve “Hastane Anksiyete Depresyon Ölçeği” kullanıldı.

I-Tanıtıcı özellikler formu (Ek I)

Literatür bilgileri doğrultusunda hazırlanan, hastaların kişisel özelliklerini içeren 15 sorudan (yaş, cinsiyet, eğitim durumu vb.) oluşmaktadır.

II- Hastane Anksiyete Depresyon Ölçeği (Ek II)

Hastane Anksiyete Depresyon Ölçeği-HADÖ (Hospital Anxiety Depression Measure): Zigmond ve Snaith tarafından hastada anksiyete ve depresyon yönünden riski belirlemek, düzeyini ve şiddet değişimini ölçmek için 1983’de geliştirilmiştir (Genel Cronbach alfa kat sayısı: 0.88, HADS-A scale, Cron-

bach alfa: 0.90, HADS-D scale, Cronbach alfa: 0.79 dur) (13). Ölçeğin Türkiye’de geçerlilik güvenilirlik çalışması Aydemir ve arkadaşları tarafından 1997 yılında yapılmıştır (HAD-A scale, Cronbach alfa: 0.8525 HAD-D scale, Cronbach alfa: 0.7784’dür) (14). Bu çalışmada ise ölçeğin genel Cronbach alfa kat sayısı: 0.853, HADS-A scale, Cronbach alfa katsayısı: 0.764, HADS-D scale, Cronbach alfa katsayısı: 0.765 olarak bulundu. Bu ölçek bedensel hastalığı olan hastalar ve birinci basamak sağlık hizmetlerine başvuranlar için tanı koymak amaçlı değil anksiyete ve depresyonu kısa sürede tanılayıp risk grubunu belirlemek için kullanılır (14).

HADÖ toplam 14 maddeden oluşmaktadır. Tek sayılı maddeler anksiyete ve çift sayılı maddeler depresyonu ölçmektedir. Ölçek dörtlü Likert tipi bir değerlendirme aracıdır. Maddeler 0-3 arasında puanlanmaktadır. Ölçekte her maddenin puanlaması farklıdır. 1., 3., 5., 6., 8., 10., 11. ve 13. maddeler giderek azalan şiddet gösterirler ve puanlama 3, 2, 1, 0 biçimindedir Öte yandan, 2., 4., 7., 9., 12. ve 14. maddeler ise 0, 1, 2, 3 biçiminde puanlanırlar. Alt ölçeklerin toplam puanları bu madde puanlarının toplanması ile elde edilir. Anksiyete alt ölçeği için 1., 3., 5., 7., 9., 11. ve 13. maddeler toplanırken; depresyon alt ölçeği için 2., 4., 6., 8., 10., 12. ve 14. maddelerin puanları toplanır. Hastaların her iki alt ölçekten alabilecekleri en düşük puan 0, en yüksek puan 21’dir. HADÖ’nin Türkçe formunun kesme noktaları anksiyete alt ölçeği (HAD-A) için 10, depresyon alt ölçeği (HAD-D) için 7 olarak saptanmıştır (14). Bu puanların üzerinde puan elde edilen hastalar risk grubu olarak kabul edilebilir.

İstatistiksel Analiz ile İlgili Bilgi: Verilerin değerlendirilmesinde ortalama, standart sapma, yüzde, Kruskal-Wallis, Independent- Sample T Testi ve One- Way ANOVA testi kullanıldı.

Çalışmadan Çıkarılma Kriterleri

Anket formunu düzgün doldurmayan ya da araştırmaya dahil olma kriterlerine uygun olmadığı halde anket formunu dolduran hastalar çalışmadan çıkarıldı.

Etik

Araştırmanın uygulanabilmesi için Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi (12.02.2015 tarih ve 60116787-020/8537 sayılı) Etik Kurul Komitesinden ve araştırmanın yürütüldüğü hastanelerden yazılı izin alındı. Hastalardan araştırmaya katılmaya isteklilik, gönüllülük ilkesine özen gösterilerek sözel onamları alındı.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen hastaların tanıtıcı özellikleri tablo 1'de verildi. Hastaların en genci 18, en büyüğü 95 yaşında olup yaş ortalaması $54,81 \pm 17,77$ 'dir. Hasta-

ların %55,8'i ortalama 1-5 (en az 1 en çok 150, Medyan: 8,31, IR: 6) gündür hastanede yatmaktadır.

Hastaların tanıtıcı özelliklerine göre anksiyete ve depresyon düzeyi puan ortalamalarının dağılımı tablo 2'de verildi. Hastaların yaş, cinsiyet, öğrenim durumu, meslek, sağlık güvencesi, ekonomik durum, hastanede kalma süresi, ek hastalık varlığı, bilgi alma ve hemşirelik bakımından memnun olma durumlarına göre anksiyete ve depresyon puan ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu tespit edildi ($p < 0,05$, Tablo 2). Buna karşın hastaların medeni durumları, yaşadığı yer, tedavi gördüğü hasta-

Tablo 1. Hastaların Tanıtıcı Özellikleri (n=774)

| Değişkenler | Sayı | % |
|-------------------------------------|------|------|
| Yaş grupları | | |
| 18-28 yaş | 81 | 10,5 |
| 29- 39 yaş | 84 | 10,9 |
| 40-50 yaş | 140 | 18,1 |
| 51-61 yaş | 141 | 18,2 |
| 62-72 yaş | 193 | 24,9 |
| 73 yaş ve üzeri | 135 | 17,4 |
| Hastanede kalma süresi | | |
| 2-5 gün | 432 | 55,8 |
| 6-11 gün | 197 | 25,5 |
| 12-16 gün | 76 | 9,8 |
| 17-21 gün | 20 | 2,6 |
| 22 gün ve üzeri | 49 | 6,3 |
| Cinsiyet | | |
| Kadın | 355 | 45,9 |
| Erkek | 419 | 54,1 |
| Medeni durum | | |
| Evli | 610 | 78,8 |
| Bekar | 164 | 21,2 |
| Öğrenim durumu | | |
| Okur-yazar değil | 22 | 2,8 |
| Okur-yazar | 85 | 11,0 |
| İlköğretim | 389 | 50,3 |
| Ortaöğretim | 93 | 12,0 |
| Lise | 109 | 14,1 |
| Yüksekokul | 76 | 9,8 |
| Mesleği | | |
| Ev hanımı | 273 | 35,3 |
| İşçi | 141 | 18,2 |
| Emekli | 193 | 24,9 |
| Memur | 51 | 6,6 |
| Öğrenci | 25 | 3,2 |
| Serbest | 57 | 7,4 |
| Çiftçi | 34 | 4,4 |
| Sağlık güvencesi olma durumu | | |
| Var | 726 | 93,8 |
| Yok | 48 | 6,2 |
| Ekonomik durum | | |
| İyi | 86 | 11,1 |
| Orta | 594 | 76,7 |
| Kötü | 94 | 12,1 |

