

EXPERIMED

Volume/Cilt **11** Issue/Sayı **2** August/Ağustos 2021

- » The Biocompatibility of Sodium Lauryl Sulphate on Developing Zebrafish Embryos
Simge Meşeli, Gül Kaplan, Derya Cansız, Ünal Veli Üstündağ, İsmail Ünal, Ebru Emekli-Alturfan, Funda Yanıkoğlu, Dilek Tağtekin
- » Oxidative Stress Markers in Young Patients with Acute Myocardial Infarction and Their Correlation with Cardiac Enzymes
Umut Karabulut, Dilay Karabulut, Cüneyt Koçaş, Ayşem Kaya, Fahrettin Katkat, Zerrin Yiğit
- » Investigation of IBC-1, a Rare Plasmid-Mediated Class A Beta-lactamase in Members of *Enterobacterales*
Gülşen Altınkanat Gelmez, Ufuk Hasdemir, Güner Söyletir
- » Metal Nanoparticles-Mediated Changes on Gene Expressions and Physiological Parameters of *Capsicum annuum* L.
Hülya Akdemir
- » A Comparison of Actual Graft Weight and Estimated Graft Volume Calculated with New Software Used for Anatomical and Volumetric Analysis of the Liver with Computed Tomography in Living Liver Donors
Ümit Özçelik, Eryiğit Eren, Yıldray Tutpınar, Devrim Ulaş Urut, Mehmet Tokaç, Ayhan Dinçkan
- » Problem Rates and Service Requirements of Extremely Low Birth Weight Preschoolers in Areas Designated in the World Health Organization International Classification of Functioning in Children and Adolescents (ICF-CY) System
Berfin Uysal, Sultan Kavuncuoğlu
- » Optimization of One Step Reverse Transcription Quantitative PCR Method for miRNA Expression Analyses
Seda Süsgün, İlker Karacan, Emrah Yücesan
- » Effects of Overexpression of ET-1 in Mammary Gland Physiology
Nadir Gül, Franz Theuring
- » Endocrine Disrupting Chemicals and Their Use in Textile Industry
Levent Tutanç, Derya Cansız, Ebru Emekli-Alturfan, A. Ata Alturfan
- » The Association Between the Testis Microbiota and Male Infertility
Ayşe Altun, Sibel Bulgurcuoğlu Kuran, İlnur Keskin, Ateş Kadioğlu

EXPERIMED

INDEXING AND ABSTRACTING / DİZİNLER

ULAKBİM TR Index

Chemical Abstracts Service (CAS)

SOBIAD

EXPERIMED

OWNER / SAHİBİ

Prof. Dr. Günnur DENİZ

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

RESPONSIBLE MANAGER / SORUMLU YAZI İŞLERİ MÜDÜRÜ

Prof. Dr. Bedia ÇAKMAKOĞLU

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

CORRESPONDENCE ADDRESS / YAZIŞMA ADRESİ

İstanbul University, Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine,
Vakıf Gureba Avenue, 34093, Çapa, Fatih, İstanbul, Turkey
Phone / Telefon: +90 (212) 414 22 29
E-mail: experimed@istanbul.edu.tr

PUBLISHER / YAYINCI

İstanbul Üniversitesi Yayınevi / İstanbul University Press
İstanbul University Central Campus,
34452 Beyazıt, Fatih / İstanbul, Turkey
Phone / Telefon: +90 (212) 440 00 00

Authors bear responsibility for the content of their published articles.
Dergide yer alan yazılardan ve aktarılan görüşlerden yazarlar sorumludur.

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

This is a scholarly, international, peer-reviewed and open-access journal published triannually in April, August and December.
Nisan, Ağustos ve Aralık aylarında, yılda üç sayı olarak yayımlanan uluslararası, hakemli, açık erişimli ve bilimsel bir dergidir.

EXPERIMED

EDITORIAL MANAGEMENT BOARD / DERGİ YAZI KURULU

Editor-in-Chief / Baş Editör

Prof. Dr. Bedia ÇAKMAKOĞLU

Department of Molecular Medicine, İstanbul University, Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine, İstanbul, Turkey – bedia@istanbul.edu.tr

Co-Editors-in-Chief / Baş Editör Yardımcıları

Assoc. Prof. Umut Can KÜÇÜKSEZER

Department of Immunology, İstanbul University, Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine, İstanbul, Turkey – uksezer@istanbul.edu.tr

Assoc. Prof. Vuslat YILMAZ

Department of Neuroscience, İstanbul University, Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine, İstanbul, Turkey – vuslat.yilmaz@istanbul.edu.tr

Managing Editor / Yönetici Editör

Prof. Dr. Sema Sırma EKMEKÇİ

Department of Genetics, İstanbul University, Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine, İstanbul, Turkey – sirmasem@istanbul.edu.tr

Editorial Management Board Members / Yazı Kurulu Üyeleri

Dr. Canan Aysel ULUSOY

Department of Neuroscience, İstanbul University, Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine, İstanbul, Turkey – canan.ulusoy@istanbul.edu.tr

Dr. Gül Bakırer ÖZTÜRK

Department of Laboratory Animals Science, İstanbul University, Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine, İstanbul, Turkey – gul.bakirer@istanbul.edu.tr

MSc. Barış ERTUĞRUL

Department of Molecular Medicine, İstanbul University, Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine, İstanbul, Turkey – baris.ertugrul@istanbul.edu.tr

Section Editors / Alan Editörleri

Prof. Dr. Elif ÖZKÖK

Department of Neuroscience, İstanbul University, Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine, İstanbul, Turkey – eozykok@istanbul.edu.tr

Assoc. Prof. Elif Sinem İPLİK

Department of Biochemistry, İstanbul Yeniüzyıl University, Faculty of Pharmacy, İstanbul, Turkey – sinem.iplik@yeniuyuzuil.edu.tr

Assoc. Prof. Ferda PAÇAL

Department of Genetics, İstanbul University, Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine, İstanbul, Turkey – ferda.pacal@istanbul.edu.tr

Language Editors / Dil Editörleri

Elizabeth Mary EARL

İstanbul University, Department of Foreign Languages, İstanbul, Turkey – elizabeth.earl@istanbul.edu.tr

Alan James NEWSON

İstanbul University, Department of Foreign Languages, İstanbul, Turkey – alan.newson@istanbul.edu.tr

Statistics Editor / İstatistik Editörü

Sevda ÖZEL YILDIZ

Department of Biostatistic, İstanbul Medical Faculty, İstanbul University, İstanbul, Türkiye – sevda@istanbul.edu.tr

EXPERIMED

EDITORIAL BOARD / YAYIN KURULU

Aziz SANCAR (Honorary Member / Onursal Üye)

Department of Biochemistry and Biophysics, University of North Carolina School of Medicine, Chapel Hill, North Carolina, USA – aziz_sancar@med.unc.edu

Abid HUSSAINI

Department of Pathology and Cell Biology, Columbia University, Taub Institute, New York, USA – abid.hussaini@columbia.edu

Ahmet GÜL

Department of Internal Medicine, İstanbul University School of Medicine, İstanbul, Turkey – agul@istanbul.edu.tr

Ali Önder YILDIRIM

Department of Lung Biology and Diseases, Helmholtz Zentrum München, München, Germany – oender.yildirim@helmholtz-muenchen.de

Batu ERMAN

Department of Molecular Biology, Genetics and Bioengineering, Sabanci University, İstanbul, Turkey – batu.erman@boun.edu.tr

Çağla EROĞLU

Department of Cell Biology, Duke University, North Carolina, USA – cagla.eroglu@duke.edu

Ebba LOHMANN

Department of Neurodegenerative Diseases, Tübingen University, Tübingen, Germany – ebba.lohmann@uni-tuebingen.de

Elif APOHAN

Department of Biology, İnönü University, Malatya, Turkey – elif.apohan@inonu.edu.tr

Erdem TÜZÜN

Department of Neuroscience, İstanbul University, Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine, İstanbul, Turkey – erdem.tuzun@istanbul.edu.tr

Gökçe TORUNER

Department of Hematology, MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA – gatoruner@mdanderson.org

Günnur DENİZ

Department of Immunology, İstanbul University, Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine, İstanbul, Turkey – gdeniz@istanbul.edu.tr

Gürol TUNÇMAN

Department of Genetics and Complex Diseases, Harvard University, Massachusetts, USA – gtuncman@hsph.harvard.edu

Hannes STOCKİNGER

Molecular Immunology Unit, Vienna School of Medicine, Pathophysiology Center, Vienna, Austria – hannes.stockinger@medunivien.ac.at

Hülya YILMAZ

Department of Molecular Medicine, İstanbul University, Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine, İstanbul, Turkey – yilmazh@istanbul.edu.tr

İhsan GÜRSEL

Department of Molecular Biology and Genetics, Bilkent University, Ankara, Turkey – ihsangursel@bilkent.edu.tr

Melih ACAR

Texas University Pediatric Research Institute, Dallas, Texas, USA – melihacar@gmail.com

Numan ÖZGEN

Department of Pathology and Immunology, Baylor University School of Medicine, Texas, USA – numan.oezguen@bcm.edu

Serhat PABUÇÇUOĞLU

Department of Reproduction & Artificial Insemination, İstanbul University-Cerrahpaşa School of Veterinary, İstanbul, Turkey – serpab@iuc.edu.tr

Sühendan EKMEKÇİOĞLU

MD Anderson Cancer Center, Texas University, Houston, Texas, USA – sekmekcioglu@mdanderson.org

Yusuf BARAN

Department of Molecular Biology and Genetics, İzmir Institute of Technology, İzmir, Turkey – yusufbaran@iyte.edu.tr

EXPERIMED

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

- 67** **The Biocompatibility of Sodium Lauryl Sulphate on Developing Zebrafish Embryos**
Simge Meşeli, Gül Kaplan, Derya Cansız, Ünsal Veli Üstündağ, İsmail Ünal, Ebru Emekli-Alturfan, Funda Yanıkoğlu, Dilek Tağtekin
- 73** **Oxidative Stress Markers in Young Patients with Acute Myocardial Infarction and Their Correlation with Cardiac Enzymes**
Umut Karabulut, Dilay Karabulut, Cüneyt Koçaş, Ayşem Kaya, Fahrettin Katkat, Zerrin Yiğit
- 81** **Investigation of IBC-1, a Rare Plasmid-Mediated Class A Beta-lactamase in Members of *Enterobacterales***
Gülşen Altınkanat Gelmez, Ufuk Hasdemir, Güner Söyletir
- 88** **Metal Nanoparticles-Mediated Changes on Gene Expressions and Physiological Parameters of *Capsicum annum* L.**
Hülya Akdemir
- 96** **A Comparison of Actual Graft Weight and Estimated Graft Volume Calculated with New Software Used for Anatomical and Volumetric Analysis of the Liver with Computed Tomography in Living Liver Donors**
Ümit Özçelik, Eryiğit Eren, Yıldırım Tutpınar, Devrim Ulaş Urut, Mehmet Tokaç, Ayhan Dinçkan
- 102** **Problem Rates and Service Requirements of Extremely Low Birth Weight Preschoolers in Areas Designated in the World Health Organization International Classification of Functioning in Children and Adolescents (ICF-CY) System**
Berfin Uysal, Sultan Kavuncuoğlu
- 113** **Optimization of One Step Reverse Transcription Quantitative PCR Method for miRNA Expression Analyses**
Seda Süsgün, İlker Karacan, Emrah Yücesan
- 120** **Effects of Overexpression of ET-1 in Mammary Gland Physiology**
Nadir Gül, Franz Theuring
- REVIEW**
- 130** **Endocrine Disrupting Chemicals and Their Use in Textile Industry**
Levent Tutañç, Derya Cansız, Ebru Emekli-Alturfan, A. Ata Alturfan
- CASE REPORT**
- 140** **The Association Between the Testis Microbiota and Male Infertility**
Ayşe Altun, Sibel Bulgurcuoğlu Kuran, İlknur Keskin, Ateş Kadioğlu

EXPERIMED

İÇİNDEKİLER

ORJİNAL ARAŞTIRMALAR

- 67** Sodyum Lauril Sülfatın Gelişmekte Olan Zebra Balığı Embriyolarında Biyouyumluluğu
Simge Meşeli, Gül Kaplan, Derya Cansız, Ünsal Veli Üstündağ, İsmail Ünal, Ebru Emekli-Alturfan, Funda Yanıkoğlu, Dilek Tağtekin
- 73** Akut Miyokard Enfarktüsü Geçiren Genç Hastalarda Oksidatif Stres Belirteçleri ve Kardiyak Enzimlerle İlişkisi
Umut Karabulut, Dilay Karabulut, Cüneyt Koçaş, Ayşem Kaya, Fahrettin Katkat, Zerrin Yiğit
- 81** *Enterobacteriales* Üyelerinde Nadir Bir Plazmid Aracılı A Sınıfı Beta Laktamaz Olan IBC-1'in Araştırılması
Gülşen Altınkanat Gelmez, Ufuk Hasdemir, Güner Söyletir
- 88** Metal Nanopartiküller Aracılığıyla, *Capsicum annuum* L'nin Gen Ekspresyonu ve Fizyolojik Parametreleri Üzerindeki Değişiklikler
Hülya Akdemir
- 96** Canlı Karaciğer Vericilerinde Karaciğerin Bilgisayarlı Tomografi ile Anatomik ve Hacimsel Analizi için Kullanılan Yeni Bir Yazılım Programı ile Hesaplanan Tahmini Greft Hacmi ile Gerçek Greft Ağırlığının Karşılaştırılması
Ümit Özçelik, Eryiğit Eren, Yıldırım Tutpınar, Devrim Ulaş Urut, Mehmet Tokaç, Ayhan Dinçkan
- 102** Aşırı Düşük Doğum Ağırlıklı Prematüre Çocukların Okul Öncesi Dönemde Dünya Sağlık Örgütü Çocuk ve Ergenlerde Uluslararası İşlevsellik Sınıflamasında Belirlenen Alanlarda Sorun Yaşama Oranları ve Hizmet Gereksinimleri
Berfin Uysal, Sultan Kavuncuoğlu
- 113** Tek Basamaklı Ters Transkripsiyon Kantitatif PZR Yönteminin miRNA Ekspresyon Analizleri için Optimizasyonu
Seda Süsgün, İlker Karacan, Emrah Yücesan
- 120** Yüksek ET-1 İfadesinin Meme Bezi Fizyolojisi Üzerine Etkileri
Nadir Gül, Franz Theuring
- DERLEME**
- 130** Endokrin Bozucu Kimyasallar ve Tekstil Alanında Kullanımları
Levent Tutanç, Derya Cansız, Ebru Emekli-Alturfan, A. Ata Alturfan
- OLGU SUNUMU**
- 140** Testis Mikrobiyotasının Erkek İnfertilitesi ile İlişkisi
Ayşe Altun, Sibel Bulgurcuoğlu Kuran, İlknur Keskin, Ateş Kadioğlu

The Biocompatibility of Sodium Lauryl Sulphate on Developing Zebrafish Embryos*

Sodyum Lauril Sülfatın Gelişmekte Olan Zebra Balığı Embriyolarında Biyouyumluluğu

Simge Meşeli¹ , Gül Kaplan² , Derya Cansız³ , Ünsal Veli Üstündağ⁴ , İsmail Ünal² , Ebru Emekli-Alturfan⁵ , Funda Yanıkoğlu⁶ , Dilek Tağtekin¹ 

¹Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Marmara University, Istanbul, Turkey

²Department of Biochemistry, Institute of Health Sciences, Marmara University, Istanbul, Turkey

³Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Istanbul University-Cerrahpasa, Istanbul, Turkey

⁴Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Istanbul Medipol University, Istanbul, Turkey

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

⁶Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Istanbul Kent University, Istanbul, Turkey

ORCID ID: S.M. 0000-0002-2970-658X; G.K. 0000-0003-4477-5708; D.C. 0000-0002-6274-801X; Ü.V.Ü. 0000-0003-0804-1475; İ.Ü. 0000-0002-8664-3298; E.E.A. 0000-0003-2419-8587; F.Y. 0000-0001-5708-1030; D.T. 0000-0002-2675-1764

Cite this article as: Meseli S, Kaplan G, Cansiz D, Ustundag UV, Unal I, Emekli-Alturfan E, Yanikoglu F, Tagtekin D. The biocompatibility of sodium lauryl sulphate on developing zebrafish embryos. Experimed 2021; 11(2): 67-72.

ABSTRACT

Objective: As an anionic surfactant, sodium lauryl sulphate (SLS), is used as an emulsifying agent in toothpastes as well as many different household cleaning products. Many toothpastes contain SLS and it is responsible for the formation of foam when brushing. However SLS may also irritate sensitive teeth and gums. Lipid peroxidation (LPO) is defined as an autoxidation process that is induced through the attack of free oxygen radicals leading to oxidative stress in the pathophysiology of various diseases. LPO causes the formation of highly reactive products including different aldehydes, ketones, and alkanes serving as biomarkers of LPO. In our study we aimed to expose zebrafish embryos to SLS and determine LPO in SLS exposed zebrafish embryos.

Material and Method: Zebrafish embryos that were dividing normally and which had spherical shapes were chosen and they were exposed to SLS both in low and high concentrations in well plates for 72 hours. Rates of mortality and hatching were determined. The levels of malondialdehyde were evaluated using the Yagi's method as the end products of LPO in the form of thiobarbituric acid reactive substances.

Results: Our findings showed LPO increased significantly in both low SLS ($p<0.05$) and high dose SLS ($p<0.05$) exposed zebrafish embryos when they were compared to the control group.

Conclusion: It may be suggested that LPO is an early indicator of exposure to SLS during embryogenesis and further studies are required to confirm this finding.

Keywords: Sodium lauryl sulphate, toothpaste, lipid peroxidation, zebrafish embryos

ÖZ

Amaç: Sodyum lauril sülfat (SLS), ev temizlik ürünleri ve diş macunlarında emülsifiye edici temizlik maddesi olarak kullanılan anyonik bir yüzey aktif maddedir. Birçok diş macunu fırçalarken köpük oluşumuna yol açan SLS içerir. Ancak SLS hassas diş ve diş etlerini tahriş edebilir. Lipid peroksidasyonu (LPO), çeşitli hastalıkların patofizyolojisinde oksidatif strese yol açan serbest radikallerin saldırısı ile başlatılan bir otooksidasyon sürecidir. LPO, LPO'nun biyobelirteçleri olarak görev yapan farklı aldehitler, ketonlar, alkanlar dahil olmak üzere reaktif ürünlerin oluşumuna neden olur. Çalışmamızın amacı, SLS'ye maruz kalan zebra balığı embriyolarında oluşan LPO'yu değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem: Normal olarak bölünen küresel embriyolar, 72 saat boyunca plaka kuyucuklarında düşük ve yüksek dozda SLS'ye maruz bırakılmıştır. Mortalite ve kuluçkadan çıkma oranları belirlenmiştir. Tiyobarbitürik asit reaktif maddeler olarak LPO'nun son ürünü olan malondialdehit (MDA) düzeyini belirlemek için Yagi yöntemi kullanılmıştır.

Bulgular: Bulgularımız, hem düşük SLS ($p<0,05$) hem de yüksek doz SLS'ye ($p<0,05$) maruz kalan zebra balığı embriyolarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında LPO'nun önemli ölçüde arttığını göstermiştir.

Sonuç: LPO'nun embriyogenez sırasında SLS'ye maruz kalmanın erken bir göstergesi olduğu öne sürülebilir ve bu bulguyu doğrulamak için farklı çalışmaların yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: sodyum lauril sülfat, diş macunu, lipit peroksidasyon, zebra balığı embriyosu

*The research was presented as an online oral presentation in the 3rd. International Caries Prevent Symposium, Istanbul, 2020.

Corresponding Author/Sorumlu Yazar: Simge Meşeli **E-mail:** dtsimge@hotmail.com

Submitted/Başvuru: 17.06.2021 **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 07.07.2021

Last Revision Received/Son Revizyon: 28.07.2021 **Accepted/Kabul:** 30.07.2021



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

INTRODUCTION

Detergents are products that are widely used by humans in various forms to provide hygiene and prevent microorganisms (1). It can be found in various forms such as cleaning, medical, cosmetic, and industrial products (2). Sodium lauryl sulphate (SLS) is a non-volatile, water-soluble, anionic surfactant commonly used in detergents. SLS, which can be produced naturally or synthetically, is found in content levels between 0.01-50% in cosmetic products and 1-30% in cleaning products (2-6). SLS is added to toothpastes due to its antibacterial effects and accounts for between 0.5-2% of weight in toothpastes (Table 1) (7).

Table 1: SLS Containing products (2-7).

Product	Rate of SLS %
Cleaning products	1-30
Cosmetic products	0.01-50
Toothpastes	0.5-2

Toothpastes are used as aids for tooth brushing and are indispensable products that provide personal oral hygiene.

Various chemical substances were added to the chemical content of toothpastes over time, which were made from a mixture of pumice and ash between 3000-5000 BC (7). The general content of toothpastes is shown in Table 2.

Table 2: Content of toothpaste (7).

Content of Toothpaste	%
Abrasives	20-40
Water	20-40
Moisturizers	20-40
Detergents	1-2
Binding agents	2
Sweeteners	2
Therapeutic agents	5
Colorant and preservatives	1

Manufacturers add abrasives, thickeners, moisturizers, preservatives, detergents and active agents to the content of toothpastes to increase the effect of fluoride, remove stains on teeth and combat dental plaque (8). Detergents and surfactants in toothpastes are substances which have cleansing and antibacterial effects due to their hydrophilic and hydrophobic properties. The most common detergent used in toothpastes is SLS (C₁₂H₂₅NaO₄S). Its inclusion in the content of toothpastes started with the development of synthetic surfactants after World War II (7-9). Due to chemical content of toothpastes, biocompatibility also needs to be searched.

All chemicals have toxic doses. In fact, many foods with chemical content are classified as toxic. For example, table salt is considered to be moderately toxic with LD₅₀ = 3000 mg/kg. Many toxicity studies have been conducted on SLS (10-13). Lethal concentrations based on animal experimental results are shown in Table 3.

In spite of there being few *in vivo* clinical studies, there are many *in vitro* studies on animals in literature to evaluate toxicity. Among the model organisms used for the toxicological evaluation of chemicals and drugs, zebrafish have recently been accepted as the *gold standard* (14,15). The Zebrafish is a 4-6 cm long fresh water fish, has 84% of human disease genes, and can breed a large number of embryos at the same time with external fertilization. The development of externally fertilized zebrafish embryos is very quick and the transparency of the embryo and the larvae allows them to be observed and to be manipulated easily in all development periods. Thus, they are considered more advantageous than common mammalian organism models (example: mouse). Embryotoxicity tests using zebrafish embryos is quite fast and simple method to evaluate the toxicity of many substances during embryogenesis (16,17).

Lipid peroxidation (LPO) is a detrimental autoxidation process that is induced through the attack of free oxygen radicals leading to oxidative stress in the pathophysiology of various diseases. In the LPO process, free radicals attack phospholipids or polyunsaturated fatty acids of cellular or subcellular component membranes. This causes the formation of highly reactive products including different aldehydes, ketones, and alkanes serving as biomarkers of LPO (18). The purpose of our study was to evaluate the possible toxic effects of SLS on developing zebrafish embryos.

Table 3: The lethal concentrations of SLS in different model organisms (2).

	Acute Toxicity Oral Exposure in Rats	Acute Toxicity Dermal Exposure in Rabbits	Acute Toxicity Inhalation in Rats	Lowest-observed-adverse-effect in Rats	Aquatic Toxicity in Fish (96 hpf)
Lethal Dose Concentration (50%)	1288 mg/ kg	2000-20000 mg/kg	>3900 mg/m ³ /1H	100 mg/kg/day	1-12 mg/L

MATERIAL AND METHOD

Research was carried out in Marmara University Basic Medical Sciences Department. Adult zebrafish were used for the research. Male and female (2:1) zebrafish were kept in an aquarium rack system at 28°C under a 14/10 light/dark cycle (Figure 1). Fertilized eggs were collected and embryos were rinsed under water several times before used. Normally dividing, spherical embryos were exposed to a low dose (0.01 mg/10ml) and a high dose (0.04 mg/10ml) of SLS solutions. E3 Medium solution was placed in well plates for the control group. In total, 180 embryos were used. Each exposure group was prepared as 3 replicates in 24-well plates having 20 embryos in each of them. They were monitored to evaluate their development and the images of malformations were recorded by using a stereomicroscope (Zeiss Discovery.V8). Mortality and hatching analyses were also carried out every 24 h. Hatching rate is defined as the ratio of hatched embryos to the whole number of alive embryos in each well. Each day all the exposure solutions used in the study were changed and they were replaced with fresh solutions. At the end of 72 hours post-fertilisation (hpf) the exposure period ended and the zebrafish embryos were washed several times using water.



Figure 1: Breeding of zebrafish

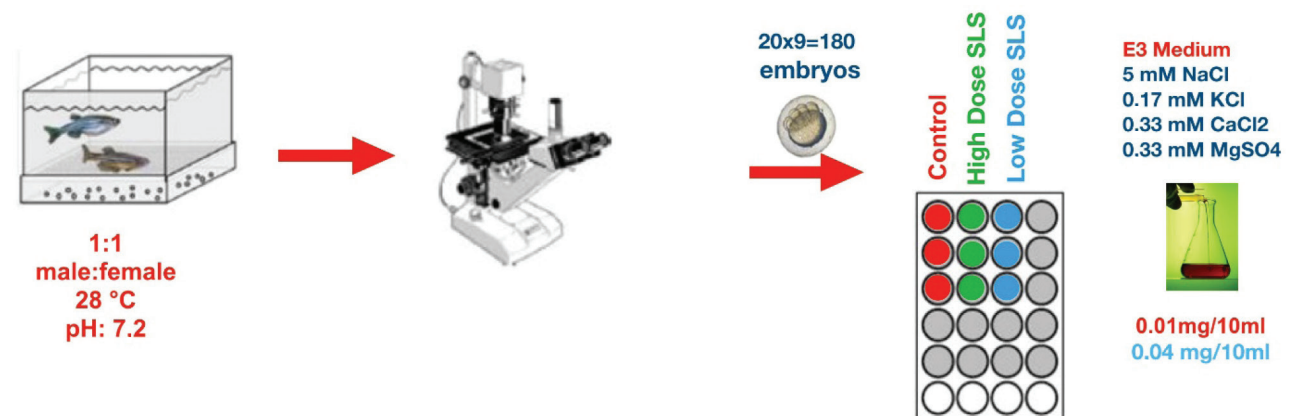


Figure 2: The schematized experimental setup.

The zebrafish housing, matching, exposure systems and the stereomicroscope setup used to examine the development are given in Figure 1, and the experimental setup is given in Figure 2.

Biochemical analyses

In order to determine the biochemical parameters, zebrafish embryos at 72 hpf were used. At the end of 72 hours, the zebrafish embryos in each pool were homogenized in 1 mL PBS, and this was followed by a brief centrifugation. This procedure was prepared as replicate pools of zebrafish embryos. For the analyses of protein levels and LPO, the supernatants was used.

Determination of Total Proteins

In order to evaluate the level of total proteins in the supernatants by using albumin as the standard, the Lowry method was applied (19). In this method, the reaction of alkaline proteins with copper ions was followed by their reduction by the Folin reagent. Using a spectrophotometer, the absorbances of the agents produced was evaluated at 500 nm. The results were calculated to express the numeric values per protein.

Determination of Lipid Peroxidation (LPO)

Malondialdehyde (MDA) is the end product of LPO and the MDA levels in the supernatants were evaluated as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) using Yagi's method (20). In this assay, the extinction coefficient was used as $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. At the end of the assay LPO levels were given as nmol MDA/mg protein, in terms of MDA equivalents.

Statistical analysis

GraphPad 9 was used to evaluate the differences between the low dose exposed SLS, high dose exposed SLS groups and the control group. First one-way analysis of variance (ANOVA) analysis was applied and this was followed by Dunn's multiple comparison test in order to evaluate the differences between the two groups. A value of $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

RESULTS

The representative images of the zebrafish embryos at 48 hpf are given in Figure 3. Yolk sac edema were observed in both the low dose exposed SLS and high dose exposed SLS groups whereas spine curvature was observed in the high dose exposed SLS group. High dose SLS exposed zebrafish embryos were found to have an increased mortality rate which was significantly higher than the group exposed to the low dose of SLS as well as the control group ($p < 0.05$) (Figure 4). A delayed hatching period was observed in the group of zebrafish embryos exposed to a high dose SLS compared to the SLS group exposed to a low dose and the control group ($p < 0.05$). There was no significant difference between the group exposed to a low dose SLS and the control group ($p > 0.05$) (Figure 5).



Figure 3: Representative images of the zebrafish embryos at 48 hpf are given as examples of individual phenotypes observed in the control, low dose SLS and high dose SLS groups. Yolk sac edema were observed in both the low dose SLS and high dose SLS exposed groups and spine curvature was observed in the high dose SLS exposed group.

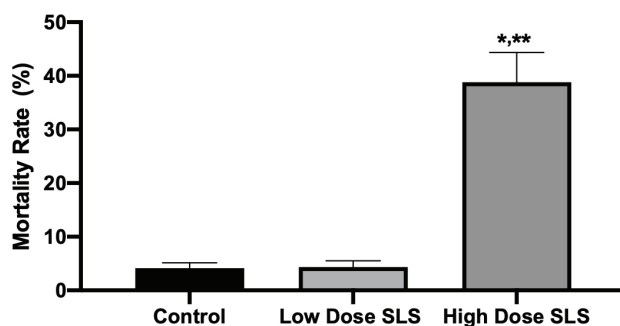


Figure 4: Mortality rates (%) of the control, low dose SLS and high dose SLS groups at 72 hpf. Values are given as mean±standard deviation. * $p < 0.05$ Significantly different than the control group; ** $p < 0.05$ Significantly different than the low dose SLS group.

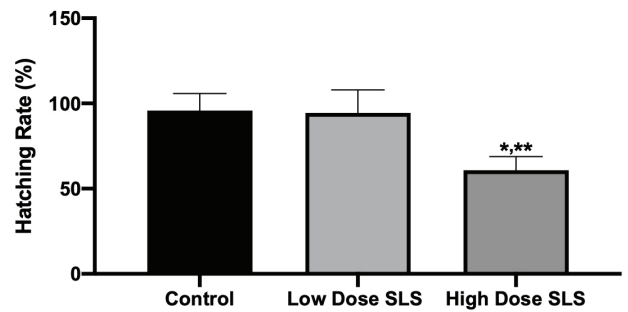


Figure 5: Hatching rates (%) of the control, low dose SLS and high dose SLS groups at 72 hpf. Values are given as mean±standard deviation. * $p < 0.05$ Significantly different than the control group; ** $p < 0.05$ Significantly different than the low dose SLS group.

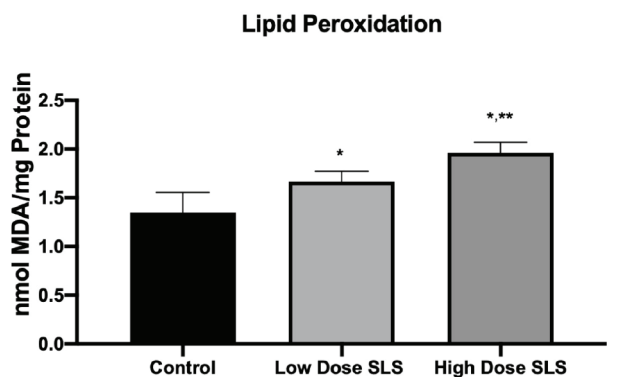


Figure 6: MDA levels as the end product of LPO, of the control, low dose SLS and high dose SLS groups at 72 hpf. Values are given as mean±standard deviation. * $p < 0.05$ Significantly different than the control group; ** $p < 0.05$ Significantly different than the low dose SLS group.

Our results showed that LPO increased significantly in both low ($p < 0.05$) and high dose exposed SLS ($p < 0.05$) zebrafish embryos when compared with the control group. Moreover LPO levels of the high dose exposed SLS zebrafish embryos increased significantly when compared with the low dose exposed SLS group ($p < 0.05$) (Figure 6).

DISCUSSION

Recently, the toxicity of toothpaste ingredients has been a matter of concern. Products, which are extremely useful at appropriate doses, may be harmful in overdose. There have been many *in vitro* studies that were conducted to determine the toxicity of toothpaste ingredients. According to the results of these studies, although the concentration of the ingredients included in the toothpaste is low, the same ingredients can be taken into the body through drinking water, food, environment and other personal care products and stored in various organs and there is a possibility that their levels might increase.

Detergents are substances that are added to toothpaste for cleaning and antibacterial effects due to their hydrophilic and hydrophobic properties. SLS, which is the most used detergent in toothpastes, is thought to have some side effects on the gum as well as adverse effects in patients with recurrent aphthous ulcers. SLS causes oral mucosal desquamation (21,22). Elimination of the protective mucin surface layer induced by SLS reduces the resistance of the oral mucosa (23). It has been shown that there is a relationship between increased oral desquamation and toothpaste use (24-26).

In the study conducted by Shim et al., it was stated that the duration of the ulcer and the pain score decreased significantly during the period when toothpaste containing SLS was used (22). Different studies have shown that ulceration and inflammation are caused by SLS. SLS also causes significant histological changes in the buccal epithelium, e.g. hyperkeratosis, acanthosis, basal cell hyperplasia, and increased epithelial thickness (27). In an *in vivo* study conducted by Tadin et al. (2019), which examined the effects of SLS on human buccal epithelial cells, it was found to alter nuclear morphology, which in turn increases epithelial thickness (28).

Although there is a limited number of studies investigating the effects of triclosan, fluoride and silica nanoparticle contents of toothpastes on zebrafish embryos, there is no study in the literature examining the effect of SLS content on zebrafish embryos (29-36). Our study is the first research to be done in this way. The toxic effects of the chemical content of toothpastes have been highly debated recently. Zebrafish, which has been accepted as the *gold standard* in toxicity studies, will be useful in the toxicity analysis of toothpastes due to the advantages of producing a large number of embryos (which will make the study more statistically reliable) and the examination of the differences in developmental stages.

Short-term SLS exposure was shown to result in the modification of morphology and cell composition of the gill apparatus in ornate wrasse (37). Because of their physiological and anatomical characteristics, fish are very sensitive to the toxic effects of many compounds. Our study is the first research to evaluate the effects of SLS on developing zebrafish embryos. We observed an increased LPO in SLS exposed embryos. The mechanism of the toxic effects of anionic detergents has been evaluated in previous studies (37,38). Prolonged anionic detergents exposure has been shown to cause mortality in fish which might be because of hypoxia, osmotic or ionic stability loss (38). In another study, guinea pigs were exposed to nickel (Ni), SLS and a combination of the two for 7 and 14 days dermally. The exposure to Ni and SLS led to changes in enzymes and LPO in the kidneys. Moreover, exposure to Ni or SLS caused slight alterations while their combined exposure exhibited more degenerative alterations in the kidneys. The authors suggest that industrial workers who are exposed simultaneously to Ni and SLS may run the risk of having kidney damage (39).

Toothpastes have many indispensable benefits such as preventing tooth decay, repairing initial caries chemically with remineralization, removing bad mouth odors, when cleaning mechanically with a toothbrush. On the other hand, some substances in the toothpaste can enter the circulation system and be stored in various organs. In addition to the beneficial properties we have mentioned, in order to prevent harm, one should be careful about this matter, especially in children, toothpaste suitable for the age group should be used, and care should be taken not to swallow the toothpaste consciously or unconsciously in both children and adults.

Ethics Committee Approval: Since zebrafish embryos before 5 days after fertilization were used in the study, ethical approval is not required for the protocols applied, according to the European Union Directive 86/609/EEC (1986) and the Regulation on the Working Procedures and Principles of Animal Experiments Ethics Committees published in the Official Gazette No. 26220.

Author Contributions: Conception/Design of Study - E.E.A., F.Y., D.T.; Analysis and/or Interpretation - E.E.A., F.Y., D.T., S.M., G.K., D.C., U.V.U.; Drafting Manuscript - S.M., E.E.A.; Critical Revision of Manuscript - E.E.A., F.Y., D.T.; Final Approval and Accountability - E.E.A., F.Y., D.T., S.M., G.K., D.C., U.V.U.

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

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

Etik Komite Onayı: Çalışmada fertilizasyon sonrası 5 günden önceki zebra balığı embriyoları kullandığı için, Avrupa Birliği (1986) 86/609/EEC sayılı direktifine ve 26220 sayılı Resmî Gazetede yayımlanan Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmeliğe göre, uygulanan protokoller kapsamında etik kurul onayı gerekmektedir.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti - E.E.A., F.Y., D.T.; Veri Analizi/Yorumlama - E.E.A., F.Y., D.T., S.M., G.K., D.C., Ü.V.Ü.; Yazım - S.M., E.E.A.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi - E.E.A., F.Y., D.T.; Son Onay ve Sorumluluk - E.E.A., F.Y., D.T., S.M., G.K., D.C., Ü.V.Ü.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını bildirmişlerdir.

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

REFERENCES

1. Magny R, Auzeil N, Olivier E, Kessal K, Regazzetti A, Dutot M, et al. Lipidomic analysis of human corneal epithelial cells exposed to ocular irritants highlights the role of phospholipid and sphingolipid metabolisms in detergent toxicity mechanisms. *Biochimie* 2020; 178: 148-57. [CrossRef]
2. Bondi CAM, Marks JL, Wroblewski LB, Raatikainen HS, Lenox RS, Gebhardt KE. Human and Environmental Toxicity of Sodium Lauryl Sulfate (SLS): Evidence for Safe Use in Household Cleaning Products. *Environ Health Insights* 2015; 9: 27-32. [CrossRef]
3. Cosmetic Ingredient Review (CIR). Final report on the safety assessment of sodium lauryl sulfate and ammonium lauryl sulfate. *Int J Toxicol* 1983; 2(7): 1-34.

4. Robinson VC, Bergfeld WF, Belsito DV, Hill RA, Klaassen CD, Marks JG, et al. Final report of the amended safety assessment of sodium lauryl sulfate and related salts of sulfated ethoxylated alcohols. *Int J Toxicol* 2010; 29(4): 1515-615.
5. Procter & Gamble (P&G). Safety Data Sheets. Accessed August 19, 2015. Available from: URL: <http://www.pgprod-uctsafety.com/productsafety>.
6. Seventh Generation. Material Safety Data Sheets. Accessed August 17, 2015. Available from: URL: <http://www.seventhgeneration.com/material-safety-data-sheets>.
7. Lippert F. An introduction to toothpaste its purpose, history and ingredients. Van Loveren C. *Toothpastes*. 23. Basel: Karger; 2013. p. 1-14.
8. Jenkins S, Andy M, Newcombe R. Triclosan and sodium lauryl sulphate mouth rinses effects on salivary bacterial counts. *J Clin Periodontol* 1991; 18(2):140-8. [\[CrossRef\]](#)
9. Herlofson BB, Barkvoll P. Oral Mucosal desquamation caused by two toothpaste detergents in an experimental model. *Eur J Oral Sci* 1996; 104(1): 21-6.
10. Material Safety Data Sheet: Sodium Chloride. Accessed August 20, 2015. Available from: URL: <http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsld>.
11. Product Bulletin: Sodium Lauryl Sulfate. Stepan Company, Northfield, Illinois; 2012. Available from: URL: <https://www.stepan.com>
12. Material Safty Data Sheet: STEPANOL WA-EXTRA K. Stephan Company, Northfield, Illinois; 2006. Available from: URL: <https://www.stepan.com>
13. OECD Screening Information Data Set (SIDS). Sodium Dodecyl Sulfate. August 19, 2015. Available from: URL:<http://www.chem.unep.ch/irptc/sids/OECD/SIDS/151213.htm>
14. Jia HR, Zhu YX, Duan QY, Chen Z, Wu FG. Nanomaterials meet zebrafish: Toxicity evaluation and Drug Delivery Applications. *J Control Release* 2019; 311-312: 301-18.
15. Scholz S, Fischer S, Gündel U, Küster E, Luckenbach T, Voelker D. The Zebrafish embryo model in environmental Risk assessment applications beyond acute toxicity testing. *Environ Sci Pollut Res* 2008; 15(5): 394-404. [\[CrossRef\]](#)
16. Chakravarty S, Sadagopan S, Nair A, Sukumaran SK. Zebrafish as an in vivo high-throughput Model for Genotoxicity. *Zebrafish* 2014; 11: 154-66. [\[CrossRef\]](#)
17. Kayhan FE, Kaymak G, Esmerduruel HE, Tartarkızılkaya Ş. *Biyolojik Araştırmalarda Zebra Balığının Kullanılması ve Önemi*. GBAD 2018; 7: 2.
18. Gaschler M, Stockwell B R. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 482(3): 419-25. [\[CrossRef\]](#)
19. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193(1): 265-75. [\[CrossRef\]](#)
20. Yagi K. Assay for blood plasma or serum. *Methods Enzymol* 1984; 105: 328-37. [\[CrossRef\]](#)
21. Hoogendoorn H, Scholtes W. Influence of the ctivation of the lactoperoxidase System in saliva on the initiation of caries and chronic, recurrent aphthes. I. *Ned Tijdschr Tandheelkd* 1979; 86(1): 36-9.
22. Shim YJ, Choi JH, Ahn HJ, Kwon JS. Effect of sodium lauryl sulfate on recurrent aphthous stomatitis: a randomized controlled clinical trial. *Oral Dis* 2012; 18(7): 655-60. [\[CrossRef\]](#)
23. Siegel IA, Gordon HP. Surfactant induced alterations of permeability of rabbit oral mucosa in vitro. *Exp Mol Pathol* 1986; 44(2): 132-7. [\[CrossRef\]](#)
24. Stec IP. A possible relationship between desquamation and dentifrices. A clinical study. *J Am Dent Hyg Assoc* 1972; 46(1): 42-5.
25. Kowitz G, Lucatorto F, Bennett W. Effects of dentifrices on soft tissues of the oral cavity. *J Oral Med.* 1973; 28(4): 105-9.
26. Allen AL, Hawley CE, Cutright DE, Seibert JS. An investigation of the clinical and histologic effects of selected dentifrices on human palatal mucosa. *J Periodontol* 1975; 46(2): 102-12. [\[CrossRef\]](#)
27. Baert JH, Veys RJ. Triclosan inhibits sodium lauryl sulphate-induced changes in expression of cytokeratin genes in hamster cheek pouch epithelium. *J Oral Pathol Med* 1997; 26: 181-6. [\[CrossRef\]](#)
28. Tadin A, Gavic L, Govic T, Galic N, Vladislavic ND, Zeljezic D. In vivo evaluation of fluoride and sodium lauryl sulphate in toothpaste on buccal epithelial cells toxicity. *Acta Odontol Scand* 2019; 77: 386-93. [\[CrossRef\]](#)
29. Meşeli S, Yanıkoğlu F, Arslantunali Tağtekin D. *Diş Macunları Toksik Mi? Arslantunali Tağtekin D, editör. Diş Macun ve Kremleri*. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2020. p.122-7.
30. Escarrone AL, Caldas SS, Primel EG, Martins SE, Nery LE. Uptake, tissue distribution and depuration of triclosan in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to freshwater. *Sci Total Environ* 2016; 560-561: 218-24.
31. Newton AP, Cadena SM, Rocha ME, Carnieri EG, Martinelli De Oliveira MB. Effect of triclosan (TRN) on energy-linked functions of rat liver mitochondria. *Toxicol Lett* 2005; 160: 49-59. [\[CrossRef\]](#)
32. Ruszkiewicz JA, Li S, Rodriguez MB, Aschner M. Is triclosan a neurotoxic agent? *J Toxicol Environ Health* 2017; B 20:104-17.
33. Cherednichenko G, Zhang R, Bannister RA, Timofeyev V, Li N, Fritsch EB, et al. Triclosan impairs excitation-contraction coupling and Ca²⁺ dynamics in striated muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109: 14158-63. [\[CrossRef\]](#)
34. Etzel TM, Calafat AM, Ye X, Chen A, Lanphear BP, Savitz DA, et al. Urinary triclosan concentrations during pregnancy and birth outcomes. *Environ Res* 2017; 156: 505-11. [\[CrossRef\]](#)
35. Yi HY, Wang ZY, Li XJ, Yin M, Wang LH, Aldalbah A, et al. Silica nanoparticles target a Wnt signal transducer for degradation and impair embryonic development in zebrafish. *Theranostics* 2016; 6(11): 1810-20. [\[CrossRef\]](#)
36. Pepla E, Besharat LK, Palaia G, Tenore G, Migliu G. Nano-hydroxyapatite and its applications in preventive, restorative and regenerative dentistry: a review of literature. *Ann Stomatol (Roma)* 2014; 5(3):108-14.
37. Brunelli E, Talarico E, Corapi B, Perrotta I, Tripepi S. Effects of a sublethal concentration of sodium lauryl sulphate on the morphology and Na⁺/K⁺ ATPase activity in the gill of the ornate wrasse (*Thalassoma pavo*). *Ecotoxicol Environ Saf* 2008; 71(2): 436-45. [\[CrossRef\]](#)
38. Lock, RAC, Van Overbeeke P. Effects of mercuryc chloride and methylmercuryc chloride on mucous secretion in rainbow trout, *Salmogairdneri Richardson*. *Comp Biochem Physiol* 1981; 69: 67-73.
39. Mathur AK, Gupta BN, Singh A, Singh S, Shanker R. Renal toxicity of nickel, sodium lauryl sulphate and their combination after dermal application in guinea pigs. *Biomed Environ Sci* 1993; 6(3): 231-6.

Oxidative Stress Markers in Young Patients with Acute Myocardial Infarction and Their Correlation with Cardiac Enzymes

Akut Miyokard Enfarktüsü Geçiren Genç Hastalarda Oksidatif Stres Belirteçleri ve Kardiyak Enzimlerle İlişkisi

Umut Karabulut¹ , Dilay Karabulut² , Cüneyt Koçtaş³ , Ayşem Kaya³ , Fahrettin Katkat⁴ , Zerrin Yiğit³ 

¹Department of Cardiology, Acıbadem International Hospital, İstanbul, Turkey

²Department of Cardiology, İstanbul Bakırköy Sadi Konuk Education and Research Hospital, İstanbul, Turkey

³Department of Cardiology, Institute of Cardiology, İstanbul University-Cerrahpaşa, İstanbul, Turkey

⁴Department of Cardiology, İstanbul Bağcılar Education and Research Hospital, İstanbul, Turkey

ORCID ID: U.K. 0000-0002-3947-9173; D.K. 0000-0003-1896-0096; C.K. 0000-0002-3927-2703; A.K. 0000-0003-3137-821X; F.K. 0000-0002-3917-3449; Z.Y. 0000-0002-8368-7906

Cite this article as: Karabulut U, Karabulut D, Kocas C, Kaya A, Katkat F, Yiğit Z. Oxidative stress markers in young patients with acute myocardial infarction and their correlation with cardiac enzymes. Experimed 2021; 11(2): 73-80.

ABSTRACT

Objective: The relationship between oxidative stress and acute myocardial infarction has been shown in studies. Total antioxidant status (TAS), total oxidant status (TOS), and oxidative stress index (OSI) reflect the oxidative balance. The risk factors, clinical features, and prognosis of acute myocardial infarction (AMI) in young patients differ from older counterparts. This study aims to determine the oxidative stress in the young acute AMI patients and its' correlation with cardiac markers within 48 hours by the quantitative measurement of TAS, TOS, and OSI.

Material and Method: In this prospective, controlled study, we included 50 patients who were 45 years old or younger and diagnosed with AMI, as well as 20 healthy individuals as the control group. TOS and TAS were measured from venous blood samples via the spectrophotometric method. The oxidative stress index was obtained from these parameters.

Results: Forty-five of totally 50 patients were male, and the mean age was (36±6.8). TOS and OSI values were found significantly higher than in the control group (p=0.002, p=0.005, respectively). TAS values were found not to be different from the control group (p=0.46). A significant correlation was found between CK 0. hour (h.), and TOS 0. h., CK-MB 0. h., and TOS 0. h., CK 48. h. and OSI 48. h., CK-MB 48. h. and OSI 48. h., respectively (r=0.36, p=0.008), (r=0.46, p=0.001), (r=0.32, p=0.03), (r=0.36, p<0.01).

Conclusion: Oxidative stress increases in the early hours of AMI. The TOS and OSI values are correlated with cardiac markers at only some time points, and their prognostic values are limited in young AMI patients. TAS is not correlated with cardiac markers.

Keywords: Total antioxidant status, total oxidant status, oxidative stress index, myocardial infarction

ÖZ

Amaç: Oksidatif stres ile akut miyokard infarktüsü (AMI) arasındaki ilişki pek çok çalışma ile gösterilmiştir. Total antioksidan seviyesi (TAS), total oksidan seviyesi (TOS) ve oksidatif stres indeksi (OSI) oksidatif dengeyi yansıtır. Genç hastalarda AMI'nin risk faktörleri, klinik özellikleri ve prognozu, yaşlı gruptan farklıdır. Bu çalışma TAS, TOS ve OSI'nin kantitatif ölçümü ile genç AMI hastalarında 48 saat içerisindeki seyrini ve kardiyak belirteçlerle ilişkisini belirlemeyi amaçlamaktadır.

Gereç ve Yöntem: Bu prospektif, kontrollü çalışmaya 45 yaş ve altında AMI tanısı almış 50 hasta ve kontrol grubu olarak 20 sağlıklı birey dahil edilmiştir. TOS ve TAS, venöz kan örneklerinden spektrofotometrik yöntemle ölçülmüştür. Oksidatif stres indeksi bu parametreler üzerinden elde edilmiştir.

Bulgular: Toplam 50 hastanın kırkbeşi erkek ve ortalama yaş (36±6,8) idi. TOS ve OSI değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (p=0,002; p=0,005). TAS değerleri kontrol grubundan farklı bulunmadı (p=0,46). Sırasıyla CK 0. saat (s) ve TOS 0. s., CK-MB 0. s. ve TOS 0. s., CK 48. s. ve OSI 48. s., CK-MB 48. s. ve OSI 48. s. arasında anlamlı bir korelasyon olduğu bulundu (r=0,36, p=0,008; r=0,46, p=0,001; r=0,32, p=0,03; r=0,36, p<0,01).

Sonuç: Oksidatif stres AMI'nin erken saatlerinde artmaktadır. TOS ve OSI değerleri, yalnızca belirli zaman dilimlerinde kardiyak belirteçlerle ilişkilendirebilmekte ve genç AMI hastalarında prognostik değerleri sınırlı olmaktadır. TAS, kardiyak belirteçlerle ilişkili bulunmamıştır.

Anahtar Kelimeler: Total antioksidan seviyesi, total oksidan seviyesi, oksidatif stres indeksi, miyokard infarktüsü

Corresponding Author/Sorumlu Yazar: Umut Karabulut **E-mail:** umkarabulut@gmail.com

Submitted/Başvuru: 26.04.2021 **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 02.06.2021

Last Revision Received/Son Revizyon: 12.06.2021 **Accepted/Kabul:** 06.07.2021



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

INTRODUCTION

Oxidative stress plays a critical role in the pathophysiology of many important diseases. It is defined as the disturbance of the balance between the oxidative processes and the body's antioxidant defense mechanisms. As a result, various damages occur in DNA, protein, and lipid structures via reactive oxygen species (ROS) (1,2). Oxidant stress promotes atherosclerosis through several mechanisms, such as endothelial dysfunction, inflammation, immune response, and thrombus formation. Oxidized lipids initiate a cascade of vascular events, resulting in atherosclerotic plaques (3).