| | | |
|--|-----|------|
| En uzun yaşadığı yer | | |
| Köy | 192 | 24,8 |
| Kasaba | 48 | 6,2 |
| İlçe | 237 | 30,6 |
| İl merkezi | 297 | 38,4 |
| Yattığı hastane | | |
| Pamukkale Üniversitesi Hastanesi | 575 | 74,3 |
| Denizli Devlet Hastanesi | 199 | 25,7 |
| Tedavi gördüğü klinik | | |
| Genel Cerrahi | 184 | 23,8 |
| Ortopedi | 146 | 18,9 |
| Üroloji | 104 | 13,4 |
| Kalp Damar cerrahisi | 110 | 14,2 |
| Beyin Cerrahisi | 118 | 15,2 |
| Plastik Cerrahi | 52 | 6,7 |
| KBB | 60 | 7,8 |
| Tanı | | |
| Kanser cerrahisi | 109 | 14,1 |
| Kanser Dışı Cerrahi | 665 | 85,9 |
| Hastanede Yatma Deneyimi olma durumu | | |
| Var | 560 | 72,4 |
| Yok | 214 | 27,6 |
| Ameliyat deneyimi olma durumu | | |
| Var | 490 | 63,3 |
| Yok | 284 | 36,7 |
| Ameliyat olma durumu | | |
| Evet | 529 | 68,3 |
| Hayır | 245 | 31,7 |
| Hastanede kalma süresi | | |
| 2-5 gün | 432 | 55,8 |
| 6-11 gün | 197 | 25,5 |
| 12-16 gün | 76 | 9,8 |
| 17-21 gün | 20 | 2,6 |
| 22 gün ve üzeri | 49 | 6,3 |
| Ek hastalık varlığı | | |
| Var | 345 | 44,6 |
| Yok | 429 | 55,4 |
| Bilgi alma durumu | | |
| Evet | 653 | 84,4 |
| Hayır | 121 | 15,6 |
| Bilgi alınan kişi (n=653) | | |
| Hemşire | 158 | 20,4 |
| Hekim | 348 | 45,0 |
| Hemşire+Hekim | 147 | 19,0 |
| İletişim kurabilme durumu | | |
| Evet | 707 | 91,3 |
| Hayır | 67 | 8,7 |
| Aile ya da arkadaşlarından destek alma durumu | | |
| Evet | 736 | 95,1 |
| Hayır | 38 | 4,9 |
| Gereksinimlerinin karşılanma durumu | | |
| Evet | 686 | 88,6 |
| Hayır | 88 | 11,4 |
| Hemşirelik bakımından memnun olma durumu | | |
| Evet | 710 | 91,7 |
| Hayır | 64 | 8,3 |

ne/klinik, hastanede yatma ve ameliyat olma deneyimi, kanser tanısı alma durumu, ameliyat öncesi /sonrası dönem, sağlık personeli ile iletişim kurabilme, hastalığı hakkında bilgi alma, destek alma ve gereksinimlerinin karşılanması durumu ile anksiyete ve depresyon düzeyi puan ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı saptandı ($p>0.05$).

Yetmiş üç ve üzeri yaş grubu hastaların anksiyete ve depresyon düzeyi puan ortalaması diğer yaş gruplarına göre daha yüksek olarak belirlendi. Hastaların yaş grupları ile depresyon düzeyi puan ortalaması arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmasına rağmen, anksiyete düzeyi puan ortalaması arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Tablo 2).

Hastaların cinsiyetleri ile anksiyete düzeyleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmasına karşın, depresyon düzeyleri arasındaki fark anlamlı bulunmadı. Kadınların anksiyete düzeyi puan ortalamaları erkeklere göre daha yüksek bulundu (Tablo 2).

Hastaların öğrenim durumlarına göre anksiyete ve depresyon düzeyi puan ortalamaları incelendiğinde, okur-yazar olmayanların puan ortalamalarının diğer hastalardan daha yüksek olduğu görüldü. Hastaların öğrenim durumları ile depresyon puan ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmasına rağmen, anksiyete puan ortalaması arasındaki fark anlamlı değildi. Okur-yazar olmayan hastaların anksiyete ve depresyon düzeyleri daha yüksek bulundu (Tablo 2).

Ev hanımı olan hastaların hem anksiyete, hem depresyon düzeyi puan ortalamaları daha yüksek olmasına rağmen sadece anksiyete düzeyi puan ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Sosyal güvencesi olmayan ve ekonomik durumu kötü olan hastaların anksiyete ve depresyon düzeyleri daha yüksekti. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi (Tablo 2).

Hastanede uzun süre (22 gün ve üzeri) kalan hastaların anksiyete ve depresyon düzeyi puan ortalamaları daha yüksek olmasına rağmen, sadece depresyon düzeyi arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı olarak tespit edildi. Ayrıca ek hastalığı olan hastaların anksiyete ve depresyon düzeylerinin daha

yüksek olduğu belirlendi ve anksiyete ile depresyon düzeyleri arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulundu (Tablo 2).

Kanser tanısı alan hastaların anksiyete ve depresyon düzeyi puan ortalamalarının diğer hastalara göre daha yüksek olmasına rağmen aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi.

Hastalığı hakkında bilgi alan ve almayan hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamasına rağmen; bilgi alanların anksiyete düzeyi, almayanların ise depresyon düzeyi puan ortalaması daha yüksek bulundu. Ayrıca hemşirelik bakımından memnun olmayan hastaların anksiyete ve depresyon düzeyi puan ortalamalarının daha yüksek olduğu belirlendi. İstatistiksel açıdan ise sadece anksiyete düzeyi puan ortalamaları arasındaki fark anlamlı bulundu (Tablo 2).

TARTIŞMA

Bu çalışmada hastalar genel olarak değerlendirildiğinde ($n=774$) HAD-anksiyete puan ortalaması $7,96\pm 4,2$, HAD-depresyon puan ortalaması $7,95\pm 4,47$ olarak bulundu. Hastaların anksiyete puan ortalaması ölçek kesme puanının altında, depresyon puan ortalaması ise ölçek kesme puanının üstündedir. Genel olarak hastaların depresyon bozukluğu açısından risk altında olduğu düşünülebilir.

Hastaların medeni durumları ile anksiyete ve depresyon düzeyi puan ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı saptandı. Literatürde bu çalışma bulgularına benzerlik gösteren sonuçlar olmasına rağmen (4,15,16) evlilerde ameliyat öncesi anksiyete oranının bekarlara göre daha yüksek olduğunu belirten çalışmalar da mevcuttur (17). Literatür bilgilerine paralel olarak bu çalışmada da anksiyete ve depresyon düzeyi puan ortalamaları ile ameliyat olma deneyimi arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (15). Diğer bir çalışmada, önceden cerrahi geçirenlerde ameliyat öncesi anksiyete oranının geçirmeyenlere göre daha yüksek olarak bulunduğu bildirilmektedir (17).

Destek aldığını ve almadığını ifade eden hastaların anksiyete ve depresyon düzeyi puan ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı saptandı. Literatürde ise sosyal desteği güçlü olan hastaların,

Tablo 2. Hastaların Tanıtıcı Özelliklerine Göre Anksiyete ve Depresyon Düzeyi Puan Ortalamalarının Dağılımı (n=774)

| Tanıtıcı Özellikler | Sayı | HAD-A X± SS | Önemlilik | HAD-D X±SS | Önemlilik |
|--|------|------------------|-----------------------------|-------------------|-----------------------------|
| Yaş grupları | | | | | |
| 18-28 yaş | 81 | 7,18±4,35 | F=1.618 p=0.153 | 6,62±4,16 | F=6,051 p=0,00 |
| 29- 39 yaş | 84 | 8,08±3,71 | | 7,67±4,41 | |
| 40-50 yaş | 140 | 7,87±3,92 | | 7,68±4,33 | |
| 51-61 yaş | 141 | 7,88±4,30 | | 7,26±4,12 | |
| 62-72 yaş | 193 | 7,79±4,60 | | 8,22±4,47 | |
| 73 yaş ve üzeri | 135 | 8,77±4,31 | | 9,55±4,75 | |
| Cinsiyet | | | | | |
| Kadın | 355 | 8,38±4,43 | p=0,012 t=2,507 | 7,94±4,58 | p=0,938 t=-,078 |
| Erkek | 419 | 7,613±4,10 | | 7,95±4,47 | |
| Öğrenim durumu | | | | | |
| Okur-yazar değil | 22 | 9,90±4,80 | KW=8,608 p=0,126 | 11,31±5,00 | KW=22,646 p=0,000 |
| Okur-yazar | 85 | 8,03±4,65 | | 9,09±4,84 | |
| İlköğretim | 389 | 8,09±4,22 | | 7,83±4,22 | |
| Ortaöğretim | 93 | 7,64±4,36 | | 8,16±4,26 | |
| Lise | 109 | 7,53±3,84 | | 7,55±4,58 | |
| Yüksekokul | 76 | 7,34±4,30 | | 6,67±4,57 | |
| Mesleği | | | | | |
| Ev hanımı | 273 | 8,61±4,44 | KW=14,564 p=0,024 | 8,21±4,46 | KW=11,932 p=0,06 |
| İşçi | 141 | 8,08±3,92 | | 8,31±4,25 | |
| Emekli | 193 | 7,52±4,61 | | 8,21±4,65 | |
| Memur | 51 | 7,15±3,82 | | 6,50±4,21 | |
| Öğrenci | 25 | 7,36±5,54 | | 7,12±4,96 | |
| Serbest | 57 | 7,29±4,01 | | 7,08±4,37 | |
| Çiftçi | 34 | 7,55±4,42 | | 7,14±4,14 | |
| Sağlık güvencesi olma durumu | | | | | |
| Var | 726 | 7,88±4,30 | t=-2,458 p=0,017 | 7,84±4,48 | t=-2,170 p=0,034 |
| Yok | 48 | 9,18±3,49 | | 9,20±4,09 | |
| Ekonomik durum | | | | | |
| İyi | 86 | 7,12±4,75 | F=5,463 p=0,004 | 6,54±4,71 | F=7,453 p=0,001 |
| Orta | 594 | 7,89±4,13 | | 7,98±4,43 | |
| Kötü | 94 | 9,15±4,45 | | 9,09±4,14 | |
| Hastanede kalma süresi | | | | | |
| 2-5 gün | 432 | 7,71±4,34 | KW=6,092 p=0,192 | 7,44±4,26 | KW=14,835 p=0,005 |
| 6-11 gün | 197 | 8,08±4,06 | | 8,27±4,41 | |
| 12-16 gün | 76 | 8,18±4,36 | | 8,50±4,72 | |
| 17-21 gün | 20 | 8,40±3,89 | | 8,65±3,78 | |
| 22 gün ve üzeri | 49 | 9,20±4,25 | | 10,08±5,51 | |
| Ek hastalık varlığı | | | | | |
| Var | 345 | 8,33±4,25 | t=2,183 p=0,029 | 8,32±4,48 | t=2,069 p=0,039 |
| Yok | 429 | 7,66±4,26 | | 7,65±4,44 | |
| Tanı | | | | | |
| Kanser cerrahisi | 109 | 8,00±4,52 | p=0,929 t=0,089 | 8,24±4,48 | p=0,465 t=0,731 |
| Kanser dışı cerrahi | 774 | 7,96±4,27 | | 7,90±4,47 | |
| Bilgi Alma Durumu - Alan/Almayan | | | | | |
| Evet | 653 | 8,05±4,20 | p=0,203 t=1,274 | 7,93±4,40 | p=0,754 t=-,313 |
| Hayır | 121 | 7,51±4,60 | | 8,07±4,83 | |
| Hemşirelik bakımından memnun olma | | | | | |
| Evet | 710 | 7,96±4,28 | t=-,127 p=0,899 | 7,84±4,41 | t=-2,333 p=0,020 |
| Hayır | 64 | 8,03±4,13 | | 9,20±4,92 | |

ameliyat öncesi anksiyete düzeylerinin daha düşük olduğu belirtilmektedir (17). Cerrahi hastaların incelendiği diğer bir çalışmada benzer şekilde ailesel desteği düşük olan hastaların, destek sistemleri daha iyi olan hastalara göre anksiyete ve depresyon açısından

risk altında oldukları vurgulanmaktadır (5).

Çalışma bulgularına göre; yetmiş üç yaş ve üzeri hastaların anksiyete ve depresyon düzeyi puan ortalaması diğer yaş gruplarına göre daha yüksek olarak belirlendi. Hastaların yaş grupları ile depresyon dü-

zeyi puan ortalaması arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmasına rağmen anksiyete düzeyi puan ortalaması arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Tablo 2). Literatürde de bu çalışma bulgularına benzer şekilde 60 yaş üstü hastaların tamamının depresyonda olduğu ve %75'inde anksiyete bulgularının gözlemlendiği belirtilmektedir (18). Konuyla ilgili yapılan farklı çalışmalarda aynı şekilde 65 yaş ve üzerindeki hastalarda depresyon görülme oranları diğer yaş gruplarındaki hastalara göre daha yüksek olduğu (4), 60 yaş ve üzerindeki hastalarda ameliyat öncesi anksiyete oranının diğer yaş gruplarına göre daha yüksek olduğu bildirilmektedir (17).

Cerrahi hastalarda anksiyete ve depresyon düzeylerinin incelendiği bir başka çalışmada 35 yaş ve üstü olan hastaların anksiyete puanlarının daha yüksek ve aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bildirilmektedir (3). Cerrahi hastaları ile yapılan farklı çalışmalarda ise hastaların yaşı ile anksiyete ve depresyon görülme düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişkinin olmadığı belirtilmektedir (15,16). Benzer şekilde kalp damar cerrahisi hastaları ile yapılan bir diğer çalışmada da yaş grupları ile anksiyete ve depresyon belirtileri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadığı ortaya konulmaktadır (19).

Hastaların cinsiyetlerine göre anksiyete düzeyleri arasındaki fark çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlı olmasına rağmen, depresyon düzeyleri arasındaki fark anlamlı bulunmadı. Kadınların anksiyete düzeyi puan ortalamalarının erkekler göre daha yüksek olduğu belirlendi (Tablo 2). Literatürde cerrahi kliniklerde yatan hastaların dahil edildiği bir çalışmada bizim çalışmamıza benzer şekilde şiddetli anksiyete görülme oranı kadınlarda %68,5 iken erkeklerde %53,3 olarak belirlenmiştir. Yine aynı çalışmada kadın hastalarda depresyon görülme oranlarının da erkeklerden daha fazla olduğu belirtilmektedir (18). Bir başka çalışmada da hastalarda anksiyete ve depresyon düzeylerine bakılmış, depresyon düzeyleri kadın ve erkek hastalarda farklılık göstermezken anksiyete düzeyleri kadınlarda (%45,5) erkeklerde (%30,6) göre daha yüksek düzeyde belirlenmiştir (4). Kalp damar cerrahisi hastalarında anksiyete ve depresyon düzeylerinin incelendiği bir

çalışmada da; kadınlarda anksiyete ve depresyon düzeyleri ameliyat öncesi dönemde erkekler göre daha yüksek bulunmuş ve aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirtilmiştir (19). Cerrahi hastaların incelendiği bir çalışmada kadınlarda anksiyete ve depresyon oranları erkeklerden daha yüksek bulunmuş (5,16), bir başka çalışmada ise kadın cinsiyet ve yüksek anksiyete puanları arasındaki ilişkinin anlamlı olduğu belirlenmiştir (3,20). Kanseri hastalarının dahil edildiği bir başka çalışmada da; kadınlarda anksiyete ve depresyon düzeylerinin daha yüksek olduğu ortaya konulmuştur (21). Tüm bunların yanı sıra cerrahi hastaların incelendiği bir çalışmada; hastaların cinsiyeti ile anksiyete ve depresyon görülme düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişkinin olmadığı belirtilmiştir (15). Tüm bunların yanı sıra farklı bir çalışmada erkek hastalarda ameliyat öncesi anksiyete görülme oranı kadın hastalardan daha yüksek bulunmuştur (17).