The effect of oxidative stress on acute coronary syndrome's pathogenesis is lipid peroxidation caused by ROS reacting with unsaturated fatty acids (4-6). The physiological or pathological roles of ROS depend on their concentration. ROS involves physiological processes; high level of ROS can modify the molecular structure and function of intracellular molecules. Also, peroxide (O_2^-) may react with nitric oxide (NO), leading to the inactivation and loss of the process of NO, resulting in the generation of peroxynitrite ($ONOO^-$) species and endothelial dysfunction. These deleterious events may trigger cardiomyocyte dysfunction in the heart, resulting in contractile dysfunction, impaired cardiac remodeling, fibrosis, and heart failure (7). Antioxidants inhibit or delay oxidative damage. There are several biological antioxidants such as superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPD), and catalases that collectively reduce superoxide/hydrogen peroxide (or lipid hydroperoxides) to water (or lipid hydroxides). Antioxidants reduce myocardial damage by reducing lipid peroxidation, reperfusion damage, and thrombosis in acute myocardial infarction (AMI) (3).

The measurement of oxidants and antioxidants separately is neither practical nor cost-effective. Total antioxidant status (TAS), total oxidative stress (TOS), and oxidative stress index (OSI) reflect the oxidative balance (8). TOS and TAS can be easily measured from venous blood samples using the spectrophotometric method. The oxidative stress index (OSI), used as the oxidative stress marker, can be calculated using these two parameters.

The relationship between oxidative stress and acute coronary syndrome, ischemic heart failure, and ischemia-reperfusion damage after myocardial infarction (MI) has been demonstrated by several studies (9,10). The risk factors, clinical features, and prognosis of AMI in young adults differ from those of older patients. While the incidence of AMI in young patients varies between 2-10%, it is increasing. Younger patients with ST-elevation myocardial infarction (STEMI) were more likely to be male, obese, smokers with hypertriglyceridemia and low high density lipoprotein (HDL) levels, and less likely to have other comorbid conditions than older patients. Younger patients had a better outcome than older patients without an apparent difference in repeated percutaneous coronary intervention (PCI) frequency or reinfarction (11). The frequency of coronary artery disease increases, with the age of onset shifting towards

a younger generation. Several studies have reported coronary artery disease in young adult patients (5,12,13,14,15). However, studies examining oxidative stress in young patients with AMI are limited.

This study aimed to determine the oxidative stress in young acute AMI patients and its correlation with cardiac markers within 48 hours via the quantitative measurement of TAS and TOS and the calculated OSI. The relationship between oxidative stress and the infarct type and the number of stenotic vessels was also examined. We aimed to demonstrate the characteristics and prognostic value of oxidative stress markers in the early phases of AMI in young patients.

MATERIAL AND METHOD

In this prospective, controlled study, we included 50 patients who were 45 years old or younger and diagnosed with AMI and 20 healthy individuals as a control group. Ethical approval was obtained from the Regional Ethics Committee (No:2020-39), and written consent was obtained from all patients. Patients with stable and unstable angina, malignant hypertension, cardiogenic shock, chronic kidney failure, chronic obstructive pulmonary disease, and sleep apnea were excluded from the study.

The demographic data, medical history, laboratory findings, and 48 hours of follow-up measurements of troponin-I, creatine kinase (CK), and CK-MB were recorded. Venous blood samples were obtained at admission (0. hour (h.) of diagnosis) and 6., 12., 24. and 48. h. after diagnosis. Samples were collected in 8-10 ml dry blood tubes, centrifuged, separated into go-dets, and stored at $-80^{\circ}C$. The total TOS and TAS were measured via the spectrophotometric method in an Opera-Technician autoanalyzer (Bayer). CK, creatine kinase muscle-brain (CK-MB), and troponin-I values were measured at the exact times.

Erel's method was used to measure TOS (16). Briefly, the oxidants in the sample oxidize the ferrous ion-o-dianicidine complex to ferric ions. Ferric ions form a colored complex with xylenol orange in an acidic environment. The intensity of the color is related to the amount of oxidants in the sample and is measured spectrophotometrically (16). The results were reported as mmol /L.

Erel's method was also used to measure TAS (16). Briefly, an Fe^{+2} -o-dianicidine complex forms a Fenton reaction with hydrogen peroxide and generates OH^* (hydroxyl) radicals. This potent reactive oxygen-type reducer reacts with the colorless o-dianicidine molecule at a low pH to form the yellow-brown dianisidyl radical. Dianisidyl radicals cause advanced oxidation reactions and increase color formation. However, antioxidants in the samples suppress these oxidation reactions and stop color formation. Similar to the measurement of TOS, this reaction is measured via a spectrophotometer (16). The results were reported as mmol /L.

OSI is calculated using the following equation: $TOS/TAS \times 100$.

Statistical analysis

Quantitative variables were presented as (mean \pm standard deviation). Categorical variables were shown as n (%). The Kolmogorov–Smirnov test was used to determine the distribution of continuous data. Normally distributed continuous data were compared via a Student's t-test, and multiple data were compared with ANOVA tests. Non-normally distributed continuous data were compared with Mann-Whitney-U and Kruskal-Wallis tests. Categorical data were compared using the chi-square test. Pearson's test was used to examine the correlations of variables. All statistical analyses were conducted using SPSS software version 22 (IBM Corp., Armonk, NY). Variables were discussed at a 95% confidence interval, and $p < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

A total of 50 patients and 20 healthy individuals were included in this study. Forty-five patients (90%) were male, and the mean age was (36 \pm 6.8) years. Smoking (82%) and hypertension (78%) were the most common traditional risk factors in young adult MI patients. Demographic data, cardiac risk factors, infarct type and localization, culprit vessel, number of stenotic vessels, and treatment strategies in STEMI patients are shown in Table 1.

The most frequent localizations in STEMI patients were anterior (38%) and interior (28%). The most common culprit lesion was the left anterior descending (LAD) artery (66%). Primary PCI (52%) was the most common reperfusion strategy in patients with STEMI.

The mean TOS values at admission and 6., 12., 24. and 48. h. after diagnosis were 15.6 \pm 10.7, 16.1 \pm 9, 14.7 \pm 7.2, 17 \pm 11.1, and 13.4 \pm 7.0 mmol/L, respectively.

The mean TAS values at admission and 6., 12., 24. and 48. h. diagnosis were 0.79 \pm 0.21, 0.84 \pm 0.26, 0.83 \pm 0.28, 0.80 \pm 0.24, and 0.81 \pm 0.24 mmol/L, respectively.

The mean OSI at admission and 6., 12., 24. and 48. h. after diagnosis were 1854 \pm 898.6, 1968 \pm 1235, 1902 \pm 878, 2328 \pm 1673, and 1789 \pm 854, respectively.

The TOS ($p=0.002$) and OSI ($p=0.005$) values of young AMI patients at admission were significantly higher than those of the control group. The TAS values of young AMI patients at admission were not different from those of the control group ($p=0.46$) (Table 2).

The TOS value was increased in 6. h. after diagnosis, followed by a partial decrease until 12. h after diagnosis. Then, the TOS value increased again, reaching a peak level 24. h. after diagnosis, before decreasing until 48. h. after diagnosis (Figure 1). The TAS value increased until 6. h. after diagnosis before plateauing for the study period's remainder (Figure 2). Like the TOS value, the OSI value increased until 6. h. after diagnosis, followed by a partial decrease until 12. h. after diagnosis, then peaked at 24. h. after diagnosis before decreasing until 48 h. after diagnosis (Figure 3).

Table 1. Baseline characteristics and initial oxidative stress markers of patients.

Age	36 \pm 6.8
Male	45 (90%)
Hypertension	39 (78%)
Hyperlipidemia	34 (68%)
Smoking	41 (82%)
Family history	31 (62%)
Diabetes mellitus	11 (22%)
ST-elevation myocardial infarction	36 (72%)
Non-ST elevation myocardial infarction	14 (28%)
Anterior myocardial infarction	19 (38%)
Inferior myocardial infarction	14 (28%)
Anteroseptal myocardial infarction	2 (4%)
Lateral myocardial infarction	1 (2%)
Left anterior descending	33 (66%)
Circumflex	13 (26%)
Right coronary artery	22 (44%)
Left main coronary artery	1 (2%)
Primary percutaneous coronary intervention	26 (52%)
Tissue plasminogen activator	7 (14%)
Streptokinase	2 (4%)
Rescue percutaneous coronary intervention	2 (4%)
Single-vessel	33 (66%)
Two-vessel	11 (22%)
Three-vessel	4 (8%)
BUN mg/dl	14.1 \pm 4.3
Creatinine mg/dl	0.9 \pm 0.2
Glucose mg/dl	129 \pm 63
HbA1c	8.3 \pm 2
Hemoglobin mg/dl	14.4 \pm 1.77
WBC mg/dl	14600 \pm 1100
Uric acid mg/dl	5.2 \pm 1.1
Total cholesterol mg/dl	201 \pm 44
Low density lipoprotein mg/dl	130.2 \pm 33.2
High density lipoprotein mg/dl	36 \pm 6,6
Triglyceride mg/dl	197 \pm 133
Troponin-I (0. hour) mg/dl	0.09 \pm 0.22
Creatine kinase (0. hour) mg/dl	229.4 \pm 124.8
Creatine kinase muscle-brain (0. hour) mg/dl	25 \pm 15.7
Total oxidant status (0. hour) mmol/L	0.79 \pm 0.21
Total antioxidant status (0. hour) mmol/L	0.79 \pm 0.21
Oxidative stress index (0. hour)	1854 \pm 898

Table 2: Comparison of oxidative stress parameters between patients and the control group.

	Myocardial infarction (n=50)	Control group (n=20)	p value
Total oxidant status (0. hour)	17.33±12.19	11.31±2.85	0.002
Total antioxidant status (0. hour)	0.80±0.25	0.77±0.56	0.46
Oxidative stress index (0. hour)	2019.7±1011.3	1487.9±434.24	0.005

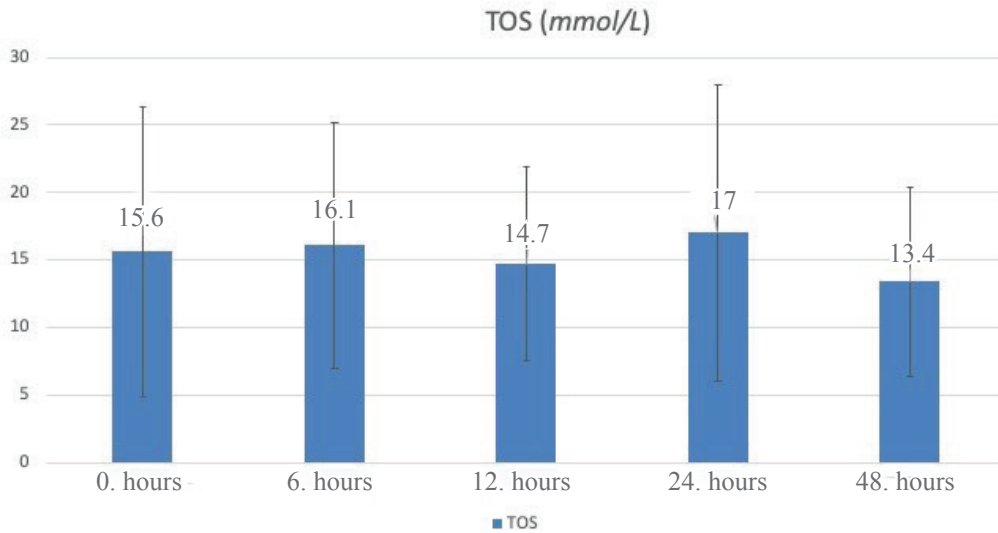


Figure 1. Course of TOS within 48 hours: TOS increased until 6. hours, followed by a partial decrease until 12. hours, and then increased again, reaching the peak level at 24. hours and decreasing again until 48. hours.

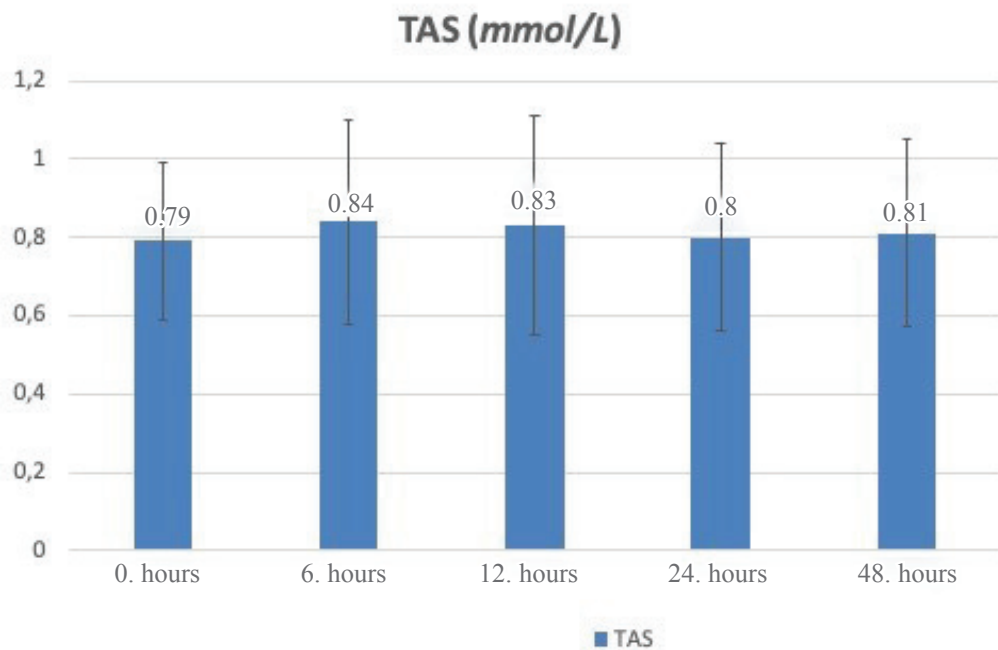


Figure 2. Course of TAS within 48 hours: TAS increased until 6. hours and that it generated a plateau.

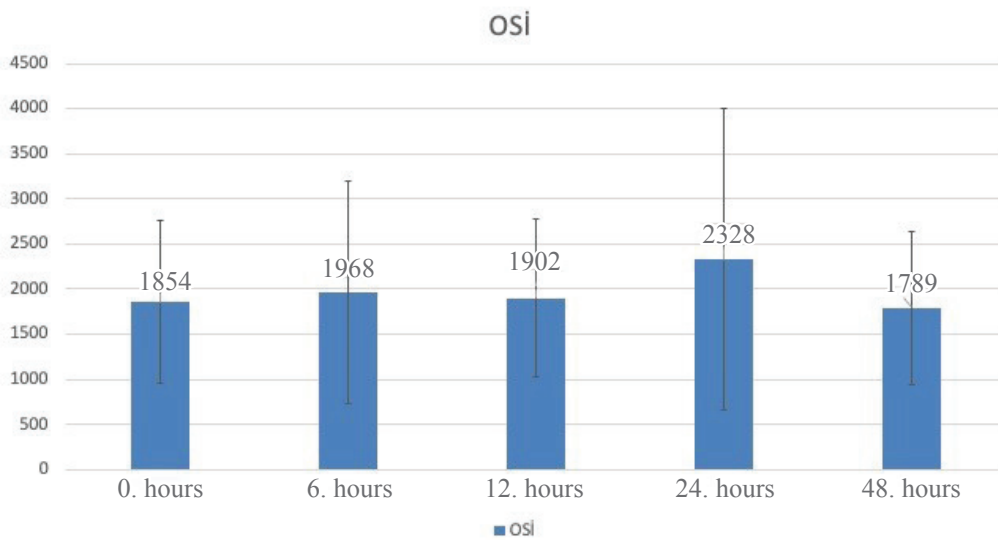


Figure 3. Course of OSI within 48 hours: The graphical course of OSI is parallel to TOS.

A significant correlation was found between TOS and CK ($r=0.36$; $p=0.008$) and CK-MB ($r=0.46$; $p=0.001$) at admission and OSI and CK ($r=0.32$; $p=0.03$) and CK-MB ($r=0.36$; $p<0.01$) at 48 h. after diagnosis (Table 3). No other significant correlations were found.

The TOS, TAS, and OSI values were compared between patients with and without STEMI. The TOS values at admission were significantly higher in the patients with STEMI than in the patients with Non-ST elevation myocardial infarction (NONSTEMI AMI) ($p=0.06$) (Table 4). No other significant differences were found.

The patients were divided into three groups according to the number of stenotic vessels: single-vessel, two-vessel, and multi-vessel disease. The TOS, TAS, and OSI values were compared between these subgroups. A significant difference in TOS was found between the three groups at admission ($p=0.008$) and 12 h. after diagnosis ($p=0.02$), and a significant difference in TAS was found between the three groups at admission ($p=0.009$) and 6 h. after diagnosis ($p=0.05$) (Table 5). No significant differences were found between binary groups in a post hoc analysis.

DISCUSSION

This study found that oxidative stress increases in the early hours of AMI in young patients. There is a significant, yet low, correlation between oxidative stress markers and cardiac markers several hours after diagnosis. The most common traditional risk factors for young AMI patients were identified as smoking and hypertension. Consistent with our findings, Yıldırım et al. found that most of the patients who experience AMI at less than 40 years of age were male and that smoking is the most significant risk factor (12). However, Tungusubutra et al. found that family history is the most important risk factor for patients less than 45 years old with an acute coronary syndrome (13).

Another study reported that STEMI occurred more frequently in patients with an acute coronary syndrome under 35 than in older patients. The preferred treatment is primary PCI, similar to our study (14). Çölkesen et al. found that single-vessel disease is the most frequent. The most common MI presentation is anterior, and the LAD artery is most often the affected artery in patients under 35 years of age with STEMI, similar to our study (15).

In our study, the TOS and OSI values at admission were significantly higher in the patient group than in the control group.

Table 3. Pearson correlation coefficients between the cardiac markers and the oxidative stress parameters.

	r coefficient	p value
Creatine kinase (0. hour) - Total oxidant status (0. hour)	0.36	0.008
Creatine kinase muscle-brain (0. hour) - Total oxidant status (0. hour)	0.46	0.001
Creatine kinase (48. hour) - Oxidative stress index (48. hour)	0.32	0.03
Creatine kinase muscle-brain (48. hour) - Oxidative stress index (48. hour)	0.36	0.01

Correlation is significant for $p<0.05$

Table 4. Comparison of oxidative stress parameters between STEMI and NONSTEMI patients.

	STEMI (n=36)	NONSTEMI (n=14)	p value
Total oxidant status (0. hour)	18.9±13.2	13.1±7.8	0.06
Total oxidant status (6. hour)	16.3±8.9	15.3±9.7	0.5
Total oxidant status (12. hour)	15.1±7.9	13.8±5.3	0.94
Total oxidant status (24. hour)	17.1±11.7	16.8±9.7	0.84
Total oxidant status (48. hour)	14.1±7	11.7±7	0.25
Total antioxidant status (0. hour)	0.81±0.29	0.76±0.08	0.72
Total antioxidant status (6. hour)	0.86±0.3	0.77±0.8	0.85
Total antioxidant status (12. hour)	0.85±0.3	0.77±0.08	0.69
Total antioxidant status (24. hour)	0.83±0.28	0.78±0.07	0.41
Total antioxidant status (48. hour)	0.83±0.28	0.77±0.09	0.83
Oxidative stress index (0. hour)	2053.4±977	1932.6±1136	0.6
Oxidative stress index (6. hour)	2021.5±1318.2	1833.13±1029.7	0.97
Oxidative stress index (12. hour)	1863.7±944.1	2000.7±708.2	0.46
Oxidative stress index (24. hour)	2318.3±1834.5	2356.2±942.4	0.37
Oxidative stress index (48. hour)	1822.9±832.8	1703.1±942.4	0.64

However, there was no significant difference in the TAS values at admission. This may be explained by the late onset of the antioxidant response.

Ho et al. reported that the levels of the oxidative markers as 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) and myeloperoxidase (MPO) were significantly higher and that the antioxidant capacity (measured as GPD and vitamin E) was significantly lower in patients with MI (17). In a recent study by Lo Presti et al., oxidant products were significantly higher, and antioxidant products were significantly lower in patients under 45 years old with AMI than in the control group (18). These findings are consistent with our study in terms of TOS and OSI, but not TAS. Oxidative stress is initiated early in the infarction stage. However, an antioxidant response occurs hours or days later. In the study conducted by Lo Presti et al., blood samples were collected in the late phase of MI. The antioxidant response is likely to have been initiated, which may account for the difference in TAS results between their study and ours.

We found that the levels of troponin, CK-MB, TOS, and OSI values exhibited a similar pattern until 6 hours after diagnosis. It has been reported that plasma thioredoxin levels, which are an indicator of oxidative stress, decrease at 12 h. after diagnosis and plateau at approximately four weeks after diagnosis (19). The difference in the patterns of oxidative stress indicators may be because different indicators were used in this study and that the ischemia-reperfusion injury may result in an increased oxidant capacity and oxidative index at more than 24 hours after diagnosis.

According to successful and unsuccessful reperfusion, another study that divided patients with STEMI after thrombolytic administration reported the antioxidant capacity at 1.5., 6., 12., and 24. h. and 2., 4., and 8. days after diagnosis (20). In the group that did not undergo successful reperfusion, the antioxidant capacity was significantly lower than that of the control group for as long as seven days after diagnosis. A significant increase in the antioxidant enzyme levels within the group's first hours underwent successful reperfusion. These levels started to decrease after the third day and regressed to normal levels in the following days. The antioxidant response in this study was partially similar to that observed in our study.

The number of studies examining the correlation of oxidative stress parameters with cardiac markers in MI is quite limited, and the results are controversial. Furthermore, to the best of our knowledge, this is the first study of young AMI patients. Cardiac markers have been reported to be correlated with MPO levels at 24. and 96. h. after diagnosis of AMI (21). However, these results were found in an older patient population with different oxidative stress parameters, inclusion and exclusion criteria, and study design. Another study reported a correlation between Nt-proBNP and troponin-T but no correlations with oxidative stress markers (4).

Oxidative stress and antioxidant capacity in AMI patients were significantly higher and lower, respectively, in STEMI patients compared to NONSTEMI patients in a previous study (22). These results are consistent with those of our study. A significant, positive correlation was found between OSI and the

Table 5. Comparison of oxidative stress parameters according to the number of stenotic vessels.

	One vessel (n=33)	Two vessel (n=11)	Three vessel (n=5)	p value
Total oxidant status (0. hour)	13.8±7	24.8±17.9	25.3±16	0.008
Total oxidant status (6. hour)	16.5±10.2	14±5.6	18.6±8.1	0.6
Total oxidant status (12. hour)	12.9±5.7	18.9±10	18.8±4.1	0.02
Total oxidant status (24. hour)	17.1±11.9	15.7±8	18.8±4.1	0.86
Total oxidant status (48. hour)	13.5±7.6	12.8±5.3	15.5±7.4	0.78
Total antioxidant status (0. hour)	0.79±0.18	0.64±0.2	1.1±0.5	0.009
Total antioxidant status (6. hour)	0.8±0.1	0.8±0.3	1.1±0.48	0.05
Total antioxidant status (12. hour)	0.81±0.24	0.81±0.3	1±0.52	0.39
Total antioxidant status (24. hour)	0.82±0.2	0.81±0.3	0.83±0.4	0.99
Total antioxidant status (48. hour)	0.81±0.2	0.83±0.2	0.8±0.25	0.99
Oxidative stress index (0. hour)	1905.8±936.6	2571.1±1199	19612±1010	0.61
Oxidative stress index (6. hour)	2086±1378	1734±781	1761±1010	0.73
Oxidative stress index (12. hour)	1833.9±851	2137.4±981	2152.8±1012	0.6
Oxidative stress index (24. hour)	2442±1890	2313±1230	1526±368	0.6
Oxidative stress index (48. hour)	1811±937	1880±762	1552±455	0.82

GRACE risk scoring system for MI, indicating the importance of OSI for these patients' prognoses (23).

The TOS and TAS were found to be significantly different in patients with one-, two-, or three-vessel disease in our study. However, these differences were only present at certain hours after diagnosis. Similar to our study, a previous study reported no significant difference in oxidative stress markers between patients with a high SYNTAX score (indicates the extent and the severity of coronary artery disease) and those with a low SYNTAX score (8). Another study, including patients below 35 with AMI, found that the SYNTAX score was positively correlated with the OSI and TOS values (24).

Treatments initiated in the first days of patients diagnosed with acute myocardial infarction, especially aspirin and statin, may also affect oxidative stress parameters (25,26). It is known that both drugs reduce oxidative stress, but since the doses of these drugs were not obtained in our study, we cannot clearly understand their absolute effects on TOS, TAS, and OSI.

A small sample size, a single-center design, and a limited follow-up period of cardiac, oxidative, and antioxidant parameters limit this study. Multi-center studies with larger patient populations are needed.

In conclusion, oxidative stress increases in the early hours of AMI. The TOS and OSI values are correlated with cardiac markers at only some time points, and their prognostic values are limited in young AMI patients. TAS is not correlated with cardiac markers.

Ethics Committee Approval: Ethical approval was obtained from the Regional Ethics Committee (No:2020-39), and written consent was obtained from all patients.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study – U.K.; Materials – U.K.; Data Collection – F.K., D.K.; Analysis and/or Interpretation – A.K., Z.Y.; Drafting Manuscript – U.K., D.K.; Final Approval and Accountability – C.K., A.K., Z.Y.

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

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

Etik Komite Onayı: Yerel Etik Kuruldan (No:2020-39) etik onay ve tüm hastalardan yazılı onam alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarımı – U.K.; Materyal: U.K.; Veri Toplama – F.K., D.K.; Veri Analizi/Yorumlama – A.K., Z.Y.; Yazma – U.K., D.K.; Son Onay ve Sorumluluk – C.K., A.K., Z.Y.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

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

REFERENCES

1. Bast A, Guido R. Oxidants and antioxidants. *Am J Med* 1991; 91(3C): 2-13. [\[CrossRef\]](#)
2. Cochrane CG. Cellular injury by oxidants. *Am J Med* 1991; 91(3C): 23-9. [\[CrossRef\]](#)
3. Jane A. Leopold, Antioxidants, and Coronary Artery Disease: From Pathophysiology to Preventive Therapy. *Cor Art Dis* 2015; 26(2): 176-83. [\[CrossRef\]](#)
4. Kasap S, Gonenc A, Sener DE. Serum cardiac markers in patients with acute myocardial infarction: oxidative stress, C-reactive protein, and N-Terminal pro-brain natriuretic peptide. *J Clin Bioch Nut* 2007; 41: 50-7. [\[CrossRef\]](#)
5. Barbara E, Miso S, Pavel P. Inflammation markers in young post-myocardial infarction patients exhibiting various expressions of classic coronary risk factors. *Cor Art Dis* 2006; 17: 325-30. [\[CrossRef\]](#)
6. Caimi G, Valenti A, Prenti L. Acute myocardial infarction in young adults: evaluation of the hemorheological pattern at the initial stage after 3 and 12 months. *Ann Ist Sup Son* 2007; 43(2): 139-43.
7. D'Oria R, Schipani R, Leonardini A, Natalicchio A, Perrini S, Cignarelli A, et al. The Role of Oxidative Stress in Cardiac Disease: From Physiological Response to Injury Factor. *Oxid Med Cell Longev* 2020; 5732956. [\[CrossRef\]](#)
8. Turan T, Mentese Ü, Ağaç MT, Akyüz AR, Kul S, Aykan AÇ. The relation between intensity and complexity of coronary artery lesion and oxidative stress in patients with acute coronary syndrome. *Anatol J Cardiol* 2014; 15(10): 795-800. [\[CrossRef\]](#)
9. Romuk E, Wojciechowska C, Jacheć W, Nowak J, Niedziela J, Malinowska-Borowska J. Comparison of Oxidative Stress Parameters in Heart Failure Patients Depending on Ischaemic or Nonischæmic Aetiology. *Oxid Med Cell Longev* 2019; 7156038. [\[CrossRef\]](#)
10. Amanvermez R, Acar E, Günay M, Baydın A, Yardan T, Bek Y. Hsp 70, hs-CRP, and oxidative stress in patients with acute coronary syndromes. *Bosn J of Basic Med Sci* 2012; 12(2): 102-7. [\[CrossRef\]](#)
11. Chua SK, Hung HF, Shyu KG, Cheng JJ, Chiu CZ, Chang CM, et al. Acute ST-elevation Myocardial Infarction in Young Patients: 15 Years of Experience in a Single Center. *Clin Cardiol* 2010; 33(3): 140-8. [\[CrossRef\]](#)
12. Yıldırım N, Arat N. Comparison of traditional risk factors, natural history, and angiographic findings between coronary heart disease patients with age <40 and > or =40 years old. *Anatol J Cardiol*, 2007; 7(2): 124-7.
13. Tungsubutra W, Tresukosol D, Buddhari W, Boonsom W, Sanguanwang S, Srichaiveth B. Acute coronary syndrome in young adults; the Thai ACS registry. *J Med Assoc Thai* 1990; 1: 81-90.
14. Schoenenberger AW, Radovanovic D, Stauffer JC, Windecker S, Urban P, Niedermaier G. Acute coronary syndrome in young patients; presentation, treatment, and outcome. *Int J Cardiol* 2011; 148(3): 300-4.
15. Colkesen AC, Acil T, Demircan S. Coronary lesion type, location, and characteristics of acute ST-elevation myocardial infarction in young adults under 35 years of age. *Cor Ar Dis* 2008; 19: 345-47. [\[CrossRef\]](#)
16. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 2005; 38(12): 1103-11. [\[CrossRef\]](#)
17. Ho HY, Chang ML. Oxidative damage markers, and antioxidants in patients with acute myocardial infarction and their clinical significance. *Biofac* 2008; 34(2): 135-45. [\[CrossRef\]](#)
18. Lo Presti, Catania A, D'Amica T, Montana M. Oxidative stress in young subjects with acute myocardial infarction: evaluation at the initial stage and after 12 months. *Clin Appl Thromb Hem* 2008; 14(4): 421-7. [\[CrossRef\]](#)
19. Soejima H, Suefuji H, Miyamoto S, Kajiwaram I, Kojimo S, Hokamaki J, et al. Increased plasma thioredoxin in patients with acute myocardial infarction. *Clin Card* 2003; 26: 583-87. [\[CrossRef\]](#)
20. Himmetoglu S, Dincer Y, Bozcali E. Oxidative DNA damage and antioxidant defense after reperfusion in acute myocardial infarction. *J Inv Med* 2009; 57(4): 595-9. [\[CrossRef\]](#)
21. Mocatta TJ, Pilbrow AP, Cameron WA, Senthilmohan R, Frampton CM, Richards AM, et al. Plasma concentrations of myeloperoxidase predict mortality after myocardial infarction. *JACC* 2007; 22; 49(20): 2001-2. [\[CrossRef\]](#)
22. Serdar Z, Serdar A, Altın A. The relationship between oxidant and antioxidant parameters and severity of acute coronary syndromes. *Act Card* 2007; 62(4): 373-80. [\[CrossRef\]](#)
23. Shahzad S, Mateen S, Hasan A, Moin S. GRACE score of myocardial infarction patients correlates with oxidative stress index, hs-CRP, and inflammation. *Immunobiology* 2019; 224(3): 433-9. [\[CrossRef\]](#)
24. Aksoy S, Cam N, Gürkan U, Öz D, Özden K, Altay S, et al. Oxidative stress and severity of coronary artery disease in young smokers with acute myocardial infarction. *Cardiol J* 2012; 19: 381-6. [\[CrossRef\]](#)
25. Demirci B, Demir O, Dost T, Birincioglu M. Antioxidative effect of aspirin on vascular function of aged ovariectomized rats. *AGE* 2014; 36: 223-9. [\[CrossRef\]](#)
26. Kilit C, Koçak FE, Paşalı Kilit T. Comparison of the effects of high-dose atorvastatin and high-dose rosuvastatin on oxidative stress in patients with acute myocardial infarction: A pilot study. *Turk Kardiyol Dern Ars* 2017; 45(3): 235-43. [\[CrossRef\]](#)

Enterobacterales Üyelerinde Nadir Bir Plazmid Aracılı A Sınıfı Beta Laktamaz Olan IBC-1'in Araştırılması

Investigation of IBC-1, a Rare Plasmid-Mediated Class A Beta-lactamase in Members of *Enterobacterales*

Gülşen Altınkanat Gelmez¹ , Ufuk Hasdemir¹ , Güner Söyletir¹ 

¹Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ORCID ID: G.A.G. 0000-0003-0274-628X; U.H. 0000-0002-1606-0804; G.S. 0000-0001-5695-731X

Cite this article as: Altınkanat Gelmez G, Hasdemir U, Söyletir G. *Enterobacterales* üyelerinde nadir bir plazmid aracılı a sınıfı beta laktamaz olan IBC-1'in araştırılması. Experimed 2021; 11(2): 81-7.

ÖZ

Amaç: Bu çalışmanın amacı, tüm dünyada sıklıkla gözlemlenen geniş spektrumlu beta laktamazları (GSBL) TEM, SHV ve CTX-M ve nadir görülen IBC-1 beta laktamaz enziminin varlığını araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Marmara Üniversitesi Hastanesinde yatan hastaların klinik örneklerinden izole edilen, fenotipik olarak GSBL üreten ve IBC-1 fenotipi gösteren 30 köken çalışmaya dahil edilmiştir. Antibiyotik duyarlılık testleri disk difüzyon ve agarda dilüsyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. GSBL enzimlerinin fenotipik olarak saptanmasında E-test ve çift disk sinerji yöntemi kullanılmıştır. GSBL üretiminden sorumlu olan genlerinin varlığını saptamak amacıyla polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yapılmıştır.

Bulgular: Kökenlerin tamamı, imipeneme duyarlı bulunurken, ampicilin, amoksisilin klavulanik asit, piperasilin, seftazidim ve trimetoprim sülfametaksazole dirençli olarak saptanmıştır. E-test yöntemiyle 4 köken tanımsız, 26 köken ise GSBL pozitif saptanmıştır. Çift disk sinerji yöntemi ile 2 köken fenotipik olarak IBC-1 pozitif iken, 5 köken şüpheli pozitif olarak belirlenmiştir. Kökenlerimizin bla_{TEM} , bla_{SHV} ve bla_{CTX-M} genlerini taşıma oranı sırasıyla %73,3, %60 ve %56,6 olarak belirlenmiştir. bla_{IBC} geni ise hiçbir kökende saptanmamıştır.

Sonuç: İlk olarak Yunanistan'da saptanan IBC-1 enzimi ülkemiz için henüz bir tehlike oluşturmazken GSBL pozitif kökenlerde TEM, SHV ve CTX-M enzimlerinin oranı oldukça yüksek olarak tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: GSBL, IBC-1, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*

ABSTRACT

Objective: The aim of the study was to investigate the presence of extended -spectrum beta-lactamases (ESBL) TEM, SHV, and CTX-M which are frequently observed all over the world, and the rare IBC-1 beta-lactamase enzyme.

Material and Method: Thirty strains that isolated from various clinical samples from inpatient at Marmara University Hospital, which were phenotypically positive for ESBL, and IBC-1 were included in the study. Antimicrobial susceptibility tests were performed both by disk diffusion and agar dilution tests. E-test and double-disc synergy method (DDS) were used for phenotypic detection of ESBLs. The presence of ESBL genes was detected by polymerase chain reaction (PCR).

Results: All strains were susceptible to imipenem while ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid, piperacillin, ceftazidime, and trimethoprim-sulfamethoxazole were resistant. While 4 strains were unidentified, 26 strains were detected as ESBL positive by E-test. Two strains were phenotypically positive for IBC-1 with DDS, while 5 strains were identified as doubtful. The rate of carrying the bla_{TEM} , bla_{SHV} , and bla_{CTX-M} genes of strains was 73.3%, 60%, and 56.6%, respectively. The bla_{IBC} gene was not detected in any of the strains.

Conclusion: While the IBC-1 enzyme, which was first detected in Greece, have not caused a threat to our country yet, the rate of TEM, SHV, and CTX-M enzymes were found to be quite high.

Keywords: ESBL, IBC-1, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Gülşen Altınkanat Gelmez **E-posta:** gulsenaltinkanat@yahoo.com

Başvuru/Submitted: 27.04.2021 **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 09.06.2021

Son Revizyon/Last Revision Received: 25.06.2021 **Kabul/Accepted:** 04.07.2021



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

GİRİŞ

Beta-laktam antibiyotiklere karşı en önemli direnç mekanizması bir beta laktamaz enzimi üretimidir. Yeni beta-laktam antibiyotiklerin kullanıma girmesi ile birlikte ilerleyen yıllarda "genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL)" ortaya çıkmıştır. Çoğunlukla plazmidler aracılığıyla aktarılan GSBL'ler 3. kuşak sefalosporinleri ve monobaktamları hidrolize ederek direnç gelişimine neden olurlar. GSBL üretimi *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* kökenleri başta olmak üzere *Enterobacteriaceae* ailesinde bulunan en yaygın direnç mekanizmasıdır. GSBL tipleri ve sıklıkları çeşitli ülkelere, coğrafik bölgelere, hatta hastanelere göre değişmektedir. GSBL üreten kökenlerin artan oranlarda izole edilmesi, bu kökenlerle gelişen enfeksiyonların tedavisini güçleştirmekte ve morbidite ve mortalite oranlarında artışa neden olmaktadır. Plazmidler tarafından kodlanan ana enzim aileleri TEM, SHV, CTX-M ve OXA tipi enzimlerdir. Ana enzimleri kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucu yeni varyant enzimler ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte çeşitli bölgelerde sporadik olarak TEM ve SHV dışı GSBL'ler (VEB, GES, IBC, PER, TLA, BES ve SFO) gözlemlenmektedir (1-3).

IBC-1, nadir görülen bir geniş spektrumlu beta laktamaz olup, 1998-2000 yılları arasında Selanik Hippokration Hastanesinde izole edilen bir *Enterobacter cloacae* kökeninde tanımlanmıştır (4). Atina'da yapılan bir çalışmada bla_{IBC-1} geninin, yeni bir sınıf 1 integron olan In111'de kodlandığı bulunmuştur. IBC-1'in nükleotid dizilimi incelendiğinde yapısal olarak sınıf A beta laktamazlara benzediği ve diğer beta laktamazlardan birkaç aminoasit residüsü ile ayrıldığı saptanmıştır. IBC-1 fenotipi, seftazidime yüksek düzey dirençli, sefotaksim, sefepim ve aztreonama azalan duyarlılıkta, klavulanik asit ve piperasilin tazobaktama diğer GSBL'lere göre daha az duyarlı ve imipenem ile inhibe olduğu saptanmıştır (5,6). Yunanistan'da ilerleyen yıllarda yapılan farklı çalışmalarda *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinde IBC-1 beta laktamaz enzimi saptanmıştır (6-8).

Hastanemizde çoklu antibiyotik direnci gösteren *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Enterobacter cloacae* kökenlerinin azımsanmayacak oranda izole edilmesinden dolayı bu kökenlerdeki antibiyotik direnç mekanizmalarının belirlenmesi, hastanemizin antibakteriyel tedavi stratejilerinin oluşturulmasında önemlidir. Bu nedenle çalışmamızda, hastanemizde enfeksiyon etkeni olarak izole edilen gram negatif bakterilerde çoklu antibiyotik direncinden sorumlu tutulan IBC-1'in yanı sıra TEM, SHV ve CTX-M türü GSBL enzimlerinin yaygınlığının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bakterilerin Seçimi

Ocak 2004-Aralık 2005 yılları arasında Marmara Üniversitesi Hastanesinde yatan hastaların klinik örneklerinden etken olarak izole edilen, fenotipik olarak GSBL pozitif veya tanımsız olduğu belirlenen ve IBC-1 fenotipine (beta laktam ve beta laktam-klavulanat kombinasyonlarına dirençli, seftazidime di-

rençli, imipeneme duyarlı) uygun *Klebsiella pneumoniae* (n=12), *Escherichia coli* (n=11), ve *Enterobacter cloacae* (n=7) kökenleri bu çalışmaya dahil edilmiştir.

Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Kökenlerin, beta laktam grubu antibiyotiklere duyarlılıkları (ampisilin, amoksisilin klavulanik asit, piperasilin, piperasilin tazobaktam, sefoksitin, seftazidim, sefotaksim, sefepim ve imipenem) agar dilüsyon yöntemi ile saptanırken, beta laktam dışı antibiyotiklere (gentamisin, tobramisin, netilmisin, amikasin, tetrasiklin ve trimetoprim sülfametaksazol) duyarlılıkları ise disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Sonuçlar; Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute; CLSI) kriterlerine göre değerlendirilmiştir (9). Çalışma süresince *Escherichia coli* ATCC 25922 standart köken olarak kullanılmıştır.

IBC-1 ve GSBL Üretiminin Fenotipik Yöntemlerle Saptanması

Gradient-test: Kökenlerin GSBL üretimi E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden) stripleri ile saptanmıştır. 18-24 saatlik kültürden 0,5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlanarak Mueller-Hinton Agar (MHA) besiyerinin üzerine steril eküvyon yardımıyla yayılmıştır. Seftazidim/seftazidim klavulanik asit (TZ/TZL) ve sefotaksim/sefotaksim klavulanik asit (CT/CTL) E-test stripleri MHA besiyeri üzerine yerleştirilmiştir. 35°C'de 16-18 saat inkübasyondan sonra TZ minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerinin TZL MİK değerine oranı ≥ 8 ya da CT MİK değerinin CTL MİK değerine oranı ≥ 8 ise GSBL üretimi açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir.

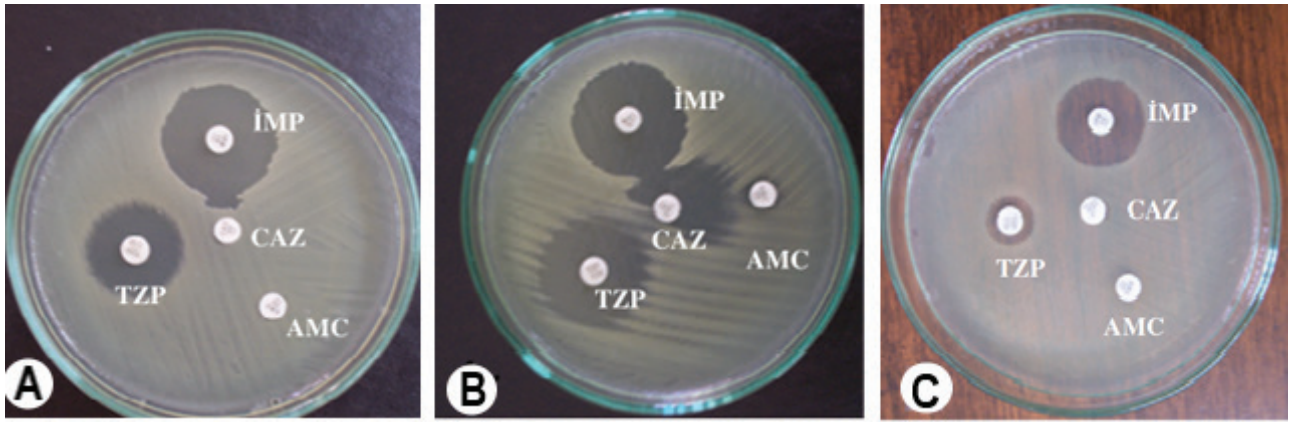
Çift disk sinerji yöntemi: Kökenlerin GSBL üretimi çift disk sinerji yöntemiyle saptanmıştır. 18-24 saatlik kültürlerden 0,5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlanarak MHA besiyerinin üzerine steril eküvyon yardımıyla yayılmıştır. Diskler arası uzaklık 15-17 mm olacak şekilde merkeze seftazidim (30µg), çevresine amoksisilin klavulanik asit (20/10µg), piperasilin tazobaktam (100/10µg) ve imipenem (10µg) diskleri yerleştirilmiştir. 35°C'de 16-18 saat inkübasyondan sonra, seftazidim diskinin inhibisyon zonunun amoksisilin klavulanik asit ve piperasilin tazobaktam disklerine doğru genişlemesi GSBL varlığı olarak kabul edilmiştir. Seftazidim diskinin imipenem diskinin doğru genişlemesi, IBC-1 enzimi varlığı açısından pozitif olarak kabul edilmiştir (Resim 1/A).

IBC-1 ve GSBL Varlığının Genotipik Yöntemlerle Saptanması

Beta laktamaz genlerinin varlığının saptanabilmesi için bakteri DNA'ları üretici firmanın önerileri doğrultusunda QIAGEN DNA izolasyon kiti ile izole edilmiştir. Kökenlerde bla_{IBC} , bla_{TEM} , bla_{SHV} ve bla_{CTX-M} genlerinin varlığını tespit etmek için polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) kullanılmıştır (6,10). PZR için kullanılan primerler ve reaksiyon şartları Tablo 1'de belirtilmiştir. Elde edilen PZR ürünleri, etidyum bromür varlığında %2'lik agaroz jelde yürütülüp ultraviyole ışık altında değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Çalışmamızda kullandığımız kökenlerin tamamı, her iki yöntem ile imipeneme duyarlı iken, ampisilin, piperasilin ve seftazidime



Resim 1. *bla*_{IBC-1} geni pozitif olduğu bilinen *Enterobacter cloacae* HT9 kökeninin çift disk sinerji yöntemiyle görünüşü (A). Çift disk sinerji yöntemiyle IBC pozitif değerlendirilen köken (B). Çift disk sinerji yöntemiyle IBC negatif değerlendirilen köken (C).

Tablo 1. Geniş spektrumlu beta laktamaz genlerine özgü primer ve reaksiyon koşulları.

Gen	Primer Dizisi(5'-3')	bp	Reaksiyon Koşulları
IBC-F	5'- CCC CAA GGA GAG ATC GTC G-3'	861	95°C 5dk, 30 siklus (95°C 1 dk, 60°C 1 dk, 72°C 1 dk), 72°C 10 dk
IBC-R	5'-GTA ATC TCT CTC CTG GGC TT-3'		
TEM-F	5'-GAA GAC GAA AGG GCC TCG TG-3'	1074	30 siklus (94°C 30 sn, 52°C 1 dk, 72°C 90 sn), 72°C 10 dk
TEM-R	5'-GGT CTG ACA GTT ACC AAT GC-3'		
SHV-F	5'-CGC CGG GTT ATT CTT ATT TGT CGC-3'	1016	30 siklus (94°C 45 sn, 65°C 1 dk, 72°C 3 dk), 72°C 10dk
SHV-R	5'-TCT TTC CGA TGC CGC CGC CAG TCA-3'		
CTX-M-F	5'-CGC TTT GCG ATG TGC AG-3'	544	30 siklus (94°C 1 dk, 54°C 1 dk, 72°C 2 dk), 72°C 10dk
CTX-M-R	5'-ACC GCG ATA TCG TTG GT-3'		

dirençli bulunmuştur. Kökenlerin tamamı disk difüzyon yöntemi ile amoksisilin klavulanik asite dirençli bulunurken agar dilüsyon yöntemiyle %56,7'si dirençli, %43,3'ü orta duyarlı bulunmuştur (Tablo 2).

Kökenlerin tamamı disk difüzyon yöntemi ile trimetoprim-sülfametaksazole dirençli bulunurken, tobramisin, tetrasiklin, netilmisin, gentamisin ve amikasinle sırasıyla %96,6, %93,3, %90, %70 ve %20 dirençli olarak bulunmuştur (Tablo 2). Beta laktam antibiyotiklerin agar dilüsyon yöntemi ile belirlenen MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri Tablo 2'de verilmiştir.

26 köken, hem TZ/TZL hem de CT/CTL E-test'leri ile GSBL pozitif bulunurken, 4 köken her iki E-test stripi ile tanımsız olarak değerlendirilmiştir. IBC enziminin varlığının fenotipik olarak saptanmasında kullanılan çift disk sinerji yöntemi ile 2 köken kesin pozitif olarak değerlendirilirken, 5 köken ise imipenem-seftazidim arasındaki genişlemesinin yanında amoksisilin-klavulanik asit-seftazidim ve piperasilin tazobaktam-seftazidim arasındaki zon genişlemelerinin varlığı sebebiyle şüpheli pozitif olarak değerlendirilmiştir (Resim 1).

Çalışmamızda kullanılan kökenlerin 5'i sadece *bla*_{SHV}, 1'i *bla*_{TEM} ve 1'i de *bla*_{CTX-M} genleri tek başına taşırken, 22 kökenin iki veya daha fazla GSBL genini bir arada taşıdığı tespit edilmiştir. 1 kökenin ise *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} ve *bla*_{CTX-M} genlerinden hiçbirini taşımadığı tespit edilmiştir. Buna göre TEM, SHV ve CTX-M enzimlerinin görülme oranları sırasıyla %73,3, %60 ve %56,6 olarak tespit edilmiştir. IBC-1 enziminin varlığı fenotipik yöntemlerle bazı kökenlerde pozitif olmasına rağmen, bütün kökenler PZR sonuçlarına göre, *bla*_{IBC-1} geni açısından negatif bulunmuştur (Tablo 3).

TARTIŞMA

Hastaneler, mobil genetik elementler ile taşınan direnç genlerinin kişiden kişiye ve türler arasında yayılması için en ideal ortamlardır. Klinik önemi olan bakterilerde, özellikle hastane ortamında, bu mekanizmalar çoklu antibiyotik direncinin gelişimine yol açarak, hastanede yatış süresinin uzamasına, tedavide sorunların ortaya çıkmasına ve hatta enfeksiyonun ölüme sonuçlanmasına neden olmaktadır. Antibiyotik direnç mekanizmaları arasında GSBL üretimi, çoklu antibiyotik diren-

Tablo 2. Kökenlerin antibiyotik duyarlılık sonuçları.

Antibiyotik	Disk difüzyon Yöntemi (%)			Agar Dilüsyon Yöntemi (%)			MiK ₅₀ (mg/L)	MiK ₉₀ (mg/L)
	S	I	R	S	I	R		
Ampisilin	0	0	100	0	0	100	>256	>256
Amoksisilin Klavulanik Asit	0	0	100	0	43,3	56,7	32	64
Piperasillin	0	0	100	0	0	100	>256	>256
Piperasilin Tazobaktam	50	26,6	23,4	43,4	33,3	23,3	32	128
Sefoksitin	63,3	3,3	33,3	63,2	10	26,8	8	>256
Seftazidim	0	0	100	0	0	100	128	>256
Sefotaksim	0	23,3	76,6	0	13,2	86,8	128	>256
Sefepim	266	20	52	30,1	16,6	53,3	16	32
İmipenem	100	0	0	100	0	0	0,5	0,5
Aztreonam*	0	3,3	96,6	-	-	-	-	-
Gentamisin*	26,6	3,3	70	-	-	-	-	-
Tobramisin*	52	0	96,6	-	-	-	-	-
Netilmisin*	6,6	3,3	90	-	-	-	-	-
Amikasin*	52	26	20	-	-	-	-	-
Tetrasiklin*	6,6	0	93,3	-	-	-	-	-
Trimetoprim Sülfametaksazol*	0	0	100	-	-	-	-	-

*Sadece disk difüzyon yöntemi ile çalışılmıştır.
S: Duyarlı, I: Orta Duyarlı, R: Dirençli, MiK: Minimum inhibitör konsantrasyon

Tablo 3. Geniş spektrumlu beta laktamaz genlerinin dağılımı.