Hastaların öğrenim düzeylerine göre anksiyete ve depresyon düzeyi puan ortalamaları incelendiğinde çalışmamızda okur-yazar olmayan hastaların puan ortalamalarının diğer hastalardan daha yüksek olduğu görüldü. Hastaların öğrenim durumları ile depresyon puan ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmasına rağmen, anksiyete puan ortalaması arasındaki fark anlamlı değildir. Okur-yazar olmayan hastaların anksiyete ve depresyon düzeyleri daha yüksektir (Tablo 2). Literatürde de hastaların öğrenim durumları ile anksiyete ve depresyon düzeylerinin karşılaştırılması ile ilgili yapılan bir çalışmada bu çalışma sonuçlarına benzer şekilde okur-yazar olmayan hastaların anksiyete ve depresyon düzeylerinin üniversite mezunu olan hastalara göre daha yüksek olarak tespit edildiği bildirilmektedir (4). Cerrahi hastaların incelendiği bir başka çalışmada da okur-yazar olmayanların anksiyete ve depresyon puan ortalamalarının diğer gruplardan daha yüksek olduğu vurgulanmakta, hastaların eğitim durumları ile anksiyete ve depresyon puan ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı ortaya konulmaktadır (16). Konuyla ilgili yapılan diğer çalışmalarda da eğitim seviyesi düşük olan hastalarda diğer gruplara göre anksiyete ve depresyon oranları-

nın daha yüksek olduğu belirtilmekte, düşük eğitim düzeyi ile yüksek anksiyete ve depresyon puanları arasındaki ilişkinin anlamlı olduğu vurgulanmaktadır (3,5,15,17,22).

Çalışmamızda ev hanımı olan hastaların hem anksiyete hem de depresyon düzeyi puan ortalamaları daha yüksek olmasına rağmen sadece anksiyete düzeyi puan ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Cerrahi hastaların incelendiği bir başka çalışmada da ev hanımı olan hastaların anksiyete ve depresyon puanlarının diğer hastalardan daha yüksek olarak bulunduğu bildirilmektedir (16). Tüm bunların yanı sıra bir başka çalışmada ise anksiyete ve depresyon görülme düzeyleri ile hastaların meslekleri arasında anlamlı ilişkinin olmadığı belirtilmektedir (4,15).

Sosyal güvencesi olmayan ve ekonomik durumu kötü olan hastaların anksiyete ve depresyon düzeyleri çalışmamızda daha yüksek bulundu ve aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (Tablo 2). Cerrahi hastalarda anksiyete ve depresyon düzeylerinin incelendiği bir çalışmada da düşük sosyoekonomik düzey ile yüksek anksiyete puanları arasındaki ilişkinin anlamlı olduğu ve düşük gelirli grupta anksiyete düzeyinin daha yüksek olduğu belirtilmektedir (3). Depresyon oranlarının ve risk faktörlerinin incelendiği bir başka çalışmada ise ekonomik düzeyi düşük bireylerde depresyon oranlarının daha yüksek olduğu vurgulanmaktadır (22). Benzer şekilde bir başka çalışmada da sosyal desteği az olan ve düşük gelire sahip bireylerde anksiyete oranlarının daha yüksek olduğu bildirilmektedir (20).

Çalışma bulgularına göre hastanede uzun süre (22 gün ve üzeri) kalan hastaların anksiyete ve depresyon düzeyi puan ortalamaları daha yüksek olmasına rağmen, sadece depresyon düzeyi arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Literatürde de 3 haftave üzerinde hastanede kalan cerrahi hastalarda anksiyete ve depresyon düzeylerinin diğer hastalara göre daha yüksek olarak bulunduğu ifade edilmektedir (18). Cerrahi hastalarda anksiyete ve depresyon düzeylerinin incelendiği diğer çalışmalarda da, depresyon düzeylerinin hastanede kalış süresi uzadıkça arttığı belirtilmekte (5), hastanede kalış süresinin uzunluğu ile yüksek depres-

yon puanları arasındaki ilişkinin anlamlı olduğu vurgulanmaktadır (3,15).

Çalışma bulgularımıza göre ek hastalığı olan hastaların anksiyete ve depresyon düzeylerinin daha yüksek olduğu ve aradaki farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu tespit edildi (Tablo 2). Benzer şekilde literatürde de kronik hastalığı olan hastalarda olmayanlara göre ameliyat öncesi anksiyete oranının daha yüksek olduğu belirtilmektedir (17). Ayrıca uzun süreli hastalık öyküsü olan hastalarda anksiyete görülme düzeylerinin daha yüksek olduğu vurgulanmaktadır (4). Depresyon oranlarının ve risk faktörlerinin incelendiği bir başka çalışmada da kronik hastalığı olan bireylerde depresyon oranlarının daha yüksek olduğu ifade edilmektedir (22).

Kanser tanısı alan hastaların anksiyete ve depresyon düzeyi puan ortalamalarının diğer hastalara göre daha yüksek olmasına rağmen aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi. Kanser hastaları ile diğer hasta gruplarının anksiyete ve depresyon düzeylerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, kanser hastalarında diğer popülasyona kıyasla anksiyete ve depresyon düzeylerinin yaklaşık iki katı daha yüksek olduğu belirtilmektedir (23). Konuyla ilgili yapılan bir başka çalışmada da cerrahi kliniğinde yatan kanser tanısı konulmuş hastalarda anksiyete ve depresyon seviyesinin bu tanının konulmadığı hastalara göre daha yüksek olduğu ortaya konulmaktadır (3,15). Kanser teşhisi sonrası anksiyete ve depresyonun değerlendirildiği bir başka çalışmada ise, kanser teşhisinin konulduğu sürecin anksiyete ve depresyon açısından en riskli zaman olduğu vurgulanmaktadır (21). Bir başka çalışmada da normal popülasyonla kıyaslandığında kanserli hastalarda depresyon düzeyinin daha yüksek olduğu belirtilmektedir (24).

SONUÇ

Sonuç olarak; İleri yaş grubunda olan, okur-yazar olmayan, hastanede uzun süre kalan, kronik hastalığı olan, hemşirelik bakımından memnun olmayan, ekonomik durumu kötü olan ve sosyal güvencesi olmayan hastaların hem anksiyete düzeyleri, hem de depresyon düzeyleri daha yüksek olarak belirlenmiş-

tır. Ev hanımlarının anksiyete düzeyleri işçilerin ise depresyon düzeyleri daha yüksektir. Ayrıca bu çalışmada hastaların anksiyete puan ortalaması ölçek kesme puanının altında, depresyon puan ortalaması ise ölçek kesme puanının üstündedir. Genel olarak cerrahi hastaların depresyon açısından risk altında olduğu düşünülebilir.

Bu nedenle risk grubunda olan hastaların hekim, hemşire, psikolog ve sosyal hizmet uzmanlarından oluşan profesyonel bir ekip tarafından psikososyal açıdan desteklenmesi ve özellikle hastalarla bire bir ilişki içinde olan hemşirelerin bu konuda duyarlı olmaları için bilgilendirilmeleri önerilebilir. Hastalarda anksiyete ve depresyon seviyeleri ve ilişkili faktörlerin belirlenmesi ile, bireylerin tedaviye uyumunun kolaylaşacağı ve yaşam kalitelerinin artıracığı düşünülmektedir.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan alınmıştır. (tarih 12.02.2015 ve no 60116787-020/8537)

Ethics Committee Approval: This study was approved by the Ethical Committee of the Pamukkale University Faculty of Medicine. (date 12.02.2015 and number 60116787-020/8537)

Bilgilendirilmiş Onam: Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Informed Consent: Written consent was obtained from the participants.

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

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

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

Financial Disclosure: Authors declared no financial support.

KAYNAKLAR/REFERENCES

1. Oflaz F, Varol H. Yatan hastaların anksiyete ve depresyon düzeyleri ve ilişkili faktörlerin incelenmesi. SDÜ Tıp Fak Derg 2010;17:1-7.
2. Kutlu R, Özberk D.I, Gök H, Demirbaş N. Kardiyoloji yoğun bakım ünitesinde yatan hastalarda anksiyete ve depresyon sıklığı ve etki eden faktörler. tğkdc.dergisi 2016;24:672-679.
3. Basak F, Hasbahceci M, Guner S, Sisik A, Acar A, Yucel M, et al. Prediction of anxiety and depression in general surgery inpatients: a prospective cohort study of 200 consecutive patients. Int J Surg 2015;23(Pt A):18-22.
4. Esteghamat S.S, Moghaddami S, Esteghamat S.S, Kazemi H, Kolivand P.H, Gorji A. The course of anxiety and depression in surgical and non-surgical patients. Int J Psychiatry Clin Pract 2014;18(1):16-20.
5. Shoar S, Naderan M, Aghajani M, Sahimi-Izadian E, Hosseini-Araghi N, Khorgami Z. Prevalence and determinants of depression and anxiety symptoms in surgical patients. Oman Med J 2016;31(3):176-81.
6. Karayağız F, Altuntaş M, Güçlü Y.A, Yılmaz T.T, Öngel K. Cerrahi servisinde yatan hastalarda görülen anksiyete dağılımı. Smyrna Tıp Dergisi 2011;1:22-6.
7. Bailey L. Strategies for decreasing patient anxiety in the perioperative setting. AORN Journal 2010;92(4):445-460.
8. Palazón JH, García DF, Araña LF, et al. Assessment of reoperative anxiety in cardiac surgery patients lacking a history of anxiety: contributing factors and postoperative morbidity. J Cardiothorac Vasc Anesth 2018;32(1):236-44.

9. Cevik B. The evaluation of anxiety levels and determinant factors in preoperative patients. *Int J Med Res Health Sci* 2018;7(1):135-43. ISSN No: 2319-5886
10. Dayılar H, Oyur G, Kamer E, Sarıçipek A, Cengiz F, Hacıyanlı M. Kolon ameliyatı öncesi hastaların anksiyete düzeylerinin değerlendirilmesi. *Turk J Colorectal Dis* 2017;27(1):6-10.
11. Taşdemir A, Erakgün A, Deniz MN, Çertuğ A. Preoperatifbilgilendirmeyapılanhastalardaameliyat öncesi ve sonrası anksiyete düzeylerinin State-Trait Anxiety Inventory Test ile karşılaştırılması. *Turk J Anaesth Reanim* 2013;41(2):44-9.
12. Çalışkan E, Gürhan N, Tekgündüz AİE. Hematolojik kanserli hastaların anksiyete, depresyon ve distres yaşama durumları. *Acta Oncol Tur* 2017;50(3):207-17.
13. Zigmond AS, Snaith RP. The hospital anxiety and depression scale. *Acta Psychiatr Scand*. 1983;67(6):361-70.
14. Aydemir Ö, Güvenir T, Kuey L. Hastane anksiyete ve depresyon ölçeği Türkçe formunun geçerlilik ve güvenilirliği. *Türk Psikiyatri Dergisi* 1997;8(4):280-7.
15. Santos MMB, Martins JCA, Oliveira L.M.N. Anxiety, depression and stress in the preoperative surgical patient. *Revista de Enfermagem Referência* 2014;4:7-15.
16. Okanlı A, Özer N, Akyl RÇ, Koçkar Ç. Cerrahi kliniklerinde yatan hastaların anksiyete ve depresyon düzeylerinin belirlenmesi, Atatürk Üniversitesi Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi 2006; 9 (4): 38-44.
17. Bedaso A, Ayalew M. Preoperative anxiety among adult patients undergoing elective surgery: a prospective survey at a general hospital in Ethiopia. *Patient Safety in Surgery* 2019;13:1-8.
18. Mirani SH, Areja D, Gilani SS, Tahir A, Pathan M, Bhatti S. Frequency of depression and anxiety symptoms in surgical hospitalized patients. *Cureus* 2019;11(2):1-6.
19. Rodrigues HF, Furuya RK, Dantas RAS, Dessotte CAM. Anxiety and depression in cardiac surgery: sex and age range differences. *Esc Anna Nery* 2016;20(3):1-7.
20. Almeida OP, Draper B, Pirkis J, Snowdon J, Lautenschlager NT, Byrne G, et al. Anxiety, Depression and Comorbid Anxiety and Depression: Risk Factors and Outcome Over Two Years, *International Psychogeriatrics*, 2012; 24 (10):1622-32.
21. Linden W, Vodermaier A, MacKenzie R, Greiga D. Anxiety and depression after cancer diagnosis: Prevalence rates by cancer type, gender, and age, *J Affect Disord* 2012; 141(2-3): 343-51.
22. Yaka E, Keskinoglu P, Ucku R, Yener GG, Tunca Z. Prevalence and risk factors of depression among community dwelling elderly, *Archives of Gerontology and Geriatrics* 2014;59(1):150-4.
23. Hinz A, Krauss O, Hauss JP, Höckel M, Kortmann RD, Stolzenburg JU, et al. Anxiety and depression in cancer patients compared with the general population. *Eur J Cancer Care* 2010;19(4):522-9.
24. Hong JS, Tian J. Prevalence of anxiety and depression and their risk factors in Chinese cancer patients. *Support Care Cancer* 2014;22(2):453-9. doi: 10.1007/s00520-013-1997-y.

Amaç ve Kapsam

Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi (SABİAD); bağımsız, önyargısız ve çift-kör hakemlik ilkeleri çerçevesinde yayın yapan İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün uluslararası ve açık erişimli bilimsel yayın organıdır. Dergi Şubat, Haziran ve Ekim aylarında olmak üzere dört ayda bir yayınlanır ve üç sayıda bir cilt tamamlanır. Yayın dili Türkçe ve İngilizcedir.

Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi (SABİAD), tıbbın tüm alanlarında klinik ve deneysel, özgün araştırmalar, ender görülebilecek olgu sunumları, özel ve güncel konularda literatür derlemeleri ve editöre mektup yayınlamaktadır. Orijinal metot geliştirme, yeni bir girişim tekniği ve orijinal çalışmaların ön sonuçlarını içeren kısa raporlara da dergide yer verilmektedir.