GSBL Geni	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=12)	<i>Escherichia coli</i> (n=11)	<i>Enterobacter cloacae</i> (n=7)	Toplam (n=30)
TEM	1	0	0	1
SHV	1	1	3	5
CTX-M	0	1	0	1
TEM+SHV	3	0	3	6
TEM+CTX-M	2	7	0	9
SHV+CTX-M	1	0	1	2
TEM+SHV+CTX-M	4	1	0	5
IBC-1	0	0	0	0
Negatif	0	1	0	1

cine sebep olan önemli bir mekanizma olup, özellikle hastane enfeksiyonu etkeni gram negatif bakterilerde (*Klebsiella*, *E. coli*, *Enterobacter spp.* vb.) yaygın olarak bulunmaktadır. Yeni geliştirilen antibiyotiklerin uzun süreli etkin olarak klinik kullanımda kalması bunlara karşı yeni GSBL'lerin ortaya çıkmasına neden

olmaktadır. Bu durum günümüzde enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde hem insan hayatını tehdit eden hem de maliyet açısından büyük yükümlülükler getiren bir tablonun ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Yeni GSBL'lerin tiplendirilmesi, bunların ortaya çıkış mekanizmalarının belirlenmesi, enfeksiyon

etkeni bakteriler arasındaki yaygınlıklarının ortaya konması, gelecekteki antibakteriyel tedavi stratejilerinin saptanmasında önemli rol oynayacaktır (11,12).

TEM, SHV ve CTX-M dışı GSBL'ler (VEB, GES, IBC, PER, TLA, BES ve SFO) ise nadir gözlemlenen aynı zamanda çeşitli coğrafik bölgelere özgü oldukları belirlenen enzimlerdir. Buna rağmen bu enzimlerin aktarılabılır plazmidlerde kodlanması, bölgeler arasında bu enzimlerin yayılabileceğini ve risk oluşturabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle risk altında bulunan bölgelerde belirli aralıklarla bu enzimlerin varlığının araştırılması ve tiplendirilmesi hem bu enzimler yoluyla oluşan direncin daha iyi anlaşılması hem de bunlara karşı önlem alınması açısından önemlidir (13).

İlk olarak Yunanistan'da tespit edilen IBC-1 enzimi bir *Enterobacter cloacae* (HT9) kökeninde tespit edilmiş ve seftazidime, klavulanat kombinasyonlarına dirençli olduğu, piperasilin tazobaktam ve klavulanik aside göre imipenem ile daha iyi inhibe olduğunu saptanmıştır. Aynı zamanda bu kökenin gentamisin hariç aminoglikozidlere ve trimetoprim sülfametaksazole çapraz direnç gösterdiği belirlenmiştir (4). Çalışmamızda kullandığımız kökenler de seftazidime, beta laktam/beta laktamaz inhibitörlerine dirençli, imipeneme duyarlı olması nedeniyle IBC-1 fenotipine uymaktadır. Aynı zamanda kökenlerin, %90'dan fazlasının netilmisin ve tobramisine dirençli bulunması, gentamisin direncinin ise görece olarak daha düşük olması literatürdeki IBC-1 fenotipi ile de benzerlik göstermektedir. Tüm *Enterobacter cloacae* kökenlerimiz IBC-1 fenotipi ile tamamen uyum göstermekte olup sefoksitin ve aztreonama da dirençli bulunmuştur.

Kartali ve ark. yoğun bakım ünitesinden izole edilen 27 *Enterobacter cloacae* kökeninin 18'inin IBC-1 enzimi ürettiğini saptamışlar ve bu kökenlerin rutin laboratuvarında tespitinde seftazidim-imipenem sinerji testinin yarar sağladığından bahsetmişlerdir (14). Vourli ve ark. 271 *Klebsiella pneumoniae* kökeninin 32'sinde PZR ile *bla*_{IBC-1} varlığını göstermişler ancak seftazidim-imipenem sinerji testi bu kökenlerin 25 tanesini pozitif olarak değerlendirmişlerdir (6). Bizim çalışmamızda da kullandığımız imipenem-seftazidim sinerji testi ile fenotipik olarak 2 köken pozitif ve 5 köken ise şüpheli pozitif olarak değerlendirilmiştir. Ancak bu kökenlerin hiçbirinde PZR ile *bla*_{IBC-1} genine rastlanmamıştır. Bu sonuçlar, IBC-1 enzimi açısından fenotipik yöntem olarak önerilen seftazidim-imipenem sinerji yönteminin henüz standardize olmadığını göstermektedir.

GES tipi enzimler ilk olarak 1998 yılında Fransa'da bir *K. pneumoniae* kökeninde saptanmıştır; penisilin ve sefalosporinlere dirençli, sefamisin ve karbapenemlere duyarlı olduğu bulunmuştur. 2001 yılında bir nokta mutasyonu ile farklılık gösteren IBC-1(GES-7) enzimi tanımlanmıştır. Sonradan IBC enziminin isimlendirilmesi GES olarak revize edilmiştir. Bugüne kadar 40'dan fazla GES varyantı saptanmıştır. Bu enzimlerden Gly170Asn veya Gly170Ser mutasyonlarına sahip 11 tanesi karbapenemaz aktivitesi göstermektedir. Diğer GES varyantları, herhangi bir karbapenem hidrolize edici aktivitesi olma-

yan GSBL'ler olarak kategorize edilmiştir. GES tipi GSBL'lerde meydana gelen nokta mutasyonları ile karbapenemaz aktivitesi kazanmaları endişe verici bir durumdur. Nadir olmasına rağmen, GES karbapenemazları şu anda dünya çapında tanımlanmış olup, Yunanistan, Fransa, Portekiz, Güney Afrika, Brezilya, Arjantin, Kore, ABD, Kanada, Çin, Belçika ve Japonya'dan tek tek vakalar şeklinde bildirilmiştir. Türkiye'de yapılan çalışmalarda GES-11, GES-14 ve GES-22 üreten kökenler bildirilmiştir (15-17).

Çalışma sonuçlarımız GSBL pozitif mikroorganizmalarla enfekte olan hastaların tedavisinde beta laktam grubu antibiyotiklerin kullanılmasının başarısız sonuçlar doğuracağını ortaya koymaktadır. Buna ek olarak beta laktam/beta laktamaz inhibitörlü kombinasyonlara ve diğer antibiyotik gruplarına da çoklu direnç giderek artmaktadır. Nitekim GSBL pozitif ya da tanımsız olarak saptanan kökenlerimizin beta laktam dışı antibiyotiklere yüksek düzeyde direnç gösterdikleri (trimetoprim-sülfametaksazol direnci %100, tetrasiklin direnci %93,3, tobramisin direnci %96,6, netilmisin direnci %90, gentamisin direnci %70) gözlemlenmiştir.

Ülkemizden bildirilen birçok çalışmada olduğu gibi, hastane-mizden izole edilen kökenlerimizde de TEM ve SHV enzimleri yaygın olduğu kadar CTX-M grubu enzimlerin oranı da oldukça fazladır (10,18-20). Çalışmamızda, PZR ile 12 *Klebsiella pneumoniae* kökenlerinin 10'unda *bla*_{TEM} geni, 9'unda *bla*_{SHV}, 7'sinde *bla*_{CTX-M} genleri pozitif olarak bulunmuştur. On bir *Escherichia coli* kökenlerinin 8'inde *bla*_{TEM} geni, 2'sinde *bla*_{SHV}, 9'unda *bla*_{CTX-M} genleri pozitif olarak bulunmuştur. Yedi *Enterobacter cloacae* kökenlerinin 4'ünde *bla*_{TEM}, 7'sinde *bla*_{SHV}, 1'inde *bla*_{CTX-M} geni pozitif olarak bulunmuştur. 5 kökenimiz *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} genlerini, 7 kökenimiz *bla*_{TEM} ve *bla*_{SHV} genlerini, 2 kökenimiz *bla*_{SHV} ve *bla*_{CTX-M} genlerini, 8 kökenimiz *bla*_{TEM} ve *bla*_{CTX-M} genlerini bir arada taşımaktadır. Bir *Escherichia coli* kökenimiz fenotipik yöntemlerle GSBL pozitif olmasına rağmen *bla*_{IBC-1}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} genlerinden hiçbirini taşımadığı belirlenmiştir. Muhtemelen bu kökende başka bir enzim ya da başka bir direnç mekanizması mevcuttur. E-test ile tanımsız olarak değerlendirilen 4 kökenin PZR ile 2'sinde *bla*_{TEM} ve *bla*_{SHV}, 1'inde *bla*_{SHV} ve *bla*_{CTX-M} genleri bir arada bulunurken, 1'inde sadece *bla*_{SHV} geni pozitif olarak bulunmuştur.

Marmara Üniversitesi hastanesinden, 2004 yılı itibarıyla *E. coli* ve *Klebsiella pneumoniae* kökenlerinde GSBL pozitiflik oranı sırasıyla %25 ve %35 iken 2020 yılı itibarıyla bu oran %45,5 ve %53,1dir. Çalışmamızın yapıldığı yıllarda yaygın görülen bu enzimler günümüzde de hala etkilerini sürdürmektedir. Bu enzimlerin yıllar içerisindeki hızlı artışının en önemli nedenleri, uygunsuz antibiyotik kullanımı, yetersiz raporlama, sağlıklı bireylerde gastrointestinal taşıyıcılığın artması, hastane enfeksiyonlarındaki belirgin artıştır. Aynı zamanda 2000'li yıllardan sonra GSBL pozitif kökenlerin toplam kökenli enfeksiyonlarda görülmeye başlanması oldukça önemlidir. 2000'li yılların öncesinde TEM ve SHV enzimleri sıklıkla saptanırken, günümüzde artık CTX-M tipi enzimler birinci sırada yer almaktadır. Yapılan çalışmalarda CTX-M geninin diğer antibiyotiklere direnç genle-

ri ile beraber taşındığı saptanmıştır. Dolayısıyla yıllar içerisinde çoklu ilaç direncine sahip başarılı klonlar hızlı bir şekilde artış göstermiştir (21).

Antibiyotiklerin yaygın ve bilinçsiz kullanımı nedeniyle antibiyotik direnci önemli bir sorun haline gelmiştir. Her hastane, enfeksiyon etkeni olarak izole ettiği kökenlerinde antibiyotik direnç mekanizmalarını ve uygun antibiyotik kullanımını belirlemeli, beta laktamaz üretimini artıran beta laktam antibiyotiklerin kullanımını sınırlandırmalıdır. GSBL enzimleri dünyada olduğu gibi ülkemizde de yaygın olarak bulunmaktadır. Sonuçlarımız beta laktam antibiyotik direncinin ülkemizde önemli bir sorun olduğunu tekrar ortaya koymuştur. IBC-1 enzimi ise şimdiye kadar sadece Yunanistan'da saptanmış olup muhtemelen bölgesel sorun oluşturan bir GSBL'dir. Bizim çalışmamızda ve diğer ülkelerde yapılan çalışmalarda henüz bu enzime rastlanmamıştır. Bu bulgu her ne kadar şu andaki durumunu ifade ediyorsa da gelecekte bu enzimi üreten kökenlerin izole edilmeyeceğinin garantisini vermemektedir. Bu nedenle bu tür çalışmaların belirli aralıklarla tekrar edilip ülkemize ait profillerin belirlenmesinde büyük yarar vardır.

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

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarımı - G.A.G., G.S., U.H.; Veri Toplama - G.A.G., G.S.; Veri Analizi/Yorumlama - G.A.G., G.S.; Yazma - G.A.G.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi - G.S., U.H.; Son Onay ve Sorumluluk - G.A.G., G.S., U.H.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje no: SAG-YLS-100105-0005).

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

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study - G.A.G., G.S., U.H.; Data Collection - G.A.G., G.S.; Analysis and/or Interpretation - G.A.G., G.S.; Drafting Manuscript - G.A.G.; Critical Revision of Manuscript - G.S., U.H.; Final Approval and Accountability - G.A.G., G.S., U.H.

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

Financial Disclosure: This study was supported by Marmara University Scientific Research Projects Commission (Project no: SAG-YLS-100105-0005).

KAYNAKLAR/REFERENCES

- Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18(4): 657-86. [CrossRef]
- Akova M. Dikkat Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz (GSBL) Var! *ANKEM Dergisi* 2004; 18(2): 98-103.
- Stürenburg E, Mack D. Extended Spectrum Beta Lactamases Implications for The Clinical Microbiology Laboratory, Therapy and Infection Control. *J Infect* 2003; 47: 273-95. [CrossRef]
- Giakkoupi P, Tzouveleki SL, Tsakris A, Loukova V, Sofianou D, Tzelepi E. IBC-1 a Novel Integron Associated Class A Beta Lactamases with Extended Spectrum Properties Produced by an *Enterobacter cloacae* Clinical Strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(9): 2247-53. [CrossRef]
- Vourli S, Tzouveleki SL, Tzelepi E, Lebessi NJ, Miriagou V. Characterization of In111 a Class 1 Integron That Carries the Extended-Spectrum Beta-Lactamase Gene *bla* IBC-1. *FEMS Microbiol Lett* 2003; 225: 149-53. [CrossRef]
- Vourli S, Tzouveleki SL, Tzelepi E. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* Clinical Strain Producing a Rare Extended Spectrum Beta Lactamase (IBC-1). *Int J Antimicrob Agents* 2003; 21(5): 495-7. [CrossRef]
- Tzelepi E, Managa C, Platsouka E, Sofianou D, Paniara O, Legakis NJ, et al. Extended Spectrum Beta Lactamase Types in *Klebsiella pneumoniae* and *E. coli* in Two Greek Hospitals. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 21: 285-8.
- Lebessi E, Stamos G, Foustoukou M, Vourli S, Legakis NJ, Tzouveleki LS. Performance of Methods for Detection Of Extended-Spectrum Beta-Lactamases Applied to Clinical Enterobacterial Strains Producing IBC-Type of Beta-Lactamases. *J Clin Microbiol* 2003; 41(2): 912. [CrossRef]
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 22th ed. CLSI Supplement M100. Wayne, PA: CLSI, 2004.
- Öksüz L, Gürler N. *Escherichia coli* ve *Klebsiella spp.* Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazların Tiplendirilmesi ve Plazmid Profil Analizi. *Mikrobiyoloji Bülteni* 2009; 43: 183-94.
- Bradford PA. Extended Spectrum Beta Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(4): 933-51. [CrossRef]
- Shaikh S, Fatima J, Shakil S, Rizvi SM, Kamal MA. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi J Biol Sci* 2015; 22(1): 90-101. [CrossRef]
- Naas T, Poirel L, Nordmann P. Minor extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect* 2008; Suppl 1: 42-52.
- Kartali G, Tzelepi E, Pournaras S, Kontopoulou C, Kontos F, Sofianou D, et al. Outbreak of Infections Caused by *Enterobacter cloacae* Producing the Integron-Associated Beta Lactamase IBC-1 in a Neonatal Intensive Care Unit of a Greek Hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(5): 1577-80. [CrossRef]
- Bonnin RA, Jousset AB, Emeraud C, Oueslati S, Dortet L, Naas T. Genetic Diversity, Biochemical Properties, and Detection Methods of Minor Carbapenemases in Enterobacterales. *Front Med (Lausanne)* 2021; 20(7): 616490. [CrossRef]
- Cicek AC, Saral A, Iraz M, Ceylan A, Duzgun AO, Peleg AY, et al. OXA- and GES-type-lactamases predominate in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a Turkish University Hospital. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20: 410-5. [CrossRef]
- Naas T, Dortet L, Iorga BI. Structural and Functional Aspects of Class A Carbapenemases. *Curr Drug Targets* 2016; 17(9): 1006-28. [CrossRef]
- Bektaş A, Güdücüoğlu H, Gürsoy NC, Berkeş M, Gültepe BS, Parlak M, et al. Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz (GSBL) Üreten *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* Suşlarının GSBL Genlerinin Araştırılması. *FLORA Dergisi* 2018; 23(3): 116-23. [CrossRef]

19. Copur Cicek A, Saral A, Ozad Duzgun A, Yasar E, Cizmeci Z, Ozlem Balci P, et al. Nationwide study of *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases TEM, SHV and CTX-M in Turkey. *J Antibiot (Tokyo)* 2013; 66(11): 647-50. [\[CrossRef\]](#)
20. Dağlar D, Ongüt G, Oğünç D, Ozhak Baysan B, Demirbakan H, et al. Toplum kaynaklı üriner sistem enfeksiyonu etkeni *Escherichia coli* suşlarında GSB β L enzim tiplerinin izoelektrik odaklama ve polimeraz zincir reaksiyonu yöntemleri ile araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2010; 44(3): 367-74.
21. Bush K. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; 2(10): e01076-18.

Metal Nanoparticles-Mediated Changes on Gene Expressions and Physiological Parameters of *Capsicum annuum* L.

Metal Nanopartiküller Aracılığıyla, *Capsicum annuum* L.'nin Gen Ekspresyonu ve Fizyolojik Parametreleri Üzerindeki Değişiklikler

Hülya Akdemir¹ 

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

ORCID ID: H.A. 0000-0001-7923-3031

Cite this article as: Akdemir H. Metal nanoparticles-mediated changes on gene expressions and physiological parameters of *Capsicum annuum* L. Experimed 2021; 11(2): 88-95.

ABSTRACT

Objective: The uptake and accumulation of nanoparticles by plants create a potential threat for human health in cases where humans consume the plants. The aim of the study was to analyze the potential beneficial or inhibitory effects of nAl₂O₃ and nZnO on *Capsicum annuum* L. (pepper)'s germination, root growth, and expression levels of aquaporin and dehydrin genes.

Material and Method: Different concentrations (0.5, 2.5, or 5.0 mM) of nAl₂O₃ and nZnO were used for the germination of pepper seeds. ICP-MS analysis was performed to determine ion contents in nanoparticle-treated pepper plants. Levels of aquaporin and dehydrin gene expressions were analyzed by quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR).

Results: The pepper germination was not affected by nanoparticle applications. While nAl₂O₃ treatments did not change root growth, higher concentrations of nZnO negatively affected root length and root number. In particular, the application of 0.5 mM nZnO significantly upregulated aquaporin and dehydrin gene expressions in roots. Downregulation of dehydrin gene expression occurred in stems and roots after exposure to nAl₂O₃ treatments.

Conclusion: The gene expression alterations and changes of growth parameters showed especially nZnO have potentially phytotoxic for pepper plants. Moreover, expression analysis suggested that the tested genes may play roles in response to the nanoparticle-based abiotic stress.

Keywords: Aquaporin, dehydrin, nanoparticles, nAl₂O₃, nZnO, germination, *Capsicum annuum* L., pepper

ÖZ

Amaç: Nanopartiküllerin bitkiler tarafından alınması ve biriktirilmesi, bu bitkilerin insanlar tarafından tüketilmesi durumunda insan sağlığı için potansiyel bir tehdit oluşturmaktadır. Bu çalışmada, nAl₂O₃ ve nZnO'nun *Capsicum annuum* L. (biber)'in çimlenmesi, kök büyümesi ile aquaporin ve dehidrin genlerinin ekspresyon seviyeleri üzerindeki potansiyel yararlı veya inhibe edici etkilerinin analiz edilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Biber tohumlarının çimlenmesi için farklı konsantrasyonlarda (0,5, 2,5 veya 5,0 mM) nAl₂O₃ ve nZnO kullanılmıştır. Nanopartikül uygulanmış biber bitkilerinde iyon içeriklerini belirlemek için, ICP-MS analizi yapılmıştır. Aquaporin ve dehidrin gen ekspresyonlarının seviyeleri ise kantitatif ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ile analiz edilmiştir.

Bulgular: Nanopartikül uygulamasının biber çimlenmesi üzerinde etkisi tespit edilmemiştir. nAl₂O₃ uygulamaları kök gelişimini de-ğıştirmezken, yüksek nZnO konsantrasyonları kök uzunluğunu ve kök sayısını olumsuz yönde etkilemiştir. Köklerdeki aquaporin ve dehidrin gen ekspresyonu, özellikle 0,5 mM nZnO uygulaması ile artmıştır. nAl₂O₃ uygulanan kök ve gövdelerde ise dehidrin gen ekspresyonu azalmıştır.

Sonuç: Gen ekspresyon ve büyüme parametrelerindeki değişiklikler, özellikle nZnO'nun biber bitkileri için potansiyel olarak fitotoksik olduğunu göstermiştir. Ayrıca, ekspresyon analizi, test edilen genlerin nanopartikül bazlı abiyotik strese yanıt olarak rol oynayabileceğini önermektedir.

Anahtar Kelimeler: Aquaporin, dehidrin, nanopartikül, nAl₂O₃, nZnO, çimlenme, *Capsicum annuum* L., biber

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

Submitted/Başvuru: 07.06.2021 **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 28.06.2021

Last Revision Received/Son Revizyon: 07.07.2021 **Accepted/Kabul:** 08.07.2021



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

INTRODUCTION

Engineered nanomaterials with their unique technical properties have extensive use in various technology and industrial sectors including mechanical industries, energy applications, environmental remediation, biosensing applications and many others (1).

Metal/metal oxide nanoparticles as engineered nanomaterials are synthesized by the addition of reducing agents to produce metal nanoparticles or oxidizing/precipitating agents for metal oxide nanoparticles (2). Because of the wide variety of applications of these nanoparticles in various industries, their effects on environment and several organisms including plants have been extensively studied (1).

Since the nanoparticles can contaminate plants in different stages of their life cycle (3), detailed studies should have been performed at molecular, cellular, metabolic, and physiological levels to comprehend the actual effects of metal oxide nanoparticles on plants. Analysis of their effects on seed germination and root elongation as a phytotoxicity parameter of these nanoparticles (4) have been studied in many plant species.

Assessment of changes on gene expression levels are another important parameter to obtain nanoparticle-based changes in plant body. Plants contain a large number of aquaporins, which are proteins responsible for controlling water transport and facilitating the transport of uncharged solutes across membranes (5). The importance of aquaporins has been demonstrated in various abiotic stress conditions (5) and alterations in their gene expressions following nanoparticle treatments were also obtained in plants (6). Even though their roles are not yet clearly understood, dehydrins are considered as stress proteins, which play a role in dehydration stress, and it is also suggested that some dehydrins may have critical roles in plant growth (7). It was demonstrated that expression levels of several genes such as aquaporins, oxidative response genes and housekeeping genes were affected by nanoparticle treatments (8,9).

The uptake and accumulation of these nanoparticles by plants create a potential threat for human health in cases where humans consume the plants (10). *Capsicum annuum* L. (peppers) belong to the Solanaceae family and they are extensively consumed as both vegetables and spices across the world. Large areas of land in several countries such as Mexico, China, Korea, USA have been used for pepper cultivation because of their use in many cuisines (11). It suggests that there is possible nanoparticle contamination risk for these large land cultivation areas. In the study, pepper was used as a plant material because of its high consumption and production levels across the world and it was aimed to analyze potential beneficial or inhibitory effects of two metal oxide nanoparticles ($n\text{Al}_2\text{O}_3$ and $n\text{ZnO}$) on its germination, root growth and expression levels of aquaporin (*CaAqp*) and dehydrin (*CaDhn*) genes.

MATERIAL AND METHOD

Plant Material

The pepper (*Capsicum annuum* L.) hybrid Bafra F1 seeds were used as a plant material. The seeds were gifted from Mehmet Yüksel, Yüksel Tohum (Antalya, Turkey) and kept in the dark at 4°C until use.

Characterization of Nanoparticles

The $n\text{Al}_2\text{O}_3$ (ca. 40 nm) and $n\text{ZnO}$ (<100 nm) nanopowders were purchased from PlasmaChem (Berlin, Germany) and Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA), respectively. Although commercial manufacturers characterized the $n\text{Al}_2\text{O}_3$ and $n\text{ZnO}$ in detail, scanning electron microscope (SEM) and transmission electron microscope (TEM) were also used to visualize shape and morphology of the nanoparticles.

For SEM analysis, the nanoparticles were placed on a carbon disc and coated with a few nm thick gold-layers by using a Baltec SDC 005 sputter-coater. SEM images were obtained using a Carl Zeiss Evo[®]40 instrument under high vacuum with an accelerating voltage of 10 kV.

For TEM analysis, FEI Tecnai G2 Spirit BioTwin CTEM instrument operating at an accelerating voltage of 120 kV were used.

Medium Preparation

Murashige and Skoog (MS) basal medium were purchased from Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA). 0.5, 2.5 and 5 mM of $n\text{Al}_2\text{O}_3$ and $n\text{ZnO}$ were used to test their effects on pepper plants. Firstly, nanopowders were suspended in half strength MS medium (pH: 6.0) by sonication for 30 min in ultrasonic water bath at room temperature, and then the suspensions were homogenized by stirring them for 20 min before use.

Plant germination and seedling establishment

The pepper seeds were imbibed with distilled water for 16 hours before treatments. Then, the seeds were transferred to 900 cm³ vitrovents (Duchefa, The Netherlands) including 1 layer of sterile damp filter paper moistened with 5 mL of sterile one-half-MS medium (pH: 6.0) containing 0.5, 2.5 and 5 mM $n\text{Al}_2\text{O}_3$ or $n\text{ZnO}$. For the control group, the seeds were transferred to the vitrovents including 1 layer of sterile damp filter paper moistened with 5 mL of sterile half strength MS medium without any of nanoparticles. Then, the vitrovents were incubated at 24°C for the first 7 days in the dark and then 8 days in the light. Each vitrovent containing 10 seeds per control group and nanoparticles treatments were used and each treatment was replicated three times.

Germination Data Analysis

The germination percentages, root number, length of roots and leaves of the control and nanoparticles-treated plants were obtained at the end of the 15th day of *Capsicum* seeds. SPSS version 25 (SPSS, USA) was used to perform statistical analysis. Germination percentages were analyzed with Chi-square statistics. One-way ANOVA (Analysis of variance) was performed to compare mean differences of leaf length. Root

length data were subjected to ANOVA, followed by Tukey post-hoc test to compare mean values. Because root number values do not have a normal distribution, the data were analyzed with the Kruskal-Wallis test, followed by the Mann-Whitney U test as a post hoc test. $p \leq 0.05$ was used as the level of significance for all the statistical analyses.

Gene expression analysis of *Capsicum annuum* L. genes

Quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to obtain impacts of nAl_2O_3 and $nZnO$ on the expression levels of genes, *CaDhn* (Accession no. AY225438.1) and *CaAqp2* (*CaTIP1*;1, Accession no. GU116569). Firstly, total RNA was extracted from the 15-day-old stems and 15-day-old roots of the peppers using the Plant/Fungi Total RNA purification kit (Norgen Biotek) according to the manufacturer's instructions, with DNaseI treatment (DNase I, RNase-free, NEB). The RNA quantification was performed using Nanodrop equipment (Thermo Scientific Nanodrop™ 2000) and RNA samples were visualized by running them in 1.5% agarose gel with EtBr to check their integrity. Secondly, cDNA templates were reverse transcribed from purified RNA samples (3 µg per treatment) using SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Invitrogen™) according to manufacturer's instructions. The obtained cDNAs were kept at -20°C until use in qRT-PCR. The NCBI database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and its BLAST tool (blast.ncbi.nlm.nih.gov) were used to get full-length sequences and verification of mRNA sequences of *CaDhn* and *CaAqp2* genes, respectively. All gene-specific qRT-PCR primers from mRNA sequences were designed by Primer3 v4.1.0 (12).

The housekeeping genes, *Actin* mRNA, *GapdH* (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase GapCp) and *EIF5A2* (Eukaryotic translation initiation factor 5A2) were used for normalization and their primer sequences were obtained from Wan et al. (13).

The primers used in the present study are listed below (5' - 3'):

Actin mRNA (F; TGTTATGGTAGGGATGGGTC, R; TTCTCTCTATTGCGCTTGGG),

GapdH (F; ATGATGATGTGAAAGCAGCG, R; TTTCAACTGGTGCTGCTAC),

EIF5A2 (F; CCTGTTATCGTGCTACTTTG, R; GTTTCATTGCCKTGCCAGAT)

CaAqp2 (F; CGATGGCGTCACTACTCTCT, R; CACCAACGAAAGCACCGA)

CaDhn (F; GGAGAAATTGCCAGGGTATCACT, R; CAGAACACCACAATCATAACATACC)

qRT-PCR analysis was carried as three replicates. Reactions (10 µL) contain template cDNA (1 µL), Biorad iTaq Universal SYBR Green Supermix (5 µL), reverse (4 µM) and forward (4 µM) primers and nuclease-free water. CFX96 Touch Real Time PCR instrument (Biorad, France) was used for qRT-PCR analysis and the analysis conditions were 3 min at 95°C followed by 40 cycles of 5 sec at 95°C and 30 sec at 60°C.

Melt curve analysis was performed following each qRT-PCR amplification by heating the product from 65°C to 95°C, 0.5°C in 5 s increments. The optimal cycle threshold (Ct) was determined using Biorad CFX Manager 3.1 software. The above-men-

tioned housekeeping genes were used for normalization using GeNorm V3 algorithm (14). The obtained normalized c_q values were processed according to the $\Delta\Delta c_q$ method and presented as relative expression values for each gene.

Determination of ion content

Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS, Thermo ICP MS X Series 2) was used to determine the level of aluminum and zinc ion contents of nAl_2O_3 or $nZnO$ treated pepper plants. The control and nanoparticles-treated plant samples (ca. 0.1 g) were weighted and digested with a 6 mL 65% (v/v) nitric acid. Following incubation in an ultrasonic water bath for 15 min, the samples were kept at room temperature for 24 h to complete the extraction. One-way ANOVA was performed to compare mean differences of ion contents in nanoparticles-treated plants.

Dissolution of Al^{3+} and Zn^{2+} ions in the exposure medium was obtained according to Leclerc and Wilkinson (15):

1. Centrifugation of the medium at 2500×g using centrifugation tubes containing 3 kDa centrifugal ultrafiltration unit (Merk Millipore, Germany) for 15 min at 0., 1., and 7. day.
2. Repetition of the 1st step four times and collecting only the filtrate at each centrifugation step.
3. Addition of 2% nitric acid to the 1 mL of filtrate.
4. ICP-MS analysis was evaluated to measure the release rates of Al^{3+} and Zn^{2+} from nAl_2O_3 or $nZnO$.

For all ICP-MS analysis, multi-element ICP QC Standard solution (Chem-Lab, Belgium) was used as ICP-MS standard.

RESULTS

Characterization of Nanoparticles

SEM (Figure 1A-1B) and TEM (Figure 1C-1D) analysis were performed to visualize the shape and size of the tested nanopar-

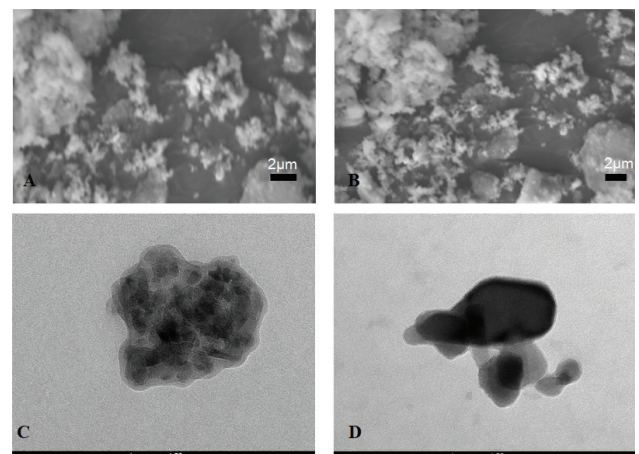


Figure 1. Images of the nAl_2O_3 (A, SEM; C, TEM) and $nZnO$ (B, SEM; D, TEM).

ticles. The images demonstrated the presence of uneven size with irregular, elongated, spherical shaped nanoparticles. While TEM analysis clearly showed that nZnO has different sizes from 40 nm to 100 nm, the nAl₂O₃ images were very low-resolution so it was not possible to obtain their mean sizes.

Effects of nAl₂O₃ and nZnO on the germination parameters of pepper

The effects of different nAl₂O₃ and nZnO concentrations (0.5, 2.5 and 5 mM) on pepper germination were analyzed and the germination percentages are presented in Figure 2. The results showed that the germination percentages of pepper seeds germinated in the MS medium at those nanoparticles concentrations were not statistically different in comparison to the control group seeds, which were germinated in the medium without nanoparticles.

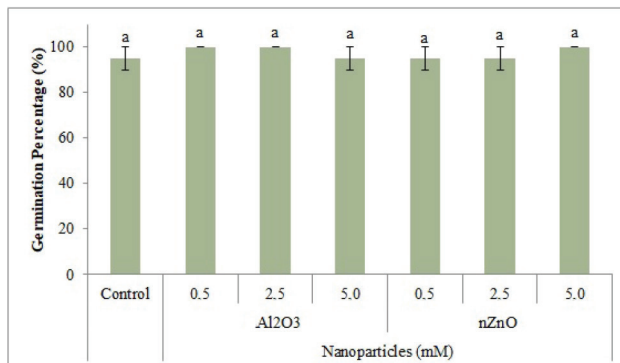


Figure 2. Germination percentages of nAl₂O₃ and ZnO-treated pepper seeds.

The average length of root and leaf of pepper plants were recorded and the results are presented in Table 1. Even though the longest leaves (60.8 mm) were obtained in the control and 2.5 mM nAl₂O₃-treated pepper plants, there were no statistically significant differences among the tested plants.

While the control and nAl₂O₃-treated pepper plants had statistically similar root lengths, the application of nZnO at different concentrations affected root length compared to control plants. The longest roots (36.2 mm) and the shortest roots (14.7 mm) were obtained with the application of the lowest and highest nZnO concentrations, respectively.

Regarding number of roots, similar effects were observed with the application of nZnO at the end of the 15th day (Table 2). Even though a statistically similar number of roots were obtained in the control and nAl₂O₃-treated pepper plants, higher nZnO concentrations had adverse effects on the number of roots. The decreased root numbers (1.11 and 1.00) were obtained with the application of 0.25 and 0.5 mM nZnO concentrations (Table 2).

Determination of ion content

To understand the detailed impacts of applied metal nanoparticles on pepper plants, ICP-MS analysis was performed to obtain Al³⁺ and Zn²⁺ ions in pepper stems and roots following nAl₂O₃ and nZnO treatments. Interestingly, Al³⁺ ions were not detected in nAl₂O₃-treated pepper stems and roots with ICP-MS analysis. ICP-MS analysis showed the presence of Zn²⁺ ions in both pepper stems and roots with the application of nZnO in MS medium (Table 3). An accumulation of Zn²⁺ ions [44.3 and 70.4 mg/kg FW (fresh weight)] was found in 0.5 mM and 2.5 mM nZnO applied stems, respectively. The higher levels of Zn²⁺ ions were determined in the 0.5 mM (312.4 mg/kg FW) and 2.5

Table 1. Root and leaf length of control and nanoparticles-treated pepper plants.

Nanoparticles	Concentration (mM)	Average root length (mm)*	Average leaf length (mm)*
Control	0	29.1±1.59b	60.8±1.57a
Al ₂ O ₃	0.5	26.8±1.48b	59.4±3.03a
	2.5	27.5±1.89b	60.8±1.66a
	5.0	29.4±1.78ab	59.4±2.01a
	0.5	36.2±1.97a	55.5±2.56a
ZnO	2.5	22.7±1.31bc	57.0±2.27a
	5.0	14.7±0.88d	55.2±2.06a
	Significance test	<i>F</i> =13.830 <i>p</i> =0.000	<i>F</i> =1.079 <i>p</i> =0.383
Statistical Analysis Test		One-way ANOVA Tukey	One-way ANOVA

* Values were represented as mean±SE.

The different letters following the means in each column show statistical differences at *p*≤0.05 according to ANOVA Test. The mean differences were analyzed vertically.

Table 2. The impacts of nAl₂O₃ and nZnO on root numbers of pepper plants^a.

Nanoparticles	Concentration (mM)	Number of roots ^b	Kruskal-Wallis Test	
			Mean rank	Significance test
Control	0	1.84±0.27	78.53	$\chi^2=20.037$ df=6 p=0.003
	0.5	1.85±0.24	79.83	
	2.5	2.15±0.33	82.93	
Al ₂ O ₃	5.0	1.37±0.17	63.61	
	0.5	1.58±0.25	68.50	
ZnO	2.5	1.11±0.07*	55.74	
	5.0	1.00±0.00*	50.00	

^aRoot number values of the tested groups were individually compared with each other by using the Mann-Whitney U nonparametric test.
^bValues were represented as mean±SE.
*Values were significantly different (p≤0.05)

mM (933.5 mg/kg FW) nZnO-applied pepper roots. However, no statistical differences were detected in the content of Zn²⁺ ions between control and 5 mM nZnO-applied pepper stems and roots (Table 3).

ICP-MS analysis was performed to obtain the release rates of dissolved Al³⁺ and Zn²⁺ ions from nAl₂O₃ and nZnO containing MS media in 1st and 7th day. The results showed that the dissolution of Al³⁺ and Zn²⁺ ions from the applied nanoparticles was very low (Table 4). While Al³⁺ release from nAl₂O₃ was only 0.053%, Zn²⁺ release from nZnO was 0.153% even after 7 days (Table 4).

Table 3. Zn²⁺ content of pepper stems and roots treated with nZnO.

Concentration (mM)	Zn ²⁺ content (mg/kg FW)	
	Stem*	Root*
0 (Control)	2.21±0.06c	4.27±0.07c
0.5	44.32±0.19b	312.44±1.16b
2.5	70.39±0.60a	933.49±3.61a
5.0	2.81±0.13c	4.68±0.02c

* Values were represented as mean±SE.

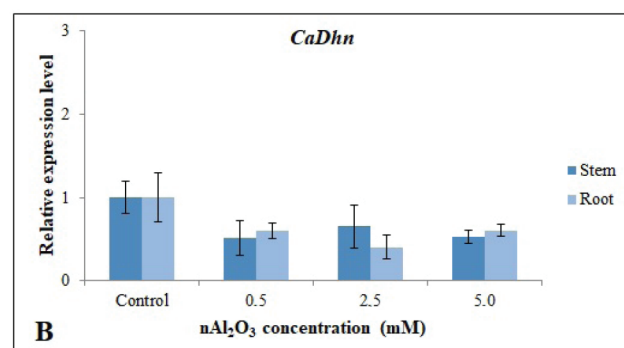
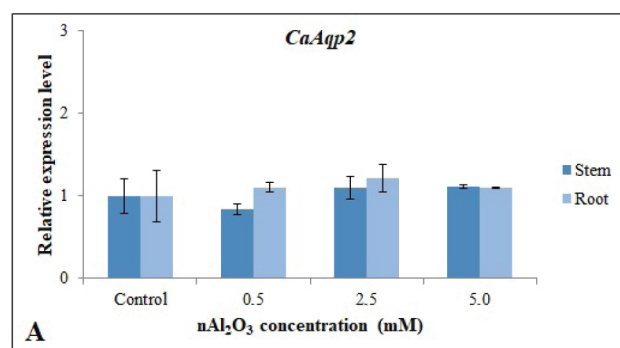
The different letters following the means in each column show statistical differences at p≤0.05 according to ANOVA Test.

Table 4. The percentages (%) of Al³⁺ and Zn²⁺ released from 2.5 mM nAl₂O₃ or nZnO containing culture medium.

Duration (days)	Al ³⁺ release (%)	Zn ²⁺ release (%)
0	-	-
1	0.028	0.069
7	0.053	0.153

qRT-PCR analysis of *CaAqp2* and *CaDhn* genes

To understand the effects of the tested metal nanoparticles at the molecular level, relative expression levels of two pepper genes (*CaAqp2* and *CaDhn*) were analyzed by qRT-PCR (Figure 3 and

**Figure 3.** Relative expression levels of *CaAqp2* and *CaDhn* in nAl₂O₃-treated pepper plants.

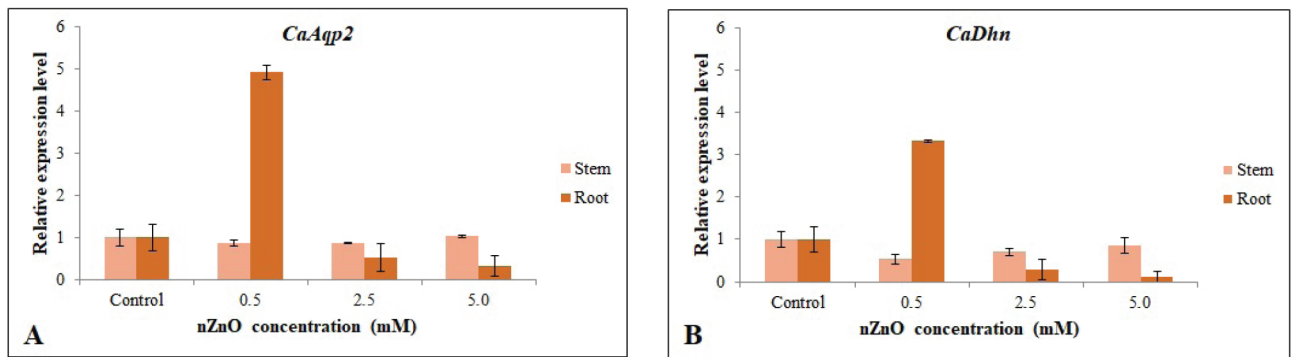


Figure 4. Relative expression levels of *CaAqp2* and *CaDhn* in nZnO-treated pepper plants.

Figure 4). Application of $n\text{Al}_2\text{O}_3$ did not have a significant effect on the relative expression of *CaAqp2* in stems and roots (Figure 3A). The only decrease in gene expression levels was obtained in stems of 0.5 mM $n\text{Al}_2\text{O}_3$ -treated pepper plants. Application of 2.5 and 5 mM $n\text{Al}_2\text{O}_3$ led to a slight increase of *CaAqp2* in stems and roots. On the other hand, $n\text{Al}_2\text{O}_3$ treatments inhibited *CaDhn* gene expression in stems and roots with respect to the control groups (Figure 3B). 0.5 and 5 mM $n\text{Al}_2\text{O}_3$ treatments resulted in statistically similar gene expression levels in stems and roots. 2.5 mM $n\text{Al}_2\text{O}_3$ treatments upregulated *CaDhn* gene expression in stems compared to the other applied concentrations.

The *CaAqp2* and *CaDhn* expression levels of pepper plants were strongly affected by nZnO treatments (Figure 4A and 4B). The highest *CaAqp2* expression (almost five times higher expression than that of control) was obtained in the roots of 0.5 mM nZnO-treated pepper plants (Figure 4A). Increased concentrations of nZnO applications resulted in inhibition of *CaAqp2* expression in roots. While *CaAqp2* expression levels showed a slight decrease in lower concentrations of nZnO applications in stems, the highest nZnO concentration (5 mM) resulted in similar gene expression levels when compared to the control group (Figure 4A). *CaDhn* gene expression in roots was significantly affected with the application of 0.5 mM nZnO (Figure 4B). Its expression was three-times higher than that of the control roots. However, higher nZnO treatments dramatically decreased *CaDhn* gene expression levels in roots. nZnO-applied pepper plants had lower gene expression of *CaDhn* in stems with respect to the control group (Figure 4B).

DISCUSSION

An increase in the worldwide use of engineered metal nanoparticles is predicted to result in an elevated transfer of these particles to the environment. The studies and modeling analysis showed that thousands of tons of nanoparticles including Al, Zn, Ag, Fe etc. have been released into the environment due to their extensive production (16). The studies demonstrated their toxic and sometimes promoting effects in various plant growth parameters. Being one of the most consumed vegetables, the contamination of pepper production areas with these nanoparticles is highly possible. Among these nanoparticles,

nZnO and $n\text{Al}_2\text{O}_3$ are the metal oxides and they have a wide application from electronics to biomedical applications and many others (17,18). In the present study, the impacts of $n\text{Al}_2\text{O}_3$ (ca. 40 nm) and nZnO (<100 nm) metal oxide nanoparticles were tested on pepper germination and seedling establishment parameters. The results showed that germination of pepper seeds was not affected with treatments of different concentrations of nZnO and $n\text{Al}_2\text{O}_3$. Similarly, *Cucurbita pepo* (zucchini) germination was unaffected by the treatment of 1000 mg/L nZnO (<5 nm and <10 nm) (19). Kumar et al. (20) tested the impacts of nZnO (≤ 50 nm) on several plant species and reported its inhibitory effects on cucumber germination and on shoot and root growth of wheat, green gram and cucumber. However, germination of rice was not significantly inhibited by the nanoparticles. Lee et al. (21) tested the effects of various metal oxide nanoparticles including $n\text{Al}_2\text{O}_3$, $n\text{SiO}_2$, $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ and nZnO on seed germination and root elongation of *Arabidopsis thaliana*. The results showed that while nZnO was the most phytotoxic, $n\text{Al}_2\text{O}_3$ was not toxic for these plants. Regarding root length and number, none of the concentrations of $n\text{Al}_2\text{O}_3$ used affected root growth of peppers. While the lowest concentration of nZnO treatments increased average root length, the highest levels of nZnO decreased root length compared to the control plants in this study. Higher nZnO concentrations also negatively affected the number of roots. Similarly, an increased root length in rice was obtained when the seeds were soaked in <100 mg/L nZnO solution for 1-2 days, but the root growth was dramatically inhibited at concentrations of 500 and 1000 mg/L ZnO (22). Similar to the shortest roots resulting from high nZnO concentrations, the application of higher nZnO concentrations also resulted in reduced root length in barley (23).

The studies show that the size, concentration, composition, physical and chemical properties determine the fate of these nanoparticles on plants (24). The plant cell walls have a size exclusion limit (~5-20 nm) (25). However, some nanoparticles such as silver nanoparticles in *Chlamydomonas reinhardtii* (26) led to the formation of bigger pores in the cell walls and thereby resulted in the entrance of larger particles. Root junction, wounding, endocytosis, and symplastic transport could be other ways to accumulate or transport the nanoparticles in the

plant body (1). Moreover, plants can accumulate nanoparticles directly or as metal ions (27). In the present study, no Al^{3+} ions were detected in nAl_2O_3 -treated pepper stems and roots with ICP-MS analysis. The results suggested that the ion content was probably out of detection limits. However, the increased Zn^{2+} contents in pepper stems and especially in the roots suggested that even though the $nZnO$ used in the present study is much bigger than the size limit for the plant cell wall, their uptake from shoots and roots could be acquired by one of above-mentioned mechanisms. The very low rates of dissolution of these ions from exposure to medium demonstrate that any obtained effects in pepper plants could be due to the direct uptake of these nanoparticles instead of their released ions. It can be concluded that the obtained effects on root length and root numbers of $nZnO$ -treated plants were probably due to the high uptake of nanoparticles and accumulation in roots and stems.

Plants have complex response and defense mechanisms to adapt to different stress conditions (28). The effects of nanoparticles could be also obtained at the level of gene expression. In the present study, relative expression levels of *CaAqp* (*CaTIP1;1*) from the tonoplast intrinsic proteins subfamily and *CaDhn* were investigated in 15-day-old pepper seedlings after exposure to nAl_2O_3 and $nZnO$.

Dehydrins are considered as stress proteins, and they play role in drought stress tolerance (7). They also have other functions such as binding metal ions, binding DNA, binding phospholipids and they can scavenge free radicals (7). Downregulation of *CaDhn* was observed in stems and roots following nAl_2O_3 and $nZnO$ treatments. Upregulation of *CaDhn* was only observed with lowest levels of $nZnO$ treatments in stems. The altered gene expression in stems and roots profiles indicates that this gene may have a function in metal oxide nanoparticle-based stress tolerance. In addition to their functions in water movement across cell membranes, aquaporins also have roles in response to the biotic and abiotic stress. The adverse effects of changes in aquaporin expression may especially be observed during germination and seedling development. However, nAl_2O_3 treatments did not significantly affect the investigated aquaporin gene expressions in pepper stems and roots. On the other hand, while $nZnO$ treatments at 0.5 mM concentration led to an upregulation of *CaAqp2* in root tissues, higher levels of $nZnO$ resulted in a downregulation of the gene in those tissues. Since roots are the first target for nanoparticles, alterations in gene expression might occur more often than expected in roots. It could be the reason for the critical alterations of gene expression in roots compared to that of stems. Aquaporin genes were significantly activated in tomato roots by carbon nanotubes treatments (29). The same increase was also observed in *Arabidopsis* plants after 1 week of exposure to Ag nanoparticles, but their levels decreased with prolonged exposure times (6). The altered *CaAqp2* expressions in the present study indicate that these nanoparticles affected plant's water and small molecules homeostasis following $nZnO$ treatments. A slight decrease of aquaporin genes was also observed in pepper stems in $nZnO$ applications. Gitto and Fricke (30) showed

that the decrease in expression of certain barley aquaporin genes was stronger with lower Zn treatments than higher Zn treatments. It is concluded that plants would have limited Zn transport to the shoot to prevent major toxicity (30).

CONCLUSION

The extensive use of metal nanoparticles worldwide is predicted to result in an elevated transfer of these particles to the environment. In the present study, the impacts of nAl_2O_3 and $nZnO$ on pepper germination, root growth and gene expression levels were analyzed. The results showed that pepper germination was not affected by nanoparticles applications. While nAl_2O_3 treatments did not significantly change root growth, higher concentrations of $nZnO$ negatively affected root length and root number. In particular, the application of 0.5 mM $nZnO$ upregulated aquaporin and dehydrin gene expressions in roots, significantly. Downregulation of dehydrin gene expression was obtained in stems and roots after exposure to nAl_2O_3 treatments. These gene expression alterations and changes of growth parameters showed that $nZnO$ especially is potentially phytotoxic for pepper plants. Moreover, expression analysis suggested that the tested genes may play roles in response to the nanoparticle based abiotic stress.

Acknowledgments: The author would like to thank Dr. Merve Seven for technical help in the gene expression analysis, Dr. Şaban Kalay for carrying out SEM analysis and Şahin Yılmaz for helping with ICP-MS analysis.

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

Peer-review: Externally peer-reviewed.

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

Teşekkür: Yazar, gen ekspresyon analizindeki teknik yardım için Dr. Merve Seven'e, SEM analizini gerçekleştiren Dr. Şaban Kalay'a ve ICP-MS analizine yardımcı olduğu için Şahin Yılmaz'a teşekkür eder.

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

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

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

REFERENCES

1. Rastogi A, Zivcak M, Sytar O, Kalaji HM, He X, Mbarki S, et al. Impact of metal and metal oxide nanoparticles on plant: A critical review. *Front Chem* 2017; 5: 78. [CrossRef]
2. Sanchez-Dominguez M, Boutonnet M, Solans C. A novel approach to metal and metal oxide nanoparticle synthesis: the oil-in-water microemulsion reaction method. *J Nanopart Res* 2009; 11:1823. [CrossRef]

3. Du W, Yang J, Peng Q, Liang X, Mao H. Comparison study of zinc nanoparticles and zinc sulphate on wheat growth: From toxicity and zinc biofortification. *Chemosphere* 2019; 227:109-116. [\[CrossRef\]](#)
4. Dogaroglu ZG, Koleli N. TiO₂ and ZnO nanoparticles toxicity in barley (*Hordeum vulgare* L.). *CLEAN Soil, Air, Water* 2017; 45(11): 1700096 (1-7). [\[CrossRef\]](#)
5. Afzal Z, Howton TC, Sun Y, Mukhtar MS. The Roles of Aquaporins in Plant Stress Responses. *J Dev Biol* 2016; 4(1):9. [\[CrossRef\]](#)
6. Qian H, Peng X, Han X, Ren J, Sun L, Fu Z. Comparison of the toxicity of silver nanoparticles and silver ions on the growth of terrestrial plant model *Arabidopsis thaliana*. *J Environ Sci* 2013; 25, 1947-1955. [\[CrossRef\]](#)
7. Liu Y, Song Q, Li D, Yang X and Li D. Multifunctional roles of plant dehydrins in response to environmental stresses. *Front Plant Sci* 2017; 8: 1018. [\[CrossRef\]](#)
8. Nair PM, Chung IM. Impact of copper oxide nanoparticles exposure on *Arabidopsis thaliana* growth, root system development, root lignification, and molecular level changes. *Environ Sci Pollut Res Int* 2014; 21: 12709-22. [\[CrossRef\]](#)
9. Selvakumaran RK, Franklin G. Nanoparticles affect the expression stability of housekeeping genes in plant cells. *Nanotechnol Sci Appl* 2020; 13: 77-88. [\[CrossRef\]](#)
10. Ma X, Yan J. Plant uptake and accumulation of engineered metallic nanoparticles from lab to field conditions. *Curr Opin Environ Sci Health* 2018; 6: 16-20. [\[CrossRef\]](#)
11. Olatunji TL, Afolayan AJ. The suitability of chili pepper (*Capsicum annuum* L.) for alleviating human micronutrient dietary deficiencies: A review. *Food Sci Nutr* 2018; 6(8): 2239-51. [\[CrossRef\]](#)
12. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3-New Capabilities and Interfaces. *Nucleic Acids Res* 2012; 40(15): e115. [\[CrossRef\]](#)
13. Wan H, Yuan W, Ruan M, Ye Q, Wang R, Li Z, et al. Identification of reference genes for reverse transcription quantitative real-time PCR normalization in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 416(1-2): 24-30. [\[CrossRef\]](#)
14. Vandensompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3 2002; research0034.0031. [\[CrossRef\]](#)
15. Leclerc S, Wilkinson KJ. Bioaccumulation of nanosilver by *Chlamydomonas reinhardtii*- Nanoparticle or the free ion? *Environ Sci Technol* 2014; 48(1):358-64. [\[CrossRef\]](#)
16. Rajput V, Minkina T, Sushkova S, Behal A, Maksimov A, Blicharska E, et al. ZnO and CuO nanoparticles: a threat to soil organisms, plants, and human health. *Environ Geochem Health* 2020; 42(1): 147-58. [\[CrossRef\]](#)
17. Jin Y, Fan X, Li X, Zhang Z, Sun L, Fu Z, et al. Distinct physiological and molecular responses in *Arabidopsis thaliana* exposed to aluminum oxide nanoparticles and ionic aluminum. *Environ Pollut* 2017; 228: 517-27. [\[CrossRef\]](#)
18. Jiang J, Pi J, Cai J. The advancing of zinc oxide nanoparticles for biomedical applications. *Bioinorg Chem Appl* 2018; 5: 1062562. [\[CrossRef\]](#)
19. Stampoulis D, Sinha SK, White JC. Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. *Environ Sci Technol* 2009; 43(24): 9473-9. [\[CrossRef\]](#)
20. Kumar S, Patra AK, Datta SC, Rosin KG, Purakayastha TJ. Phytotoxicity of nanoparticles to seed germination of plants. *Int J of Adv Res* 2015; 3(3): 854-65.
21. Lee CW, Mahendra YS, Zodrow YK, Li YD, Tsai YYC, Braam J. Developmental phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. *Environ Toxicol Chem* 2010; 29: 669-75. [\[CrossRef\]](#)
22. Boonyanitpong P, Kumar P, Kositsup B, Baruah S, Dutta J. Effects of zinc oxide nanoparticles on roots of rice *Oryza Sativa* L. *Int Conf Environ BioSci* 2011; 21: 172-6.
23. Akdemir H. Evaluation of transcription factor and aquaporin gene expressions in response to Al₂O₃ and ZnO nanoparticles during barley germination. *Plant Physiol Biochem* 2021; 166: 466-76. [\[CrossRef\]](#)
24. Ma X, Geisler-Lee J, Deng Y, Kolmakov A. Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation. *Sci Total Environ* 2010; 408: 3053-61. [\[CrossRef\]](#)
25. Schwab F, Zhai G, Kern M, Turner A, Schnoor JL, Wiesner MR. Barriers, pathways and processes for uptake, translocation and accumulation of nanomaterials in plants - Critical review. *Nanotoxicology* 2016; 10(3): 257-78. [\[CrossRef\]](#)
26. Navarro E, Piccapietra F, Wagner B, Marconi F, Kaegi R, Odzak N, et al. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ Sci Technol* 2008; 42(23): 8959-64. [\[CrossRef\]](#)
27. Cota Ruiz K, Delgado Rios M, Martinez-Martinez A, Nunez-Gastelum JA, Peralta Videa JR, Gardea Torresdey JL. Current findings on terrestrial plants - Engineered nanomaterial interactions: Are plants capable of phytoremediating nanomaterials from soil? *Curr Opin Environ Sci Health* 2018; 6: 9-15. [\[CrossRef\]](#)
28. Choi DW, Zhu B, Close TJ. The barley (*Hordeum vulgare* L.) dehydrin multigene family: sequences, allele types, chromosome assignments, and expression characteristics of 11 Dhn genes of cv. Dicktoo. *Theor Appl Genet* 1999; 98: 1234-47. [\[CrossRef\]](#)
29. Khodakovskaya MV, de Silva K, Nedosekin DA, Dervishi E, Biris AS, Shashkov EV et al. Complex genetic, photothermal, and photoacoustic analysis of nanoparticle-plant interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(3): 1028-33. [\[CrossRef\]](#)
30. Gitto A, Fricke W. Zinc treatment of hydroponically grown barley plants causes a reduction in root and cell hydraulic conductivity and isoform-dependent decrease in aquaporin gene expression. *Physiol Plant* 2018; 164: 176-90. [\[CrossRef\]](#)

A Comparison of Actual Graft Weight and Estimated Graft Volume Calculated with New Software Used for Anatomical and Volumetric Analysis of the Liver with Computed Tomography in Living Liver Donors

Canlı Karaciğer Vericilerinde Karaciğerin Bilgisayarlı Tomografi ile Anatomik ve Hacimsel Analizi için Kullanılan Yeni Bir Yazılım Programı ile Hesaplanan Tahmini Greft Hacmi ile Gerçek Greft Ağırlığının Karşılaştırılması

Ümit Özçelik¹ , Eryiğit Eren² , Yıldırım Tutpınar³ , Devrim Ulaş Urut⁴ , Mehmet Tokaç² ,
Ayhan Dinçkan² 

¹Department of General Surgery, İstanbul Aydın University Training and Research Hospital, Küçükçekmece, İstanbul, Turkey

²Department of General Surgery, İstinye University Training and Research Hospital, Esenyurt, İstanbul, Turkey

³Department of Radiology, İstinye University Training and Research Hospital, Esenyurt, İstanbul, Turkey

⁴Department of Radiology, İstanbul Aydın University Training and Research Hospital, Küçükçekmece, İstanbul, Turkey

ORCID ID: Ü.Ö. 0000-0003-1073-2494; E.E. 0000-0001-6705-4095; Y.T. 0000-0001-9445-6604; D.U.U. 0000-0003-4763-8645; M.T. 0000-0002-7278-0937; A.D. 0000-0003-1395-333X

Cite this article as: Özçelik Ü, Eren E, Tutpınar Y, Urut DU, Tokaç M, Dinçkan A. A comparison of actual graft weight and estimated graft volume calculated with new software used for anatomical and volumetric analysis of the liver with computed tomography in living liver donors. Experimed 2021; 11(2): 96-101.

ABSTRACT

Objective: In the living donor liver transplantation (LDLT) context, accurate estimation of the graft weight to recipient weight ratio (GRWR) and future donor liver remnant volume by pre-operative volumetric analysis is very important. We aimed to compare the estimated graft volume (EGV) calculated with the LiverVision® software with the actual graft weight (AGW) measured in the back-table in this study.

Material and Method: Patients who underwent right lobe LDLT and liver donors between 01.01.2018-30.05.2020 were retrospectively evaluated. Demographic data, body mass index, EGV, AGW and GRWR were recorded. Linear regression analysis, Pearson correlation coefficient and Bland-Altman plots were utilized for evaluation of the relationships between continuous variables.

Results: A total of 108 liver donors were included in the study. The mean age of the donors was 32.6±8.8 years and mean EGV was 902.5±147.1 mL for all donors. The mean AGW was 890.6±145.9 g for all donors. A significant correlation was found between EGV and AGW for all donors ($r=0.856$, $p<0.001$). The mean difference between EGV and AGW was 11.9±78.5 for all donors. 105 of the 108

ÖZ

Amaç: Canlı vericili karaciğer naklinde, alıcıda greftin alıcı ağırlığına oranının (GRWR) ve vericide ameliyat sonrası kalacak karaciğer hacminin ameliyat öncesi hacimsel analizle doğru tahmin edilmesi çok önemlidir. Bu çalışma ile karaciğer vericilerinde karaciğerin anatomik ve hacimsel analizinin yapılması için kullandığımız LiverVision® programı ile hesaplanmış tahmini sağ lob greft hacimlerinin (EGV) ameliyat sırasında arka-masada (back-table) ölçülen gerçek greft ağırlığı (AGW) ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda 01.01.2018-30.05.2020 tarihleri arasında canlı vericiden sağ lob karaciğer nakli yapılmış olan hastalar ve vericileri retrospektif olarak incelenmiştir. Hastaların demografik bulguları, vücut kitle indeksi, EGV, AGW ve GRWR kayıt altına alınmıştır. Sürekli değişkenler arasındaki ilişkiler, Pearson korelasyon katsayısı, doğrusal regresyon analizi ve Bland Altman grafikleri ile değerlendirilmiştir.

Bulgular: Ortalama yaşı 32,6±8,8 yıl olan toplam 108 karaciğer vericisi çalışmaya dâhil edilmiştir. Ortalama EGV tüm vericiler için, 902,5±147,1 mL iken, ortalama AGW tüm vericiler için 890,6±145,9 g olarak hesaplanmıştır. Tüm vericiler için EGV ile AGW arasında an-

Corresponding Author/Sorumlu Yazar: Ümit Özçelik **E-mail:** dr_umit_ozcelik@yahoo.com

Submitted/Başvuru: 01.06.2021 **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 17.07.2021

Last Revision Received/Son Revizyon: 20.07.2021 **Accepted/Kabul:** 21.07.2021



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

(97.2%) measurements were within the 95% ranges of agreement between EGV and AGW according to the Bland-Altman plot. According to the regression model created to calculate the AGW, the formula $AGW(g) = 0.85 \times EGV(mL) + 124.5$ was obtained ($r^2 = 0.732$, $p < 0.001$).

Conclusion: The liver volumes of the donors were successfully estimated with computed tomography (CT) with the newly developed Turkish semi-automatic LiverVision® software.

Keywords: Liver transplantation, living liver donor, estimated graft volume; actual graft weight, software

INTRODUCTION

The best treatment modality for end-stage liver failure is liver transplantation. In countries where deceased donor organ donation rates are low, as in Turkey, cadaveric graft waiting lists are gradually increasing in length and some of the patients unfortunately die while they are on the waiting list. Liver transplantation from a living donor can be the only option for these patients who do not have the chance of cadaveric liver transplantation. Liver transplantation requires a detailed examination of the donor and recipient. This examination includes an evaluation of the liver anatomy, parenchymal and vascular structure, and donor liver volume. In living donor liver transplantation (LDLT), in order to perform a safe and successful surgery for both donor and recipient, liver volumetric analysis of the donor before the operation is very important for predicting the graft weight to recipient weight ratio (GRWR) and residual liver volume. The weight of the liver is approximately 2% of the body weight. The weight of a liver graft which will be sufficient to meet the metabolic needs of the recipient body, has to be 40-50% of the recipient's liver weight, which corresponds to approximately 0.8-1% of the recipient's body weight (1). Therefore, it is recommended that the GRWR be not less than 0.8% for a successful liver transplant (1,2). Small for size syndrome is more likely to occur if the GRWR is below 0.8% (2). This syndrome manifests itself with coagulopathy, long-term cholestasis, ascites and graft failure (2) For the safety of the living donor, the remnant liver volume must be at least 30% (2).

Computed tomography (CT) is recognized worldwide as the best imaging modality used in the preoperative evaluation of liver volume. In the past, while liver volume measurements with CT were made 2-dimensionally and manually, today there are many examples of 3-dimensional (3D) software that have been used for this purpose. After Van Thiel et al. showed in 1985 that there is a well-nigh relationship between water volume and liver weight at 25°C, the volume of the liver began to be converted to one to one liver weight (1 mL=1 g) (3). Although the difference between the estimated graft volume (EGV) and actual graft weight (AGW) has decreased as software programs have developed, in many cases, the actual graft weight is determined to be lower than the estimated graft volume. Due to this, it has been suggested that the calculations made by Van Thiel et al. were derived from cirrhotic livers and the density of non-cirrhotic livers is lower (1,4-6). Dehydration because of

lamli bir korelasyon olduğu saptanmıştır ($r = 0.856$, $p < 0.001$). Bland-Altman metoduna göre 108 ölçümün 105'inde (%97,2) EGV, AGW ile %95 güven aralığı içerisinde saptanmıştır. AGW'yi hesaplamak için oluşturulan regresyon modeline göre $AGW(g) = 0.85 \times EGV(mL) + 124,5$ formülü elde edilmiştir ($r^2 = 0,732$, $p < 0,001$).

Sonuç: Yeni geliştirilmiş Türk yapımı yarı otomatik LiverVision® yazılımı ile bilgisayarlı tomografi (BT) ile vericilerin karaciğer hacimleri başarılı bir şekilde tahmin edilebilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Karaciğer nakli, canlı karaciğer vericisi, tahmini greft hacmi; gerçek greft ağırlığı, yazılım programı

preservative solutions and differences in the plane of division of the liver parenchyma are other suspected causes of volume-weight mismatch in the liver graft (6).

We used a new semi-automatic CT volumetry software called LiverVision® (Medivizyon, Ankara, Turkey) for anatomical and volumetric analysis of the liver in our liver donors. The purpose of our study is to compare the estimated right lobe graft volumes calculated with the LiverVision® software with the actual liver graft weight.

MATERIAL AND METHOD

Patients who had undergone living related right lobe liver transplantation in Istanbul Aydın University Hospital and Istinie University Hospital between 01.01.2018-30.05.2020 and their donors were retrospectively evaluated in this study. The Institutional Review Board of Istanbul Aydın University (IRB approval number: 2020/313) approved the study protocol. The demographic data of the patients, body mass index (BMI), EGV calculated by LiverVision® software, AGW measured in the operation theatre and GRWR were recorded.

Preoperative CT imaging of all liver donors was performed in Istinie University Hospital Radiology Department with a multidetector (Philips Ingenuity 128, Philips Healthcare, The Netherlands) computed tomography device. Following the precontrast scanning, 120-150 mL of contrast agent was injected and a dynamic triphasic (arterial, portal and hepatic phase) hepatic CT at 3 mm slice thickness was performed. A senior radiologist (Y.T.) measured the liver volumes using LiverVision® 3D semi-automatic volumetric software. The estimated amount of blood in the hepatic veins and portal venous system was also calculated with this software. An illustration of the 3D liver image and liver volume calculation from the software is shown in Figure 1.

Blood-free actual graft weight was measured in the donor before the graft was perfused with preservative solution using a digital weight scale after removing the right lobe graft and draining the blood.

Statistical Analysis

The Shapiro-Wilk test was used to determine the conformity of continuous variables to the normal distribution. Levene's test was used to analyze the homogeneity of variances. The Student's t test was used to compare the mean of two inde-



Figure 1. Illustration of 3D liver and volume calculation provided by LiverVision © program (image taken from LiverVision.org).

pendent groups where the assumptions of the parametric tests were met. The Mann-Whitney U test was utilized to compare the mean of two independent groups for variables that were determined as not meeting the prerequisites of the parametric tests. Linear regression analysis, Pearson correlation coefficient and Bland Altman plots were utilized for the evaluation of the relationships between continuous variables. A value of $p < 0.05$ was accepted as statistically significant. Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software for Windows version 19.0 (IBM, Armonk, New York, United States) was used for the analysis of the data set.

RESULTS

A total of 108 liver donors were included in this study. Their mean age was 32.6 ± 8.8 years (range; 18-55). 73 (67.6%) of the donors were male and their mean age was 31.3 ± 8.6 years (range; 18-55). 35 (32.4%) of the donors were female and their mean age was 35.3 ± 8.6 years (range; 18-52). The overall mean body mass index was 25.6 ± 3.5 kg/m^2 (range; 18.1-33.9) for all donors, while it was 25.3 ± 3.3 kg/m^2 (range; 18.1-33.2) for men and 26.3 ± 3.7 kg/m^2 (range; 20-33.9) for women. While there was no significant difference between men and women in terms of BMI ($p=0.159$), there was a significant difference regarding age ($p=0.026$). The mean estimated graft volume calculated by CT was 902.5 ± 147.1 mL (range; 630-1305) for all

donors, while it was 926.4 ± 152.8 mL (range; 641-1305) for men and 852.5 ± 121.7 mL (range; 630-1180) for women. The mean estimated graft volume of men was significantly higher than that of women ($p=0.014$). For all donors, positive correlations were observed between EGV and height ($r=0.290$, $p < 0.01$), between EGV and body weight ($r=0.600$, $p < 0.001$), and between EGV and BMI ($r=0.384$, $p < 0.001$).

The mean actual graft weight was 890.6 ± 145.9 g (range; 600-1360) for all donors, while it was 911.7 ± 154.2 g (range; 600-1360) for men and 846.4 ± 116.8 g (range; 680-1300) for women. The mean actual graft weight of men was significantly higher than that of women ($p=0.018$). For all donors, there were positive correlations between AGW and height ($r=0.260$, $p < 0.01$), between AGW and body weight ($r=0.594$, $p < 0.001$) and between AGW and BMI ($r=0.403$, $p < 0.001$).

For all donors, there was a positive correlation between EGV and AGW ($r=0.856$, $p < 0.001$). This correlation was stronger in men ($r=0.883$, $p < 0.001$), while it was slightly weaker in women ($r=0.728$, $p < 0.001$). The mean difference between EGV and AGW was 11.9 ± 78.5 (range; -280 to +267) for all donors, while it was 14.4 ± 74.1 (range; -280 to +202) in men and 6.7 ± 87.7 (range; -261 to +267) in women. No significant difference was detected between men and women regarding the difference between EGV and AGW ($p=0.568$).

Table 1. Demographic and clinical data of patients.

Donors	Men	Women	Total	p value
Patient number	73	35	108	
Mean age (years)	31.3±8.6	35.3±8.6	32.6±8.8	0.026
BMI (kg/m²)	25.3±3.3	26.3±3.7	25.6±3.5	0.159
Mean EGV (mL)	926.4±152.8	852.5±121.7	902.5±147.1	0.014
Mean AGW (g)	911.7±154.2	846.4±116.8	890.6±145.9	0.018
Mean difference between EGV and AGW	14.4±74.1	6.7±87.7	11.9±78.5	0.568
Mean GRWR (%)	1.23±0.38	1.2±0.26	1.22±0.35	0.602

According to the Bland-Altman method, 105 (97.2%) of the 108 measurements were within the 95% ranges of agreement between EGV and AGW. In only one of 73 male donors (1.3%), EGV was found outside the 95% ranges of agreement, while in two of 35 female donors (5.7%), EGV was found outside the 95% ranges of agreement.

The mean GRWR was 1.22±0.35% (range; 0.73-2.4) for all patients, while it was 1.23±0.38% (range; 0.73-2.4) for men and 1.2±0.26% (range, 0.85-2) for women. No significant difference detected between men and women in terms of GRWR ($p=0.602$).

In 78 patients (72.2%), GRWR was found to be 1% and above, while in 30 (27.8%) patients GRWR was found to be less than 1%. In 50 (68.5%) of the 73 male patients, GRWR was found to be 1% and above, while in 23 (31.5%) patients GRWR was found to be less than 1%. In 28 (80%) of the 35 female patients, GRWR was found to be 1% and above, while in 7 (20%) patients GRWR was found to be below 1%. The mean difference between EGV and AGW was 7.6±85.4 (range; -280 to +267) for those with a GRWR of 1% and above, while it was 23±56.4 (range; -108 to +171) for those with a GRWR of less than 1%. No significant difference was detected between the two groups ($p=0.265$). In three (3.8%) of the 78 donors with a GRWR 1% and above, EGV was found outside the 95% ranges of agreement, while EGV was found within the 95% ranges of agreement in all 30 donors with GRWR of less than 1%.

According to the regression model created to calculate the actual graft weight (AGW) using EGV, the formula $AGW (g) = 0.85 \times EGV (mL) + 124.5$ was obtained ($r^2=0.732$, $p<0.001$).

The demographic data of the donors, mean estimated graft volume, mean actual graft weight, mean difference between EGV and AGW, and mean GRWR are shown in Table 1.

DISCUSSION

Due to the low number of cadaveric donors, most of the liver transplants performed in Turkey consist of living related liver

transplants. The most important factor affecting the surgical planning, postoperative morbidity and mortality in the LDLT setting is the accurate preoperative estimation of donor liver volume. Overestimation or underestimation of remnant liver volume in the donor may lead to changing the surgical resection plan, or even eliminating the donor due to insufficient liver volume and canceling the surgery. Many manual and automatic volume calculation methods were developed after Heymsfield et al. defined liver volume calculation for the first time in 1979 (7). Many organ transplant centers have started to use 3D CT volumetry software with developing technology due to faster results and smaller error margin. Although calculating preoperative liver graft volume by volumetric analysis has an acceptable accuracy level in predicting actual liver volume before surgery, it is controversial that one milliliter of liver equated to one gram of liver tissue (8-10). This equation has been criticized for being based on measurements made from cirrhotic livers (1,4). Some studies have revealed that the error rate in weight estimation with CT volumetry ranges from ±5% to ±20% (11). Differences in the liver density, the amount of blood in the liver, variations in tomography machines and the software used for volumetric analysis, differences between observers, detecting more fatty liver than expected, hydration status when CT was performed and deviation from the designated liver cutting line were put forward as possible reasons for this discrepancy.

Yoneyama et al. suggested that 1 mL liver volume in cirrhotic livers equals 1 gram of liver tissue, while 1 mL volume equates to 0.85 g liver tissue in non-cirrhotic livers (4). Sonnemans et al. measured liver weights during autopsies after performing 3-D CT volumetric analysis of the liver in the early postmortem period, and found a perfect correlation ($r=0.950$) between actual liver weight and estimated liver volume, and they calculated the liver density as 0.99 g/mL (12). They found that age, gender, body mass index, heart failure and hepatosteatosis caused no difference on liver density in this cadaver series of 39 patients (12). Again, in an autopsy study conducted by Jackowski et al., liver density was found to be 1.05 g/mL (13). When previous studies in the literature are examined, it is seen that liver den-

sity has been reported between 0.86 and 1.13 g/mL (12). The reason for these differences in liver density may be due to differences in the measurement times of the graft weight (6) because different measurement times were used in these studies such as immediately after the liver graft was removed (blood-filled), after the blood was drained (blood-free) from the liver, after the perfusion of the graft with preservative solutions, and after the back-table procedures were completed (6). Graft dehydration after perfusion is an important factor affecting liver density (6). In our study, since the amount of blood in the liver was calculated and deducted in the volume measurements calculated with CT, we measured the graft weight after the graft was removed and the blood was drained, and before the graft was perfused.

Zakareya et al. found the formula $AGW (g) = 0.92 \times EGV (mL) + 51.48$ ($r^2=0.651$, $p<0.001$) in their study (1). Liu et al. found a similar formula - $AGW (g) = 0.86 \times EGV (mL) + 72.5$ ($r^2=0.9$, $p<0.001$) in their study (5). In another study by Bozkurt et al. $AGW (g)$ was calculated as $0.843 \times EGV (mL)$ ($r=0.834$; $p=0.001$) (2). In the study conducted by Kim et al. the mean estimated blood-filled right lobe graft volume was found to be 789 ± 126.4 mL, while the mean estimated blood-free right lobe graft volume was 713.9 ± 114.4 mL (14). In the same study, the mean actual graft weight was found to be 717.8 ± 110.4 g, and using the estimated blood-free right lobe graft volume, the formula $AGW (g) = 0.88 \times EGV (mL) + 88.5$ ($r^2=0.83$, $p<0.001$) was determined (14). In the study of Hwang et al., it was suggested that the weight of the blood-filled liver graft was closer to the volume of the right lobe graft estimated by CT (15). Also, Satuo et al. supported this opinion and suggested that blood-filled graft weight correlated more closely with the estimated graft volume (6). These researchers suggested that although the amount of blood in the large vessels of the liver was calculated in volumetric analysis with CT, the amount of blood in the peripheral vascular bed of the liver was ignored (6).

In our study, the right lobe liver graft volumes were predicted with a 97.2% success rate in the measurements made by the LiverVision® 3D semi-automatic CT volumetry software. A positive correlation of 85.6% was found between EGV and AGW. This relationship was found to be stronger in men (88.3% vs 72.8%) compared to women, but this may be due to the fact that the number of female donors was almost half of the males (73 vs 35). In order to estimate the actual graft weight, the formula $AGW (g) = 0.85 \times EGV (mL) + 124.5$ ($r^2=0.732$, $p<0.001$) was obtained. As expected, EGV and AGW were found higher in men than in women. We found no significant difference between men and women regarding GRWR and the difference between EGV and AGW. In cases where the GRWR was less than 1%, we considered the possibility of surgeons shifting the resection line to the left lobe to remove a slightly bigger liver graft. Because of this, the difference between EGV and AGW was compared between those with a GRWR of 1% and above and those with a GRWR of less than 1%, but no significant difference was detected between these two groups. The only striking point was that all measurements made in those with

a GRWR below 1% were determined within the 95% ranges of agreement.

In conclusion, with the newly developed Turkish semi-automatic LiverVision® software, liver volumes of donors can be successfully predicted with CT in living related liver transplantation. We think that this software can be used safely in calculating the preoperative liver volume for liver donors. As the number of cases increases, it will be appropriate to re-evaluate with the results of larger series.

Acknowledgments: The authors thank to Professor Ayşe Canan Yazıcı Güvercin for the statistical analysis of this study.

Ethics Committee Approval: Istanbul Aydın University Institutional Review Board approved the study protocol on 09.12.2020 (IRB approval number: 2020/313).

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study - Ü.Ö., A.D.; Data Collection - Ü.Ö., E.E., D.U.U., M.T.; Analysis and/or Interpretation - Y.T., A.D.; Drafting Manuscript - Ü.Ö.; Final Approval and Accountability - Ü.Ö., E.E., D.U.U., M.T., A.D.

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

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

Teşekkür: Yazarlar, bu çalışmanın istatistiksel analizi için Prof. Dr. Ayşe Canan Yazıcı Güvercin'e teşekkür eder.

Etik Komite Onayı: İstanbul Aydın Üniversitesi Kurumsal İnceleme Kurulu, çalışma protokolünü 09.12.2020 tarihinde onaylamıştır (IRB onay numarası: 2020/313).

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarımı - Ü.Ö., A.D.; Veri Toplama - Ü.Ö., E.E., D.U.U., M.T.; Veri Analizi/Yorumlama - Y.T., A.D.; Yazma - Ü.Ö.; Son Onay ve Sorumluluk - Ü.Ö., E.E., D.U.U., M.T., A.D.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

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

REFERENCES

1. Zakareya T, Abbasy M, Abdel-Razek W, Abdelkader Salama I, Deif M. A novel formula for graft weight estimation from preoperative computed tomography volumetric measurement in living donor liver transplantation. *Transplant Technol* 2017; 5:1.
2. Bozkurt B, Emek E, Arıkan T, Ceyhan O, Yazıcı P, Sahin T, et al. Liver Graft Volume Estimation by Manual Volumetry and Software-Aided Interactive Volumetry: Which is Better? *Transplant Proc* 2019; 51(7): 2387-90.
3. Van Thiel DH, Hagler NG, Schade RR, Skolnick ML, Pollitt Heyl A, Rosenblum E, et al. In vivo hepatic volume determination using sonography and computed tomography. *Gastroenterology* 1985; 88: 1812-17. [CrossRef]

4. Yoneyema T, Asonuma K, Okajima H, Lee KJ, Yamamoto H, Takeichi T, et al. Coefficient factor for graft weight estimation from preoperative computed tomography volumetry in living donor liver transplantation. *Liver Transpl* 2011; 17: 369-72. [\[CrossRef\]](#)
5. Lui SA, Bonney GK, Kow WCA, Iyer SG, Chang SKY, Madhavan KK. Standard Formulae in Predicting Liver Volumes: A South East Asian series of Adult Living Donors. *Transplant Technol Res* 2016; 6: 153.
6. Satou S, Sugawara Y, Tamura S, Yamashiki N, Kaneko J, Aoki T, et al. Discrepancy between estimated and actual weight of partial liver graft from living donors. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2011;18(4): 586-91. [\[CrossRef\]](#)
7. Heymsfield SB, Fulenwider T, Nordlinger B, Barlow R, Sones P, Kutner M. Accurate measurement of the liver, kidney and spleen volume and mass by computerized axial tomography. *Ann Intern Med* 1979; 90: 185-7. [\[CrossRef\]](#)
8. Kamel IR, Kruskal JB, Warmbrand G, Goldberg SN, Pomfret EA, Raptopoulos V. Accuracy of volumetric measurements after virtual right hepatectomy in potential donors undergoing living adult liver transplantation. *AJR Am J Roentgenol* 2001; 176: 483-7. [\[CrossRef\]](#)
9. Harada N, Shimada M, Yoshizumi T, Suehiro T, Soejima Y, Maehara Y. A simple and accurate formula to estimate left hepatic graft volume in living-donor adult liver transplantation. *Transplantation* 2004; 77: 1571-5. [\[CrossRef\]](#)
10. Salvalaggio PR, Baker TB, Koffron AJ, Fryer JP, Clark L, Superina RA, et al. Liver graft estimation in 100 living donors: measure twice, cut once. *Transplantation* 2005; 80: 1181-5. [\[CrossRef\]](#)
11. Lemke AJ, Brinkmann MJ, Schott T, Niehues SM, Settmacher U, Neuhaus P, et al. Living donor right liver lobes: preoperative CT volumetric measurement for calculation of intraoperative weight and volume. *Radiology* 2006; 240: 736-42. [\[CrossRef\]](#)
12. Sonnemans LJ, Hol JC, Monshouwer R, Prokop M, Klein WM. Correlation between liver volumetric computed tomography results and measured liver weight: A tool for preoperative planning of liver transplant. *Exp Clin Transplant* 2016; 1: 72-78.
13. Jachowski C, Thali MJ, Buck U, Aghayev E, Sonnenschein M, Yen K, et al. Noninvasive estimation of organ weights by postmortem magnetic resonance imaging and multislice computed tomography. *Invest Radiol* 2006; 41(7): 572-8. [\[CrossRef\]](#)
14. Kim KW, Lee J, Lee H, Jeong WK, Won HG, Shin YM, et al. Right lobe estimated blood-free weight for living donor liver transplantation: accuracy of automated blood-free CT volumetry - preliminary results. *Radiology* 2010; 256: 433-40. [\[CrossRef\]](#)
15. Hwang S, Lee S, Kim K, Park K, Ahn C, Moon D, et al. Correlation of blood-free graft weight and volumetric graft volume by an analysis of blood content in living donor liver grafts. *Transplant Proc* 2002; 34: 3293-4. [\[CrossRef\]](#)

Aşırı Düşük Doğum Ağırlıklı Prematüre Çocukların Okul Öncesi Dönemde Dünya Sağlık Örgütü Çocuk ve Ergenlerde Uluslararası İşlevsellik Sınıflamasında Belirlenen Alanlarda Sorun Yaşama Oranları ve Hizmet Gereksinimleri

Problem Rates and Service Requirements of Extremely Low Birth Weight Preschoolers in Areas Designated in the World Health Organization International Classification of Functioning in Children and Adolescents (ICF-CY) System

Berfin Uysal¹ , Sultan Kavuncuoğlu² 

¹Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Bursa Şehir Hastanesi, Çocuk Nefroloji Bölümü, Bursa, Türkiye

²Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Yenidoğan Bölümü, İstanbul, Türkiye

ORCID ID: B.U. 0000-0001-6267-0454; S.K. 0000-0002-6323-8994

Cite this article as: Uysal B, Kavuncuoğlu S. Aşırı düşük doğum ağırlıklı prematüre çocukların okul öncesi dönemde dünya sağlık örgütü çocuk ve ergenlerde uluslararası işlevsellik sınıflamasında belirlenen alanlarda sorun yaşama oranları ve hizmet gereksinimleri. Experimed 2021; 11(2): 102-12.

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada, 1000 gram ve altında doğan ve 3-5 yaşına gelmiş çocukların, Dünya Sağlık Örgütü Çocuk ve Ergenlerde Uluslararası İşlevsellik Sınıflaması (ICF-CY) sisteminde belirlenen alanlarda sorunla karşılaşma oranları araştırılarak ve hizmet ihtiyaçlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Elli sekiz çocuğa okul öncesi dönemde fizik muayene ve ayrıntılı nörolojik inceleme yapıldı. Bu çocuklar perinatal ve sosyodemografik özellikler yönünden irdelenerek tüm çocuklara Vineland Uyum ve Davranış Ölçeği uygulanmıştır. Sonuçlar ICF-CY modeline uyarlanmıştır.

Bulgular: Olgularımızın iletişim işlevselliğinde %20,6'sının, günlük yaşam becerilerine katılımında %12,1'inin, sosyalleşme işlevselliğinde %19'unun, hareket işlevselliğinde ise %29,3'ünün ciddi düzeyde sorun yaşadıkları saptanmıştır. Sadece 3 olguda ciddi düzeyde yaşla uyumlu olmayan davranış sorunu tanımlanmıştır. Hareket işlevselliğinin; öz bakım işlevselliğini, ev yaşamı etkinliklerine katılımı, sosyalleşme işlevselliğini, oyun ve boş zaman etkinliklerine katılımı, öğrenme ve problem çözme işlevselliğini anlamlı olarak etkilediği belirlenmiştir. Olgularımızın %22,4'ünün (13 olgu) yüksek seviyede özel eğitim desteğine ihtiyacı olduğu belirlenmiştir.

Tartışma: Günümüzde yaşama şansları oldukça yüksek olan aşırı düşük doğum ağırlıklı prematürelerin işlevsellik, etkinlik, yaşama

ABSTRACT

Objective: Our aim was to determine the problem rates and service requirements according to the World Health Organization International Classification of Functioning in Children and Adolescents (ICF-CY) system defining specified areas such as body structures, functionality, activity, participation in life and environmental factors in premature children born weighing <1000 g and aged 3 to 5 years during the research process.

Material and Method: The physical and neurological examination results and perinatal and sociodemographic characteristics were examined for 58 preschoolers who had been born prematurely and they were evaluated in terms of communication, socialization, movement, and daily living skills using the Vineland Adaptation and Behavior Scale. The results were adapted to the ICF-CY model.

Results: The proportions of functionality problems of our cases were found to be 20.6% for communication, 12.1% for participation in daily life skills, 19% for socialization and 29.3% for movement. Severe behavioral problems incompatible with age were identified in only 3 cases. Movement functionality was determined to significantly affect self-care functionality, participation in home life activities, socialization functionality, participation in games and leisure activities, and learning and problem solving function-

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Berfin Uysal **E-posta:** berfing@yahoo.com

Başvuru/Submitted: 26.04.2021 **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 11.06.2021

Son Revizyon/Last Revision Received: 06.07.2021 **Kabul/Accepted:** 08.07.2021



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

katılım ve hizmet ihtiyaçlarının saptanabilmesi için uzun dönem izlemleri çok önemlidir ve mutlaka ergenlik dönemine kadar devam ettirilmelidir.

Anahtar Kelimeler: Prematüre, aşırı düşük doğum ağırlıklı, Dünya Sağlık Örgütü, Vineland, özel eğitim

GİRİŞ

Günümüzde çok düşük doğum ağırlıklı (ÇDDA) bebeklerin yaşatılma başarısı yalnızca yaşama oranları ile değil erken ve uzun dönemde yaşam kalitelerini yansıtan nörolojik ve gelişimsel durumları kapsamında değerlendirilmektedir. ÇDDA ve aşırı düşük doğum ağırlıklı (ADDA) çocukların büyük bir çoğunluğunun çocukluk döneminde duygusal, davranışsal ve uyum sorunlarının olduğu gösterilmiştir (1). Doğum ağırlığının düşük olması ve gebelik haftasının az olması çocuğun ileri döneminde bu sorunlarının olabileceğinin en iyi göstergesidir. Bu sorunlar çocuğun yaşamakta olduğu sağlık sorunları, ev ortamı, sosyo-kültürel ve ekonomik düzey, anne-baba eğitimi, gelişimsel durum, sosyal stresler ve özellikle aile ve toplum desteklerinin birbirleriyle olan ilişkilerine bağlıdır. Aynı zamanda bu bileşenlerin her biri diğerini etkileyebilen faktörlerdir ve bunların tamamı bir bütün olarak çocuğun sağlık durumunu belirler. Çocuğun gelişimi ve davranışsal sorunları ve iyi olma hali arasındaki karmaşık ilişkiyi anlayabilmek için bugüne kadar çeşitli modeller öne sürülmüştür. Bu anlamda İşlevsellik, Yetiştirimi ve Sağlığın Uluslararası Sınıflaması (International Classification of Functioning, Disability and Health-ICF) modeli; vücut fonksiyonları, vücut yapısı, etkinlikler ve katılım bileşenleri ile bireyin sağlık ve yetiştirimi durumunu belirlemektedir (2).

Batı ülkelerinde ve ABD'de çocuklarda uyum performansını ölçebilen çok sayıda yöntem kullanılmaktadır. Bunlar içinde en gözde olanlardan biri Vineland Uyum Davranış Ölçeğidir (3,4). Bu test, 0 -18 yaş arası çocukların iletişim, sosyalleşme ve hareket işlevselliğini, günlük yaşam becerilerine katılımını ölçen altın standart bir testtir. Gelişmiş ülkelerde, çok düşük doğum ağırlığı ile doğan bebeklerin okul öncesi dönemde gözlenen gelişimsel sorunları ile ilgili çok sayıda çalışma olmasına karşın ülkemizde ve benzer sosyoekonomik özellikler taşıyan gelişmekte olan ülkelerde bu alanda yapılmış çalışma sayısı azdır (5). Bu çalışmada ünitemizde, 1000 gram ve altında doğan ve 3-5 yaşına gelmiş prematüre bebeklerin, Dünya Sağlık Örgütü Çocuk ve Ergenlerde Uluslararası İşlevsellik Sınıflaması (ICF-CY) sisteminde tanımlanan alanlarda sorun yaşama oranlarının ve hizmet gereksinimlerinin belirlenmesi planlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya Sağlık Bakanlığı İstanbul Bakırköy Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesinde 1 Ocak 2005 ile 31 Aralık 2007 tarihleri arasında 1000 gram ve altında doğup İstanbul sınırları içerisinde yaşayan ve ebeveynlerinden

ality. It was determined that 22.4% of our cases (13 cases) needed a high level of special education support.

Conclusion: Long-term follow-up is very important in determining the functionality, efficiency, participation in life, and service needs of extremely low birth weight premature babies whose survival rates are gradually increasing and should be continued with a multidisciplinary approach until adolescence.

Keywords: Premature, extremely low birth weight, World Health Organization, Vineland, special education

çalışmaya katılmak için yazılı onay alınmış olgular dahil edildi. Başka bir merkezde doğup hastanemize kabul edilen, hastanemizde doğup yer olmaması nedeniyle sevk edilen ve İstanbul sınırları dışında yaşayan olgular çalışma dışı bırakıldı.

Çalışmaya alınan prematürelere ait erken dönem neonatal dönem kayıtları veri tabanı ve hasta dosyalarından elde edildi. Perinatal dönem özelliklerinden erken membran rüptürü ve klinik koriyoamniyonit irdelendi. Erken neonatal özelliklerden gebelik haftası, doğum ağırlığı, yoğun bakım gereksinimi, ventilatörde kalış süresi, sürfaktan kullanımı, nekrotizan enterokolit (NEK), germinal matrisks intraventriküler kanama (GM-İ-VK), respiratuar distress sendrom (RDS), serebral palsy, sepsis, konvülsiyon, hiperbilirubinemi, patent duktus arteriosus (PDA), prematüre retinopati (ROP), postnatal steroid tedavisi ile toplam hastanede yatış süresi sorgulandı ve araştırma formuna kaydedildi. Prematüre takip polikliniği kayıtlarından postneonatal döneme ait bilgilere ulaşıldı, özellikler kaydedildi. Ailelere telefon ve mektupla ulaşılarak çalışma anlatıldı. Çalışmaya katılmak isteyenlere randevu verilerek çocuk ve ebeveyn çağrıldı. Randevu günü aile çalışmayı yapan hekim tarafından karşılandı, yapılacak muayene ve test anlatıldı. Onam alındı. İlk değerlendirme sonuçları forma kaydedildi.

Olguların değerlendirildiği ortam düzenlendi. Olabildiğince izole, sessiz, test ve değerlendirmeler yapılırken çocuğun ve ailenin dikkatini dağıtmayacak rahat bir ortam sağlandı. Prematürelere genel fizik muayene yapıldı; ağırlık, boy ölçümü yanında Amiel-Tison metodu ile nörolojik muayenede sekel, yetersizlik araştırıldı. Nörolojik muayenede patoloji saptanan olgulara pediatrik nöroloji konsültasyonu yapıldı ve izleme alındı. Rehabilitasyon gerekenler özel eğitime yönlendirildi.

Ailelerin sosyodemografik durumunu belirleyebilmek için ak-raba evliliği, anne-baba eğitim düzeyi, anne-baba mesleği, kardeş sayısı, kardeş öğrenim durumu, konut durumu, aynı evde yaşayan birey sayısı, konutun ısınması, özel arabaya sahip olma, sağlık güvencesi gibi özelliklerden oluşan 19 soruluk bir form oluşturuldu ve her bir olgu için bu sorular ailelere soruldu.

Çalışmaya alınan prematüre çocuklara Vineland Uyum Davranış Ölçeği-2 uygulandı. Çalışma öncesinde Vineland Uyum Davranış Ölçeği-2'yi uygulayan hekim Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Gelişimsel Pediatri Bilim Dalı'nda 2 hafta süre ile eğitim aldı.

Testin uyum becerilerini kapsayan dört ana alanı ve onbir alt alanı olup bu alanlar; iletişim (alıcı, anlatım, yazılı), günlük yaşam becerileri (kişisel, evdeki beceriler, toplumsal), sosyalleşme

(kişiler arası ilişkiler, oyun ve boş zaman, başa çıkma becerileri) ve hareket (ince, kaba) tüm olgularda ayrı ayrı değerlendirildi. Aynı zamanda her olgu için 36 adet uyumlu olmayan davranış maddeleri soruldu. Çocuklara her zaman yapabildikleri maddeler için '2' puan, hiçbir zaman yapamadıkları maddeler için '0' puan, bazen yapıp bazen yapamadıkları maddeler için '1' puan verildi. Bazı özel maddelerde 'fırsat yok' seçeneği kullanıldı. Puanlar verildikten sonra her hasta için alt alanlar ve uyumlu olmayan davranışlar için v-skala skor, alanlar ve uyumlu davranış bileşkesi için standart skor hesaplandı. Tüm olgularımız ICF-CY'de belirlenen alanlarda sınıflandırıldı. Buna göre Vineland Uyum ve Davranış Ölçeğinde aldıkları puan < -2 SD ise ciddi, < -1 SD ise hafif-orta düzeyde sorun var olarak kabul edildi. Testin uygulanma süresi ortalama 45-60 dk arasında idi.

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken istatistiksel analizler için SPSS 14,0 paket programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (ortalama, standart sapma, frekans) yanısıra niceliksel verilerin karşılaştırılmasında Student-t testi kullanıldı. Sürekli değişkenlerin karşılaştırılmasında Spearman korelasyon analizi ve Mann-Whitney U testi kullanıldı. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise Ki-Kare testi, Fisher's Exact test ve tanı tarama testleri kullanıldı. Sonuçlar %95'lik güven aralığında anlamlılık $p < 0,05$ düzeyinde değerlendirildi.

BULGULAR

Sağlık Bakanlığı Bakırköy Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi 3. düzey yoğun bakım ve 2. düzey prematüre servislerinde, 1000 gram altında doğan toplam 162 prematüre bebek izlendi. Toplam 14 bebek kaybedildi, 21 bebek ise hastanemizde 3. düzey yenidoğan yoğun bakım ünitesinde yer olmaması nedeni ile sevk edildi. Serviste izlenen hastalarımızın 18'i başka hastanelerden tarafımıza sevk edilen hastalardı. Kalan 109 hastadan 26'sı İstanbul dışında oturdukları için çalışmaya dahil edilmedi. Geriye kalan 83 vakadan 19'una adres ve telefon değişikliği nedeni ile ulaşılamadı. Ulaşılan 64 hastanın velisine araştırma hakkında bilgi verildi ancak 6 hastanın ailesi çocukları ile ilgili bir sıkıntılarının olmadığını ve çalışmaya katılmaya gerek duymadıklarını belirterek katılmayı reddettiler. Sonuçta 58 hasta çalışmaya dahil edildi. Olgularımızın 37'si kız (%63,8), 21'i erkek (%36,2) idi. Ortalama doğum ağırlığı $877,6 \pm 102,1$ gram, ortalama gebelik haftası $28 \pm 2,36$ hafta idi. Olgularımız ortalama $22,1 \pm 23,18$ gün yoğun bakım ünitesinde, $59 \pm 21,2$ gün hastanede yatırılmıştı. Hastalarımızda görülen prematüre sorunları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Hastalarımızın ICF-CY Sınıflamasına Göre Gelişimsel İşlevler ve Etkinlikler ve Katılım Alanlarında Sorun Yaşama Oranları

İLETİŞİM

Alıcı dil

Koryoamniyonit olmayan hastaların %5,7'sinde alıcı dil işlevselliğinde ciddi düzeyde sorun mevcut iken annesinde koryoamniyonit olanların %40'ında ciddi düzeyde sorun saptandı ve ara-

Tablo 1. Olgularımızda görülen prematüre sorunlarının oranları.

	n (olgu sayısı)	%	
RDS	20	34,5	
Sepsis	29	50	
Menenjit	6	10,3	
NEK	Evre-1	12	20
	Evre-2	4	6,8
	Evre-3	1	1,7
GM-İVK	Evre-1	12	20,7
	Evre-2	8	13,8
	Evre-3	2	3,4
	Evre-4	1	1,7
PVL	5	8,6	
Hidrocefali	2	3,4	
haPDA	9	15,5	
ROP	32	55,1	
BPD	24	41,4	

RDS: Respiratuar distress sendromu, NEK: Nekrotizan enterokolit, GM-İVK: Intraventriküler kanama, PVL: Periventriküler lökomalazi, haPDA: Hemodinamik anlamlı patent duktus arteriozus, ROP: Prematüre retinopatisi BPD: Bronkopulmoner displazi

larındaki ilişki anlamlı bulundu. Aynı şekilde annenin öğrenim durumu, annenin çalışma durumu, babanın işinin olup olmaması, kendine ait bir odanın olup olmaması ile alıcı dil işlevselliği arasında anlamlı bir ilişki saptandı (Tablo 2). Çekirdek aile olmayan 4 hastadan hepsinin alıcı dil işlevlerinin normal olduğu görülürken çekirdek ailesi olanların %24,1'inde alıcı dil işlevlerinde sorun olduğu tespit edildi. İşitme kaybı olanların alıcı dil işlevlerinde anlamlı olarak daha ciddi sorun olduğu saptandı. Annesinde erken membran rüptürü (EMR) olan ve GM-İVK, periventriküler lökomalazi (PVL) geçiren olgularımız alıcı dil işlevselliğinde daha fazla oranda sorun yaşamalarına rağmen aralarındaki ilişki anlamlı değildi. Alıcı dil işlevselliğinde sorun yaşayan olgularımızın %15,5'i (9 olgu) özel eğitim almıyordu. Bu olgularımızın anne ve baba eğitim düzeyinin daha düşük olduğu saptandı.

Anlatım dili

Sepsis ve menenjit geçiren olgular anlatım dili işlevselliğinde daha ciddi sorunlar yaşamasına rağmen aradaki ilişki anlamlı bulunmadı.

Annesi çalışan bebeklerin anlatım dili işlevselliği annesi ev hanımı olan bebeklere göre anlamlı olarak daha iyi bulundu. Aynı

Tablo 2. Alıcı dil işlevselliği ile annenin öğrenim ve çalışma durumu arasındaki ilişki.

		Alıcı dil işlevselliği (n)		
		Ciddi düzey	Hafif-orta düzey	Sorun yok
Annenin öğrenim durumu*	Okuryazar değil	0	1	1
	İlk-Orta-Lise mezunu	5	7	39
	Yüksek okul mezunu	0	0	5
Annenin çalışma durumu*	Ev hanımı	5	7	34
	Çalışıyor	0	1	11

*: p<0,05, n: Olgu sayısı

şekilde kendisine ait bir odası ve oyun odası olanların olmayanlara göre bu alandaki durumları daha iyi idi (sırayla p=0,025, p=0,001). Anlatım dili işlevselliğinde sorun olan 42 hastanın 37'si (%88) özel eğitim almıyordu. Ciddi düzeyde sorun yaşayan 12 hastanın ise 9'u özel eğitimden faydalanmıyordu.

Yazılı dil

Olgularımız incelendiğinde yazılı dil işlevselliği ile herhangi bir prematüre sorunu arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı. Hastalarımızın sosyodemografik özellikleri ile yazılı dil işlevselliği arasında da anlamlı bir ilişki bulunmadı.