Editöryal Politikalar ve Hakem Süreci

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

Özgünlük, yüksek bilimsel kalite ve atif potansiyelli 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. Toplantılarda sunulan çalışmalar için, sunum yapılan organizasyonun tam adı, tarihi, şehri ve ülkesi belirtilmelidir.

Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi'ne (SABİAD) 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 Editöründür.

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 yazarlardan Etik Komisyon raporu veya eşdeğeri olan resmi bir yazı talep edilebilir. İnsanlar üzerinde yapılmış deneysel çalışmaların sonuçlarını bildiren yazılarda, çalışmanın yapıldığı kişilere uygulanacak prosedürler tümüyle açıklandıktan sonra, onaylarının alındığına dair bir açıklamaya metin içinde yer verilmelidir. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda ise ağrı, acı ve rahatsızlık verilmemesi için yapılmış olanlar açık ve net olarak makalede belirtilmelidir. Hasta onamları, Etik Kurul raporunun alındığı kurumun adı, onay belgesinin numarası ve tarihi ana metin dosyasında yer alan Gereç ve Yöntem başlığı altında yazılmalıdır. Hastaların kimliklerinin gizliliğini korumak yazarların sorumluluğundadır. Hastaların kimliğini açığa çıkarabilecek fotoğraflar için hastadan ya da yasal temsilcilerinden alınan imzalı izinlerin de gönderilmesi gereklidir.

Bütün makalelerin eşleşme oranı değerlendirmesi, iThenticate yazılımı aracılığıyla yapılmaktadır.

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

Yazar olarak listelenen herkesin ICMJE (www.icmje.org) tarafından önerilen yazarlık koşullarını karşılaması gerekmektedir.

ICMJE, yazarların aşağıdaki 4 koşulu karşılamasını önermektedir:

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

Bir yazar, çalışmada katkı sağladığı kısımların sorumluluğunu almasına ilaveten, diğer yazarların da çalışmanın hangi kısımlarından sorumlu olduğunu tanımlayabilmelidir. Ayrıca, her yazar diğer yazarların katkı bütünlüğüne güven duymalıdır.

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

Derginin Yayın Kurulu, itiraz ve şikâyet durumlarında, COPE rehberleri kapsamında işlem uygular. Yazarlar, itiraz ve şikâyetleri için doğrudan Yayıncılık Birimi ile temasa geçebilirler. İhtiyaç duyulduğunda Yayın Kurulu'nun kendi içinde çözemediği konular için tarafsız bir temsilci atanmaktadır. İtiraz ve şikâyetler için karar verme süreçlerinde nihai kararı Baş Editör verecektir.

Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi her makalenin <https://dergipark.org.tr/tr/pub/sabiad> adresinden erişebileceğiniz Telif Hakkı Anlaşması Formu ile beraber gönderilmesini talep eder. Yazarlar, basılı ya da elektronik formatta yer alan resimler, tablolar ya da diğer her türlü içerik dâhil daha önce yayınlanmış bir alıntıyı kullanırken telif hakkı sahibinden izin almalıdırlar. Bu konudaki yasal, mali ve cezai sorumluluk yazar(lar)a aittir.

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

Telif Hakkında

Yazarlar Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi 'nde yayınlanan çalışmalarının telif hakkına sahiptirler ve çalışmaları Creative Commons Atıf-GayriTicari 4.0 Uluslararası (CC BY-NC 4.0) olarak lisanslıdır. Creative Commons Atıf-GayriTicari 4.0 Uluslararası (CC BY-NC 4.0) lisansı, eserin ticari kullanım dışında her boyut ve formatta paylaşılmasına, kopyalanmasına, çoğaltılmasına ve orijinal esere uygun şekilde atıfta bulunmak kaydıyla yeniden düzenleme, dönüştürme ve eserin üzerine inşa etme dâhil adapte edilmesine izin verir.

Makale Hazırlama

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 <https://dergipark.org.tr/tr/pub/sabiad> adresinde yer alan derginin online makale yükleme ve değerlendirme sistemi üzerinden gönderilebilir. Farklı mecralardan gönderilen makaleler değerlendirilmeye alınmayacaktır.

Gönderilen makalelerin dergi yazım kurallarına uygunluğu ilk olarak Yayıncılık Birimi tarafından kontrol edilecek, derginin yazım kurallarına uygun hazırlanmamış makaleleri teknik düzeltme talepleri ile birlikte yazarlarına geri gönderilecektir.

Yazar(lar)ın aşağıdakileri sunmaları gerekir:

Telif Hakları Formu

Kapak sayfası: Gönderilen tüm makalelerle birlikte ayrı bir kapak sayfası da gönderilmelidir. Bu sayfada;

- Makalenin Türkçe ve İngilizce başlığı ve 50 karakteri geçmeyen Türkçe ve İngilizce kısa başlığı,
- Yazarların isimleri, kurumları, eğitim dereceleri ve ORCID numaraları
- Finansal destek bilgisi ve diğer destek kaynakları hakkında detaylı bilgi,
- Sorumlu yazarın ismi, adresi, telefonu (cep telefonu dâhil), faks numarası ve e-posta adresi,
- Makale hazırlama sürecine katkıda bulunan ama yazarlık kriterlerini karşılamayan bireylerle ilgili bilgileri içermelidir.

Özet: Editöre Mektup türündeki yazılar dışında kalan tüm makalelerin Türkçe ve İngilizce özetleri olmalıdır. Özgün Araştırma makalelerinin özetleri “Amaç”, “Gereç ve Yöntem”, “Bulgular” ve “Sonuç” alt başlıklarını içerecek biçimde hazırlanmalıdır. Olgu sunumu ve derleme türündeki yazıların Özet bölümlerinde alt başlıklar yazılmamalıdır.

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

Özgün Araştırma: Ana metin; “Giriş”, “Gereç ve Yöntem”, “Bulgular” ve “Tartışma” alt başlıklarından oluşmalıdır.

Özgün Araştırmalarla ilgili sınırlandırmalar için lütfen Tablo 1’i inceleyiniz.

Sonucu desteklemek için istatistiksel analiz genellikle gereklidir. İstatistiksel analiz, tıbbi dergilerdeki istatistik verileri 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, Gereç ve 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 hakem tarafından kısaca yorumlanması amacını taşımaktadır. Yazar(lar), dergi tarafından seçilip davet edilir. Özet, anahtar sözcük, tablo, şekil, resim ve diğer görseller kullanılmaz.

Derleme: Konunun alanında birikimi olan ve bu birikimleri uluslararası literatüre yayın ve atıf sayısı olarak yansıtmış uzmanlar tarafından hazırlanmış yazılar değerlendirmeye alınır. Yazar(lar) dergi tarafından da davet edilebilir. Bir bilgi ya da konunun klinikte kullanılması için vardığı son düzeyi anlatan, tartışan, değerlendiren ve gelecekte yapılacak çalışmalara yön veren bir düzeyde 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 yöntemi tarif eden, kitaplarda yer verilmeyen bilgiler 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: Yazar(lar), 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 formatında Editöre Mektup yazılarını sunabilirler. Bu metinde, özet, anahtar sözcük, tablo, şekil, resim ve diğer görseller kullanılmaz. Ana metin alt başlıksız olmalıdır. Hakkında mektup yazılan yayına ilişkin cilt, yıl, sayı, sayfa numaraları, yazı başlığı ve yazar(lar)ın 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 numaralandırılmalıdır. Tabloların üzerinde tanımlayıcı bir başlık yer almalı ve tablo içerisinde geçen kısaltmaların açıkları tablo altına yazılmalıdır. Tablolar Microsoft Office Word dosyası içinde “Tablo Ekle” komutu kullanılarak hazırlanmalı ve kolay okunabilir şekilde düzenlenmelidir. Tablolarda sunulan verilerin tekrarı olmamalı; 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 metin 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 etmek

Tablo 1: Makale türleri için kısıtlamalar

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

amacıyla etiketlenmemelidir (a, b, c vb.). Resimlerde altyazıları desteklemek için kalın ve ince oklar, ok başı, yıldızlar, asteriksler ve benzer işaretler kullanılabilir. Makalenin geri kalanında olduğu gibi resimlerde kör olmalıdır. Bu sebeple, resimlerde yer alan kişi ve kurum bilgilerine kesinlikle yer verilmemelidir.. Görsellerin minimum çözünürlüğü 300 DPI olmalıdır. Değerlendirme sürecindeki aksaklıkları önlemek için gönderilen tüm görsellerin çözünürlüğü net ve büyük boyutlu (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 açıklanarak kısaltma açıklamanın ardından parantez içerisinde verilmelidir.

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

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

Özgün araştırmaların kısıtlılıkları, engelleri ve yetersizlikleri Sonuç paragrafı öncesi "Tartışma" bölümünde yer almalıdır.

Revizyonlar

Yazar(lar) makalelerin 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 bir hakemin yorumunun ardından yazarın cevabı gelmeli ve değişikliklerin yapıldığı satır numaraları da ayrıca belirtilmelidir. Revize edilen makaleler karar mektubunu takip eden 30 gün içerisinde dergiye gönderilmelidir. Makalenin revize versiyonu belirtilen süre içerisinde yüklenemezse, revizyon seçeneği iptal olabilir. Yazar(lar)ın revizyon için ek süreye ihtiyaç duyması 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 dâhil 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.

Kaynaklar

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Son Kontrol Listesi

- **Editöre mektup**
 - Makalenin türü
 - Başka bir dergiye gönderilmemiş olduğu bilgisi
 - Sponsor veya ticari bir firma ile ilişkisi (varsa belirtiniz)
 - İstatistik kontrolünün yapıldığı (araştırma makaleleri için)
 - Kaynakların NLM referans sistemine göre belirtildiği
- Yazar Formu
- Telif Hakkı Anlaşması Formu
- Makale kapak sayfası
 - Makalenin kategorisi
 - Makalenin Türkçe ve İngilizce başlığı
 - Makalenin Türkçe ve İngilizce kısa başlığı
 - Yazarların ismi soyadı, unvanları ve bağlı oldukları kurumlar (üniversite ve fakülte bilgisinden sonra şehir ve ülke bilgisi de yer almalıdır), e-posta adresleri
 - Sorumlu yazarın e-posta adresi, açık yazışma adresi, iş telefonu, GSM, faks no'su
 - Tüm yazarların ORCID'leri
- Makale ana metin dosyasında olması gerekenler
 - Makalenin Türkçe ve İngilizce başlığı
 - Özetler 250 kelime Türkçe ve 250 kelime İngilizce, (olgu sunumlarında özet 200 kelime Türkçe ve 200 kelime İngilizce)
 - Anahtar Kelimeler: 3 -6 Türkçe ve 3 -6 İngilizce
 - Makale ana metin bölümleri
 - Kaynaklar
 - Teşekkür (varsa belirtiniz)
 - Tablolar-Resimler, Şekiller (başlık, tanım ve alt yazılarıyla)

Aims and Scope

Journal of Advanced Research in Health Sciences (JARHS) is an international, scientific, open access periodical published in accordance with independent, unbiased, and double-blinded peer-review principles. The journal is the official publication of Institute of Health Sciences of İstanbul University and it is published every 4 months on February, June, and October. The publication languages of the journal are Turkish and English.

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

Editorial Policies and Peer Review Process

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

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

Manuscripts submitted to Journal of Advanced Research in Health Sciences will go through a double-blind peer-review process. Each submission will be reviewed by at least two external, independent peer reviewers who are

experts in their fields in order to ensure an unbiased evaluation process. The editorial board will invite an external and independent editor to manage the evaluation processes of manuscripts submitted by editors or by the editorial board members of the journal. The Editor in Chief is the final authority in the decision-making process for all submissions.

An approval of research protocols by the Ethics Committee in accordance with international agreements (World Medical Association Declaration of Helsinki “Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects,” amended in October 2013, www.wma.net) is required for experimental, clinical, and drug studies and for some case reports. If required, ethics committee reports or an equivalent official document will be requested from the author(s). 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 author(s)’ responsibility to carefully protect the patients’ anonymity. For photographs that may reveal the identity of the patients, signed releases of the patient or of their legal representative should be enclosed.

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

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

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

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

1. Substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; AND
2. Drafting the work or revising it critically for important intellectual content; AND

3. Final approval of the version to be published; AND
4. Agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

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

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

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.

Journal of Advanced Research in Health Sciences requires each submission to be accompanied by a Copyright Transfer Form (available for download at <https://dergipark.org.tr/en/pub/sabiad>). When using previously published content, including figures, tables, or any other material in both print and electronic formats, authors must obtain permission from the copyright holder. Legal, financial and criminal liabilities in this regard belong to the author(s).

Statements or opinions expressed in the manuscripts published in Journal of Advanced Research in Health Sciences 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.

Copyright Notice

Authors publishing with **Journal of Advanced Research in Health Sciences** retain the copyright to their work, licensing it under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0) license that gives permission to copy and redistribute

the material in any medium or format other than commercial purposes as well as remix, transform and build upon the material by providing appropriate credit to the original work.

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>). Author(s) 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 <https://dergipark.org.tr/tr/pub/sabiad>. 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.

Author(s) are required to submit the following:

- **Copyright Transfer Form,**

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

- The full title of the manuscript as well as a short title (running head) of no more than 50 characters,
- Name(s), affiliations, highest academic degree(s) and ORCID ID(s) of the author(s),
- Grant information and detailed information on the other sources of support,
- Name, address, telephone (including the mobile phone number) 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

fulfil the authorship criteria.

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

Keywords: Each submission must be accompanied by a minimum of three to a maximum of six keywords for subject indexing at the end of the abstract. The keywords should be listed in full without abbreviations. The keywords should be selected from the National Library of Medicine, Medical Subject Headings database (<http://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, Discussion, and Conclusion 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,

| Type of manuscript | Word limit | Abstract word limit | Reference limit | Table limit | Figure limit |
|----------------------|------------|---------------------|-----------------|-------------|--------------------------|
| Original Article | 3500 | 250 (Structured) | 30 | 6 | 7 or total of 15 images |
| Review Article | 5000 | 250 | 50 | 6 | 10 or total of 20 images |
| Case Report | 1000 | 200 | 15 | No tables | 10 or total of 20 images |
| Technical Note | 1500 | No abstract | 15 | No tables | 10 or total of 20 images |
| Letter to the Editor | 500 | No abstract | 5 | No tables | No media |

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

Figures and Figure Legends

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

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

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

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.

Revisions

When submitting a revised version of a paper, the author(s) 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(s) and their publication approval is requested within 2 days of their receipt of the proof.

References

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

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

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

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

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

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

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

Thesis: Yılmaz B. Ankara Üniversitesindeki Öğrencilerin Beslenme Durumları, Fiziksel Aktivitelerine Beden Kitle İndeksleri Kan Lipidleri Arasındaki İlişkiler. H.Ü. SağlıkBilimleriEnstitüsü, DoktoraTezi. 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. DiagnIntervRadiol. 2016 Feb 24. doi: 10.5152/dir.2016.15323. [Epub ahead of print].