GÜNLÜK YAŞAM BECERİLERİ

Öz bakım

Çalışan annelerin çocuklarının öz bakımlarının anlamlı olarak daha iyi olduğu görülürken aynı şekilde annenin eğitim durumu ile öz bakım işlevselliği arasında anlamlı bir ilişki saptandı (Tablo 3). Olgularımızın arasında annesinde EMR olanların ve

PVL, NEK sorunlarını yaşayanların öz bakım işlevselliklerinde daha ciddi sorunlar yaşadığı görüldü. Aynı şekilde hareket işlevselliği ile öz bakım işlevselliği arasında çok anlamlı bir ilişki saptandı (Tablo 3). Anne dışında bakıcısı olan olgularımızın öz bakım işlevselliğinin daha iyi olduğu görüldü (p=0,04). Çalışmamızda kendine ait odası olanların da öz bakım işlevselliğinin anlamlı olarak daha iyi düzeyde olduğu saptandı. Öz bakım işlevselliğinde ciddi düzeyde sorun yaşayan 12 hastanın 8'inin fizik tedavi almadığı görüldü.

SOSYALLEŞME

Kişiler arası ilişkiler

Annesinde koryoamniyonit olan, sepsis geçiren, bronkopulmoner displazi (BPD) sorunu olan ve steroid tedavisi alan olgularımızın kişiler arası ilişkilerde anlamlı olarak daha ciddi sorun yaşadıkları saptanırken GM-İVK, posthemorajik hidrosefali, menenjit, PVL varlığında bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 4). Görme işlevi ile kişiler arası ilişkiler arasında çok

Tablo 3. Öz bakım işlevselliği ile hareket işlevselliği, prematüre sorunları ve anne eğitim durumu arasındaki ilişki.

		Ciddi düzey (n)	Hafif-orta düzey (n)	Sorun yok (n)
EMR**	Var	7	6	1
	Yok	5	23	16
NEK**	Var	7	9	2
	Yok	5	20	15
Serebral palsy*	Var	6	2	0
	Yok	6	27	17
Anne eğitim durumu**	Ev hanımı	12	24	10
	Çalışmıyor	0	5	7
Hareket işlevselliği*	Ciddi	8	8	1
	Hafif-orta	4	14	5
	Sorun yok	0	7	11

*: p<0,001; **: p<0,05; EMR: Erken membran rüptürü; NEK: Nekrotizan enterokolit; n: Olgu sayısı

kuvvetli bir ilişki saptandı. Kendine ait odası olan olgularımızın kişiler arası ilişkilerinin anlamlı olarak daha iyi düzeyde olduğu tespit edildi. Annenin ve babanın eğitim durumu ile kişiler arası ilişkiler arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı. Aynı şekilde kreşe gidip gitmeme ile de kişiler arası ilişkiler arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmedi. Kişiler arası ilişkilerinde ciddi düzeyde sorun yaşanan 8 olgumuzun 4'ü özel eğitim almıyordu. Tüm olgular incelendiğinde ise bu alanda sorun saptanan 35 olgunun 30'u özel eğitimden faydalanmıyordu.

Oyun ve boş zaman

Serebral palsisi olan 8 olgumuzun ise hepsinin oyun ve boş zaman etkinliklerine katılımında sorun olduğu tespit edilirken serebral palsisi olmayan 50 olgumuzun sadece %4'ünde ciddi düzeyde sorun saptandı ve aralarındaki ilişki yüksek düzeyde anlamlı idi ($p=0,0001$). Hareket işlevselliği ve görme işlevlerinde sorun saptanan olguların oyun ve boş zaman etkinliklerine katılımında ciddi düzeyde sorun yaşadıkları görüldü. Olgularımızın kendine ait odasının olmasının oyun ve boş zaman etkinliklerine katılımı anlamlı olarak etkilediği saptandı. Aynı şekilde anne ve babanın öğrenim durumunun oyun etkinliklerine katılımı anlamlı olarak etkilediği görüldü. Çalışan annesi olan olgularımızın oyun ve boş zaman etkinliklerine katılımında daha

az sorun yaşadığı bulundu. Bakıcısı olan olgularımızın oyun ve boş zaman etkinliklerine katılımında daha iyi durumda oldukları görüldü ($p=0,03$).

Öğrenme ve problem çözme işlevleri

Olgularımızın baba ve anne yaşı arttıkça öğrenme ve problem çözme işlevselliğinde sorun yaşama oranlarının arttığı görülmeye rağmen aradaki ilişki anlamlı bulunmadı. Çalışan annesi olanların öğrenme ve problem çözebilme becerilerinde daha hafif sorunlar yaşadığı tespit edildi (Tablo 5). Anne ve babanın öğrenim durumunun ise olgularımızın öğrenme işlevselliğini etkilemediği bulundu. Buna karşın bakıcısı olan olgularımızın problem çözebilme işlevselliğinin daha sorunsuz olduğu görüldü ($p=0,033$). Öğrenme ve problem çözme işlevselliğinde ciddi sorun yaşayan 18 olgunun 13'ünün özel eğitim desteği olmadığı tespit edildi. Bu alanda sorun yaşayan toplam 56 hastanın ise sadece 5'inin özel eğitim aldığı saptandı.

MOTOR BECERİLER-İNCE VE KABA HAREKET

Prematüre sorunları ile karşılaşma ve hareket işlevselliği arasındaki ilişki Tablo 6'da belirtilmiştir. Menenjit geçiren olgularımızın hareket işlevselliğinde daha ciddi sorunlar yaşamalarına

Tablo 4. Olgularımızın prematüre sorunları ile kişiler arası ilişkileri arasındaki ilişki.

		Ciddi düzey (n)	Hafif-orta düzey (n)	Sorun yok (n)	p
Koryoamnionit	Var	3	2	0	0,005
	Yok	5	25	23	
Sepsis	Var	5	17	7	0,04
	Yok	3	10	16	
Steroid tedavisi	Alan	4	12	3	0,03
	Almayan	4	15	20	
BPD	Var	5	15	4	0,01
	Yok	3	12	19	
Serebral palsy	Var	6	2	0	0,0001
	Yok	2	25	23	

BPD: Bronkopulmoner displazi, n: Olgu sayısı

Tablo 5. Öğrenme ve problem çözme işlevselliği ile annenin çalışma durumu arasındaki ilişki.

Anninin çalışma durumu	Öğrenme ve problem çözme işlevselliği (n)		
	Ciddi düzey	Hafif-orta düzey	Sorun yok
Ev hanımı	18	27	1
Çalışıyor	0	11	1

$p=0,02$ (Ki-Kare), n: Olgu sayısı

Tablo 6. Hareket işlevselliği ile prematüre sorunları arasındaki ilişki.

		İnce hareket (n)			Kaba hareket (n)		
		Ciddi	Hafif-orta	Sorun yok	Ciddi	Hafif-orta	Sorun yok
EMR*	Var	7	5	2	6	7	1
	Yok	6	21	16	5	25	14
Koryoamnionit*	Var	5	0	0	3	2	0
	Yok	8	26	19	8	30	15
PVL*	Var	3	0	2	3	0	2
	Yok	10	26	17	8	32	13
Menenjit	Var	2	3	1	1	4	1
	Yok	11	23	18	10	28	14
GM-İVK	Var	8	8	7	5	10	8
	Yok	5	18	12	6	22	7
Sepsis	Var	9	10	9	7	15	7
	Yok	4	16	9	4	7	18
Steroid	Var	6	8	5	3	13	3
	Yok	7	18	14	8	19	12

*: p<0,05; EMR: Erken membran rüptürü, PVL: Periventriküler lökomalazi, GM-İVK: Germinal Matris-İntraventriküler kanama, n: Olgu sayısı

rağmen aralarındaki ilişki anlamlı değildi. Steroid tedavisi alan 19 olgunun 14'ünde ince hareket işlevselliğinde,16'sında ise kaba hareket işlevselliğinde sorun saptandı. Evre-3 ve üzeri ROP olan olgularımızın hepsinde ince ve kaba hareket işlevselliğinde sorun yaşanırken, ROP olmayan olgularımızın sadece 2'sinde bu alanda sorun saptandı ve aralarındaki ilişki anlamlı bulundu. Olgularımızın görme işlevleri ile hareket işlevselliği arasında çok anlamlı bir ilişki saptandı (p=0,0001). Annenin eğitim durumunun olgularımızın hareket işlevselliğini anlamlı olarak etkilediği görüldü.

Kas gücü ve tonusunun hareket işlevselliğini çok anlamlı bir şekilde etkilediği görülürken eklem işlevlerinin özellikle ince hareket işlevselliğini etkilediği saptandı.Tüm olgular içinde 2'sinin kronik ağrısı mevcut idi ve bu iki olgunun da hareket işlevselliğinde sorun saptandı.

Uyumlu Davranış Bileşkesi

Olgularımızın uyumlu davranış bileşke düzeyleri belirlendi (Tablo 7). Buna göre tüm olgularımızın %22,4'ü (13 olgu) düşük seviyede saptanırken, %53,4'ü ortalamanın altında bulundu, 14 olgunun ise uyumlu davranış bileşke skorları normal tespit edildi. Olgularımızın yoğun bakım ünitesinde yatış süreleri uzadıkça uyumlu davranış sorunlarının anlamlı olarak arttığı saptandı (p=0,048). Gestasyon yaşı, doğum ağırlığı ile bu şekilde bir ilişki

saptanmadı. NEK, RDS, ROP, sepsis, posthemorajik hidrosefali, BPD ile ilişki istatistiksel olarak anlamsızdı. Menenjit geçiren olgularımızın ise bileşke skorlarının daha düşük olmasına rağmen aralarındaki ilişki anlamlı bulunmadı.

Steroid tedavisi alan hastalarımızın uyumlu davranış bileşke skorları anlamlı olarak daha düşük tespit edildi (p=0,05). Serebral palsi ile bileşke düzeyleri arasında çok anlamlı bir ilişki tespit edildi (p=0,0001).

Annelerin eğitim durumunun olgularımızın uyumlu davranış düzeylerini anlamlı olarak etkilediği görülürken, baba eğitim durumunun uyumlu davranış düzeylerini etkilemediği tespit edildi (p=0,001). Aynı şekilde annenin çalışma durumunun da uyumlu davranış bileşke düzeylerini etkilediği görüldü (p=0,001). Bakıcısı olanların uyumlu davranış bileşke skorlarının anlamlı olarak daha yüksek olduğu görüldü (p=0,003). Kendine ait odası olan 15 olgunun 9'unun uyumlu davranış bileşke düzeyi normal iken, odası olmayan 43 olgunun sadece 5'inin normal olduğu tespit edildi (p=0,0001). Görme işlevselliğinin olgularımızın uyumlu davranış bileşke skorlarını çok anlamlı bir şekilde etkilediği saptandı (p=0,0001). Kronik ağrının uyumlu davranış bileşke düzeyini anlamlı olarak etkilemediği belirlendi. Uyumlu davranış bileşke düzeyi düşük olan 13 olgudan 8'inin özel eğitim desteğinden faydalanmadığı tespit edildi.

Tablo 7. Uyumlu olmayan davranışlar ile prematüre sorunları arasındaki ilişki.

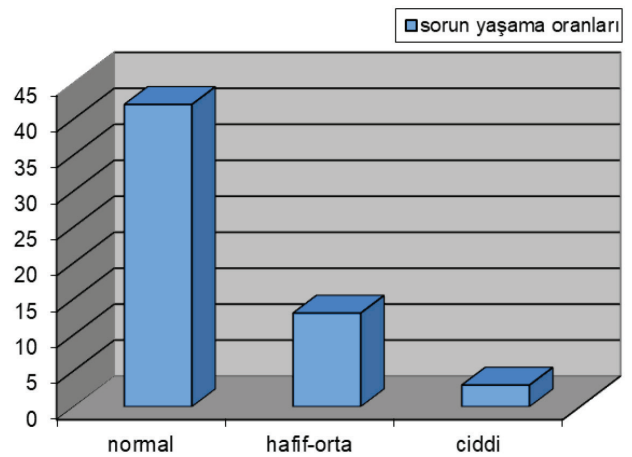
		Normal (n)	Hafif-orta (n)	Ciddi (n)
Koryoamnionit*	Var	1	2	2
	Yok	41	11	1
EMR	Var	9	3	2
	Yok	33	10	1
GM-İVK**	Var	11	10	2
	Yok	31	3	1
Steroid tedavisi	Almış	13	5	1
	Almamış	29	8	2
Hidrocefali**	Var	0	1	1
	Yok	42	12	2
RDS	Var	13	5	2
	Yok	29	8	1
NEK**	Var	12	3	3
	Yok	30	10	0
PVL	Var	4	1	0
	Yok	38	12	3
ROP**	Var	22	7	3
	Yok	20	6	0
BPD	Var	16	6	2
	Yok	26	7	1
Sepsis	Var	18	8	3
	Yok	24	5	0

*: p<0,001; **: p<0,05; EMR: Erken membran rüptürü, GM-İVK: Germinal Matris-intraventricüler kanama, RDS: Respiratuar distress sendromu, NEK: Nekrotizan enterokolit, PVL: Periventricüler lökomalazi, ROP: Prematüre retinopatisi, BPD: Bronkopulmoner displazi, n: Olgu sayısı

Tüm olgular içinde ise uyumlu davranış bileşke skorları ortalamasının altında olan 44 olgudan 39'unun özel eğitim desteğinden faydalanmadığı saptandı.

Uyumlu Olmayan Davranışlar

Olgularımızın %72,4'ünün (42 olgu) uyumlu olmayan davranışlarda sorun göstermediği 13 olgunun ise hafif-orta düzeyde sorun yaşadığı, 3 olgunun ise ciddi düzeyde sorun yaşadığı saptandı (Şekil 1). Yoğun bakım yatış süreleri uzun olan olgularımız klinik olarak daha anlamlı uyumlu olmayan davranış gösterdikleri tespit edildi (p=0,005). Doğum ağırlığı, gestasyon yaşı ile uyumlu olmayan davranışlar arasında bu şekilde bir ilişki saptanmadı. Serebral palsisi olan olgularımızın anlamlı olarak daha fazla oranda uyumlu olmayan davranış sergiledikleri tespit edildi (Tablo 7). ICF-CY sınıflamasında belirlenen alanlarda sorun yaşama oranları ile uyumlu olmayan davranışlar arasındaki ilişki Tablo 8'de özetlenmiştir.



Şekil 1. Olgularımızın uyumlu olmayan davranışlarda sorun yaşama oranları.

Tablo 8. İCF-CY sınıflamasında belirlenen alanlarda sorun yaşama oranları ile uyumlu olmayan davranışlar arasındaki ilişki.

		Uyumlu olmayan davranışlardaki sorun düzeyi (n)			
		Sorun yok	Hafif-orta	Ciddi	p
İletişim işlevselliği**	Ciddi	6	3	3	0,005
	Hafif-orta	30	6	0	
	Sorun yok	6	4	0	
Günlük yaşam becerileri*	Ciddi	3	1	3	0,0001
	Hafif-orta	17	7	0	
	Sorun yok	22	5	0	
Sosyalleşme işlevselliği**	Ciddi	5	3	3	0,004
	Hafif-orta	28	6	0	
	Sorun yok	9	4	0	
Hareket işlevselliği*	Ciddi	7	7	3	0,001
	Hafif-orta	21	2	0	
	Sorun yok	14	4	0	

*: p<0,001; **: p <0,05; n: Olgu sayısı

TARTIŞMA

Son 25-30 yılda aşırı düşük doğum ağırlığı ile doğan prematürlerin yaşatılma oranlarının artması, uzun süreli izlemde yaşam kalitesini değişik düzeylerde etkileyerek bazı gelişimsel sorunları da beraberinde getirmiştir. Prematüre bebeklerin uzun dönem izlem sonuçlarını inceleyen birçok çalışmada doğum ağırlığı ve gebelik haftası düşük olanların gelişimsel sorunlarının daha fazla olduğu vurgulanmıştır (6). Çalışmamızda hastalarının iletişim işlevselliği, günlük yaşam becerilerine katılımı, sosyalleşme işlevselliği ile gebelik haftası ve doğum ağırlığı arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı.

Düşük doğum ağırlıklı (DDA) ve 4 yaşına gelmiş çocuklarda yapılan İskoçya kohort çalışmasında tüm olguların %47'sinde iletişim işlevselliğinde sorun olduğu tespit edilmiştir (7). ADDA ve DDA bebeklerin incelendiği bir çalışmada ise iletişim işlevselliğinde sorun yaşama oranları %5-22 bulunmuştur (8). Bizim çalışmamızdaki olgular incelendiğinde iletişim alanında 12 olgunun (%20,7) ciddi düzeyde, 36 olgunun (%62,1) hafif-orta düzeyde sorun yaşadığı tespit edildi. Olgularımızın %17,2'sinin ise bu alanda sorun yaşamadığı belirlendi. Avustralya'da Betty ve ark. tarafından yapılan çalışmada, 227 prematüre (<30 GH ve <1250 g) 5 yaşında incelenmiş ve annenin eğitim düzeyinin bu çocukların iletişim işlevselliğini etkilediği rapor edilmiştir (9). Bizim çalışmamızda da annenin eğitim durumu ile alıcı dil işlevselliği arasında anlamlı bir ilişki saptandı.

Çekirdek aile olmayan 4 hastadan hepsinin alıcı dil işlevlerinin normal olduğu görülürken çekirdek ailesi olanların %24,1'inde

alıcı dil işlevlerinde sorun olduğu tespit edildi. Bu da bize kalabalık ailelerde yaşamının alıcı dil işlevselliğini olumlu olarak etkilediğini göstermektedir.

Çalışmamızda 12 prematüre çocukta (%20,7) anlatım dili işlevselliğinde ciddi düzeyde sorun saptanırken 30'unda (%51,7) hafif-orta düzeyde gerilik vardı. Bu durum hastalarımızın anlatım dili işlevselliğinde alıcı dil işlevselliğine oranla daha ciddi sorun olduğunu ortaya koymaktadır.

Birçok çalışmada GM-İVK, BPD ve koryoamnionit ile iletişim işlevselliği arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır (10-12). Çalışmamızda EMR, koryoamnionit, NEK ile anlatım dili işlevselliği arasında anlamlı bir ilişki saptanırken, GM-İVK, PVL, RDS, BPD ve steroid tedavisi ile anlatım dili işlevselliği arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı. GM-İVK ile iletişim işlevselliği arasında ilişki olmaması olgularımızda ileri evre kanama oranının düşük olmasına bağlı olabileceği düşünüldü. Voorman JM ve ark. 110 serebral palsili olguyu inceledikleri bir çalışmada serebral palsi şiddeti arttıkça iletişim işlevselliğinde daha ciddi sorunlar olduğunu rapor etmişlerdir (13). Bizim çalışmamızda ise serebral palsisi olan hastaların anlatım dili işlevselliğinde anlamlı olarak ciddi sorunlar yaşadıkları görülmüş, serebral palsi şiddeti arttıkça sorun yaşama oranlarının da paralel olarak arttığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda annesi çalışan bebeklerin iletişim işlevselliği çalışmayan anne bebeklerine göre anlamlı olarak daha iyi bulunmuştur. Aynı şekilde kendisine ait bir odası ve oyun odası olanların olmayanlara göre bu alandaki durumlarının daha iyi

olduğu saptanmıştır. Bu bulgular iyi sosyoekonomik düzeyin etkisine bağlanmıştır.

Olgularımızın günlük yaşam becerilerini yerine getirebilmede 7'sinin ciddi düzeyde, 24'ünün ise hafif-orta düzeyde sorunları olduğu görüldü. Buna karşılık %46,6 prematüre çocuğun günlük yaşam becerilerini yerine getirebilme kapasitesinde sorun yoktu. Hack ve ark. yaptığı çalışmada 750 gram altında doğan prematürelerin 8 yaşındaki değerlendirmesinde olguların %27'sinin günlük yaşam becerilerine katılımda ciddi düzeyde yetiyitimi olduğunu vurgulanmıştır (14). Msall ve ark. çalışmasında ise 148 ADDA bebeğin 4,5 yaşında %4 sıklıkta basit günlük yaşam becerilerinde ciddi sorun yaşadıklarını rapor etmiştir (15). Aynı çalışmada bu sorunların majör belirleyicilerinin majör nörogelişimsel bozukluklar ve ROP olduğu ifade edilmiştir. Bir başka çalışmada ağır BPD'nin preterm bebeklerin ileri dönemde günlük yaşam becerilerine katılımı anlamlı olarak etkilediği gösterilmiştir (16). Bizim çalışmamızda EMR ve PVL saptanan olgularda günlük yaşam becerilerine katılımda ciddi sorunlar yaşanırken, koryoamnionit, GM-İVK, RDS, ROP, BPD, sepsis ve posthemorajik hidrosefali tanımlanan olgularda anlamlı ilişki saptanmamıştır. İVK ve ROP ile günlük yaşam becerilerine katılımdaki sorun düzeyleri arasında ilişki olmaması olgularımızda ileri evre kanama ve ROP oranlarının düşük olmasına bağlanmıştır.

Olgularımızda serebral palsi ile öz bakım işlevselliği ve ev yaşamı etkinliklerine katılım arasında çok anlamlı bir ilişki tespit edildi. Aynı şekilde hareket işlevselliğinde sorun yaşayan olguların öz bakım işlevselliğinde anlamlı düzeyde ve yüksek oranda sorun yaşadıkları belirlendi. Palta ve ark. yaptığı çalışmada <1500 gr prematüre çocuklar 5 yaşında incelenmiş ve öz bakım işlevselliğinde serebral palsisi olmayanların %5,2'sinde sorun varken, serebral palsisi olanların %57'sinde sorun yaşandığı belirlenmiştir (17).

Düşük sosyoekonomik düzeyin prematüre bebeklerin uzun dönem sonuçlarını olumsuz etkilediği bilinmektedir. Bu etki birçok çalışmada gösterilmiştir (18,19). Bizim çalışmamızda annenin eğitim durumunun olgularımızın günlük yaşam becerilerine katılımını anlamlı bir şekilde etkilediği gösterilmiş, aynı şekilde kendine ait odası olan olgularımızın öz bakım işlevselliğinde ve evdeki yaşam becerilerine katılımda daha iyi durumda oldukları görülmüştür. Çalışmamızda bakıcısı olan çocukların öz bakım işlevselliğinde anlamlı olarak daha az sorun yaşadığı saptanmıştır. Buradan yola çıkarak annelerin ADDA bebeklerine karşı çok hassas ve korumacı tutumunun olgularımızın öz bakım işlevselliğini olumsuz etkilediği sonucuna varılmıştır.

Grunau ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada ADDA ile doğan çocukların çeşitli atletik sporlara ve okuldaki derslere katılımda, romantik ilişkilerde, iş ortamında kendini ispat etmede öz güvenlerinin az olduğu rapor edilmiştir (20). Çalışmamızda 11 prematüre çocuğun (%19) sosyalleşme kapasitesinde ciddi düzeyde sorun yaşadığı saptanırken, 34 olgunun (%58,6) hafif-orta düzeyde sorun yaşadığı, 13'ünün ise sosyalleşme kapasitesinde sorunu olmadığı görülmüştür.

Olgularımızın kişiler arası ilişkilerde %13,8'inin ciddi düzeyde sorun yaşadığı tespit edilmiştir. Hamilton ve ark. çalışmasında 156 ADDA prematürenin 8 yaşına geldiğinde majör nörogelişimsel sorunu olanların (%15 serebral palsi, %10 zeka geriliği, %10 körlük) %62'sinin kişiler arası ilişkilerde sorunu olduğu saptanmıştır (21). Bir başka çalışmada serebral palsisi olanların %32'sinin sosyalleşme işlevselliğinde sorun olduğu, serebral palsisi olmayanların %7,6 sıklıkta sorun yaşadığı bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da olgularımızın görme işlevleri ile kişiler arası ilişkilerde, oyun ve boş zaman etkinliklerine katılımda sorun yaşama oranları arasında çok kuvvetli bir ilişki saptandı. Aynı şekilde serebral palsili çocukların kişiler arası ilişkilerde, oyun ve boş zaman etkinliklerine katılımda daha ciddi düzeyde sorun yaşadıkları saptanmıştır.

Araştırmamızda tüm olgularımızın öğrenme ve problem çözme işlevleri incelendiğinde sadece 2 olgumuzda bu alanda sorun saptanmadığı belirlendi. 18 hastada (%31,1) ciddi düzeyde sorun varken 38 olguda (%65,5) hafif-orta düzeyde sorun olduğu belirlenmiştir. İngiltere ve İrlanda'da 1995 yılında doğan 26 gebelik haftasından küçük prematüreler 30. ayda incelenmiş ve %22'sinin ciddi, %58'inin ise hafif-orta düzeyde öğrenme sorunları olduğu bildirilmiştir (22). Bir başka çalışmada ise 1500 gram altında doğan prematüre çocukların 11 yaşındaki değerlendirmesinde öğrenme işlevselliğinde erkeklerde daha ciddi sorun olduğu gözlenmiştir (23). Bizim çalışmamızda ise her iki cinsiyet arasında fark saptanmamıştır.

Çalışmamızda öğrenme ve problem çözme işlevselliği ile koryoamnionit, EMR arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Aşırı düşük doğum ağırlıklı prematürelerin uzun dönem sonuçlarının incelendiği 1151 olguda BPD nedeni ile postnatal steroid alan ve annesinde koryoamnionit olanların öğrenme işlevselliğinin anlamlı olarak daha düşük olduğu saptanmıştır (24). Bizim çalışmamızda ise steroid tedavisi alınan olgularımızın öğrenme işlevselliğini etkilemediği görülmüştür.

Annesi çalışan olgularımızın öğrenme ve problem çözme işlevselliğinin anlamlı olarak daha iyi olduğu saptanırken bunun nedeni çalışan annelerin çocukları ile kısıtlı bir zaman da olsa daha fazla ilgilenmelerine, daha değerli zaman geçirmelerine bağlanmıştır.

Çalışmamızda olgularımızın hareket işlevselliğinin günlük yaşam becerilerine katılımlarını ve sosyalleşme işlevselliğini çok anlamlı olarak etkilediği gösterilmiştir.

Aşırı düşük doğum ağırlıklı çocukların davranışsal sorunlarının normal yaşitlarına göre daha fazla olduğu değişik çalışmalarda gösterilmiştir. Bhutta ve ark. tarafından yayınlanan bir meta-analiz çalışmasında, son 20 yıl içindeki 16 çalışma incelenmiş, çalışmaların %81'inde prematüre doğan çocuklarda okul çağına gelindiğinde, içe dönük ve dışa dönük davranış sorunlarının artmış olduğu saptanmıştır (25). İlişki ve iletişim kurma sorunları, kendine güvensizlik, içe dönüklük, kaygı bozukluğu, depresyon ve sosyal yetilerde sorunlar, ADDA çocuklarda normal doğan çocuklara göre daha sık olarak bildirilmektedir (26). Çalışmamızda olgularımızın %72,4'ünün (42 olgu) uyumlu olma-

yan davranışlarda sorun yaşamadığı tespit edildi. 13 olgunun hafif-orta düzeyde sorun yaşadığı, 3 olgunun ise ciddi düzeyde sorun yaşadığı saptandı. Çalışmalarda GM-İVK ve PVL'nin davranış sorunlarını arttırdığı bildirilmiştir (27). Bizim çalışmamızda olgularımızın koryoamniyonitli anne bebeği olmasının ve GM-İVK geçirmesinin uyumlu olmayan davranışlarını anlamlı bir şekilde etkilediği görülmüştür. Buna karşılık PVL, RDS, BPD, sepsis, menenjit, NEK, ROP ve steroid tedavisi ile ilişki saptanmamıştır. Posthemorajik hidrosefali ve serebral palsi ile uyumlu olmayan davranış düzeyi arasında çok kuvvetli bir ilişki görülmüştür. Yoğun bakım ünitesinde uzun yatış; uyumlu olmayan davranış istatistiksel anlamlı düzeyde etkilemiştir.

Aşırı düşük doğum ağırlıklı çocuklar okul öncesi dönemde değişik alanlarda sıklıkla sorun yaşamakta ve özel eğitim desteğine ihtiyaç duymaktadırlar. Bir çalışmada 1000 gram altında doğanlarda bu oran %26 olarak bulunmuştur (28). Bizim çalışmamızda olgularımızın Vineland Uyum ve Davranış Ölçeğine göre uyumlu davranış bileşke düzeyleri tanımlanmış, bu düzeye göre özel eğitim gereksinimleri belirlenmiştir. Buna göre çalışmamızda, olgularımızın %22,4'ünün yüksek seviyede özel eğitim ihtiyacı olduğu görülmüştür. Özellikle ciddi düzeyde sorunu olanlar incelendiğinde bu olguların yoğun bakım ünitesinde daha uzun süre yatan, GM-İVK ve PVL olan prematürelere olduğu görülmüştür. Steroid tedavisinin prematüre çocukların uzun dönem sonuçlarını olumsuz yönde etkilediği birçok çalışmada gösterilmiştir (29). Çalışmamızda da steroid tedavisi alanların uyumlu davranış bileşke skorları daha düşük saptanmıştır. Serebral palsisi olan 8 olgunun hepsinin de uyumlu davranış bileşke düzeyi anormaldi ve aralarındaki ilişki anlamlı bulundu. Annenin eğitim durumunun olgularımızın uyumlu davranış düzeylerini anlamlı olarak etkilediği görülürken, baba öğrenim durumunun bu etkiyi yapmadığı tespit edilmiştir. Anne ve babanın düşük öğrenim durumunun ADDA çocukların birçok işlevselliğini kötü yönde etkilediği çalışmalarda da gösterilmiştir (18,19).

Yüksek seviyede özel eğitim gerekliliği olan 13 olgudan 8'inin özel eğitim desteğinden faydalanmadığı tespit edilmiştir. Özel eğitim desteğinden faydalanmayan 8 olgunun sosyodemografik özellikleri incelendiğinde olguların annelerinin eğitim seviyesinin ve sosyoekonomik düzeylerinin anlamlı olarak düşük olduğu saptanmıştır. Çalışmanın sonunda sorun yaşayan prematüre çocuklar gerekli bölümlere yönlendirilmiştir.

Sonuç olarak ADDA prematürelere başta olmak üzere tüm prematürelere, kısa ve uzun dönem izleminde sorunlar yaşayan riskli yenidoğanlardır. Prematürelere uzun süreli izlemi bir halk sağlığı sorunudur. Erken dönemde yaşadığı sorunlar; uzun dönemde karşımıza dil, iletişim, zihinsel aktivite ve hareket alanlarında sorun olarak çıkmaktadır. Bu çocukların ilk üç yaşta yakın izlemi, okul öncesi-okul döneminde de tekrar değerlendirilmesi, gereksinimi olanların rehabilitasyon programları ile desteklenmesi çok önemlidir. Prematüre doğmuş ergenler adölesan dönemde de çevre, aile ve psikosozal faktörlerden etkilendiğinden bu bakış açısından değerlendirilmeli ve desteklenmelidir.

Teşekkür: Bu çalışmada bize büyük desteği nedeniyle Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Gelişimsel Pediatri Bilim Dalı'nın değerli öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. İlgi Ertem ve ekibine şükran ve teşekkürlerimizi sunarız.

Etik Komite Onayı: Etik kurul onayı İstanbul Bakırköy Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulundan alınmıştır (2009/208).

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarımı - B.U.; Materyal: B.U.; Veri Toplama - B.U., S.K.; Veri Analizi/Yorumlama - B.U.; Yazma - B.U.; S.K.; Son Onay ve Sorumluluk - B.U., S.K.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

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

Acknowledgements: We would like to express our gratitude and appreciation to dear Professor Dr. İlgi Ertem and her team from Ankara University Faculty of Medicine, Department of Developmental Pediatrics for their great support and help in this study.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was obtained from İstanbul Bakırköy Gynecology and Pediatrics Training and Research Hospital (2009/208).

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study - B.U.; Materials - B.U.; Data Collection and/or Processing - B.U., S.K.; Analysis and/or Interpretation - B.U.; Drafting Manuscript - B.U., S.K.; Final Approval and Accountability - B.U., S.K.

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

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

KAYNAKLAR/REFERENCES

1. Chung EH, Chou J, Brown KA. Neurodevelopmental outcomes of preterm infants: a recent literature review. *Transl Pediatr* 2020; 9 (Suppl 1): 3-8.
2. World Health Organization: International Classification of Functioning, Disability and Health, Geneva, WHO, 2001.
3. Sparrow SS, Cicchetti DV, Balla DA. Vineland adaptive behavior scales 2nd ed. AGS Publishing; Circle Pines, MN: 2005.
4. Rosenbaum P, Saiga S, Szatmari P, Hoult L. Vineland adaptive behavior scales as a summary of functional outcome of extremely low-birth weight children. *Dev Med Child Neurol* 1995; 37: 577-86. [CrossRef]
5. De Battista AM, Huffman LC, Cooper B, Alkon A, Kennedy CM, Weiss SJ. Adaptive Behavior Trajectories in Children Born Prematurely: The influence of biologic and social risk factors over the first few years of life. *Ann Pediatr Child Health* 2016; 4(2): 1101.
6. Pascal A, Govaert P, Oostra A, Naulaers G, Ortibus E, Van Den Broeck C. Neurodevelopmental outcome in very preterm and very-low birthweight infants born over the past decade: a meta-analytic review. *Dev Med Child Neurol* 2018; 60: 342-55. [CrossRef]

7. The Scottish low birthweight study: II. Language attainment, cognitive status, and behavioural problems. *Arch Dis Child* 1992; 67: 682-6. [\[CrossRef\]](#)
8. Sajaniemi N, Hakamies-Blomqvist N, Katainenc S, Wendta L. Early cognitive and behavioral predictors of later performance: a follow-up study of ELBW children from ages 2 to 4. *Early Child Res Q* 2001; 16: 343-61. [\[CrossRef\]](#)
9. Vohr BR, Msall ME. Neuropsychological and functional outcomes of very low birth weight infants. *Seminars in perinatology* 1997; 21: 202-20. [\[CrossRef\]](#)
10. Chen PS, Jeng SF, Tsou KI. Developmental function of very-low-birth-weight infants and full-term infants in early childhood. *J Formos Med Assoc* 2004; 103: 23-31.
11. Sullivan MC, Msall ME. Functional performance of preterm children at age 4. *J Pediatr Nurs* 2007; 22: 297-309. [\[CrossRef\]](#)
12. Short EJ, Klein NK, Lewis BA, Fulton S, Eisengart S, Kerckmar C, et al. Cognitive and academic consequences of bronchopulmonary dysplasia and very low birth weight: 8-year-old outcomes. *Pediatrics* 2003; 112: e359.
13. Voorman JM, Dallmeijer AJ, Van Eck M, Schuengel C, Becher JG. Social functioning and communication in children with cerebral palsy: association with disease characteristics and personal and environmental factors. *Dev Med Child Neurol* 2010; 52: 441-7. [\[CrossRef\]](#)
14. Hack M, Friedman H, Fanaroff AA. Outcomes of extremely low birth weight infants between 1982-1988. *N Eng J Med* 1989; 321: 1642-7. [\[CrossRef\]](#)
15. Msall ME, Rogers BT, Buck GM, Mallen S, Catanzaro NL, Duffy LC. Functional status of extremely preterm infants at kindergarten entry. *Dev Med Child Neurol* 1993; 35: 312-20. [\[CrossRef\]](#)
16. Moore GP, Lemyre B, Barrowman N, Daboval T. Neurodevelopmental outcomes at 4 to 8 years of children born at 22 to 25 weeks' gestational age: a meta-analysis. *JAMA Pediatr* 2013; 167: 967-74. [\[CrossRef\]](#)
17. Palta M, Sadek-Badawi M, Evans M, Weinstein MR, McGuinness G. Functional assessment of a multicenter very low-birth-weight cohort at age 5 years. *Newborn Lung Project. Arch Pediatr Adolesc Med* 2000; 154: 23-30.
18. Dieterich SE, Hebert HM, Landry SH, Swank PR, Smith KE. Maternal and child characteristics that influence the growth of daily living skills from infancy to school age in preterm and term children. *Early Education and Development* 2004; 15: 283-304. [\[CrossRef\]](#)
19. Delmas O, Garcia P, Bernard V, Fabre M, Vialet R, Boubred F, et al. Neurodevelopmental outcome at 3 years of age of infants born at less than 26 weeks. *Arch Pediatr* 2016; 23: 927-34. [\[CrossRef\]](#)
20. Grunau RE, Whitfield MF, Fay TB. Psychosocial and academic characteristics of extremely low birth weight (<800 g) adolescents who are free of major impairment compared with term-born control subjects. *Pediatrics* 2004; 114: 725-32. [\[CrossRef\]](#)
21. Hamilton BE, Minino AM, Martin JA, Kochanek KD, Strobino DM, Guyer B. Annual summary of vital statistics: 2005 *Pediatrics* 2007; 119: 345-60.
22. Marlow N, Wolke D, Bracewell MA, Samara M, for the EPICure Study Group. Neurologic and developmental disability at six years of age after extremely preterm birth. *New Eng J Med* 2005; 352: 9-19. [\[CrossRef\]](#)
23. Johnson EO, Breslau N. Increased risk of learning disabilities in low birth weight boys at age 11 years. *2000*; 47: 490-500.
24. Vohr BR, Wright LL, Dusick AM, Mele I, Verter J, Steichen JJ, et al. Neurodevelopmental and functional outcomes of extremely low birth weight infants in the national institute of child health and human development neonatal research network, 1993-1994. *Pediatrics* 2000; 105: 1216-26. [\[CrossRef\]](#)
25. Bhutta AT, Cleves MA, Casey PH, Cradock MM, Anand KJS. Cognitive and behavioral outcomes of school-aged children who were born preterm: a metaanalysis. *Jama* 2002; 288: 728-37. [\[CrossRef\]](#)
26. Cheong, JLY, Burnett AC, Treyvaud K, Spittle AJ. Early environment and long-term outcomes of preterm infants. *J Neural Transm* 2020; 127: 1-8. [\[CrossRef\]](#)
27. Hollebrandse NL, Spittle AJ, Burnett AC, Anderson PJ, Roberts G, Doyle LW, et al. School-age outcomes following intraventricular haemorrhage in infants born extremely preterm. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2021; 106: 4-8. [\[CrossRef\]](#)
28. Hack M, Schluchter M, Cartar L, Rahman M, Cuttler L, Borawski E. Growth of very low birth weight infants to age 20 years. *Pediatrics* 2003; 37: 668-73. [\[CrossRef\]](#)
29. Davidovitch M, Kuint J, Lerner-Geva L, Zaslavsky-Paltiel I, Rotem RS, Chodick G, et al. Postnatal steroid therapy is associated with autism spectrum disorder in children and adolescents of very low birth weight infants. *Pediatr Res* 2020; 87: 1045-51. [\[CrossRef\]](#)

Tek Basamaklı Ters Transkripsiyon Kantitatif PZR Yönteminin miRNA Ekspresyon Analizleri için Optimizasyonu

Optimization of One Step Reverse Transcription Quantitative PCR Method for miRNA Expression Analyses

Seda Süsgün^{1,2} , İlker Karacan³ , Emrah Yücesan¹ 

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

²İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye

³İstanbul Medeniyet Üniversitesi, Bilim ve İleri Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, İstanbul, Türkiye

ORCID ID: S.S. 0000-0001-9689-3111; İ.K. 0000-0003-3100-0866; E.Y. 0000-0003-4512-8764

Cite this article as: Süsgün S, Karacan İ, Yücesan E. Tek basamaklı ters transkripsiyon kantitatif PZR yönteminin miRNA ekspresyon analizleri için optimizasyonu. Experimed 2021; 11(2): 113-9.

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada mikroRNA (miRNA) hedeflerinin spesifik olarak belirlenmesi ve ekspresyon ölçümünün yapılmasına yönelik tek basamaklı ters transkripsiyon kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPZR) yönteminin, seçilen iki farklı miRNA (hsa-miR-145-5p ve hsa-miR-146a-5p) için araştırılması ve sürecin optimizasyonu amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: RNA eldesi HEK293T hücre hattından yapılmıştır. Çalışmada seçilen her iki miRNA hedefi için uygun primerler tasarlanmış, tek basamaklı RT-qPZR yöntemi ile optimizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Hedef ampliconların spesifiklik doğrulamaları agaroz jel elektroforezi ve konvansiyonel dizileme yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: Tek basamakta gerçekleştirilen RT-qPZR çalışmasının her iki primer için de yüksek spesifiklikte ve hassasiyette sonuç verdiği qPZR erime eğrisi ve agaroz jel görüntüleme sistemi ile gösterilmiştir. qPZR sırasındaki bağlanma sıcaklıklarından en düşük Ct değerinin 54°C'de elde edildiği görülmüştür. Ayrıca konvansiyonel Sanger dizileme sonucunda yalnızca ilgili miRNA dizilerinin hedeflendiği ve spesifik olmayan herhangi bir çoğaltma işleminin olmadığı gösterilmiştir.

Sonuç: Sunulan çalışmada deneysel tasarım her iki miRNA hedefi için de optimize edilerek spesifik olarak yalnızca hedef miRNA molekülünün tespitinin yapılabildiği gösterilmiştir. Bu yaklaşım, ilerleyen çalışmalarda miRNA tespit ve ekspresyon analizlerinde güvenilir olarak kullanılabilir. Sunulan yaklaşım, düşük maliyetli, zamandan ve iş gücünden tasarruf sağlayan bir alternatif olması sebebiyle benzer tüm çalışmalarda değerlendirilebilir.

Anahtar Kelimeler: miRNA, RT-qPZR, miR-145, miR-146a

ABSTRACT

Objective: We aimed to investigate and optimize the one step reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) method for specific detection and quantitation of two selected microRNA (miRNA)s, namely hsa-miR-145-5p and hsa-miR-146a-5p.

Material and Method: RNA was extracted from HEK293T cell line. Primers were designed and experimentally optimized to be compatible with with one step RT-qPCR method for two selected miRNAs. Targeted amplicons were visualized with agarose gel electrophoresis and sequenced using the Sanger method for specificity verification.

Results: High specificity of one step RT-qPCR amplification was demonstrated using melt curve and agarose gel electrophoresis analyses for both miRNA targets. It was shown that the earliest cycle threshold (Ct) values were obtained at the annealing temperature of 54°C. Also, target specificity was confirmed by conventional Sanger sequencing.

Conclusion: In this study, one-step RT-qPCR design was optimized for both miRNA targets and target specificity was verified. Our study showed this approach to be a good candidate for miRNA detection and quantitation as a cost-effective alternative method. Furthermore, the approach is highly suitable for research projects as it is both low-cost and fast, involving less hands-on time.

Keywords: miRNA, RT-qPCR, miR-145, miR-146a

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Emrah Yücesan **E-posta:** eyucesan@bezmi alem.edu.tr

Başvuru/Submitted: 04.06.2021 **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 02.07.2021

Son Revizyon/Last Revision Received: 02.07.2021 **Kabul/Accepted:** 02.07.2021



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

GİRİŞ

MikroRNA'lar (miRNA) ilk olarak 1993 yılında *Caenorhabditis elegans*'da keşfedilmiş (1) ve ardından hız kazanan çalışmalar sonucunda miRNA'ların neredeyse tüm ökaryotik hücrelerde bulunduğu belirlenmiştir (2). miRNA'lar evrimsel olarak korunmuş genetik diziler olup, protein kodlamayan RNA'lardır (3). Öncül miRNA'lar nükleer ve sitoplazmik işlemlerden *DROSHA* ve *DICER* endoribonükleazları aracılığıyla geçer ve nihayetinde olgunlaşan miRNA'lar RNA kaynaklı susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex, RISC)'e dahil olurlar. Bu kompleks içerisinde miRNA'lar hedeflerine eşlenerek bağlanır ve biyolojik fonksiyonunu gerçekleştirir (4). miRNA'lar, RNA susturma mekanizmasında rehber molekül olarak bulunur ve genellikle protein kodlayan transkriptleri hedefleyerek (mRNA), neredeyse tüm gelişimsel ve patolojik mekanizmalarda post-transkripsiyonel düzenleyici olarak görev alır (3). miRBase veri tabanının son güncellemesiyle (v22.1) birlikte 271 organizmada 48.885 olgun miRNA tanımlanmıştır, insanlarda ise 1.917 öncül ve 2.654 olgun miRNA bilgisi bulunmaktadır (5,6).

Klinik örneklerden alınan parafine gömülü dokularda ve plazmada miRNA'ların yüksek stabilite gösterdiği ve ifade düzeyinde değişiklikler olduğuna dair bulgular miRNA'ları hastalıkların tanısında umut verici biyobelirteç adayları yapmıştır (7). Bugüne kadar miRNA'ların ifade düzeyindeki değişimler kanser, diyabet, immün sistem hastalıkları, kas hastalıkları ve nörodejenereasyon gibi birçok hastalık ile ilişkilendirilmiştir (8).

miRNA tespiti ve ekspresyon analizi için çok sayıda yöntem geliştirilmiştir ancak her yöntemin sınırlılıkları bulunmaktadır (9). Northern blot ve microarray analizleri konvansiyonel olmakla birlikte miRNA konsantrasyonlarının yetersiz olduğu durumlarda istenen hassasiyeti gösterememektedir (7). Hassasiyeti ve spesifikliğini arttırmak adına nanopartikül amplifikasyon metodu, konjuge-polimer bazlı yöntem, ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, RT-PZR), ribozim amplifikasyon yöntemi, izotermal amplifikasyon, elektrokimyasal metot gibi çok sayıda yöntem geliştirilmiştir (10). Bu metodlar arasında RT-PZR yöntemi en pratik olanıdır ancak miRNA'lar için zaman alıcı bir ters transkripsiyon adımını içermeleri ve kullanılan bazı problemlerin maliyetleri nedeniyle yine de tam olarak istenen özellikleri taşımamaktadır. Bu dezavantajları ortadan kaldırmak amacıyla Yan ve ark. tarafından "Tek basamaklı gerçek zamanlı ters transkripsiyon PZR" (RT-qPZR) yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen bu sistemde tek bir tüp içerisinde tüm bileşenler bulunmakta ve reaksiyonlar bir gerçek zamanlı PZR cihazında ardışık olarak yürütülmektedir (8).

Sunulan çalışmamızda tek basamaklı RT-qPZR yöntemi ele alınmıştır. Deney ve primer tasarımları tarafımızca yapılarak gelecek miRNA çalışmalarında kullanılmak üzere kendi laboratuvar sistemimizde optimize edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla; RNA kaynağı olarak HEK293T hücre hattı kullanılmıştır ve iki farklı miRNA (miR-145-5p ve miR-146a-5p) için tek tüp içerisinde ardışık ters transkripsiyon ve PZR basamakları optimize edilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, deneysel olarak

kalitatif ve kantitatif doğrulaması da yapılan bu yaklaşımın, diğer hedef miRNA'lar için de uyarlanabilmesi olanaklıdır ve bu sayede hızlı, kolay ve düşük maliyetli olarak miRNA tespiti ve ekspresyon ölçümünün gerçekleştirilmesi mümkün olacaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

RNA İzolasyonu

Çalışmamızda HEK293T (*Human Embryonic Kidney 293T*) hücre hattı kullanılmıştır. RNA izolasyonları Qiagen RNeasy Tissue Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Almanya) kullanılarak üreticinin protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. RNA konsantrasyonları ve saflıkları Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD) cihazı ile değerlendirilmiştir. RNA için ölçülen $A_{260/280}$ oranı $\sim 2,0$ ve $A_{260/230}$ oranı $\sim 2,0-2,2$ olması durumunda örnekler 50 ng/ μ l konsantrasyonda olacak şekilde seyreltilerek -80°C 'de saklanmıştır.

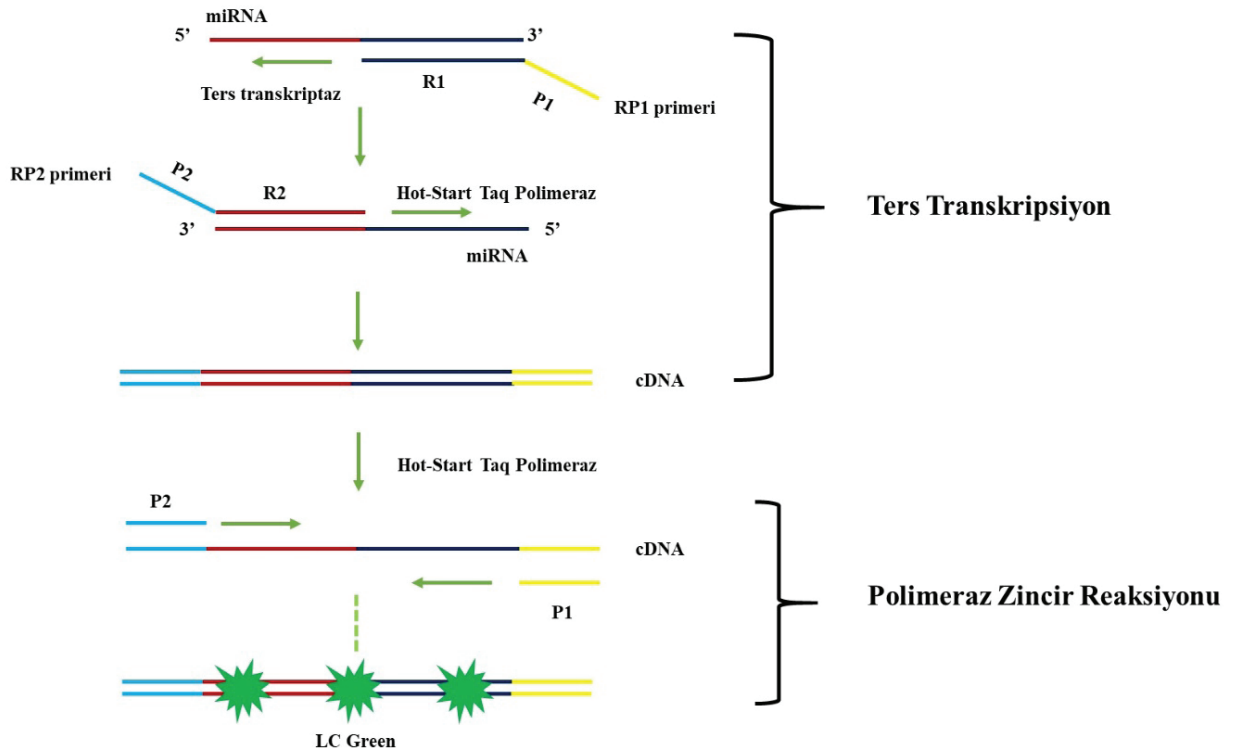
Primer Dizaynı

Tek basamaklı RT-qPZR primerleri Yan ve ark. (8) tarafından geliştirilen yöntem temel alınarak tasarlanmıştır. Bu amaçla öncelikle çalışılacak miRNA'lara ait dizi bilgileri (hsa-miR-145-5p #MIMAT0000437 ve hsa-miR-146a-5p #MIMAT0000449) miRBase veri tabanından alınmıştır (5). Tek basamaklı RT-qPZR yönteminde iki çift olmak üzere toplamda dört primer gerekmektedir (Şekil 1). Buna göre ilk çift primer (RP1 ve RP2) miRNA spesifiktir, her miRNA için özel olarak tasarlanmıştır. RP1 primeri; P1 primerinin dizisini ve R1 olarak belirtilen hedef miRNA'nın 3' ucuna komplementer dizi içerir. RP2 ise P2 primerinin dizisini ve R2 olarak adlandırılan hedef miRNA'nın 5' ucuna komplementer dizi içerir. RP1 ve RP2 primerleri ters transkripsiyon işlemi için kullanılmıştır. İkinci çift P1 ve P2 primerleri ise sabit dizili primerlerdir, qPZR işlemi için gereklidir ve literatürde daha önce bildirilen primer dizileri kullanılmıştır (11). Tüm primer tasarımları sRNAprimerDB online biyoinformatik aracı kullanılarak yapılmıştır (11). miRNA spesifik RP1, RP2 primerleri ile evrensel P1 ve P2 primerlerinin dizileri Tablo 1'de verilmiştir.