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

Submission Checklist

- **Cover letter to the editor**
 - The category of the manuscript
 - Confirming that “the paper is not under consideration for publication in another journal”

- Including disclosure of any commercial or financial involvement.
- Confirming that the statistical design of the research article is reviewed.
- Confirming that the references cited in the text and listed in the references section are in line with NLM.

- **Copyright Agreement Form**

- **Author Form**

- **Permission of previous published material if used in the present manuscript**

- Acknowledgement of the study “in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional and national) and with the Helsinki Declaration.
- Statement that informed consent was obtained after the procedure(s) had been fully explained. Indicating whether the institutional and national guide for the care and use of laboratory animals was followed as in “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”.

- **Title page**

- The category of the manuscript
- The title of the manuscript both in Turkish and in English
- Short title (running head) both in Turkish and in English
- All authors’ names and affiliations (institution, faculty/department, city, country), e-mail addresses
- Corresponding author’s email address, full postal address, telephone and fax number
- ORCIDs of all authors.

- **Main Manuscript Document**

- The title of the manuscript both in Turkish and in English
- Abstracts both in Turkish and in English (250 words). (Case report’s abstract limit is 200 words)
- Key words: 3 - 6 words both in Turkish and in English
- Main article sections
- References
- Acknowledgement (if exists)
- All tables, illustrations (figures) (including title, description, footnotes)

COPYRIGHT AGREEMENT FORM / TELİF HAKKI ANLAŞMASI FORMU



Istanbul University
İstanbul Üniversitesi

Journal name: Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi
Dergi Adı: Journal of Advanced Research in Health Sciences

Copyright Agreement Form
Telif Hakkı Anlaşması Formu

| | |
|--|--|
| Responsible/Corresponding Author Sorumlu Yazar | |
| Title of Manuscript Makalenin Başlığı | |
| Acceptance date Kabul Tarihi | |
| List of authors Yazarların Listesi | |

| Sıra No | Name - Surname Adı-Soyadı | E-mail E-Posta | Signature İmza | Date Tarih |
|---------|------------------------------|-------------------|-------------------|---------------|
| 1 | | | | |
| 2 | | | | |
| 3 | | | | |
| 4 | | | | |
| 5 | | | | |

| | |
|--|--|
| Manuscript Type (Research Article, Review, Short communication, etc.) Makalenin türü (Araştırma makalesi, Derleme, Kısa bildiri, v.b.) | |
|--|--|

| | |
|--|--|
| Responsible/Corresponding Author: Sorumlu Yazar: | |
|--|--|

| | | |
|---------------------------------------|--------------------|--|
| University/company/institution | Çalıştığı kurum | |
| Address | Posta adresi | |
| E-mail | E-posta | |
| Phone; mobile phone | Telefon no; GSM no | |

The author(s) agrees that:
The manuscript submitted is his/her/their own original work, and has not been plagiarized from any prior work, all authors participated in the work in a substantive way, and are prepared to take public responsibility for the work, all authors have seen and approved the manuscript as submitted, the manuscript has not been published and is not being submitted or considered for publication elsewhere, the text, illustrations, and any other materials included in the manuscript do not infringe upon any existing copyright or other rights of anyone. İSTANBUL UNIVERSITY will publish the content under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0) license that gives permission to copy and redistribute the material in any medium or format other than commercial purposes as well as remix, transform and build upon the material by providing appropriate credit to the original work.
The Contributor(s) or, if applicable the Contributor's Employer, retain(s) all proprietary rights in addition to copyright, patent rights; to use, free of charge, all parts of this article for the author's future works in books, lectures, classroom teaching or oral presentations, the right to reproduce the article for their own purposes provided the copies are not offered for sale.
All materials related to manuscripts, accepted or rejected, including photographs, original figures etc., will be kept by İSTANBUL UNIVERSITY for one year following the editor's decision. These materials will then be destroyed.
I/We indemnify İSTANBUL UNIVERSITY and the Editors of the Journals, and hold them harmless from any loss, expense or damage occasioned by a claim or suit by a third party for copyright infringement, or any suit arising out of any breach of the foregoing warranties as a result of publication of my/our article. I/We also warrant that the article contains no libelous or unlawful statements, and does not contain material or instructions that might cause harm or injury.
This Copyright Agreement Form must be signed/ratified by all authors. Separate copies of the form (completed in full) may be submitted by authors located at different institutions; however, all signatures must be original and authenticated.

Yazar(lar) aşağıdaki hususları kabul eder
Sunulan makalenin yazar(lar)ın orijinal çalışması olduğunu ve intihal yapmadıklarını,
Tüm yazarların bu çalışmaya aslı olarak katılmış olduklarını ve bu çalışma için her türlü sorumluluğu aldıklarını,
Tüm yazarların sunulan makalenin son halini gördüklerini ve onayladıklarını,
Makalenin başka bir yerde basılmadığını veya basılmak için sunulmadığını,
Makalede bulunan metnin, şekillerin ve dokümanların diğer şahıslara ait olan Telif Haklarını ihlal etmediğini kabul ve taahhüt ederler.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ'nin bu fikri eseri, Creative Commons Atıf-GayriTicari 4.0 Uluslararası (CC BY-NC 4.0) lisansı ile yayınlamasına izin verirler. Creative Commons Atıf-GayriTicari 4.0 Uluslararası (CC BY-NC 4.0) lisansı, eserin ticari kullanım dışında her boyut ve formatta paylaşılmasına, kopyalanmasına, çoğaltılmasına ve orijinal esere uygun şekilde atıfta bulunmak kaydıyla yeniden düzenleme, dönüştürme ve eserin üzerine inşa etme dâhil adapte edilmesine izin verir.
Yazar(lar)ın veya varsa yazar(lar)ın işverenin telif dâhil patent hakları, yazar(lar)ın gelecekte kitaplarında veya diğer çalışmalarında makalenin tümünü ücret ödemesiz kullanma hakkı makaleyi satmamak koşuluyla kendi amaçları için çoğaltma hakkı gibi fikri mülkiyet hakları saklıdır.
Yayımlanan veya yayıma kabul edilmeden önce makalelerle ilgili dokümanlar (fotoğraf, orijinal şekil vb.) karar tarihinden başlamak üzere bir yıl süreyle İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ'nce saklanır ve bu sürenin sonunda imha edilir.
Ben/Biz, telif hakkı ihlali nedeniyle üçüncü şahıslara vuku bulacak hak talebi veya açılacak davalarda İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ ve Dergi Editörlerinin hiçbir sorumluluğunun olmadığını, tüm sorumluluğun yazarlara ait olduğunu taahhüt ederim/ederiz.
Ayrıca Ben/Biz makalede hiçbir suç unsuru veya kanuna aykırı ifade bulunmadığını, araştırma yapılırken kanuna aykırı herhangi bir malzeme ve yöntem kullanılmadığını taahhüt ederim/ederiz.
Bu Telif Hakkı Anlaşması Formu tüm yazarlar tarafından imzalanmalıdır/onaylanmalıdır. Form farklı kurumlarda bulunan yazarlar tarafından ayrı kopyalar halinde doldurularak sunulabilir. Ancak, tüm imzaların orijinal veya kanıtlanabilir şekilde onaylı olması gerekir.

| | | |
|--|-------------------------|---------------------|
| Responsible/Corresponding Author; Sorumlu Yazar; | Signature / İmza | Date / Tarih |
| | |/...../..... |