Tek Basamaklı RT-qPZR Yönteminin Uygulanması ve Ürünlerin Konfirmasyonu

Tek basamaklı RT-qPZR yönteminde hazırlanan reaksiyonlar Tablo 2'de, uygulanan koşullar Tablo 3'te sunulmuştur. Tek basamaklı RT-qPZR yöntemi temelde iki aşamadan oluşmaktadır; ters transkripsiyon ve PZR. Kullanılan PZR master karışımı 25 μ l'lik reaksiyonda 100 U PrimeScript Reverse Transcriptase (Takara Bio, ABD), 1,25 U TaKaRa Taq HS (Takara Bio, ABD), RNaz inhibitörü, dNTP ve bu enzimlerin tampon çözeltisini içerecek şekilde hazırlanmıştır.

Birinci aşamada ters transkripsiyon reaksiyonu 52°C 'de 5 dakika ve 95°C 'de 10 saniye olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada; RP1 primerinin R1 dizisi hedef miRNA'nın 3' ucuna bağlanır, ters transkriptaz enzimi ve dNTP'ler varlığında uzama reaksiyonu gerçekleşir. Aynı zamanda oluşan bu çift zincirli yapıları RP2 primerinin komplementer R2 dizisi bağlanır ve ortamda bulunan Hot-Start Taq polimeraz (HS-Taq) enzimi sayesinde uzama gerçekleşir. Ardından 95°C 'de reaksiyondaki ters transkriptaz enzimi inhibe edilir ve qPZR aşamasına geçilir.



Şekil 1. Tek basamaklı RT-qPZR yönteminin çalışma prensibi.

Tablo 1. Tek basamaklı RT-qPZR yönteminde kullanılan primer dizileri.

Primer	5'-3' primer dizisi
hsa-miR-145-5p RP1	GGACGGTAGCAAGCAAAGAGTGTGAGGGATTCTCTG
hsa-miR-145-5p RP2	GGGATTCTGGAAGATGATGATGACGTCCAGTTTTC
hsa-miR-146a-5p RP1	GGACGGTAGCAAGCAAAGAGTGTGAACCCATGGAA
hsa-miR-146a-5p RP2	GGGATTCTGGAAGATGATGATGACTGAGAACTGAA
P1	GGACGGTAGCAAGCAAAGAGTGTG (11)
P2	GGGATTCTGGAAGATGATGATGAC (11)

İkinci aşama konvansiyonel PZR yöntemidir. Ters transkripsiyon aşamasından gelen çift zincirli yapılara eklenen evrensel diziler sayesinde P1 ve P2 primerleri kullanılarak, HS-Taq polimeraz ve dNTP'lerin varlığında 95°C'de 10 saniye ve erime sıcaklığında (gradyent oluşturularak çalışılmıştır) 30 saniye olacak şekilde 40 döngüde PZR gerçekleştirilmiştir. Bu PZR karışımına ek olarak floresan bir DNA boyası olan *LC Green* eklenmiştir, bu sayede cDNA amplifikasyonu gerçek zamanlı olarak izlenmiş ve erime eğrisi analizi yapılmıştır.

PZR döngüsünün bitmesini takiben yapılan erime eğrisi analizi sayesinde hedeflenmeyen amplifikasyon ürünlerinin varlığı araştırılmıştır. Erime eğrisi analizi; 65°C'den 95°C'ye yavaş ısıtma ile elde edilmiş ve her 0,5°C sıcaklık artışında floresan ölçümleri alınmıştır. RT-qPZR çalışmaları Bio-Rad CFX96 Connect

(Bio-Rad Laboratories, Inc., California, ABD) ısı döngü cihazında yapılmıştır. Ek olarak, RT-qPZR sonrasında elde edilen ürünler %2'lik agaroz jel yardımıyla incelenmiş ve amplifiye edilen örneklerin uzunlukları kontrol edilmiştir. İleri konfirmasyon amacıyla hsa-miR-145-5p'ye ait tek örnekte konvansiyonel Sanger dizileme işlemi yapılmıştır (Macrogen Inc., Seul, Güney Kore).

BULGULAR

Çalışma kapsamında ilk olarak her iki miRNA için de tek basamaklı gradyent gerçek zamanlı RT-PZR yapılarak primerlerin bağlanma sıcaklıkları belirlenmiş ve erime eğrisi analizi yapılmıştır. Şekil 2'de dört farklı sıcaklık için (58,6°C/57,6°C/56°C/54°C) elde edilen Ct (*Cycle threshold*) değerleri ve erime eğrileri verilmiştir. Buna göre primerlerin optimum bağlanma

Tablo 2. Tek basamaklı RT-qPZR için hazırlanan reaksiyon bileşenleri ve miktarları.

Reaktifler	1X (µl)
PZR master karışımı (2X)	10
P1 evrensel primer (2,5 µM)	1,6
P2 evrensel primer (2,5 µM)	1,6
miRNA spesifik RP1 primeri (2,5 µM)	0,4
miRNA spesifik RP2 primeri (2,5 µM)	0,4
Kalıp RNA (50 ng/µl)	1,5
LC Green (10X)	2
dH ₂ O	2,5
Toplam	20 µl

Tablo 3. Tek basamaklı RT-qPZR koşulları.

Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı	Yöntem
52°C	5 dk	1	Ters transkripsiyon
95°C	10 sn		
95°C	5 sn	40	Polimeraz zincir reaksiyonu
54°C	30 sn		
65°C-95°C	0,5 °C / sn	1	Erime eğrisi analizi

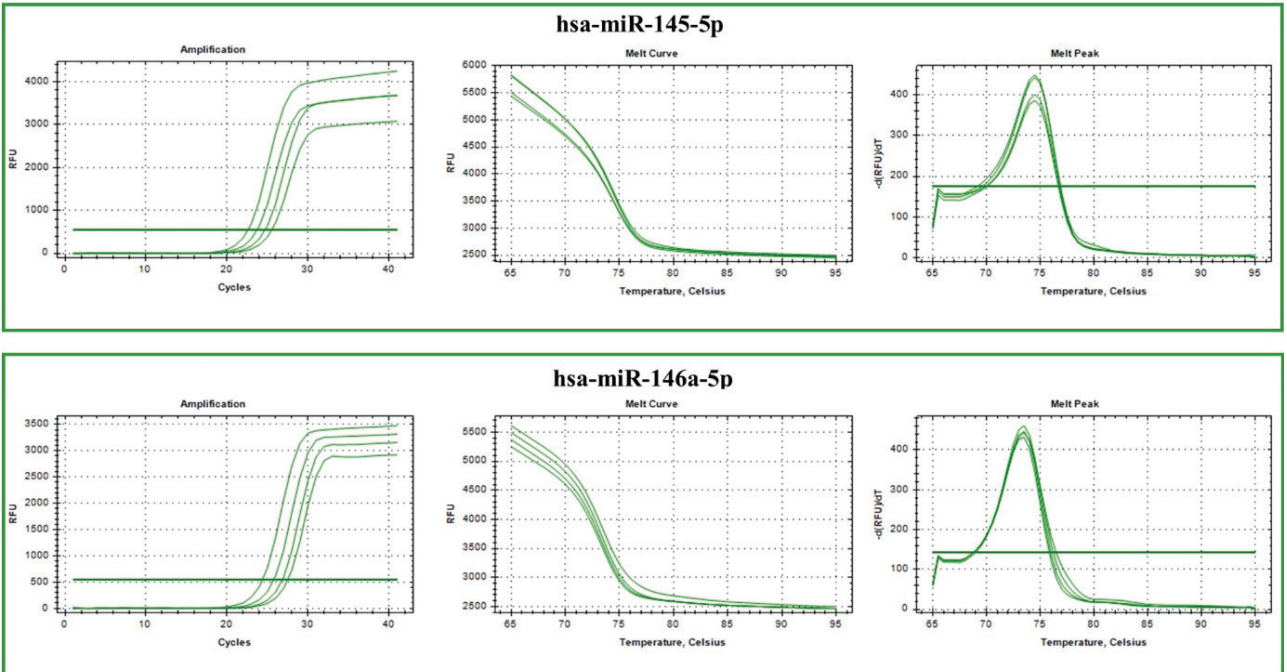
sıcaklığı en düşük Ct değerinin alındığı ve hedef dışı amplifikasyon görülmeyen 54°C olarak belirlenmiştir. Erime eğrileri dikkate alındığında tek bir noktada erime piki alındığı görülmektedir dolayısıyla hedef dışı PZR ürününün olmadığı yorumu yapılabilmektedir.

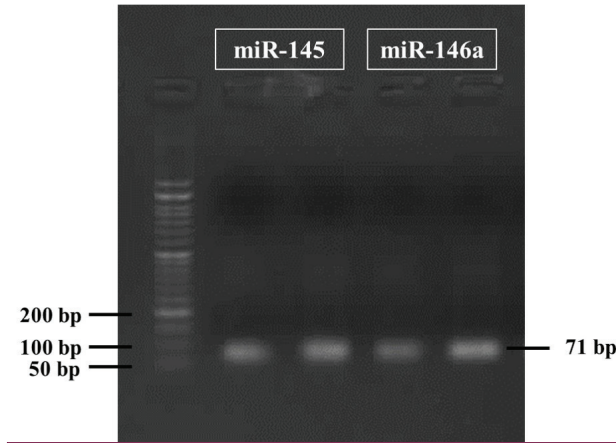
Ardından elde edilen ürünler %2'lik agaroz jel yardımıyla görüntülenmiştir (Şekil 3). Son olarak, ileri konfirmasyon amacıyla hsa-miR-145-5p için tek basamaklı RT-qPZR ürünü Sanger dizilemeye tabi tutulmuştur. Sanger dizileme sonuçları *CLC Main Workbench v5.0.2* (QIAGEN, Hilden, Almanya) programı kullanılarak analiz edilmiştir. Şekil 4'te gösterildiği haliyle verilen dizi sonuçlarına göre amplifiye edilen ürün dizisi miRBase veri tabanından alınan hsa-miR-145-5p dizisi ile aynıdır.

TARTIŞMA

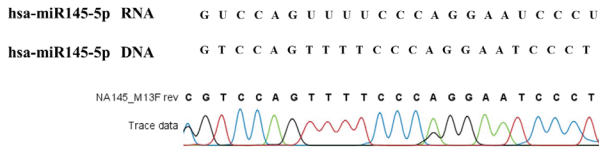
miRNA'lar neredeyse tüm ökaryotik hücrelerde bulunan kodlamayan RNA molekülleridir ve miRBase veri tabanının son sürümüne göre (v22.1) insanlarda öncül miRNA sayısı 1.917 olarak belirtilmiştir ancak yapılan deneysel konfirmasyon çalışmaları ile bu sayının çok daha yüksek olabileceği öngörülmüştür (6).

Klinik örneklerde miRNA'ların yüksek stabilizasyon göstermesi ve bu sayede biyobelirteç olma potansiyelleri miRNA ekspresyon çalışmalarına ivme kazandırmıştır. Bu anlamda yapılan kilit çalışmalardan biri 2005 yılında *Nature* dergisinde yayımlanmıştır. Buna göre, 217 memeli miRNA'sı ele alınmış ve tümör dokusu, sağlıklı doku, kanser hücre hatları, klinik örnekler, fare tümörleri dahil 334 farklı örnekte yapılan incelemeler sonucunda miRNA'ların büyük kısmının enformatif olduğu ve hatta tümörün gelişimsel aşamasını dahi güvenilir bir şekilde yansıttığı belirlenmiştir (12).

**Şekil 2.** Tek basamaklı gradient RT-PZR sonuçları.



Şekil 3. Tek basamaklı RT-PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri.



Şekil 4. hsa-miR-145-5p PZR ürününün Sanger dizileme kromatogramı.

Bugüne kadar yapılan çok sayıda çalışma bu verileri doğrular niteliktedir. İnsan miRNA-ilişkili hastalık veri tabanının (*The human miRNA-associated disease database-HMDD*) son sürümünde (v3.2) 1.206 miRNA'nın 893 hastalıkla ilişkilendirildiği 19.280 yayın bulunmaktadır. Bu bilgiler ışığında miRNA'ların çeşitli kritik biyolojik süreçlerde önemli roller oynadığını söylemek mümkündür (13).

miRNA'ların saptanması ve kantitasyonu için çok sayıda yöntem geliştirilmiştir ancak optimum bir yöntem henüz belirlenmemiştir ve her yöntemin kendine özgü avantajları ile dezavantajları bulunmaktadır. Bunlar arasında; mikroarray çalışmaları yüksek çıktılı miRNA ifade çalışmalarına imkân tanısa da duyarlılık ve özgüllük açısından nispeten sınırlıdır (14). Northern blot yöntemi görece karmaşıktır ve sinyal artefaktları önemli bir sorun teşkil etmektedir (10). Aynı zamanda hibridizasyon temelli çalışmalarda hem öncül hem de olgun miRNA'lara problemlerin bağlanma ve yanlış pozitiflik verme ihtimali vardır (7). miRNA dizileme çalışmaları yüksek çıktılı olmasına rağmen veri analizi için yüksek altyapı ve ekipman ile tecrübeli araştırmacı gerektirmektedir ve oldukça maliyetli bir yöntemdir (15). Tüm sınırlayıcı parametreler göz önünde bulundurularak düşük maliyetli ve yüksek verimli olabilecek; nanopartikül-aracılı problemler, izotermal amplifikasyon, elektrokimyasal metot gibi çok sayıda yöntemin uygulanması mümkündür (10). Geliştirilen bu yöntemlerden özellikle ddPZR (*droplet digital PCR*) platformları olumlu sonuçları ile umut vaat etmektedir. Bu yöntemde pozitif ve negatif damlacıklardan gelen floresan sinyaller kullanılarak absöüt kantitasyon yapılır. ddPZR'de referans gene ihtiyaç

duyulmaz, düşük miktarda örnekten yüksek hassasiyete sahip sonuçlar alınabilir. ddPZR yöntemi RT-qPZR yöntemleri ile karşılaştırıldığında dolaşımdaki miRNA'ların analizinde hem teknik performans hem de tanı potansiyeli açısından üstünlük göstermiştir (16). Fakat bu yöntemde de kullanılması gereken cihazlar uygulamaya özgü olup, qPZR cihazları gibi yaygın olarak laboratuvarlarda bulunmamaktadır. Cihaz ve sarf maliyetleri düşüldüğünde kullanım alanı geniş olabilecek olsa dahi, maliyet açısından etkin bir yöntem değildir.

Tüm bunların yanında gerçek zamanlı PZR yöntemi gen ekspresyonunun kantitasyonunda maliyet ve kolay uygulanabilirlik açısından hala altın standart olarak kabul edilmektedir (14). miRNA çalışmalarında PZR temelli evrensel veya spesifik primerlerle ters transkripsiyon yaklaşımı bulunmaktadır (17,18). Evrensel ters transkripsiyon yaklaşımında, tüm miRNA moleküllerine cDNA dönüşümü için bilinen tek özdeş bir kuyruk eklenmektedir. Bu kuyruk; 3' ucuna poly-A polimeraz ile poly-A kuyruğunun eklenmesi (15), poly-U polimeraz yardımı ile poliuridilasyon (19), T4 RNA ligaz ile evrensel linkerların eklenmesi (20) veya hem linker hem de kuyruk eklenmesi kombinasyonu şeklinde uygulanabilmektedir. Bu yaklaşımların temel avantajı, tüm miRNA'ların aynı tüpte cDNA'ya dönüşümüne olanak sağlamasıdır ancak arka plan kirliliği bu yaklaşımın sınırlayıcı parametresidir (21).

İkinci grupta ise spesifik lineer primerler, kısaçak problemler (*pincer probes*) ve *Stem-loop* RT primerleri kullanılır. *Stem-loop* metodu günümüzde en sık kullanılan yöntemlerdendir (22-24). Geleneksel *Stem-loop* yönteminde her miRNA için yeni bir spesifik *Stem-loop* primeri tasarlanmalıdır, bu primer olgun miRNA'ların 3' ucuna bağlanır ve ardından cDNA sentezlenir. Buna ek olarak evrensel *Stem-loop* primer kullanımı da geliştirilmektedir (14,15).

Tek basamaklı RT-qPZR yöntemi ise miRNA çalışmalarında hassas ve spesifik kantitasyon sağlamaktadır. Bu yöntemde, tek tüp içerisinde ters transkripsiyon ve PZR aşamaları ardışık olarak, gerçek zamanlı PZR cihazında tek seferde yürütülür. Sistemin en büyük avantajı ayrı bir ters transkripsiyon aşamasına ihtiyaç duymaması ve çok kısa sürede sonuca ulaşmayı sağlamasıdır. Uygulama kolaylığının yanı sıra bu yöntem aynı zamanda iki basamaklı PZR temelli miRNA kantitasyon yöntemlerine göre kontaminasyon riskini azaltmakta ve bu sayede yüksek numune sayılı çalışmalar için daha verimli olmaktadır (8). Bununla birlikte, birçok avantajının yanı sıra yöntemin tek basamaklı olması beraberinde bazı sınırlamalar da doğurmaktadır; ters transkripsiyon ve PZR basamakları aynı tüpte gerçekleştirildiği için ayrı ayrı optimize edilememektedir, bu durum ise her iki basamakta daha düşük verime yol açabilmektedir. Ek olarak, sentezlenen cDNA'ların tamamı hemen sonrasında PZR yönteminde kullanılmaktadır, bu nedenle herhangi bir sulandırma işlemi gerçekleştirilememektedir. Bir diğer kısıtlama ise sonuçlar açısından olumsuz bir durum sergilemese de başlangıç materyalinin daha stabil olan cDNA yerine kırılğan RNA olmasıdır. Tüm bu bilgiler göz önünde bulundurularak her çalışma için o deneye uygun yöntem tercih edilmelidir. Tek seferde ve RNA'dan gerçekleştirilen işlemler hem araştırma hem de tanı

laboratuvarı pratiğinde aktif olarak kullanılmaktadır. Örnek vermek gerekirse; bu yöntem günümüzde hızı ve uygulama kolaylığı nedeniyle COVID-19'un etiyolojik tespiti için kullanılmakta ve altın standart olarak kabul edilmektedir. Vakalardan alınan sürüntülerden izole edilen SARS-CoV-2 RNA genomu tek tüp içerisinde önce ters transkripsiyon sonra da PZR işlemine tabi tutularak hızlı bir şekilde analiz edilmektedir (25,26).

Sunulan çalışmada tek basamaklı RT-qPCR yönteminin seçilen hedef miRNA'lar için optimizasyonu denenmiştir. Çalışmamızın kısıtlılığı; az sayıda örnek kullanılması ve sınırlı sayıda miRNA için optimizasyonun gerçekleştirilmiş olmasıdır. Sunulan çalışmada deneysel optimizasyon için hsa-miR-145-5p ve hsa-miR-146a-5p miRNA hedefleri seçilmiştir. Bu hedef miRNA'lar için alınan sonuçlar güvenilir şekilde deneysel olarak doğrulanmış olsa da bu dizaynın diğer hedef miRNA'lar için benzer hassasiyetlere sahip olma durumları ayrıca incelenmelidir. Bu sebeple her çalışılacak miRNA hedefi için deneysel optimizasyon ve doğrulamalara ihtiyaç duyulabilecektir.

Sonuç olarak, önerilen yaklaşım ile tek basamaklı RT-qPCR yaklaşımı ile miRNA tespiti ve ekspresyon ölçülmesi mümkün hale gelmiştir. Bu yaklaşım ile yapılan dizayn hsa-miR-145-5p ve hsa-miR-146a-5p miRNA hedef dizileri için denenmiş ve en az optimizasyon ihtiyacı ile hassas sonuçlar alınabildiği görülmüştür. Bu sayede yüksek maliyetli miRNA tespit ve ölçümü yapan ticari kitlelere olan bağımlılık azaltılabilecektir.

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

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti - S.S., İ.K., E.Y.; Literatür Tarama - S.S., İ.K.; Deneysel Analiz - S.S., İ.K., E.Y.; Veri Analizi/Yorumlama - S.S., İ.K., E.Y.; Yazım - S.S., İ.K., E.Y.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi - S.S., İ.K., E.Y.; Son Onay ve Sorumluluk - S.S., İ.K., E.Y.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını bildirmişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje no: 20200906).

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

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study - S.S., İ.K., E.Y.; Literature Reading - S.S., İ.K.; Experimental Analysis - S.S., İ.K., E.Y.; Data Analysis/Interpretation - S.S., İ.K., E.Y.; Drafting - S.S., İ.K., E.Y.; Critical Revision of Manuscript - S.S., İ.K., E.Y.; Final Approval and Accountability - S.S., İ.K., E.Y.

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

Financial Disclosure: This study was supported by Bezmialem Vakıf University Scientific Research Projects (Project no: 20200906).

KAYNAKLAR/REFERENCES

- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993; 75(5): 843-54. [CrossRef]
- Vishnoi A, Rani S. MiRNA Biogenesis and Regulation of Diseases: An Overview. *Methods Mol Biol*. 2017; 1509: 1-10. [CrossRef]
- Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014; 15(8): 509-24. [CrossRef]
- Michlewski G, Caceres JF. Post-transcriptional control of miRNA biogenesis. *RNA*. 2019; 25(1): 1-16. [CrossRef]
- Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res*. 2019; 47(D1): D155-D62. [CrossRef]
- Alles J, Fehlmann T, Fischer U, Backes C, Galata V, Minet M, et al. An estimate of the total number of true human miRNAs. *Nucleic Acids Res*. 2019; 47(7): 3353-64. [CrossRef]
- Hydbring P, Badalian-Very G. Clinical applications of microRNAs. *F1000Res*. 2013; 2: 136. [CrossRef]
- Yan J, Zhang N, Qi C, Liu X, Shangguan D. One-step real time RT-PCR for detection of microRNAs. *Talanta*. 2013; 110: 190-5. [CrossRef]
- Androvic P, Valihrach L, Elling J, Sjoback R, Kubista M. Two-tailed RT-qPCR: a novel method for highly accurate miRNA quantification. *Nucleic Acids Res*. 2017; 45(15): e144. [CrossRef]
- Tian T, Wang J, Zhou X. A review: microRNA detection methods. *Org Biomol Chem*. 2015; 13(8): 2226-38. [CrossRef]
- Xie S, Zhu Q, Qu W, Xu Z, Liu X, Li X, et al. sRNAprimerDB: comprehensive primer design and search web service for small non-coding RNAs. *Bioinformatics*. 2019; 35(9): 1566-72. [CrossRef]
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005; 435(7043): 834-8. [CrossRef]
- Huang Z, Shi J, Gao Y, Cui C, Zhang S, Li J, et al. HMDD v3.0: a database for experimentally supported human microRNA-disease associations. *Nucleic Acids Res*. 2019; 47(D1): D1013-D7. [CrossRef]
- Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2005; 33(20): e179. [CrossRef]
- Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, Ghaffari SH. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol*. 2019; 234(5): 5451-65. [CrossRef]
- Robinson S, Follo M, Haenel D, Mauler M, Stallmann D, Tewari M, et al. Droplet digital PCR as a novel detection method for quantifying microRNAs in acute myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2018; 257: 247-54. [CrossRef]
- Li J, Yao B, Huang H, Wang Z, Sun C, Fan Y, et al. Real-time polymerase chain reaction microRNA detection based on enzymatic stem-loop probes ligation. *Anal Chem*. 2009; 81(13): 5446-51. [CrossRef]
- Jin J, Vaud S, Zhelkovsky AM, Posfai J, McReynolds LA. Sensitive and specific miRNA detection method using SplintR Ligase. *Nucleic Acids Res*. 2016; 44(13): e116. [CrossRef]
- Mei Q, Li X, Meng Y, Wu Z, Guo M, Zhao Y, et al. A facile and specific assay for quantifying microRNA by an optimized RT-qPCR approach. *PLoS One*. 2012; 7(10): e46890. [CrossRef]
- Benes V, Collier P, Kordes C, Stolte J, Rausch T, Muckentaler MU, et al. Identification of cytokine-induced modulation of microRNA expression and secretion as measured by a novel microRNA specific qPCR assay. *Sci Rep*. 2015; 5: 11590. [CrossRef]
- Munafò DB, Robb GB. Optimization of enzymatic reaction conditions for generating representative pools of cDNA from small RNA. *RNA*. 2010; 16(12): 2537-52. [CrossRef]

22. Raymond CK, Roberts BS, Garrett-Engle P, Lim LP, Johnson JM. Simple, quantitative primer-extension PCR assay for direct monitoring of microRNAs and short-interfering RNAs. *RNA*. 2005; 11(11): 1737-44. [\[CrossRef\]](#)
23. Sharbati-Tehrani S, Kutz-Lohroff B, Bergbauer R, Scholven J, Einspanier R. miR-Q: a novel quantitative RT-PCR approach for the expression profiling of small RNA molecules such as miRNAs in a complex sample. *BMC Mol Biol*. 2008; 9:34. [\[CrossRef\]](#)
24. Benes V, Castoldi M. Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods*. 2010; 50(4): 244-9. [\[CrossRef\]](#)
25. Rai P, Kumar BK, Deekshit VK, Karunasagar I, Karunasagar I. Detection technologies and recent developments in the diagnosis of COVID-19 infection. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2021; 105(2): 441-55. [\[CrossRef\]](#)
26. Wang J, Cai K, Zhang R, He X, Shen X, Liu J, et al. Novel One-Step Single-Tube Nested Quantitative Real-Time PCR Assay for Highly Sensitive Detection of SARS-CoV-2. *Anal Chem*. 2020; 92(13): 9399-404. [\[CrossRef\]](#)

Yüksek ET-1 İfadesinin Meme Bezi Fizyolojisi Üzerine Etkileri

Effects of Overexpression of ET-1 in Mammary Gland Physiology

Nadir Gül¹ , Franz Theuring² 

¹Humboldt Berlin Üniversitesi, Matematik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Berlin, Almanya

²Charite Tıp Fakültesi Berlin, Farmakoloji Enstitüsü, Berlin, Almanya

ORCID ID: N.G. 0000-0003-1259-4910; F.T. 0000-0003-1736-0312

Cite this article as: Gul B, Theuring F. Yüksek ET-1 ifadesinin meme bezi fizyolojisi üzerine etkileri. Experimed 2021; 11(2): 120-9.

ÖZ

Amaç: Endotelin (ET-1), kardiyovasküler sistemde güçlü bir vazokonstriktör rolü olmasının yanı sıra birçok fizyolojik olayda kendini göstermektedir. ET-1 ekspresyonunun özellikle gebelik ve emzirme döneminde ortaya çıkması nedeniyle hem emzirme hem de yeni doğan için önemli bir işlevi olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada ET-1 transgenik fare modeli kullanarak meme bezi üstünde ET-1'in etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Gerçek ve Yöntem: Meme dokusunun farklı fizyolojik durumlarında (ergenlik, gebelik, laktasyon ve involusyon) ET-1 in etkisini incelemek üzere karşılaştırmalı bir çalışma gerçekleştirildi. Meme dokularından paralel kesitler hazırlanıp hematoksilin-eozin (HE) boyama ile mikroskopik inceleme yapıldı. Meme bezi gelişimi ve metabolizmasında önemli görevleri olan sinyal proteinlerinin (STAT5, AKT, STAT3) analizlerinde Western blot tekniği kullanıldı. Metabolik faaliyetlerde anahtar rolü olduğu bilinen genler (WAP, beta kazein, GLUT-1, SRBF-1 Claudin 8, IL-6, LIF) gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) tekniği ile analiz edildi.

Bulgular: ET-1 transgenik farelerde sırasıyla sekresyonel hasar, laktasyonel yetmezlik ve erken involusyon gibi patolojik bulgular tespit edildi. Transgenik grupta STAT5'in aktivasyonunun bu durumdan etkilenmediği ancak AKT protein seviyesinde düşüş olduğu saptandı. İnvolyasyonda görülen STAT3 aktivasyonu transgenik farelerde laktasyonun 3. gününde tespit edildi. Ayrıca, RT-PCR analizleri ile transgenik farelerde yüksek ET-1 ifadesine bağlı olarak WAP'ın baskılandığını LIF protein ifadesinin belirgin bir şekilde arttığı tespit edildi.

Sonuç: Sadece gebelik ve laktasyon döneminde ifade edilen ET-1'in laktasyon ve yeni doğan için önemli bir işlevi olduğu düşünülmektedir. Yüksek ET-1 ifadesi meme fizyolojisinde önemli olduğu bilinen genlerin sentezini doğrudan etkileyerek laktasyonel yetersizliğe sebep olmuştur. Bu çalışmada ET-1 regülasyonunun meme bezi gelişiminde ve süt sekresyonu fonksiyonunda kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Endotelin, laktasyonel yetersizlik, WAP, LIF, erken involusyon, transgenik fare

ABSTRACT

Objective: Alongside its role as a potent vasoconstrictor in the cardiovascular system, endothelin-1 (ET-1) is involved in numerous physiological processes. Its expression is thought to be an important function for both breastfeeding and newborns since it occurs especially during pregnancy and lactation. In this study, we projected the effects of ET-1 on mammary gland physiology employing ET-1 transgenic mice.

Material and Method: In this study, we compared the mammary glands of ET-1 transgenic mice with the control mice in different physiological states (adolescence, pregnant, lactation and involution). Parallel sections were prepared from mammary glands and microscopic examinations were performed with hematoxylin and eosin (HE)-staining. Western blot techniques were used in the analysis of signal proteins that have important functions in mammary gland development and the metabolism (STAT5, AKT, STAT3). Genes known to play a key function in metabolic activities (WAP, beta casein, GLUT-1, SRBF-1 Claudin 8, IL-6, LIF) were analyzed employing real-time PCR techniques.

Results: It was determined that ET-1 transgenic mice developed pathological conditions such as secretory damage, lactational failure and early involution, respectively. Our Western blot studies showed that STAT5 activation was not affected by this process in the transgenic group, but a decrease in AKT protein level was detected. We detected STAT3 activation seen in the involution process in transgenic mice only on the 3rd day of lactation. In addition, we found that WAP was suppressed due to high ET-1 expression and that LIF protein expression increased significantly, by real-time PCR analysis.

Conclusion: ET-1 expression is thought to be an important function for both lactation and newborns, especially during pregnancy and lactation. In this study, it was found that when ET-1 expression increases, it causes lactation failure in the mammary gland and directly affects the synthesis of genes known to be important in mammary physiology. Hereby, it was determined that the regulation of ET-1 plays a critical role in the development and secretory function of the mammary gland.

Keywords: Endothelin, lactational incompetence, WAP, LIF, precocious involution, transgenic mice

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Nadir Gül **E-posta:** nadir.gul@gmail.com

Başvuru/Submitted: 20.01.2021 **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 17.02.2021

Son Revizyon/Last Revision Received: 22.02.2021 **Kabul/Accepted:** 01.03.2021



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

GİRİŞ

Meme bezi, süt salgılama yeteneği kazanmış özel bir organdır. Gelişimi ve fonksiyonel özelliğini kazanması oldukça karmaşık bir sistematik farklılaşma ve hormonal düzenlemeler sayesinde olur. Meme bezi, epitel parankimi ve onu çevreleyen yağ stroması olarak iki yapısal komponentten oluşur. Parankim süt salgılanmasını sağlayan dallanmış salgı bezleri ve alveoler yapılar-dan meydana gelirken, stroma parankimin işlevini sağlayacak substrat ihtiyacını ve büyüyüp genişleyebileceği ortamı sağlar. Bu bağlamda meme bezlerinin yapısal ve fonksiyonel gelişimi altı kategoriye ayrılabilir: embriyonik, doğum sonrası, ergenlik, gebelik, laktasyon ve involusyon.

Gebelik ile birlikte östrojen ve progesteron hormonları epitel parankiminin gelişimini başlatır. Bu iki steroid hormonunun yanı sıra duktal gelişim ve alveogenezle ilgili olarak bir çok büyüme faktörü de rol almaktadır. Meme bezi doğum sonrası emzirmeye bağlı olarak sürekli süt üretimi ve sekresyonunu sağlayan bir fabrikaya dönüşür. Bu süreçte prolaktin sinyal kaskadı anahtar rol oynar. Yüksek seviyede salgılanan prolaktin hormonunun etkisiyle sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 5 (signal transducer and activator of transcription 5, STAT5) faktörünün etkinliği maksimum seviye ulaşır ve peynir altı suyu asidik proteini (whey acidic protein, WAP) beta kazein gibi farklı süt proteinlerinin sentezlenmesi sağlanır (1,2). Prolaktin ayrıca sterol düzenleyici eleman bağlayıcı protein 1 (sterol regulatory element binding factor 1, SREBF-1)'i aktive ederek çok sayıda lipid metabolizması genlerinin sentezlenmesini sağlar (3). Hem gebelik hem de laktasyon dönemlerinde protein kinaz B olarak da bilinen AKT sentezi ve aktivasyonu hücre yaşama ve anti-apoptotik sinyal yollarında etki gösterir (4).

Involusyon, emzirmenin bitmesi veya süttten kesilme ile başlayan bir süreçtir. Emzirmenin kesilmesi ile uyarılan lobuloalveoler yapı küçülmeye başlar. Bu durumla birlikte laktojenik hormonlar hızla azalır yerini lösemi inhibitör faktörü (leukemia inhibitor factor, LIF) ve interlökin (IL)-6 gibi apoptoz aktivatörü sitokinlerin artışına bırakarak bu süreçte anahtar rolü üstlenen STAT3 proteininin aktivasyonuna neden olurlar. STAT3 kaskadı meme bezinde apoptoz ve involusyon için elzemdir (5-7). Involusyon ile meme bezi süt salgılama kabiliyetini kaybederek yapısal ve fizyolojik olarak gebelik öncesi duruma döner.

Endotelin-1 (ET-1) vasküler homeostazın korunmasının yanı sıra geniş fizyolojik etkilere sahip küçük bir vazoaaktif peptiddir (8). ET-1 sentezleyen hücrelerin depolama ve salgılama özellik-

leri olmamasından dolayı ET-1'in sentezi transkripsiyon seviyesinde kontrol edilir (9).

Kardiyovasküler bir molekül olarak bilinen ET-1 kardiyovasküler sistemle ilgisi olmayan çok sayıda fizyolojik süreçte de yer almaktadır. Özellikle sütte ET-1'in varlığı, pek çok peptid ve büyüme faktörü gibi, hem emziren anne hem de yeni doğanın fizyolojisinde önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir (10). Ayrıca meme bezi gelişiminde ve fizyolojisinde anahtar hormonlardan biri olan prolaktin hormonunun ET-1'in ifadesini güçlü bir şekilde indüklediği (11) tespit edilmiş ve ET-1'in gen ifadesinin özellikle gebelik sırasında başlayıp laktasyon dönemi boyunca devam ettiği önceki çalışmalarda belirtilmiştir (12). Bu bağlamda, ET-1'in meme bezi gelişimi üzerine etkisi ve olası fonksiyonel rollerini aydınlatmak üzere ET-1 transgenik fareler kullanılarak bu çalışma tasarlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hayvan Deneyleri

Bu çalışmada NMRI (Harlan-Winkelmann, Padernborn) kontrol grubu fareler ile Franz Theuring tarafından geliştirilen NMRI kökenli homozigot insan ET-1 transgenik fareler kullanılmıştır. Standart fare yemi ve içme suyu ile beslenen fareler 12 saat gün ve 12 saat gece döngüsüne sahip, sıcaklığın 20-22°C ve rutubetin %50-70 arasında tutulduğu, patojenden arıtılmış bir ortamda yetiştirilmiştir.

Meme dokuları, anterior abdominal duvar, kaslar ve deriden ayrıştırılarak toplanmıştır. Dokular hızlı bir şekilde soğuk yıkama tampon solüsyonu ile yıkanıp histoloji çalışmaları için formalin solüsyonu (Sigma) ile muamele edilip 4°C de saklandı. Moleküler biyoloji uygulamaları için işaretli tüplere alınan numuneler sıvı nitrojenle muamele edilip çalışmalar için -20°C de saklanmıştır.

Hayvan deneyleri iki grup altında gerçekleştirilmiştir. Ergenlik döneminden başlayarak sırasıyla gebelik, laktasyon ve involusyon dönemlerini kapsayan birinci grup farelerin meme dokularından elde edilen numuneler ile karşılaştırmalı gen ifade analizleri, göreceli protein fosforilasyon seviyeleri ve histolojik çalışmalar için doku preparatları hazırlanmıştır. Numuneler Tablo 1'de belirtilen 4 farklı fizyolojik durumda toplanmıştır.

İkinci grupta, laktasyon süresi boyunca 10 kontrol grubu farenin emzirdiği 70 yeni doğan ile 17 ET-1 transgenik farenin emzirdiği 119 yeni doğanın gelişimleri günlük ağırlık ölçümleri yapılarak takip edilmiştir. Ayrıca, laktasyon sırasında oluşan ağırlık farkının genetik bir farklılıktan kaynaklanıp kaynaklanmadığını

Tablo 1. Histolojik ve moleküler biyoloji uygulamalarının gerçekleştirildiği birinci grup farelerin dağılımları.

	Ergen		Gebe		Laktasyon		İnvolusyon
	8. hafta	10. gün	18. gün	3. gün	14. gün	14. gün	
Kontrol (WT)	6	6	7	6	10	7	
Transgen (ET-1)	6	6	7	6	10	7	

anlamak üzere çalışmayı takiben her iki gruptan olgunluğa erişmiş 20 adet dişi farenin ağırlıkları tekrar kontrol edilmiştir.

Bütün hayvan deneyleri Alman hayvan koruma kanunlarına (Tierschutzgesetz) uygun bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Histolojik Çalışmalar

Birinci grup farelerden elde edilen meme bezleri, oda sıcaklığında minimum 12 saat PBS (pH 7.4) içinde %4 (w/v) paraformaldehit ile fikse edildi. Fiksasyon işleminden sonra doku örnekleri parafin bloklara gömüldü ve 5 mm'lik kesitler alınmıştır. Gebe (n=26) ve laktasyon (n=32) dişilerden toplam 232 meme bezi örneği (her meme bezinden 2 slayt ve her bir fareden 4 meme bezi) analiz edilmiştir. Meme bezleri hematoksil-eozin (HE) ile boyanmıştır.

Gen İfade Analizleri

Meme bezi gelişiminde ve fonksiyonunda anahtar rol üstlenen bir grup genlerin göreceli ifadeleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemleri ile analiz edilmiştir. Bu genler, süt proteinleri olarak bilinen beta kazein ve WAP genlerinin yanı sıra süt salgılayan hücrelerin tight-junction'larında görev alan Claudin-8, süt salgılayan hücrelere glukoz transportunu üstlenen merkezi proteinlerden biri olan GLUT-1 geni, yine aynı şekilde süt salgılayan hücrelerde lipid metabolizmasını düzenleyen SRBF-1 genleridir. Ayrıca süt salgılama fonksiyonunun bittiği meme bezinde STAT3 aktivatörü ve involusyon belirteci olarak bilinen IL-6 ve LIF genleri de gen ifade analizlerinin kapsamında çalışılmıştır.

Toplam RNA, standart guanidinyum tiosiyanat-fenol-kloroform ekstraksiyonu (Trizol, Invitrogen) kullanılarak hızlı bir şekilde dondurulmuş dokulardan elde edilmiştir. cDNA sentezinden

önce, tüm ham RNA örnekleri rutin olarak DNase1 (TurboDNase, Ambion) ile muamele edilmiştir. cDNA, üreticinin protokolüne göre oligo (dT) 18 primerler ile (Promega) MMLV ters transkriptaz enzimi kullanılarak oluşturulmuştur.

Kantitatif analiz için Ensembl gen veri tabanı, Primer3 ve web tabanlı algoritmalar (NCBI Blast, çoklu hizalama) kullanılarak tasarlanmıştır (Tablo 2). Kantitatif PCR'larda, MX3700p RT-PCR sisteminde (Stratogen) SYBR Green mastermix (Applied Biosystems) kullanılarak her bir numune 3'lü set olarak çalışılmıştır.

Western Blot Çalışmaları

Meme bezlerinin gelişimini ve fonksiyonel değişimlerini koordine eden sinyal proteinlerinin aktivasyonlarını Western blot teknikleri kullanılarak tespit edilmiştir. Özellikle alveogenez ve süt sentezini koordine eden STAT5 proteininin yanı sıra hücre ölüm ve yaşam kaderini belirleyen AKT ve involusyon sürecini koordine eden STAT3 proteinlerinin göreceli fosforilasyon seviyeleri çalışılmıştır.

Birinci grup farelerden elde edilen dondurulmuş meme bezi örnekleri bir havan yardımı ile sıvı nitrojenle toz haline getirilmiştir. 100 mg doku örnekleri oda sıcaklığında 15 dakika süreyle 600 µl üre lizis tamponunda homojenize edilmiştir. Çözdürme işleminden sonra numuneler oda sıcaklığında 45 dakika süreyle 13000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Süpernatantlar yeni tüplere yerleştirilerek protein konsantrasyonu Bradford metodu ile (Biorad) ölçülmüştür. SDS PAGE'den önce numuneler, 4x yükleme tamponu (Roth) ile 95°C'de 5 dakika kaynatılarak denatüre edilmiş, örnekler elektroforezi takiben (25µg her bir örnek) Western blotlama tekniği ile nitroselüloz membran (Amersham) üzerine blotlanmıştır. TBS içinde bloke

Tablo 2. RT-PCR gen ifade analizlerinde kullanılan primerler.

Gen Adı	F- Primerler (5'-3')	R- Primerler (5'-3')
Beta- Kazein (fare)	CTCCAATAAGGACTTGACAGC	AGTGAACCTTAGCCTGGAGCAC
Claudin-8 (fare)	CGC TGG AGG AGC ACT GTT CTG TTG	CGG CGT GGA AAC TCC GTT GA
GAPDH (fare)	CTTCAACCACCATGGAGAAGGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
GLUT-1 (fare)	CCAGCTGGGAATCGTCGTT	CAAGTCTGCATTGCCCATGAT
HPRT (fare)	CATTATGCTGAGGATTTGGAAAGG	CTTGAGCACACAGAGGGCTACA
IL6 (fare)	TGTACTCCAGGTAGCTATGG	GTTCTCTGGGAAATCGTGGA
LIF (fare)	GGCAACCTCATGAACCATGATCA	GCAAAGCACATTGCTGAGGAGGC
PPET-1(fare)	CCCCACTCTTCTGACCCCTT	ACTCCTTGTCATCAAGGAAGAAC
PPET-1 (insan)	ATCAGAAGAAGTTCAGAGGAACAC	GAAGGTCTGTACCAATGTGCT
PPET-1 (fare/ insan)	CAAGGAGCTCCAGAAACAGC	GATGTCCAGGTGGCAGAAGTA
SRBF-1 (fare)	AGGCGGCTCTGGAACAGA	TGTCGTTCAAACCGCTGTG
WAP (fare)	TAGCAGCAGATTGAAAGCATTATG	CAACGCATGGTACCGGTGTCA

Tablo 3: Western Blot çalışmalarında kullanılan antikorlar.

Antikor	Orjin ve Dilüsyonlar	Moleküler ağırlık kDa	Referans
pAKT (tyr 334)	RPA 1/1000 Dilüsyon	60	Santa Cruz Biotech.
AKT	RPA 1/1000 Dilüsyon	60	Santa Cruz Biotech.
B-Actin	GPA 1/2000 Dilüsyon	43	Santa Cruz Biotech.
pSTAT3 (tyr 705)	RPA 1/1000 Dilüsyon	79/86	Cell signaling Tech.
STAT3	RPA 1/1000 Dilüsyon	79/86	Cell signaling Tech.
pSTAT5 (tyr 694)	RPA 1/1000 Dilüsyon	90	Cell signaling Tech.
STAT5	RPA 1/1000 Dilüsyon	90	Cell signaling Tech.
Antimouse Ig	Rabbit, HRP linked polyclonal antibody	--	Dakocytomation.
Antirabbit Ig	Goat, HRP linked polyclonal antibody	--	Dakocytomation.

*RPA = Rabbit Polyclonal Antibody, GPA= Goat Polyclonal Antibody, HRP: Horseradish peroxidase

edici çözelti ile %0,1 Tween 20 ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Membranlar, 4°C'de gece boyunca bloke edici çözelti içinde seyreltilmiş birincil antikor ile inkübe edilmiştir (Tablo 3). Spesifik sinyaller ikincil antikor uygulamasını takiben ECL (Amersham) solüsyonu vasıtasıyla saptanmıştır.

İstatistiksel Yöntemler

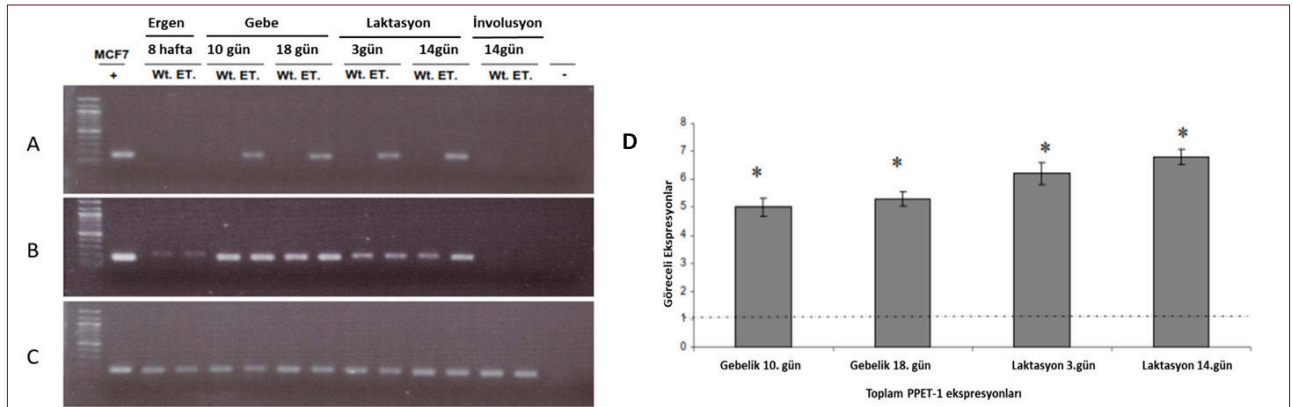
Hayvan deneyleri: Elde edilen sonuçlar Student's t-testi kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Göreceli gen ifade değerleri: Meme bezi cDNA'sının seri seyreltilmesiyle oluşturulan standart bir eğri vasıtasıyla GAPDH'ye karşı normalize edildi. İstatistiksel analizler için pair wise fixed reallocation randomizasyon testi (REST) (29) uygulanmıştır.

Western blot çalışmaları: Membran görüntüleri dijitalleştirildikten sonra özel bir yazılımla (AlphaEaseFC); dansitometrik veriler bir istatistiksel analiz programı (GraphPad Prism) ile analiz edilmiştir. Sonuçlar Student's t-test yöntemi kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR

RT-PCR gen ifade analizlerinde meme bezinde gebelik (10. ve 18. gün) ve laktasyon (3. ve 14. gün) dönemlerinde ET-1 transgen ifadesi (Şekil 1A) ve toplam prepro-endothelin-1 (PPET-1) (Şekil 1B) tespit edilmiştir. Ergen grubunda sadece fare ET-1 sentezlenirken involüsyon periyodunda ET-1 ifadesine rastlanmamıştır (Şekil 1). Göreceli ifade analizlerinde ise toplam PPET-1 transgenik farelerde gebelik periyodunda 5,

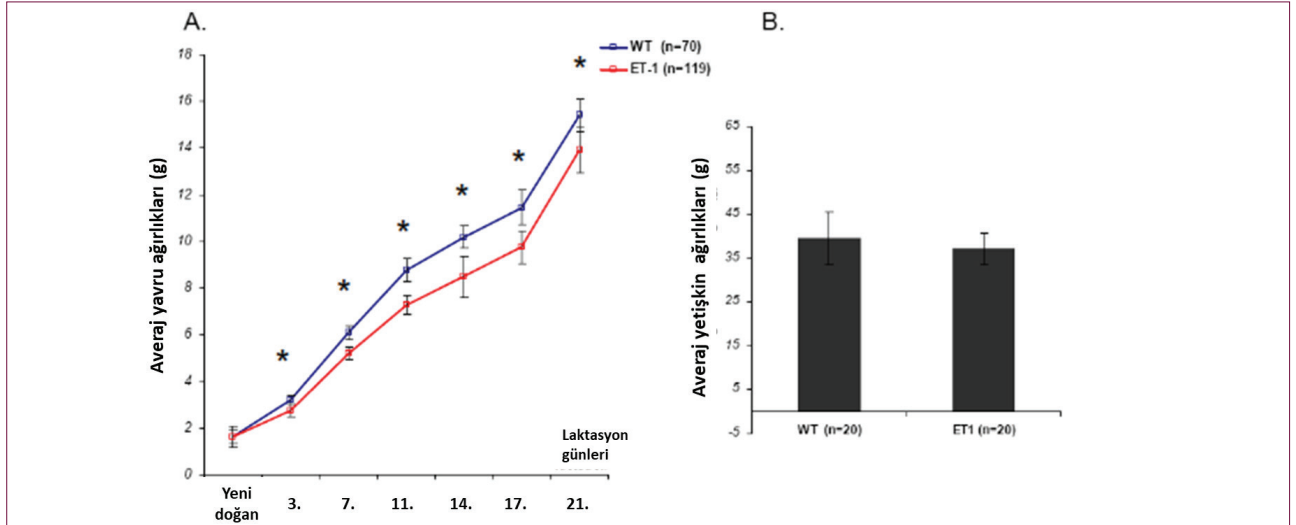


Şekil 1. ET-1'in meme bezinin dört farklı fizyolojik durumdaki ifadesi: Ergen (8. hafta), gebelik (10. ve 18. günler), laktasyon (3. ve 18. günler) ve involüsyon (14. gün) A: PPET-1 (insan) transgen gen ifadesi, B: PPET-1 (insan/fare) gen ifadesi, C: Hipoksantinguanin fosforibosiltransferaz (Hprt) (fare) kontrol gen ifadesi. Çalışmada MCF7 hücre hattı PPET-1 (insan) için pozitif kontrol ve negatif kontrol olarak ddH₂O kullanılmıştır. D: Transgenik farelerde göreceli toplam PPET-1 ifade seviyeleri. Kontrol grubu (Wt) PPET-1 ifade seviyeleri 1 olarak düzenlenmiştir (çizgili hat) ; *p<0,05 (REST) her bir grup için n=4.

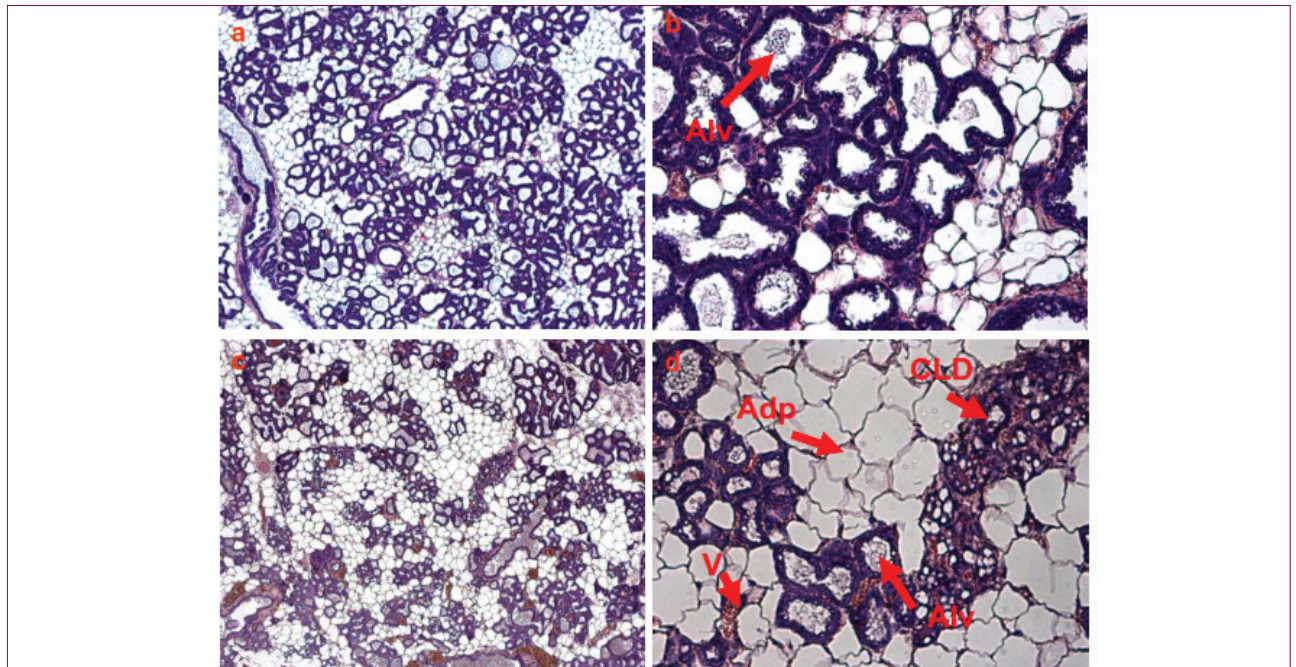
laktasyon periyodunda 6 kat daha fazla ifade edildiği tespit edilmiştir (Şekil 1D).

Normal bir gebelik süreci geçiren transgenik farelerin yeni doğanlarında mortalitenin dikkat çekecek şekilde yüksek olduğu gözlenmiştir. Emzirmenin daha ilk günlerinde ölü yeni doğan-

ların karınlarında süt tespit edilemediğinden, laktasyonel yeterliliği daha iyi tanımlayabilmek üzere laktasyon süresi boyunca yavrularda kilo artışı takip edilmiştir. Şekil 2A da görüldüğü gibi yeni doğanların ağırlıklarında bir fark yokken 3. günden itibaren transgenik grupta anlamlı bir şekilde düşük kilo kazanımı tespit edilmiştir. Laktasyon sonunda yavrular arasından seçilen



Şekil 2. A. Laktasyon periyodu süresince yeni doğandan başlayarak yavru farelerde kilo kazanımı. Kontrol grubu n=70; ET-1 transgen grubu n=119; *= $p < 0.05$ (Student's t-test). B. Yetişkin farelerde ortalama ağırlık (gruplar arasında bir fark bulunmamaktadır).



Şekil 3. Laktasyon 3. gün meme bezi histolojisi. Kontrol grubu a. (x50 büyütme) ve b. (x200 büyütme) ET-1 transgenik grup c. (x50 büyütme) ve d. (x200 büyütme). a ve b histogramlarında görüldüğü gibi doğum sonrası emzirmeye bağlı olarak adipositler (Adp) metabolize edilmiş, alveoli genişlemiş ve bütün dokuyu kaplamıştır. Alveoller (Alv) arasında ince bir tabaka olarak dikkati çeken kırmızı kan hücreleri kan damarlarını belirtmektedir (V). c ve d histogramlarında sitoplazmik lipid damlacıkları (CLD) ve zayıf alveoller genişleme görülmektedir.

her bir grup için 20 fare yetişkinliğe ulaştığında tekrar tartılmış ancak kontrol grubu ile transgenik grup arasında istatistiksel bir fark görülmemiştir.

Histolojik çalışmalarda ET-1 transgenik farelerde düşük seviyede duktal büyüme, tıkanmış alveoli ve düşük genişleme kapasitesi ile beraber artmış adiposit birikimi tespit edilmiştir. Ayrıca alveol içinde sıkışmış bir şekilde bulunan sitoplazmik lipid damlacıkları (CLDs) ET-1 transgenik farelerde sekresiyonel bir hasar olduğunu göstermektedir (Şekil 3).

Histolojik bulgulara ek olarak önemli süt proteinlerinden WAP gen ifadesinin hem gebelikte hem de laktasyon dönemlerinde baskılanmış olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca beta kazein gebelik sırasında normal seviyede ifade gösterirken laktasyon periyodunda ise ifadesi baskılanmıştır (Şekil 4).

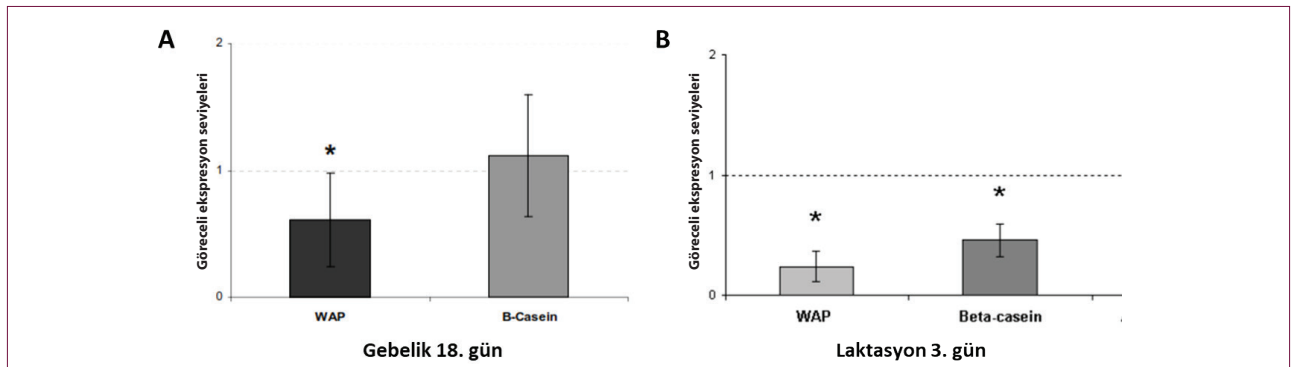
Süt üretimi ve salgılanması çeşitli ve karmaşık bir dizi gelişimsel ve fiziyojik taşıma ve salgılama süreçlerinden oluşmaktadır. Sıkı bağlantı (tight junction) proteinlerinin sentezinde veya regülasyonlarındaki bir hasar sekresiyon aktivitesine doğrudan etki eder (13). Ayrıca glukoz ve lipid transport süreçlerindeki herhangi bir olumsuz durum meme bezinde hızlı bir şekilde etkisini sekresiyonel hasar olarak gösterir. Bu süreçlerin substan-

siyal regülasyonları mRNA seviyesinde gerçekleşmektedir (14-17). Bu nedenle sekresiyon hasarını daha iyi karakterize etmek üzere Claudin-8, GLUT-1, SREBF-1 ifade seviyeleri laktasyon 3. günde çalışılmıştır. SREBF-1 ifadesinde ciddi bir artış gözlemlendiği için bu genin ifade seviyesi ayrıca gebelik 18. gün için de çalışılmıştır (Şekil 5B).

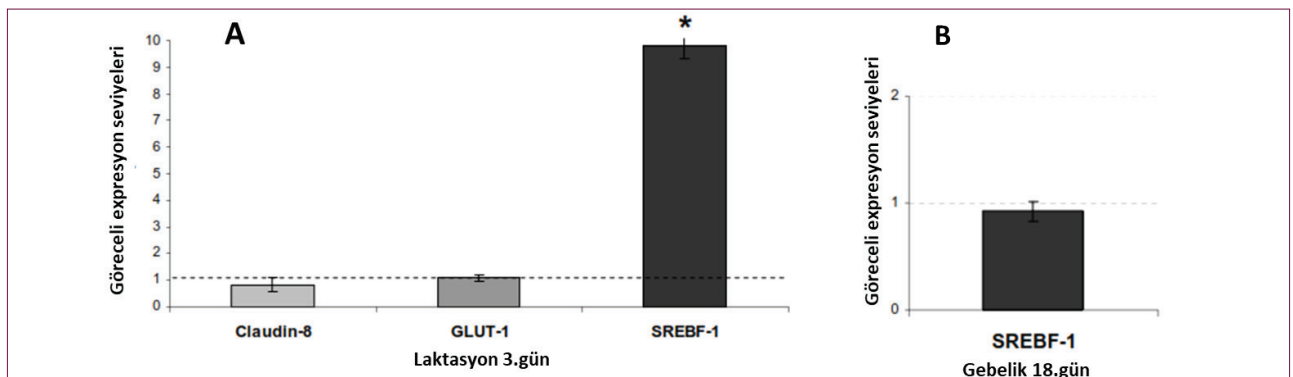
Gebelik ve laktasyon dönemlerinde fare meme epitel hücrelerinin terminal farklılaşmasında STAT5 aktivasyonu gerekmektedir (3). Prolaktinin aktive ettiği STAT5 alveolar gelişiminin yanı sıra WAP gen ifadesini de sağlar (13). Transgenik farelerde gelişen sekresiyonel hasarın ve baskılanmış WAP gen ifadelerinin moleküler mekanizmalarını daha iyi anlayabilmek için STAT5 aktivitesinin nispi fosforilasyon seviyeleri immüblot teknikler ve dansitometrik analizler ile incelenmiştir.

Gebeliğin 18. gününde ve laktasyonun 3. gününde STAT5 proteinin aktivasyonunda anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 6).

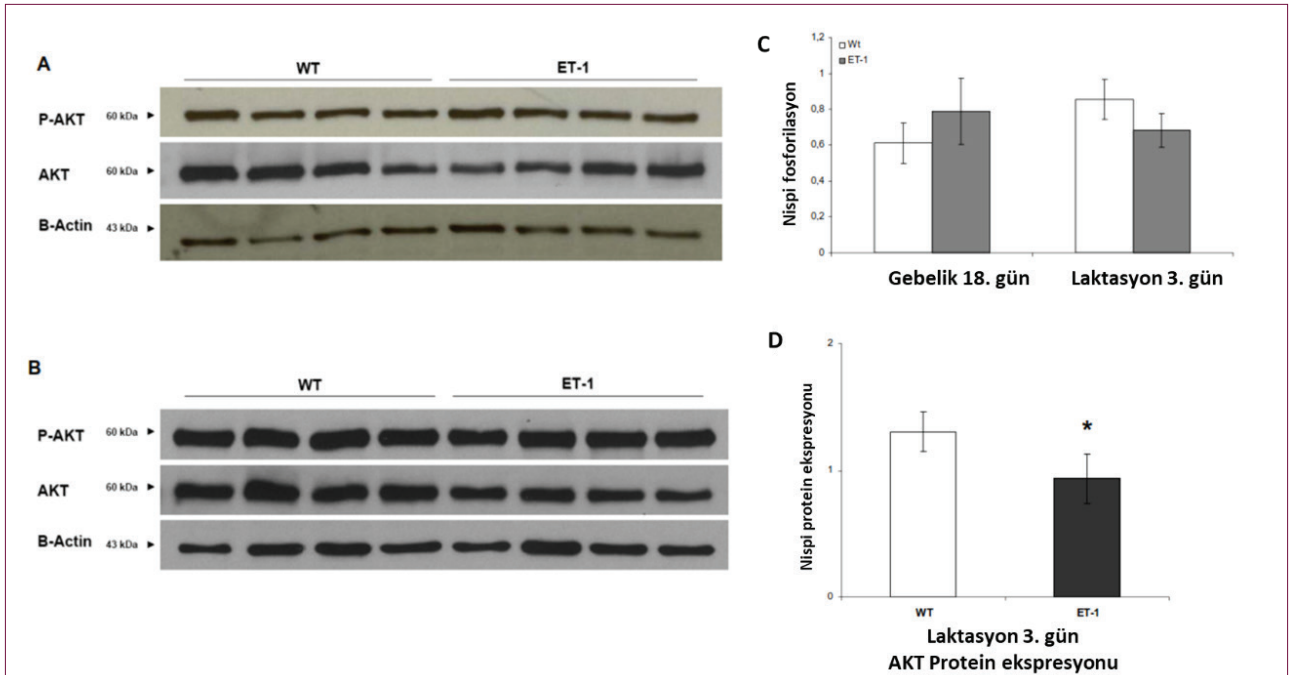
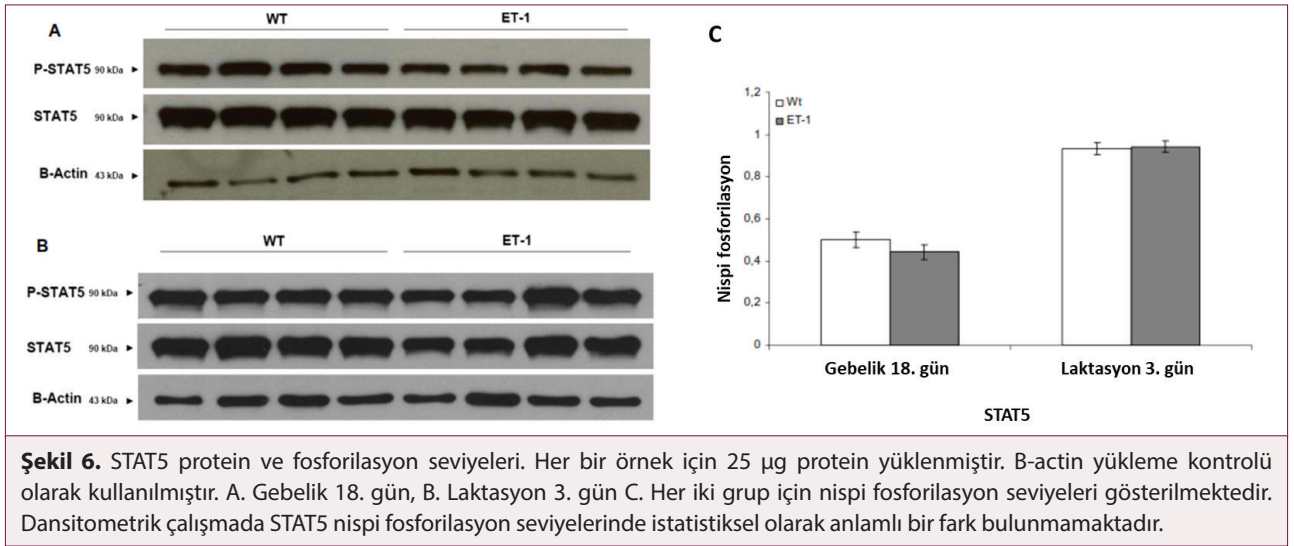
Gebelik sırasında meme bezindeki epitel hücrelerinin sekresiyon özelliği kazanması için gerekli fonksiyonel değişimde AKT anahtar bir rol almaktadır (14). AKT ayrıca laktasyon sırasında süt sentezini düzenlemektedir (18).



Şekil 4. Önemli süt proteinlerinin göreceli gen ifade analizleri. A. Gebelik, B. Laktasyon dönemi kontrol grubunun ifade seviyesi 1 olarak düzenlenmiştir (çizgili hat). * = p < 0,05 (REST). Her bir grup için n = 5.



Şekil 5. A. Laktasyon 3. günde Claudin-8, GLUT-1 ve SREBF-1 gen ifade seviyeleri. B. Gebelik 18. günde SREBF-1 ifade seviyeleri. Kontrol grubunun ifade seviyesi 1 olarak düzenlenmiştir (çizgili hat). * = p < 0,05 (REST). Her bir grup için n = 5.

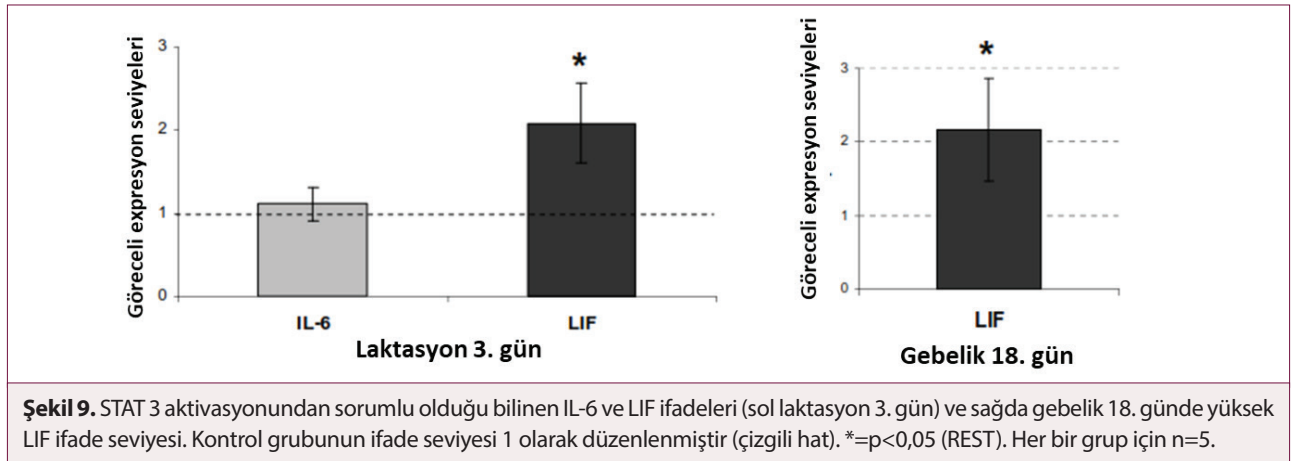
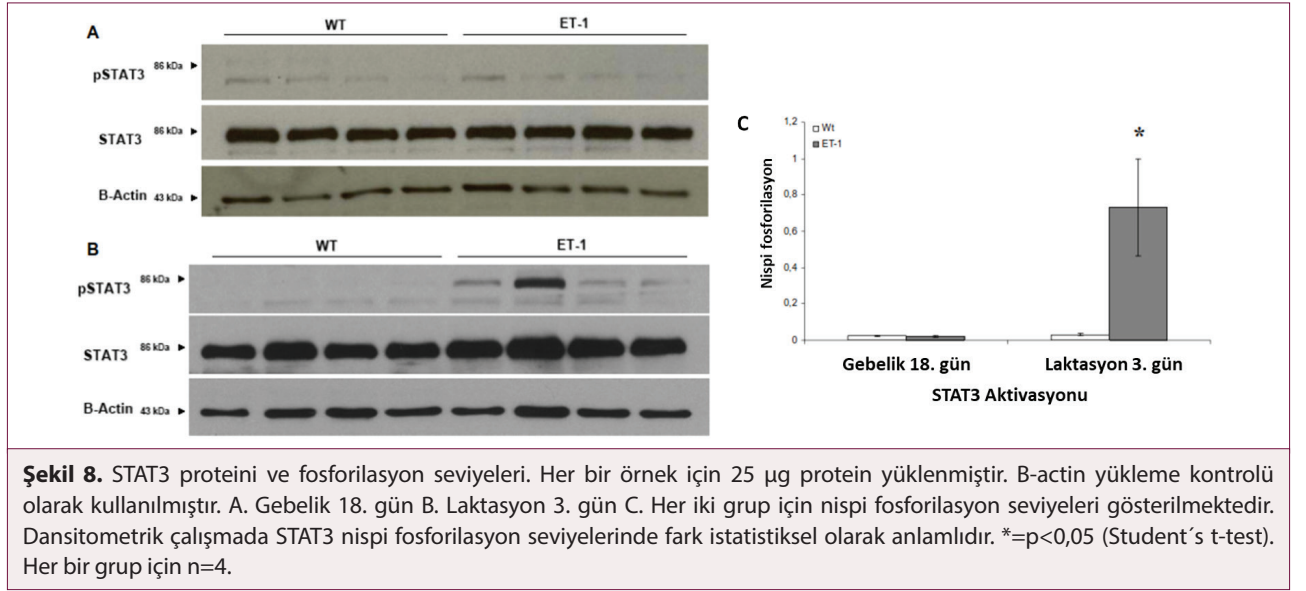


Bu fonksiyonel ve metabolik etkilere ek olarak, AKT, salgı epitel hücreleri için bir hayatta kalma faktörü görevi görür. Gen ifadesi involusyon ile hızlıca düşüş gösterir (19). Bu bağlamda sekresyon hasarı gelişen transgenik farelerde AKT aktivasyonu ve protein seviyeleri karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. (Şekil 7).

Her ne kadar nispi aktivasyon olarak AKT kontrol grubu ile bir fark göstermiyor olsa da AKT'nin bu anlamlı düşüşü sekresyo-

nel hasarın bir sonucu olarak erken bir involusyon sürecinin başladığını düşündürmüştür (7). Bu bağlamda involusyon başlangıcında anahtar rol oynayan STAT3 sinyal sistemini kontrol ederek hipotezimizin sağlanması yapılmıştır (Şekil 8).

ET-1 transgenik farelerde erken involusyonun bir kanıtı olarak STAT3 proteininin aktivasyonu tespit edilmiştir. Ancak bu aktivasyon sekresyon hasarından dolayı mı yoksa STAT3 proteinlerinin aktivasyonunda görev alan diğer başka involus-



yon belirteçlerinin ifade seviyelerindeki değişimden dolayı mı olduğunun belirlenmesi gerekmektedir. Birçok çalışmada IL-6 ve LIF sitokinlerinin STAT3'ü aktive ettiği gösterilmiştir (7,19,20,21). Bu sayede ET-1 yüksek ifadesi ile alakalı bir ipucu bulunabileceği öngörülerek IL-6 ve LIF sitokinlerinin karşılaştırmalı gen ifade analizleri önce laktasyonun 3. gününde test edilmiştir. LIF geninin normalden 2,5 kat daha fazla sentzlendiği tespit edilince, aynı çalışma gebeliğin 18. günü için tekrarlanmıştır. Her iki farklı fizyolojik durumda da ET-1 transgenik farelerde LIF geni normalin üstünde bir ifade göstermektedir (Şekil 9).

TARTIŞMA

ET-1 transgenik fareler laktasyonel yetmezlik olarak adlandırılan bir fenotip geliştirmiştir. Bu hasar fareler doğum yaptıktan hemen sonra ortaya çıkmıştır. Doğumu takiben birçok ölü yavru fare tespit edilmiş ve makroskopik olarak transgenik yavru-

rın karınlarında süt olmadığı gözlenmiştir. Bu durum laktasyonel hasarın ilk belirtisi olmuştur.

Bu çalışmada öncelikle endotelin sisteminin meme bezlerinde aktif olduğunun tespit edilmesi hedeflenmiştir. Şekil 1'de açıkça görüldüğü gibi endojen ET-1 ifadesi 8. hafta ergen farelerde gözlenirken transgen ET-1 ifadesi sadece gebelik ve laktasyon dönemlerinde ortaya çıkmıştır. Endojen ET-1 ile transgen ET-1 arasındaki bu fark genomik ET-1 klonunda bazı promotör bölgelerin eksik olduğu yönünde yorumlanabilir. İnvolyasyon periyodunda da herhangi bir ET-1 sentezi tespit edilemediğinden dolayı çalışmamız sadece gebelik ve laktasyon dönemleri ile sınırlandırılmıştır. Ayrıca RT-PCR analizleri bu iki fizyolojik dönemdeki transgenik fareler için toplam (fare ve insan) ET-1 ifadesinin kontrol grubu farelere göre yaklaşık 6 kat arttığını göstermektedir. Bu durum bize yüksek ET-1 ifadesinin meme bezi üzerine etkilerini analiz etmemize olanak veren bir model oluşturmuştur.

Transgenik farelerde laktasyonel yetmezlik olarak ortaya çıkan fenomeni teyit etmek üzere transgenik farelere kontrol grubu yavru fareler foster edilerek kontrol grubu ile eşit miktarda yavru fare emzirme imkânı sağlanmıştır. Şekil 2'de yeni doğandan laktasyon sonuna kadar yavru farelerin büyümeleri gözlemlenmiştir. Başlangıçta ağırlık farkı gözlenmemesine rağmen laktasyon sonuna kadar transgen farelerden beslenen yavrular istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha düşük büyüme göstermişlerdir. Ayrıca yetişkinliğe erişen farelerin ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmediğinden dolayı genotipsel farkın burada ayırt edici bir faktör olmadığı da gösterilmiştir.

Laktasyonel hasar normal şartlarda oluşmaz. Histolojik değişimler, metabolik veya sekresyon yollarındaki hasarlar sonucu veya belli genlerin değişen regülasyonları ile oluşur. Bu hasarlar süt proteinlerinin transport mekanizmalarının, tight junction fonksiyonlarının, lipid metabolizmasının veya ilgili genlerin aktivasyonu sonucu hücresel ölüm ile gerçekleşir.

Şekil 3'te de anlaşılacağı gibi transgenik farelerde sekresyon hasarı görülmektedir. Bu durum ilk sütte yer alan ve emzirme ile alveolar gelişmeye sebep olan CLD'lerin alveollerin içinde sıkışık kalması ile ortaya çıkmaktadır (22).

Sekresyonun başlaması ile süt proteinlerinin ifadesi de artar (14). Şekil 4'te yüksek ET-1 ifadesinin WAP süt proteini ifadesini hem gebelikte hem de laktasyon periyodunda kuvvetli bir şekilde baskıladığı tespit edilmiştir. Bu durumu teyit etmek için laktasyon veya gebelik fizyolojisini taklit edecek bir hücre kültürü bulunmamaktadır. Ancak WAP knockout fare modellerinde de laktasyonel hasar olduğu Tripplett ve arkadaşları tarafından belirtilmiştir (23). Öte yandan beta kazein ifadesi gebelikte normal bir seviyede laktasyonda düşüş göstermiştir. Bu düşüş sekresyonel hasara bağlı bir gelişme olarak yorumlanabilir. STAT5, WAP ve beta kazein ifadelerinde kritik bir role sahip olmasına rağmen (24) transgenik farelerde STAT5 aktivasyonunda herhangi bir değişime rastlanmamıştır (Şekil 6). Bu durum ET-1'in STAT5'ten bağımsız bir şekilde WAP ifadesine etki ettiğini gösterir. Ayrıca STAT5 aktivasyonuna rağmen beta kazeinin ifadesinin düşmesi bu iki protein için de STAT5 aktivasyonundan farklı bir mekanizma ile regüle olduğunu ortaya koymaktadır.

Laktasyon sırasında glukozun kandan alveoliye taşınması ve oradan laktoza dönüştürülüp süte aktarılması çok özel bir süreçtir. Bu süreçteki hasarlar sekresyon hasarı olarak ortaya çıkar. Bu bağlamda GLUT-1 en çok çalışılmış glukoz transport proteini (22). Benzer bir şekilde Claudin-8 proteini tight junctionların kompozisyonlarının düzenlenmesinde ve gen regülasyonunda görev alır (25). Her iki protein için transgenik farelerde anlamlı bir fark bulunmamıştır. SREBF-1 yağ asitleri ve kolesterol biyosentezi için kritik bir regülatör proteindir (19,22). Şekil 5'de görüldüğü gibi SREBF-1 ifadesi laktasyonda 9 kat artış göstermiştir. Ancak aynı artış gebelikte görülmediği için bu artış yüksek ET-1 ifadesi ile ilişkilendirilememektedir. Öte yandan AKT aktivitesi özellikle SREBF-1 gen ifadesinin regülasyonunu sağlayarak lipid metabolizmasını kontrol eden önemli bir proteindir (19). AKT'nin özellikle gebelik ve laktasyon dönemlerinde regülasyonunun arttığı bilinmektedir (26). Şekil 7'de transgenik farelerde AKT aktivasyonu bakımından kontrol grubuna göre bir fark bulunmamaktadır. Bu bağlamda SERBF-1 in 9 kat artışının sebebi salgılanamayan CLD'lerden kaynaklanıyor olabilir. Ancak ilginç olarak AKT protein ifade seviyesi laktasyon periyodunda anlamlı bir düşüş sergilemektedir (Şekil 7D). Bu durum erken involusyonun bir habercisidir.

Involusyon daha önce de bahsettiğimiz gibi meme bezinin laktasyon periyodundan laktasyon olmayan periyoda geçişidir. Meme bezlerinde involusyon iki fazda gerçekleşir. İlk faz geri dönüşümlüdür ve lokal faktörlerin birikimi ile karakterize edilir (27).

Transgenik farelerde histolojik olarak fokal erken involusyon tespit edilmiştir. Pro-apoptotik faktörlerin ifadesi her ne kadar artış gösterse de süt emme devam ettiği için bu durum geri dönüşümlü olarak bir süre devam eder. Süt emmenin bitmesi ya da süt tıkanması ile hızlı bir şekilde involusyon sürecinin ikinci ve geri dönüşümü olmayan fazına geçilir. Bu süreci meme bezinde kontrol eden başlıca protein STAT3'tür. Şekil 8'de transgenik farelerde STAT3 aktivasyonu laktasyon sırasında tespit edilmiştir. Bu transgenik farelerin erken involusyona geçtiğini doğrulamaktadır.

STAT3'ün en temel aktivatörlerinden biri olarak bilinen LIF proteini ifadesinin gebelik ve laktasyon döneminde nerdeyse tespit edilemeyecek seviyelerde sentezlendiği bilinmektedir (28). ET-1 transgenik farelerde LIF proteini ifadesi gebelik ve laktasyon dönemlerinde anlamlı bir şekilde artış göstermektedir (Şekil 9). Öte yandan IL-6'nın ifadesinde herhangi bir değişim saptanmamıştır. Bu durum ET-1'in LIF ifadesi üzerinde etkisi olduğunu göstermektedir. Belki de bu nedenle fenotip olarak diğer transgenik modellere göre ET-1 transgenik model daha ağır bir laktasyonel hasar göstermektedir. Bu bulgu ET-1 ile LIF arasındaki etkileşimin *in vitro* analizlerinin yapılmasının ve bu moleküler mekanizma hakkında daha ayrıntılı çalışma yapılmasının önünü açmaktadır.

Etik Komite Onayı: Bütün hayvan deneyleri Charite Tıp Fakültesi Berlin'de gerekli izinler alınarak Alman hayvan koruma kanunlarına (Tierschutzgesetz) uygun bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti - N.G., F.T.; Veri Toplama - N.G.; Veri Analizi/Yorumlama - N.G., F.T.; Yazma - N.G., F.T.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

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

Ethics Committee Approval: All animal experiments were carried out in accordance with German animal protection laws (Tierschutzgesetz), with the necessary permissions from Charite Universitätsmedizin Berlin.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - N.G., F.T.; Data Collection - N.G.; Analysis and/or Interpretation - N.G., F.T.; Writing - N.G., F.T.

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

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

KAYNAKLAR/REFERENCES

- Muldoon TG. Prolactin mediation of estrogen-induced changes in mammary tissue estrogen and progesterone receptors. *Endocrinology* 1987; 121: 141-9. [CrossRef]
- Robinson GW, Johnson PF, Hennighausen L, Sterneck E. The C/EBPbeta transcription factor regulates epithelial cell proliferation and differentiation in the mammary gland. *Genes Dev* 1998; 12: 1907-16. [CrossRef]
- Naylor MJ, Oakes SR, Gardiner-Garden M, Harris J, Blazek H, Ho TWC, et al. Transcriptional changes underlying the secretory activation phase of mammary gland development. *Mol Endocrinol* 2005; 19: 1868-83. [CrossRef]
- Yang ZZ, Tschopp O, Baudry A, Dümmler B, Hynx D, Hemmings BA. "Physiological functions of protein kinase B/Akt". *Biochem Soc Trans* 2004; 32(Pt 2): 350-4. [CrossRef]
- Green KA & Streuli CH. Apoptosis regulation in the mammary gland. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61(15): 1867-83. [CrossRef]
- Watson CJ. Involution: apoptosis and tissue remodelling that convert the mammary gland from milk factory to a quiescent organ. *Breast Cancer Res* 2006; 8(2): 203. Epub 2006 Apr 10. [CrossRef]
- Kritikou EA, Sharkey A, Abell K, Came PJ, Anderson E, Clarkson RW, et al. A dual, non-redundant, role for LIF as a regulator of development and STAT3-mediated cell death in mammary gland. *Development* 2003; 130(15): 3459-68. [CrossRef]
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y., et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332(6163): 411-5. [CrossRef]
- Itoh Y, Kimura C, Onda H, Fujino M. Canine endothelin-2: cDNA sequence for the mature peptide. *Nucleic Acids Res* 1989; 17(13): 5389. [CrossRef]
- Lam HC, Takahashi K, Ghatei MA, Bloom SR. Presence of immunoreactive endothelin in human milk. *FEBS Lett* 1990; 261(1): 184-6. [CrossRef]
- Baley PA, Resink TJ, Eppenberger U, Hahn AW. Endothelin messenger RNA and receptors are differentially expressed in cultured human breast epithelial and stromal cells. *J Clin Invest* 1990; 85(4): 1320-3. [CrossRef]
- Kozakai T, Sakate M, Masuo Y, Uchida T, Saida K. Increased gene expression of endothelin-1 and vasoactive intestinal contractor/endothelin-2 in the mammary gland of lactating mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 297(5): 1339-43. [CrossRef]
- Neville MC. Introduction: alpha-lactalbumin, a multifunctional protein that specifies lactose synthesis in the Golgi. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2009; 14(3): 211-2. [CrossRef]
- Rudolph MC, McManaman JL, Phang T, Russell T, Kominsky DJ, Serkova NJ, et al. Metabolic regulation in the lactating mammary gland: a lipid synthesizing machine. *Physiol Genomics* 2007; 28(3): 323-36. [CrossRef]
- Blackman B, Russell T, Nordeen SK, Medina D, Neville MC. Claudin 7 expression and localization in the normal murine mammary gland and murine mammary tumors. *Breast Cancer Res* 2005; 7(2): R248-55. [CrossRef]
- Seagroves TN, Hadsell D, McManaman J, Palmer C, Liao D, McNulty W, et al. HIF1 alpha is a critical regulator of secretory differentiation and activation, but not vascular expansion, in the mouse mammary gland. *Development* 2003; 130(8): 1713-24. [CrossRef]
- Camps M, Vilaro S, Testar X, Palacín M, Zorzano A. High and polarized expression of GLUT1 glucose transporters in epithelial cells from mammary gland: acute down-regulation of GLUT1 carriers by weaning. *Endocrinology* 1994; 134(2): 924-34. [CrossRef]
- Maroulakou IG, Oemler W, Naber SP, Klebba I, Kuperwasser C, Tschlis PN. Distinct roles of the three Akt isoforms in lactogenic differentiation and involution. *J Cell Physiol* 2008; 217(2): 468-77. [CrossRef]
- Schwertfeger KL, Richert MM, Anderson SM. Mammary gland involution is delayed by activated Akt in transgenic mice. *Mol Endo* 2001; 15: 867-81. [CrossRef]
- Clarkson RW, Wayland MT, Lee J, Freeman T, Watson CJ. Gene expression profiling of mammary gland development reveals putative roles for death receptors and immune mediators in postlactational regression. *Breast Cancer Res* 2004; 6(2): 92-109. [CrossRef]
- Akira S, Nishio Y, Inoue M, Wang XJ, Wei S, Matsusaka T, et al. Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated Signaling pathway. *Cell* 1994; 77(1): 63-71. [CrossRef]
- Anderson SM, Rudolph MC, McManaman JL, Neville MC. Secretory activation in the mammary gland: its not just about milk protein synthesis. *Breast cancer research* 2007; 9: 204. [CrossRef]
- Triplett AA, Sakamoto K, Matulka LA, Shen L, Smith GH, Wagner KU. Expression of the whey acidic protein (WAP) is necessary for adequate nourishment of the offspring but not functional differentiation of mammary epithelial cells. *Genesis* 2005; 43(1): 1-11. [CrossRef]
- Ivanilovitch E, Groner B, Barash I. Overexpression and forced activation of stat5 in mammary gland of transgenic mice promotes cellular proliferation, enhances differentiation, and delays postlactational apoptosis. *Mol Cancer Res* 2002; 1(1): 32-47.
- Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, et al. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 2002; 156(6): 1099-111. [CrossRef]
- Creamer BA, Sakamoto K, Schmidt JW, Triplett AA, Moriggl R, Wagner KU. Stat5 promotes survival of mammary epithelial cells through transcriptional activation of a distinct promoter in Akt1. *Mol Cell Biol* 2010; 30(12): 2957-70. [CrossRef]
- Lund LR, Bjorn SF, Sternlicht MD, Nielsen BS, Solberg H, Usher PA, et al. Lactational competence and involution of the mouse mammary gland require plasminogen. *Development* 2000; 127: 4481-92.
- Zhao L, Hart S, Cheng J, Melenhorst JJ, Bierie B, Ernst M, et al. Mammary gland remodeling depends on gp130 signaling through Stat3 and MAPK. *J Biol Chem* 2004; 279(42): 44093-100. [CrossRef]
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002; 30(9): e36. [CrossRef]

Endokrin Bozucu Kimyasallar ve Tekstil Alanında Kullanımları

Endocrine Disrupting Chemicals and Their Use in Textile Industry

Levent Tutanc¹ , Derya Cansız² , Ebru Emekli-Alturfan³ , A. Ata Alturfan² 

¹Istanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Adli Bilimler Enstitüsü, Fen Bilimleri Bölümü, İstanbul, Türkiye

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

³Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Biyokimya Bölümü, İstanbul, Türkiye

ORCID ID: L.T. 0000-0001-8641-4252; D.C. 0000-0002-6274-801X; E.E.A. 0000-0003-0528-9002; A.A.A. 0000-0003-2419-8587

Cite this article as: Tutanc L, Cansız D, Emekli-Alturfan E, Alturfan A. Endokrin bozucu kimyasallar ve tekstil alanında kullanımları. Experimed 2021; 11(2): 130-9.

ÖZ

Son yıllarda endokrin bozucu kimyasallar (EBK) olarak adlandırılan ve insan yapımı olan bileşikler bilim dünyasında dikkatleri üzerine çekmektedir. Bu kimyasallar endokrin sistemin gelişimini ve fonksiyonunu değiştirebilmekte, hormonların bağlanma, taşınma, üretim ve vücuttan uzaklaştırılmaları üzerine etki etmektedir. Şu ana kadar yapılan bilimsel çalışmaların çoğu EBK'ların kanserojen etkilerine, balıkların ve memelilerin üreme sistemlerine olan etkilerine odaklanmıştır. Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı'na (EPA) göre hormon taklit edebilme özelliği olan EBK'lar, homeostazın devamından ve gelişim ile ilgili süreçlerin regülasyonundan sorumlu olan hormonların üretimine, salgılanmasına, taşınmasına, bağlanmasına, metabolizmasına ya da eliminasyonuna müdahale edebilen dışsal ajanlar olarak tanımlanmaktadır. Dolayısıyla bu eksojen kimyasallardan en fazla endokrin sistem etkilenmektedir. Endokrin bozucular, hücrenin yağ dokusunda depolanabilirler. Bu sebeple EBK'ların çevre ve toplum sağlığı üzerindeki etkilerini minimuma indirmek adına sıkı önlemlerin alınması gerekmektedir. İnsanlar ve hayvanlar EBK'lara günlük hayatta pek çok yol ile maruz kalabilmektedir. İnsanların maruz kaldığı yollardan biri de tekstil ürünlerinde bulunan EBK'lardır.

EBK'ların sağlık üzerindeki olumsuz etkileri literatürdeki birçok çalışmada gözler önüne serilmiştir. Bilim ve teknolojinin bu kadar hızlı ilerlediği bir çağda bugüne kadar varlığı tespit edilen ve henüz tespit edilmemiş olan bu kimyasallarla kontamine olmamak imkansız gibi görünmektedir.

Bu derlemede en yaygın EBK'lardan bisfenol A ve ftalatların etkileri hakkında bilgi verildikten sonra tekstil ürünlerinde belirlenen bisfenol A ve ftalatlardan bahsedilecektir.

Anahtar Kelimeler: Endokrin bozucu kimyasallar, bisfenol A, ftalat, tekstil sanayi

ABSTRACT

In recent years, man-made compounds referred to as endocrine disrupting chemicals (EDC) have attracted the attention of the scientific world. These chemicals can change the development and function of the endocrine system, and affect the binding, transport, production, and removal of hormones from the body. Most of the studies conducted so far have focused on the carcinogenic effects of EDCs and their effects on the reproductive system of fish and mammals. According to the US Environmental Protection Agency (EPA), EDCs with the ability to mimic hormones are defined as exogenous agents that can interfere with the production, secretion, transport, binding, metabolism, or elimination of hormones in the body responsible for the maintenance of homeostasis and regulation of developmental processes. Therefore, the endocrine system is mostly affected by these exogenous chemicals. Endocrine disruptors can be stored in adipose tissues. For this reason, it is essential to make strict rules to minimize the effects of EDCs on the environment and public health. Humans and animals can be exposed to EDCs in many ways in daily life.

The negative effects of EDCs on health have been revealed in many studies in literature. In a global world where science and technology are advancing so rapidly, it seems nearly impossible not to be contaminated with these chemicals.

In this review, after giving information about the effects of bisphenol A and phthalates, the most common EDCs bisphenol A and phthalates used in textile products will be mentioned.

Keywords: Endocrine disrupting chemicals, bisphenol A, phthalates, textile industry

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: A. Ata Alturfan **E-mail:** ataalturfan@gmail.com

Başvuru/Submitted: 16.02.2021 **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 09.03.2021

Son Revizyon/Last Revision Received: 18.03.2021 **Kabul/Accepted:** 18.03.2021



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

Endokrin Bozucu Kimyasallar ve Sınıflandırılmaları

Endokrin bozucular hem doğal olarak bazı canlılar tarafından sentez edilebilirken hem de endüstriyel faaliyetler neticesinde sentetik olarak üretilebilirler. Doğal endokrin bozucuların sentetik olanlara göre yarı ömürleri çok daha kısa olmakta, kolaylıkla yıkılabilmekte, vücuttan hızlı bir şekilde atılabilmekte ve dokularda daha düşük konsantrasyonda birikebilmektedirler. Bu nedenle doğal endokrin bozucuların ciddi yan etkileri gözlenmemiştir (5). Bu kategoriye giren endokrin bozucular fitoöstrojenler olarak tanımlanır. Fitoöstrojenler doğal hormon yapısında olup, depolanma özellikleri yoktur. Doğal endokrin bozuculara örnek olarak kumestrol ve genistein verilebilir. Her iki fitoöstrojen özellikle üzüm, soğan, brokoli, kırmızı şarap, domates, elma ve soya fasülyesi gibi besinlerde bol miktarda bulunur (6,7).

Sentetik endokrin bozuculara ise örnek olarak fitalatlar, bisfenol A (BFA), poliklorlu bifeniller (PCB), dioksinler, vinklozolin, dietilstilbestrol, diklorodifeniltriokloroetan (DDT) gibi moleküller verilebilir. Bu sentetik kimyasallar, tarım ilaçları, temizlik ürünleri, boya, plastik ve çözücüler gibi endüstriyel kimyasalların içinde bulunmakla birlikte, yağda çözünme özelliklerinden dolayı canlılarda yağ dokusunda depolanabilmekte ve doğal endokrin bozuculara göre vücutta daha uzun süreli kalabilmektedirler. Bu nedenle organizmaya zarar verme potansiyelleri doğal endokrin bozuculara göre daha fazladır. Eğer sentetik kimyasallara maruziyet fetal dönemde gerçekleşirse, ciddi sağlık sorunlarıyla karşı karşıya kalınabilmektedir (7,8).

Endokrin Bozucu Kimyasalların Etki Mekanizmaları

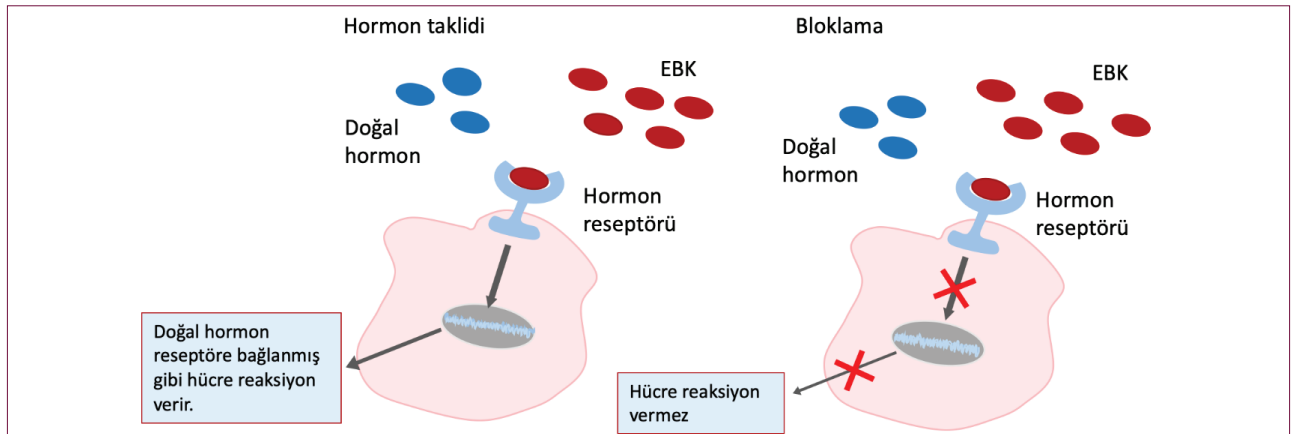
Endokrin bozucular etkilerini farklı mekanizmalar üzerinden gösterir. Pek çok endokrin bozucu kimyasal (EBK) steroid, amino asit ve peptit/protein yapıdaki hormonların reseptör dönüşümünü (turnover) modifiye ederek, endojen hormon konsantrasyonunu etkileyerek veya sinyal mekanizmalarını bozarak işlev görür (9). Bazı endokrin bozucular ise etkilerini direkt olarak

genler üzerinden gerçekleştirir. Bunun yanı sıra östrojen türevleri DNA hasarı yapabilmekte, çeşitli hücre tiplerinde malign farklılaşmaya sebep olabilmektedir (10). Endokrin bozucular gen ekspresyonunda kalıcı etkilere de yol açabilir. Buna göre, fitalatlar tarafından hayatın erken dönemlerinde genlerde meydana gelen metilasyon reaksiyonlarının hayatın ileri dönemlerinde canlı sağlığını olumsuz yönde etkileyeceği ve bu olumsuzlukların genetik geçişli olabileceği düşünülmektedir (10).

Çoğu endokrin bozucu, üreme ile ilgili olan yan etkilerini östrojen ve androjen reseptörlerine bağlanarak gerçekleştirir. Bu etkiyi post-transkripsiyonel ya da transkripsiyonel mekanizmaları stimüle ya da inhibe etme yolu ile yapar. Membran üzerinde lokalize olan nükleer olmayan steroid hormon reseptörleri (membran üzerindeki östrojen reseptörleri), nükleer hormon reseptörleri (tiroid, östrojen reseptörleri, androjen reseptörleri, retinoid reseptörler, progesteron reseptörleri) ve nonsteroid reseptörler (serotonin, dopamin, norepinefrin reseptörleri) ligandlarını bağladıktan sonra iyon kanalları, ikinci mesajcılar ve sinyal iletim mekanizmaları üzerinden etkilerini gösterir (7,10). Örneğin hem BFA'nın hem de fitalatların epitel-mezenkimal transizyona neden olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte bu kimyasallar genlerin ifadesini artırarak ve/veya azaltarak sinyal iletiminin regülasyonunda da rol oynamaktadırlar (11,12). Endokrin bozucular bu mekanizmalar üzerinden beyin, hipofiz, uterus, meme bezi ve prostat bezi hücrelerinde etkilerini gösterirler (10).

EBK'lar ayrıca hormonları taklit edebilirler, steroid hormonlar ve peptit yapıdaki hormonların etkilerini azaltabilir, olması gerekenden daha yüksek konsantrasyonda peptit/protein ya da steroid hormon sentezine neden olabilirler. Ayrıca hormonların taşınmasına ve yıkım mekanizması üzerine etki edebilir ve hormon-reseptör etkileşimi sonrası sinyal iletimini bozabilirler. Bu etkilerin biri veya birkaç tanesi bir arada da gerçekleşebilirler (13-15). EBK'ların etki mekanizmaları Şekil 1'de özetlenmiştir.

Endokrin bozucular enzimatik yollarla üzerine de etki edebilirler. Bu kimyasallar, steroid biyosentezindeki enzimatik yolacla-



Şekil 1. Endokrin bozucu kimyasalların etki mekanizmaları. Soldaki hücrede EBK hormonları taklit ederek hormon reseptörüne bağlanır ve hücrede sinyal iletimi başlamış olur. Hormon reseptörleri hücre üzerinde ya da çekirdek membranında olabilir. Sağdaki hücrede ise doğal hormon reseptörüne bağlanamaz. Hormon reseptörüne bir EBK bağlanmıştır.

rı, cinsel davranışları ve endokrin sistemi harekete geçiren bazı mekanizmaları bozabilir, steroidogenezdeki enzimlerin ve östrojenlerin metabolik faaliyetlerini inhibe edilebilirler. Örneğin, bazı PCB metabolitleri sülfotransferazları inhibe ederek dolaşımdaki östradiol seviyesinin artışına neden olabilirler (16-18).

Endokrin bozucuların vücudun farklı bölümleri üzerindeki etkileri karmaşık olmakla birlikte bu etkiler canlıların yaşadıkları bölgeye, mevsime, beslenme alışkanlıklarına, yaş ve genetik farklılıklara bağlı olarak değişebilir. Fitoöstrojenler, vücutlarında düşük konsantrasyonda östrojen bulunan çocuk ve erişkin erkeklerde belirgin östrojenik etkiye neden olurken, yüksek konsantrasyonda östrojen bulunduran ergin dişilerde, kandaki östrojen ile yarışarak etkisini azaltabilirler (7,19).

Endokrin Bozucuların Sağlık Üzerine Etkileri

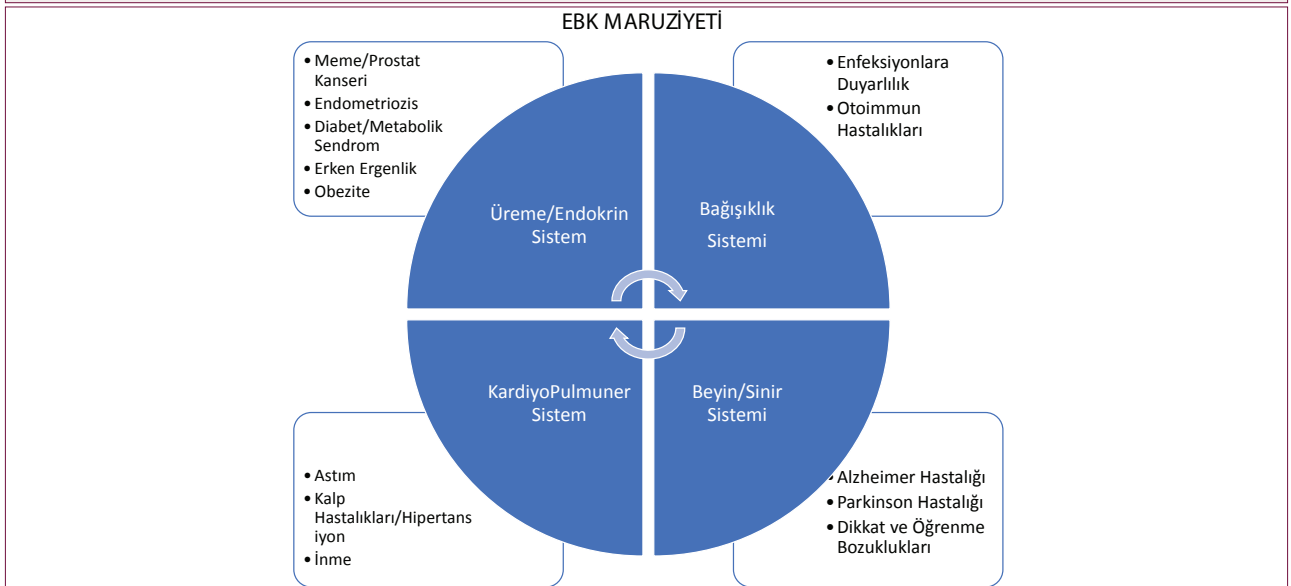
Hormonlar, salgı bezleri tarafından üretilerek kana salınan ve özel hedef hücrelere etki eden bileşiklerdir. Endokrin sistem, hormonlar aracılığı ile, canlıların çeşitli metabolik fonksiyonlarını, hücredeki kimyasal tepkimelerin hızını, hücre membranından madde taşınmasını, hücrelerin farklılaşma, gelişme ve sekresyon yapma fonksiyonlarını kontrol edip aynı zamanda hormon salgılayan özel dokulara ait hücrelerdeki tepkimeleri çevresel uyanlara göre regüle eder. Endokrin sistem beyinde hipofiz, hipotalamus ve endokrin bezlerden ibarettir. Bu sistem çeşitli görevleri yerine getiren farklı hormonları hassas oranda belirlenmiş düzeylerde üretir ve kana salgılar (20). Vücutta hormonal sistemin etkileri bazen saniyeler, günler, haftalar, bazen de yıllarca devam edebilir. Hormonların salınması esnasında konsantrasyon bazında meydana gelen dramatik azalış ve artışlar endokrin sistemde bozukluklara neden olabilir. Eğer hormon yeterli seviyede salgılanamıyorsa bu hormona ait fizyolojik etkiler az ya da hiç gözlenemezken aksi durumlarda etki aşırı olabilir (20,21). Hormona özgü hedef hücreler hücre

membranında bulunan protein yapıdaki spesifik reseptöre, ilgili hormonun bağlanması sağlar. Hormon-reseptör etkileşimi, hedef hücrenin aktivitesinin veya işlevinin değişmesini sağlayacak olan bir dizi kimyasal tepkimeyi başlatır (22).

Endokrin bozucular vücuda yiyecek, içecek, solunum ve deri yoluyla alınabilmekte birlikte (10) metabolitleri de özellikle hayvan ve insan hayatını olumsuz yönde etkileyerek fizyolojik değişikliklere neden olabilmektedir (23,24).

Endokrin bozucuların canlılar üzerindeki olumsuz etkileri genellikle tiroid fonksiyonları ve üreme sistemi üzerinde meydana gelir (25,26). Sentetik ve doğal endokrin bozucular hayatın pek çok alanında kullanılmaktadır. Bu kimyasallar hormonların üretiminden etkilerinin ortaya çıkışı ve metabolitlerinin vücuttan atılmasına kadar her aşamada etkilerini gösterebilmektedir. Gündelik hayatımızda, tarımda ve endüstride kullanılan pek çok madde EBK içerir (27). Bu kimyasallar yumurtalık ve testis gelişimini sağlayan endokrin bezlerden, dişide üreme fonksiyonlarından, uterus gelişimine kadar hemen her aşamada etkilerini göstererek fizyolojik değişikliklere neden olurlar. Özellikle fetal dönemde bu kimyasallara maruz kalınması, üreme organlarında geri dönüşümü olmayan ciddi kusur ve hastalıklara sebep olabilir (28). Benzer olarak, neonatal dönem, canlıların endokrin bozuculara karşı en savunmasız kaldığı dönemdir. Örneğin, neonatal dönemde androjenik ilaç verilen sıçanların testis ağırlıklarında değişikliklerin olduğu bildirilmiştir (29). Bununla birlikte testislerde kanser riskinin arttığı, sperm sayılarının azaldığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (30). Antiandrojenik ve östrojenik endokrin bozucular dişide rahim ile meme kanseri gelişiminde, erkekte ise prostat ve testis kanseri oluşumunda bir risk faktörü olarak değerlendirilmektedir (31,32). EBK'lara gelişim dönemlerinde maruziyete bağlı olarak deney hayvanları ve insan çalışmalarında ortaya çıkan hastalıklar Tablo 1'de verilmiştir (33).

Tablo 1. EBK'lara gelişim dönemlerinde maruz kalmış olan deney hayvanları ve insan çalışmalarında ortaya çıkan hastalıklar.



Endokrin Bozucu Kimyasalların Günlük Hayatımızdaki Yeri

Günümüzde EBK'lara doğada artık hemen her yerde rastlanabilmektedir. Endokrin bozucular günlük yaşamımızda kullandığımız plastik şişeler, plastik torbalar, metal yiyecek ve içecek kutuları, deterjanlar, oyuncaklar, yiyecekler ve kozmetik ürünlerinde bulunmaktadır. Bununla birlikte sanayi site atıkları, evsel ve hastane kaynaklı atıklar da bu kimyasallardan zengindir. Bu bölgelerden kaynaklanan atık sular, ileri biyolojik atık su arıtma tesislerinde çeşitli kademelerden geçtikten sonra bakterilerce biyolojik arıtmaya tabi tutularak ya doğal ortama verilmekte ya da özel havuzlarda toplanarak yeniden kullanıma hazır hale getirilmektedir. Eğer atık sular etkin bir şekilde arıılmaz ise endokrin bozucuların akarsu, deniz, göller ve toprak aracılığı ile insan, bitki ve hayvanlarla teması kaçınılmaz olur. Bu konuyla ilgili literatürde pek çok çalışma bulunmaktadır (34-36).

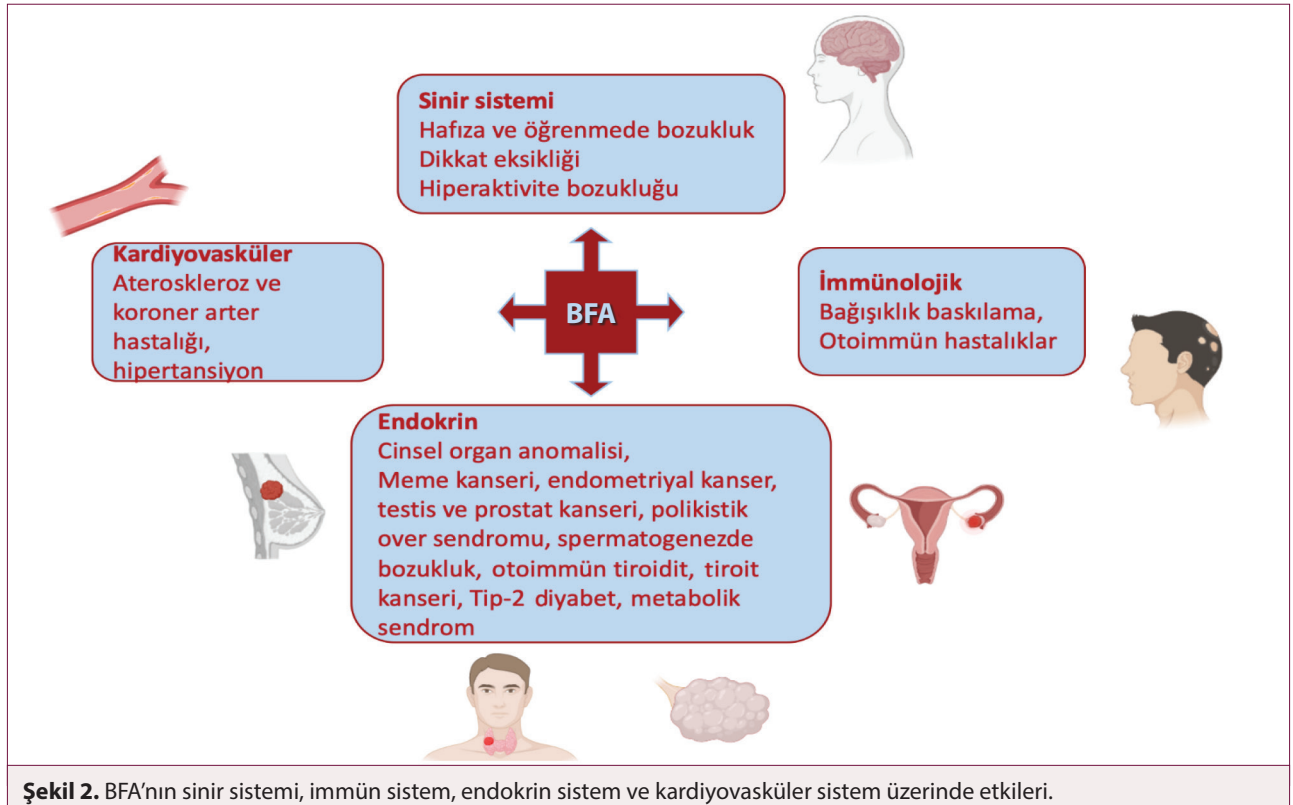
İngiltere'de çeşitli bölgelerdeki atık su arıtma tesislerinin çıkış sularında 17 β -östradiol, östron ve sentetik östrojen türevi olan 17 α -etinilöstradiol tespit edilmiştir. Bununla birlikte atık suların deşarj edildiği göl ve nehirlerde yaşayan çeşitli deniz canlıları ve balıkların üreme sistemlerinde bozukluklar rapor edilmiştir (37). Östrojenlerin balıklarda farklılaşma ve büyüme süreçlerinde, cinsiyet belirlenmesinde; insanlarda ise içme suyuna karışan endokrin bozucuların sperm yoğunluğu, sperm sayısı ve hareketliliğinin azalması, erkekte jinekomasti gibi etkilerinin olduğu ortaya konmuştur. Bununla bağlantılı olarak Almanya, Kanada, İngiltere,

İsveç ve Türkiye'deki çalışmalarda ilaç bileşimlerindeki östrojen ve metabolitlerinin kanalizasyon sularının karıştığı akarsu ve nehirlerde bol miktarlarda tespit edildiği rapor edilmiştir (35,38-40).

Endokrin Bozucu Kimyasalların Tekstil Endüstrisinde Kullanımı

Bisfenol A

Bisfenol A, ilk olarak 1891 yılında keşfedilmiştir. Endokrin etkileri ise 1930'lardan beri bilinmektedir. BFA, endüstriyel alanda pek çok tüketici ürünlerinin imalatında kullanılan endokrin bozucu özellikteki plastizer bir maddedir. Plastiklerdeki polimerizasyon tepkimelerinde yer alır. Oyuncaklarda, kozmetik ürünlerde, ilaçlarda, biberonlarda, yiyecek ve içecek kaplarında, konserve kutu iç yüzeylerinde ve diş dolgu malzemelerinde kullanılan BFA'nın insan sağlığına olumsuz etkilerinin olduğu bildirilmiştir. BFA'nın pH, sıcaklık gibi bazı etmenler sonucu plastik kapların iç yüzeyindeki polimerlerden kap içinde bulunan sıvı ortama göç edebildiği gösterilmiştir (41,42). Özellikle son 10 yılda dünya genelinde kız çocuklarının ergenliğe giriş yaşının öne kaydığı ve artan meme kanseri vakalarının ortaya konması ile beraber östrojenik etkisi kanıtlanmış bir çevresel endokrin bozucu olan BFA'nın her geçen gün önemi daha da artmaktadır (43-46). Bununla birlikte BFA'nın östrojen benzeri etki gösterebildiği, beyinde cinsel farklılaşmadan sorumlu bölgede deformasyona sebep olabileceği ileri sürülmüş ve öğrenme ile ilgili defektlere neden olduğu ortaya konmuştur (47). BFA maruziyetinin etkileri Şekil 2'de özetlenmiştir.



Şekil 2. BFA'nın sinir sistemi, immün sistem, endokrin sistem ve kardiyovasküler sistem üzerinde etkileri.

İnsan vücuduna oral yolla alındıktan sonra BFA, büyük oranda karaciğer ve bağırsakta çözünebilir metaboliti olan bisfenol A-glukronide dönüştürülür. Sonrasında ise bisfenol A-glukronid yaklaşık 6 saat kadar sonra renal yolla atılır (48). BFA maruziyetinin tek yolu oral yol olmamakta, inhalasyon ve deri yoluyla da vücuda girişi yapabilmektedir. BFA maruziyeti çoğunlukla kronik dönemde ve düşük dozla gerçekleşir. Özellikle son yıllarda insanoğlu geri dönüşüme tabi tutulmuş plastik şişelerde, cidarı epoksi reçine ile kaplanmış teneke kaplarda ve polikarbonat materyalden yapılmış kutuların içine BFA'nın geçiş yaptığı içecek ve yiyecekleri tüketerek bu endokrin bozuculara maruz kalmaktadır (49,50).

Bunun yanı sıra BFA sentetik üretilen ksenoöstrojenler içinde önemli bir yer teşkil eden, insan yapımı ve yıllık üretimi neredeyse 3.8 milyon tonu geçen bir kimyasaldır (51). Yapılan deneysel araştırmalar BFA'nın östrojen reseptörüne bağlanıp östrojeni taklit ettiğini ortaya koymuştur (52). *In vitro* modellerde BFA'nın kromozom sayılarında değişikliklere, nükleik asitlerde serbest radikal hasarına ve mutajenik etkilere sebebiyet verdiği bildirilmiştir. BFA'nın DNA'ya verdiği hasar canlı türlerinde kısırlığa, doğumsal anomalilere ve düşüklere neden olur. Nitekim bir deneysel modelde içme sularına BFA katılan sıçanlarda meme dokularından ekstrakte edilen hücrelerin DNA moleküllerinde ve protein yapılarında serbest radikal kaynaklı protein hasarı olduğu bildirilmiştir (53).

BFA vücutta etkilerini çeşitli şekillerde gösterir. Bunlar BFA'nın hem nükleer östrojen reseptörüne hem de membran östrojen reseptörüne bağlanması ve genomik olmayan yollara entegrasyonu meydana gelir. BFA'nın bu etkileri meme bezi, yumurtalık, beyin gibi östrojenin hedef organlarında fizyolojik birtakım değişikliklere sebep olur. Literatürde BFA'nın oksidatif hasara da neden olduğu bildirilmektedir. Bu etkiyi mitokondri elektron transport sisteminin çalışmasını bozarak ve antioksidan enzimleri inaktive ederek gerçekleştirir (54,55).

BFA'nın sağlık üzerine olumsuz pek çok etkisi sebebiyle kullanımına kısıtlamalar ve yasaklar getirilmesi sağlık otoriteleri ve bilim dünyası tarafından yıllardan beri gündem konusu olmaya devam etmektedir. Amerikan Ulusal Toksikoloji Programı (NTP) 2008 yılında hazırladığı raporda fetüs, çocuk ve yetişkin bireylerdeki BFA maruziyetinin üreme, sinir sistemi ve davranış üzerine etkilerine dair endişelerini kamuoyuyla paylaşmış, 2010'da Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) de NTP gibi durumun önemine dikkatleri çekmiştir. Yapılan bu açıklamalardan sonra Kanada Hükümeti yetkilileri BFA içeren bebek biberonlarının ithalatına ve satışına yasak getirdiğini açıklamış, Avrupa Komisyonu da 2011 yılında polikarbonat ihtiva eden şişe üretiminde BFA kullanımını sınırlandırmıştır (56,57). Daha sonra FDA Amerikan Kimya Birliğinin taleplerine cevap olarak BFA ihtiva eden biberonların kullanılmasını 2012 yılında kesin olarak yasaklamıştır. FDA, yapısında BFA ihtiva eden reçinelerin kutu içi içecek kaplamalarda kullanılmasını ise 2013'de aldığı kararla yasaklamıştır (58). Türkiye'de Avrupa Komisyonunun beslenme şişeleri üretimindeki BFA kullanımını ciddi bir şekilde sınırlandırma kararıyla koşut olarak Tarım Köy İşleri Bakanlığı'nca 2011 yılı Haziran ayında BFA ihtiva eden biberonlar ve benzeri beslenme gereçleri piyasadan geri çekirilip toplatılmıştır (59).

Pek çok bilimsel kuruluş insan sağlığı açısından tehlikeli bir molekül olan BFA'nın toksisitesiyle ilgili çeşitli değerlendirmelerde bulunmuştur. Bu kuruluşlardan biri olan Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA), çeşitli platformlarda 2006 yılından beri düzenli olarak BFA hakkında bilimsel görüşlerini açıklamaktadır. Bu kuruluş 2015 yılında düzenlediği panelde BFA'nın diyetle, ev tozu ile, termal kağıttan ve kozmetiklerden günde 4 µg/kg'lık miktara kadar vücuda alımını "tolere edilebilir değer" (t-TDI) olarak deklare etmiştir. Ancak bu değer vücuda alım ile ilgili sabit bir değer olmaması gerektiği de ileri sürülmektedir. Bunun nedeni BFA'nın yukarıda belirttiğimiz kaynaklarının yanı sıra farklı kaynaklarının da olabileceğidir. Son yıllarda yapılan çalışmalara göre bu kaynaklardan biri tekstil sanayidir. Ne yazık ki günümüzde tekstil sanayisinde BFA kullanımına ilişkin doğrudan bir kısıtlama yoktur. Ülkemizde bu doğrudan kısıtlama henüz yokken Avrupa Birliği ülkeleri "Ecolabel 66/10" denetimi altındadır. Bunun nedeni, BFA'nın "Çok Yüksek Önem Arz Eden Maddeler (SVHC)" listesine dahil edilmesine karşın, Avrupa Birliği Çevre Etiketini yalnızca ağırlıkça %0,1'den fazla SVHC içermeyen tekstil ürünlerine verilmektedir (60).

Geçtiğimiz birkaç yıla kadar BFA'nın sadece polikarbonat, epoksi reçineler ve termal kağıtlarda bulunduğu düşünülmektedir. Bu nedenle BFA'nın tekstil sanayindeki maruziyet senaryoları veya toksisitesi ile ilgili yapılan değerlendirmeler hiçbir zaman bir tehlike unsuru olarak görülmedi (61). Ancak son yıllarda, tekstil sanayinde bazı ürünlerde BFA'nın varlığı tespit edilmiş ve beraberinde de bazı maruziyet çalışmaları yapılmaya başlanmıştır. 2017 ve 2018 yıllarında Avrupa Birliği dışındaki çeşitli ülkelerden alınan kumaş örnekleri üzerinde yapılan araştırmalarda bazı bebek çoraplarında ve kadın külotlu çoraplarında BFA'nın tespit edildiği bildirilmiştir. Ayrıca son zamanlarda (Nisan 2019) Avrupa pazarlarından alınan bebek ve küçük çocuk çorap örneklerinde BFA'nın varlığı ve endokrin bozucu aktivitesi gösterilmiştir (62-64).

Bu veriler giyim eşyalarının ciltle doğrudan ve uzun süreli temas halinde olması nedeniyle endişe vericidir. Bu endişe, tekstil ürünlerinde tespit edilen, bunların deri ile temas yoluyla vücuda alınması sonucu idrarda da görülen, sadece östrojenik ve anti-androjenik etkileri nedeniyle değil, aynı zamanda bebek ve küçük çocukların genellikle çorap ve kıyafetlerini ağızlarına sokmaları ve emmeleri suretiyle bu EBK'ları bünyelerine almaları ile de ilgilidir. Benzer şekilde, hamile kadınların da bu kimyasallara maruz kalma ihtimali, fetüs üzerindeki olası potansiyel etkileri nedeniyle de endişe verici boyutlardadır (65).

Dolayısıyla bebekler, küçük çocuklar ve hamile kadınların kullandığı tekstil ürünlerindeki BFA'nın zararlı etkilerinin bertaraf edilmesini sağlamaya yönelik kısıtlı yasa ve yönetmelikler, bu kimyasalların neden olabileceği sağlık ve çevre problemleri ile ilgili yaptırımların ortaya konulmasında birtakım zorluklara neden olacaktır (65).

Tekstil endüstrisinde elyaf, iplik ve nihai kumaş üretimi aşamasında çeşitli kimyasallar kullanılmaktadır. Şeffaflık Piyasası Araştırma Firması tarafından 2015 yılında yapılan bir çalışma, tekstil kimyası pazarının küresel anlamda 21 milyar dolar olan mevcut

ABD piyasa değerinin yıllık %3,7 büyümesinin beklendiğini ortaya koymuştur. Her yıl tekstil kimyası pazarının bu boyutlarda büyümesi canlı sağlığı bakımından endişe vericidir. Bununla birlikte tekstil endüstrisi tarafından üretilen nihai kumaşların %100 doğal liflerden yapılmış olmaları durumunda bile yaklaşık %27 (ağırlıkça) kimyasal içerdiği tahmin edilmektedir. Üretimde sentetik lifler kullanılması durumunda ise beraberinde yüksek miktarda kimyasal kullanımı da gerçekleşecektir. Bunun sonucunda da canlıların bu kimyasallara maruziyetleri artacaktır (66).

Kumaş üretiminde kullanılan kimyasallar tekstil yardımcıları, tekstil kimyasalları ve apre olarak kategorize edilir. Tekstil yardımcıları doğal liflerin saflaştırılmasında kullanılır. Tekstil kimyasalları, kumaş üretiminde kullanılan boyaları ve UV ışık emicilerini barındıran kimyasallardır. Kumaşın doğal özelliklerini daha da iyileştirmek ve ömrünü uzatmak amacıyla ise tekstil apreleri uygulanır. Bu işlemde, oksidasyonun önlenmesi ve tekstil materalinin bozulmasının engellenmesi adına antioksidan katkıları kullanılır. BFA ve türevleri bu antioksidanların ve tekstil boyalarının üretiminde ara kimyasal olarak kullanılmasının yanı sıra tekstil endüstrisinde işleme aşamasında da kullanılır. Örneğin, polyester kumaşların üretiminde apre olarak %5 polietilen glikol bisfenol A eter diakrilat kullanımı rapor edilmiştir. Bununla birlikte sentetik deri üretiminde kullanılan plastisol polivinil klorür (PVC) baskılar, tekstil üretiminde önemli bir BFA kaynağıdır. Benzofenoller de tekstilde güneş ışığından kaynaklanan oksidatif hasarı önlemek amacıyla kullanılır (67-69).

Kullanımları oldukça yaygın olmasına rağmen, EBK'ların tekstil ürünlerindeki konsantrasyonları yakın zamana kadar detaylı bir şekilde araştırılmamıştır. Günlük yaşamda sıklıkla kullandığımız giysi ve yatak nevresimi gibi tekstil ürünlerinin derinin epidermisi ile teması neticesinde insanlar bu kimyasallara maruz kalmaktadır. Bununla birlikte bebekler de bazı bebek bezlerinde bulunan endokrin bozucular yüzünden risk altındadır (70).

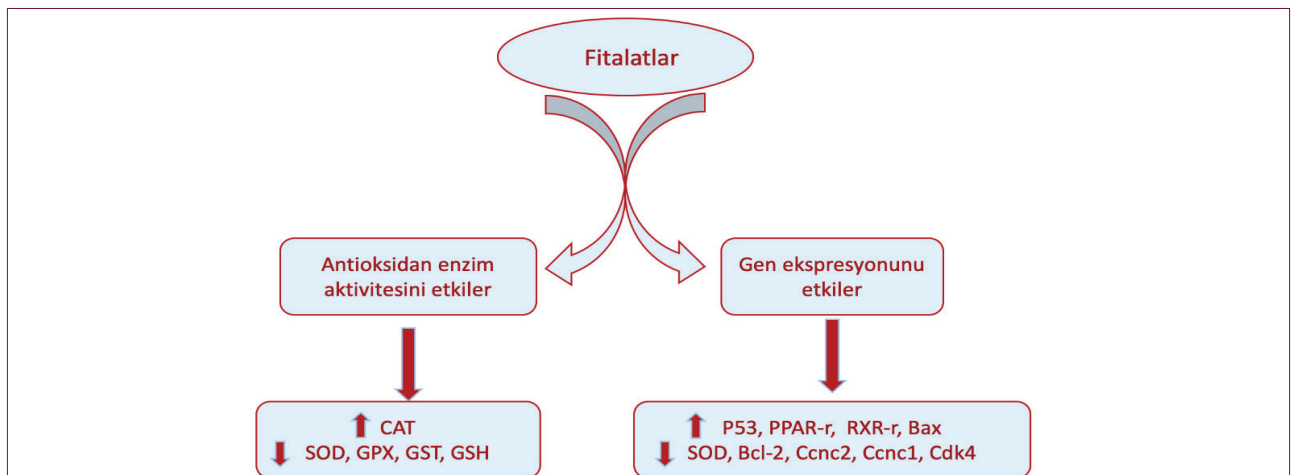
Literatürde kumaş ve giysilerdeki BFA düzeyleri ile ilgili fazla çalışma bulunmamaktadır. Xue ve arkadaşlarının (62) çalışmasında çeşitli çocuk tekstil ürünlerinde BFA konsantrasyonları ölçül-

müştür. En yüksek BFA konsantrasyonu 6-12 aylık bebekler için üretilen %97 polyester malzemeden yapılmış gri renkli çoraplarda 13300 ng/g olarak tespit edilmiştir. BFA doğrudan tekstil üretiminde kullanılmamaktadır, ancak kumaş boyaları da dahil olmak üzere tekstil üretiminde kullanılan çeşitli ara ürünler BFA kaynağı olabilir. Örneğin, polietilen glikol bisfenol A eter diakrilat günümüzde polyester kumaşların üretimine bir kimyasal olarak katılmaktadır. Çalışmadaki çorapların büyük kısmı %97-98 polyester kumaştan yapılmıştır. Son yıllarda polietilen ve polikarbonattan üretilen geri dönüştürülmüş plastik şişeler, polyester fibere dönüştürülerek çorap ve giysi üretiminde kullanılmaktadır. Bu nedenle, polyester içeren çoraplarda bulunan BFA'nın kaynağı polyester üretiminde hammadde olarak kullanılan geri dönüştürülmüş plastik şişelerdir. Medyada tüketim mallarında BFA kullanımına ilişkin artan endişeler nedeniyle, bisfenol S (BFS) kullanımı BFA içermeyen bir alternatif olarak sunulmuştur. Ancak çalışmalar, BFS'nin BFA'dakilere benzer genotoksikite ve östrojenik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (68,70,71).

Fitalatlar

Plastiklere şeffaflık, esneklik ve dayanıklılık kazandırmak üzere üretilen fitalatlar "sentetik kimyasallar" grubuna girer. Dietilhekzil fitalat (DEHP) sanayide en fazla kullanılan fitalat türü olmakla birlikte genel olarak vinil içeren ürünlerde yumuşatıcı ve akışkanlık sağlayıcı, polimer endüstrisinde de çözücü olarak kullanılmaktadır. Global olarak senede ortalama 3 milyon ton fitalat işlenmektedir (72,73).

Polimerlere plastikleştirici olarak ilave edilen fitalatlar, bu yapıları kovalent olarak bağlanamamalarından dolayı çeşitli ürünlerin yüzey tabakalarından kolaylıkla göç edebilme yeteneğindedirler. Böylelikle çevresel etkenler nedeniyle havaya karışabilir ve BFA'da olduğu gibi buldukları kaplardaki sıvıların içine göç edebilirler. Fitalatlar, insan ve diğer canlıların sağlığını bu yollarla tehdit ederken aynı zamanda çevre kirliliğine de neden olur. Bu yollarla insanoğlu istemeden ve farkında olmadan yoğun bir şekilde bu kimyasallara maruz kalır (74,75). Fitalatların toksik etkilerinin mekanizması Şekil 3'te özetlenmiştir.



Şekil 3. Fitalatlar gen ekspresyonu ve antioksidan enzim aktivitesini etkileyerek toksisiteye neden olur.

Günümüzde doğada her yerde karşımıza çıkan plastik ürünlerde bulunan fitalatların deri, sindirim ve solunum sistemi yoluyla vücuda alınarak insan sağlığı üzerine olan etkilerinin kapsamlı bir şekilde ortaya konması önem arz eden bir konudur. Öncelikle BFA üzerine odaklanan çoğu araştırmacı son yıllarda fitalat ve fitalat esterlerinin canlı sağlığı üzerine olan olumsuz etkilerine odaklanmıştır. Fitalat esterlerinin yarılanma ömürleri kısadır. Bu moleküller monoesterlere, glukronik konjugatlara ve ileri oksidasyon ürünlerine bağlanabilir ve daha sonra idrarla atılır (76). Fitalat metabolitlerinin anne sütü, amniyotik sıvı, insan tükürüğü gibi biyolojik sıvılara geçişi yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (77). Fitalatlar endokrin sisteme zarar verir ve hücrede reseptöre bağlanmak suretiyle endokrin sistem üzerinde çeşitli etkilere neden olur (78). Fitalat esterlerinin gonadlar, karaciğer ve böbrekler üzerine zararlı etkileri hayvan modelleri üzerinde yapılan araştırmalarda ortaya konmuştur (79).

Fitalatlar gündelik hayatta çeşitli kullanım alanlarına sahiptir. Öyle ki bazı plastik malzemeler %40'a kadar DEHP içerebilir. DEHP sentetik deride, suya dayanıklı tekstil malzemesi imalatında, ayakkabı, kablo, teflon tava, döşeme, ambalaj malzemesi, çocuk oyuncakları, kauçuk, alüminyum folyo ve çeşitli tipteki kimyasal çözücüde bulunur. Bununla birlikte bazı medikal malzemelerde de DEHP varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca uzun zincirlere sahip olan fitalatlar endüstriyel yağlarda, sıvı deterjan ürünlerinde, kağıt imalatında ve pestisit üretiminde ek malzeme olarak kullanılmaktadır (80,81). Kısa zincir içeren fitalatlar ise makyaj malzemelerinde, kişisel bakım ürünlerinde, sabun, parfüm, boya, yapıştırıcılarda ve enterik kaplı tabletlerde bulunmaktadır (82,83).

Fitalatlar nefes alma suretiyle, oral yolla ve deri yoluyla vücuda girebilir. Bununla birlikte diğer fitalat maruziyet yolları arasında kan transfüzyonu, diyaliz torbası ve sonda gibi medikal malzemelerin kullanımı bulunmaktadır (84,85). Bir diğer dikkate değer maruziyet yolu ise kapı ve pencere imalatında kullanılan PVC malzemelerdir (86). Bu sebepten dolayı çoğunlukla iç mekan hava fitalat konsantrasyonu dış mekanlara göre daha yüksektir. Ayrıca şehirleşmenin başladığı bölgelerde açık alanlardaki fitalat konsantrasyonu kırsal bölgelerle karşılaştırıldığında daha yüksek olarak tespit edilmiştir (87,88). Fitalat içeren kaplarda saklanan yiyecek ve içecekler vasıtasıyla da maruziyet mümkündür. Özellikle fitalat ihtiva eden içecek ve yiyecek kaplarının mikrodalga fırınlarda yüksek watt değerlerinde ısıtılması neticesinde bu maruziyet çok daha fazla gerçekleşmektedir (89).

Serum fitalat konsantrasyonunun artışı ile birlikte kalp ve damar hastalıkları riskinin belirgin şekilde arttığı bildirilmektedir (90). Bebek ve küçük çocukların oyuncak ve tekstil ürünlerini sıklıkla ağızlarına götürmeleri, vücut su yüzdelerinin fazla olması ve yüksek metabolik hızı sahip olmaları nedeniyle bu kimyasallardan yetişkinlere göre daha çok etkilenirler. Bu etkilenme hayvan çalışmaları da açıkça ortaya konmuştur. Gebe hayvanlarda DEHP maruziyeti teratojenik ve gelişimsel defektlerle sonuçlanmıştır (91-93). Deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalarda fitalatların böbrek, akciğer ve karaciğer gibi organlar başta olmak üzere özellikle üreme sistemi üzerinde toksik ve

karsinogen etki yaptığı bildirilmiştir. Avrupa birliği öncelikli olarak iki tür fitalatı (DEHP ve Dibütil fitalat (DBP)) üreme açısından toksik olarak sınıflandırmıştır (94).

Pedersen ve Hartmann'ın (95) yaptığı çalışmada kullanılan kumaşların baskılı olan bütün kısımlarında fitalat tespit edilse de miktarlar baskı üzerindeki yerine göre önemli oranda değişmektedir. Danimarka'da bir mağazadan alınan Tigger yeleğinin baskılı bölümü toplamda 1,4 mg/kg fitalat içeriğine sahipken, Slovak menşei Tigger önlük numunesinin toplamda 200 mg/kg fitalat içerdiği bulunmuştur (numunenin ağırlığının %20'sinden fazlası). Hollanda'dan alınan Donald Duck tişört baskısı ise 170.036 mg/kg toplam fitalat içermektedir (numunenin ağırlıkça %17'sinden fazlası). Bu sonuçlar, giysilerin PVC bazlı plastisol baskılarla basılmış olabileceğini düşündürmektedir. Belçika, Kanada, Norveç, Çin, İspanya ve ABD'den gelen giysilerden alınan baskı numuneleri, 42 ile 101 g/kg (ağırlıkça %4 - %10 arasında ve yüksek oranda) seviyelerde fitalat içerirken, diğer 6 adet farklı baskı numunesinde ise 0,1 gramdan daha az fitalat içeriği bulunmuştur. Almanya'da satın alınmış olan PVC Winnie the Pooh yağmurlukta tespit edilen fitalat düzeyleri ise 320 mg/kg olarak tespit edilmiştir. Yapılan çalışmaların sonuçlarına göre numunelerde bulunan kimyasalların türü ve miktarında farklılıkların olduğu görülmektedir. Bu araştırmada tespit edilen başlıca fitalatlar DEHP, benzil-butil fitalat (BBP), diisononil fitalat (DINP) ve diheptil fitalat (DHP)'tir. ABD'den satın alınmış giysilerde tanımlanamayan fitalatlar da tespit edilmiştir. Belçika ve Slovakya'dan alınan örnek kıyafetlerin baskılı kısımlarının ise çok yüksek miktarlarda fitalat içerdiği bulunmuştur. Bu giysilerde muhtemelen PVC bazlı plastisol baskıların kullanıldığı düşünülmektedir (95).

Tekstil ürünlerinde bulunan fitalatlar, kullanıcılarının bu ürünleri yıkamaları neticesinde doğayı tehdit eder hale gelmektedir. Atık sulara karışan fitalatlar atık su arıtma tesisleri veya kanalizasyon yoluyla akarsu, göl ya da denizlere deşarj edilerek doğaya salınmakta, buralarda yaşayan türlerin varlığını tehdit etmekte ve çevre kirliliğine neden olmaktadır (94-95).

SONUÇ

EBK'ların sağlık üzerindeki olumsuz etkileri literatürdeki birçok araştırmada gözler önüne serilmiştir. Bilim ve teknolojinin bu kadar hızlı ilerlediği bir çağda bugüne kadar varlığı tespit edilen ve henüz tespit edilmemiş olan bu kimyasallara maruz kalmamak imkansız gibi görünmektedir.

Endokrin bozucular hücrenin yağ dokusunda depolanabilirler. Bu sebeple EBK'ların çevre ve toplum sağlığı üzerindeki etkilerini minimuma indirmek adına sıkı önlemlerin alınması elzemdir. Öncelikli olarak tarladan mutfağımıza gelen sebze ve meyvelerin iyi bir şekilde yıkanarak pestisit ve herbisitlerden arındırılmasına özen gösterilmeli, atık suların deşarj edildiği akarsu, göl ve denizlerde yaşayan canlıların tüketilmesinden kaçınılmalı, bu kimyasalları içeren çeşitli ilaçlar, saklama kapları, su damacaneleri, pet şişeler, biberon, bebek oyuncakları, tekstil ürünleri ve kozmetik ürünler gibi tüketim mallarının kullanımını durdurulmalı, ithalatına ve üretimine sınırlamalar getirilmeli,

konu ile ilgili yeni yasa ve yönetmelikler acilen çıkarılmalı, yürürlüğe konulmalıdır. Endokrin bozucuların insan sağlığı üzerine olan etkilerini minimum seviyeye indirmek için yaşam tarzımızın ve alışkanlıklarımızın ciddi bir şekilde gözden geçirilmesi gerekmektedir. Endokrin bozucu mekanizmaların daha iyi anlaşılabilmesi için çok daha fazla sayıda bilimsel araştırmaya gereksinim duyulmaktadır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti – A.A.A.; Veri Toplama – L.T., D.C., E.E.A., A.A.A.; Veri Analizi/Yorumlama – E.E.A., Yazma – L.T., D.C.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

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

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept – A.A.A.; Data Collection – L.T., D.C., E.E.A., A.A.A.; Analysis and/or Interpretation – E.E.A.; Writing – L.T., D.C.

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

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

KAYNAKLAR/REFERENCES

- Goldman JM, Laws SC, Balchak SK, Cooper RL, Kavlock RJ. Endocrine-disrupting chemicals: pre-pubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid activity in the female rat. A focus on the EDSTAC recommendations. *Crit Rev Toxicol* 2000; 30: 135-96. [CrossRef]
- Zafra-Gómez A, Ballesteros O, Navalón A, Vilchez JL. Determination of some endocrine disrupter chemicals in urban wastewater samples using liquid chromatography-mass spectrometry. *Microchemical Journal* 2008; 88(1): 87-94. [CrossRef]
- Khetan SK. Environmental Chemicals Targeting Estrogen Signaling Pathways. *Endocrine Disruptors in the Environment*. 1st Edition. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2014.p.67-8.
- Lee MM. *Endocrine Disruptors. A Current Review of Pediatric Endocrinology* 2007; 109-18.
- Kumar A, Kumari C, Mochan S, Kulandhasamy M, Sesham K, Sharma VK. *Endocrine System*. In: Vonk J, Shackelford T, editors. *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior*. Springer, Cham 2018; p.1-26. [CrossRef]
- Büyüktuncer Z, Başaaran A. Fitoöstrojenler ve Sağlıklı Yaşamdaki Önemleri. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi* 2005; 25(2): 79-94.
- Jarvis E, Campbell NA, Reece JB. *Hormones and the Endocrine System*. Wilbur B. Biology. San Francisco: Pearson Education 2005.p.945-6.
- Wuttke W, Jarry H, Seidlova-Wuttke D. Definition, classification and mechanism of action of endocrine disrupting chemicals. *Hormones (Athens)* 2010; 9(1): 9-15. [CrossRef]
- Colborn T, vom Saal FS, Soto AM. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 1993; 101(5): 378-84. [CrossRef]
- Chang HS, Choo KH, Lee B, Choi SJ. The methods of identification, analysis, and removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) in water. *J Hazard Mater* 2009; 172(1): 1-12. [CrossRef]
- Metzler M, Pfeiffer E. Chemistry of Natural and Anthropogenic Endocrine Active Compounds. In: Metzler M editor. *The Handbook of Environmental Chemistry, Endocrine Disruptors Part 1*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2001. p.63-80. [CrossRef]
- Ward WE, Thompson LU. Dietary Estrogens of Plant and Fungal Origin: Occurrence and Exposure. In: Metzler M editor. *The Handbook of Environmental Chemistry, Endocrine Disruptors Part 1*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2001.p.101-28. [CrossRef]
- Toppari J, Larsen JC, Christiansen P, Giwercman A, Grandjean P, Guillellet LJ, et al. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environmental Health Perspectives* 1996; 104: 741-803. [CrossRef]
- Bigsby R, Chapin RE, Daston GP, Davis BJ, Gorski J, Gray KL, et al. Evaluating the effects of endocrine disruptors on endocrine function during development. *Environmental Health Perspectives* 1999; 107: 613-8. [CrossRef]
- Kuwada M, Kawashima R, Nakamura K, Kojima H, Hasumi H, Maki J. Study of neonatal exposure to androgenic endocrine disruptors, testosterone and dihydrotestosterone by normal-phase HPLC. *Biomed Chromatography* 2006; 20: 1237-41. [CrossRef]
- Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* 1992; 305: 609-13. [CrossRef]
- McLachlan JA, Simpson E, Martin M. Endocrine disruptors and female reproductive health. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2006; 20: 63-75. [CrossRef]
- Bergman A, Heindel JJ, Jobling S, Kidd KA, Zoeller RT. WHO, State of the science of endocrine disrupting chemicals: Summary for decision makers. *DTI/1554/GE*, 2012. [CrossRef]
- Laganà A, Bacaloni A, De Leva I, Faberi A, Fago G, Marino A. Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. *Analytica Chimica Acta* 2004; 501(1): 79-88. [CrossRef]
- Çek Ş, Sarıhan F. Endokrin Sistemi Bozan Kimyasallardan Cinsiyet Steroidlerinin Balıklardaki Etkileri. *E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences* 2010; 27(1): 41-6.
- Beszterda M, Frański R. Endocrine disruptor compounds in environment: As a danger for children health. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab* 2018; 24(2): 88-95. [CrossRef]
- Hemming JDC, Barman MAE, Standridge JH. Assessment of Source and Drinking Waters for Estrogenic Endocrine Disruption, AWWA WQTC Conference 2001.
- Matthiessen P. Endocrine disruption in marine fish. *Pure Appl Chem* 2003; (75)11-12: 2249-61. [CrossRef]
- Turan F, Çek Ş. "Masculinization of African Catfish (*Clarias gariepinus*) treated with Gokshura (*Tribulus terrestris*)", *The Israeli Journal of Aquaculture- Bamidgah* 2007; 59(4): 224-9.
- Sharp RM, Skakebaek NE. Are estrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 1993; 41: 1392-5. [CrossRef]
- Wazir U, Mokbel K. Bisphenol A: A Concise Review of Literature and a Discussion of Health and Regulatory Implications. *In Vivo* 2019; 33(5): 1421-3. [CrossRef]
- Cooper JE, Kendig EL, Belcher SM. Assessment of bisphenol A released from reusable plastic, aluminium and stainless steel water bottles. *Chemosphere* 2011; 85(6): 943-7. [CrossRef]
- Yang Y, Wang Z, Xie S. Aerobic biodegradation of bisphenol A in river sediment and associated bacterial community change. *Sci Total Environment* 2014; 470-471: 1184-8. [CrossRef]

29. McGuinn LA, Ghazarian AA, Joseph S, Ellison GL. Urinary bisphenol A and age at menarche among adolescent girls: evidence from NHANES 2003-2010. *Environ Res* 2015; 136: 381-6. [CrossRef]
30. Rhie YJ, Nam HK, Oh YJ, Kim HS, Lee KH. Influence of bottle-feeding on serum bisphenol a levels in infants. *J Korean Med Sci* 2014; 29(2): 261-4. [CrossRef]
31. Paulose T, Speroni L, Sonnenschein C, Soto AM. Estrogens in the wrong place at the wrong time: Fetal BPA exposure and mammary cancer. *Reprod Toxicology* 2015; 54: 58-65. [CrossRef]
32. MacLusky NJ, Hajszan T, Leranthe C. The environmental estrogen bisphenol-A inhibits estrogen-induced hippocampal synaptogenesis. *Environ Health Perspect* 2005; 113: 675-9. [CrossRef]
33. Volkel W, Colnot T, Csanady GA, Filser JG, Dekant W. Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol* 2002; 15(10): 1281-7. [CrossRef]
34. Bloom MS, Mok-Lin E, Fujimoto VY. Bisphenol A and ovarian steroidogenesis. *Fertil Steril* 2016; 106(4): 857-63. [CrossRef]
35. Vandenberg LN, Stafni MV, Sonnenschein C, Rubin BS, Soto AM. Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocr Rev* 2009; 30(1): 75-95. [CrossRef]
36. Michalowicz J. Bisphenol A - Sources, toxicity and biotransformation. *Environ Toxicol Pharmacol* 2014; 37: 738-58. [CrossRef]
37. Lee HS, Parka EJ, Oha JH, Moona G, Hwanga MS, Kima SY, et al. Bisphenol A exerts estrogenic effects by modulating CDK1/2 and p38 MAP kinase activity. *Biosci Biotechnol Biochem* 2014; 78(8): 1371-5. [CrossRef]
38. Izzotti A, Kanitz Z, D'Agostini F, Camoirano A, De Flora S. Formation of adducts by bisphenol A, an endocrine disruptor, in DNA in vitro and in liver and mammary tissue of mice. *Mutat Res/Genet Toxicol Environ Mutagen* 2009; 679: 28-32. [CrossRef]
39. Rezg R, El-Fazaa S, Gharbi N, Mornagu B, Rezg R. Bisphenol A and human chronic diseases: Current evidences, possible mechanisms, and future perspectives. *Environ Int* 2014; 64: 83-90. [CrossRef]
40. Moon MK, Kim MJ, Jung IK, Koo YD, Ann HY, Lee KJ, et al. Bisphenol A impairs mitochondrial function in the liver at doses below the no observed adverse effect level. *J Korean Med Sci* 2012; 27(6): 644-52. [CrossRef]
41. Rezg R, El-Fazaa S, Gharbi N, Mornagui B. Bisphenol A and human chronic diseases: current evidences, possible mechanisms, and future perspectives. *Environ Int* 2014; 64: 83-90. [CrossRef]
42. EFSA, Report on the two-phase public consultation on the draft EFSA scientific opinion on bisphenol A (BPA). Retrieved from Parma ITALY 2015 http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/740e.pdf.
43. Usman A, Ahmad M. From BPA to its analogues: Is it a safe journey? *Chemosphere* 2016; 158: 131-2. [CrossRef]
44. İşciöglü D. Bebek Beslenmesi İçin Seçtiğimiz Ürünlerin Bpa İçermesi Yetmez. 2015. Retrieved from <http://www.otcnews.com.tr/bebekbeslenmesi-icin-sectigimizurunlerin-bpaicermemesi-yetmez/>
45. Commission Decision (EU) 2017/1392 of 25 July 2017 amending Decision 2014/350/EU establishing the ecological criteria for the award of the EU Ecolabel for textile products.
46. Commission Regulation (EU) 2016/2235 of 12 December 2016 amending Annex XVII to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) as regards bisphenol A. [CrossRef]
47. Xue J, Liu W, Kannan K. Bisphenols, benzophenones, and bisphenol A diglycidyl ethers in textiles and infant clothing. *Environ Sci Technol* 2017; 51(9): 5279-86. [CrossRef]
48. Li AJ, Kannan K. Elevated concentrations of bisphenols, benzophenones, and antimicrobials in pantyhose collected from six countries. *Environ Sci Technol* 2018; 52: 10812-9. [CrossRef]
49. Freire C, Molina-Molina JM, Iribarne-Durán LM, Jiménez-Díaz I, Vela-Soria F, Mustieles V, et al. Concentrations of bisphenol A and parabens in socks for infants and young children in Spain and their hormone-like activities. *Environ Int* 2019; 127: 592-600. [CrossRef]
50. Street ME, Bernasconi S. Endocrine-Disrupting Chemicals in Human Fetal Growth. *Int J Mol Sci* 2020; 21(4): 1430. [CrossRef]
51. Zhang XL, Wang HS, Liu N, Ge LC. Bisphenol A stimulates the epithelial mesenchymal transition of estrogen negative breast cancer cells via FOXA1 signals. *Arch Biochem Biophys* 2015; 585: 10-6. [CrossRef]
52. Arukwe A. Cellular and molecular responses to endocrine-modulators and the impact on fish reproduction. *Marine Pollution Bulletin* 2001; 42(8): 643-55. [CrossRef]
53. Ecotextiles. Bisphenol A in textile processing? <https://ecotextiles.wordpress.com/2011/12/16/bisphenol-a-in-textile-processing/> (accessed Jan 20, 2017).
54. Bisphenol A. Directive 2014/81/EU amending Appendix C of Annex II to directive 2009/48/EC. <http://www.btha.co.uk/wp-content/uploads/2015/06/BPA-Guide-Version-1.pdf> (accessed Jan 20, 2017).
55. Herva M, Alvarez A, Roca E. 2011. Sustainable and Safe Design of Footwear Integrating Ecological Footprint and Risk Criteria, *Journal of Hazardous Materials*, 2011;192. [CrossRef]
56. Greenpeace. Dirty laundry: Unravelling the corporate connections to toxic water pollution in China; Greenpeace International: Amsterdam, The Netherlands, 2014.
57. Hsieh TH, Tsai CF, Hsu CY, Kuo PL, Lee JN, Chai CY, et al. Phthalates stimulate the epithelial to mesenchymal transition through an HDAC6-dependent mechanism in human breast epithelial stem cells. *Toxicol Sci* 2012; 128: 365-76. [CrossRef]
58. Teilmann G, Juul A, Skakkevik NE, Toppari J. Putative effects of endocrine disrupters on pubertal development in the human. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2020; 16(1): 105-21. [CrossRef]
59. Geyer JH, Rimkus GG, Scheunert I, Kaune A, Schramm KW, Ketrup A, et al. Bioaccumulation and occurrence of endocrine disrupting chemicals (EDCs), persistent organic pollutants (POPs), and other organic compounds in fish and other organisms including humans. *The Handbook of Environmental Chemistry* 2000; 2: 1-166. [CrossRef]
60. Lacasse K, Baumann W. *Textile Chemicals: Environmental Data and Facts*. Springer Berlin Heidelberg: New York, 2004.p.609. [CrossRef]
61. Ecotextiles. Choosing a fabric for your new sofa. <https://ecotextiles.wordpress.com/tag/bisphenol-a/> (accessed Jan 20, 2017).
62. Xue J, Liu W, Kannan K. Bisphenols, Benzophenones, and Bisphenol A Diglycidyl Ethers in Textiles and Infant Clothing. *Environ Sci Technol* 2017; 51(9): 5279-5286. [CrossRef]
63. AndricNL, KosticTS, ZoricSN, StanicBD, AndricSA, KovacevicRZ. Effect of a PCB based transformer oil on testicular steroidogenesis and xenobiotic-metabolizing enzymes. *Reprod Toxicol* 2006; 22: 102-10. [CrossRef]
64. Herva M, Alvarez A, Roca E. Sustainable and Safe Design of Footwear Integrating Ecological Footprint and Risk Criteria, *Journal of Hazardous Materials* 2011.p.192. [CrossRef]
65. Eurofins, Analytical reports; Testing of textile with prints (Disney products), December 2003.
66. Nakajima T, Hopf NB, Schulte PA, Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) 2000. Internet Adresi: <https://monographs.iarc.fr/ENG/Publications/techrep42/TR42-18.pdf>, (accessed 08.03.2017)
67. Cetinkaya S. Endokrin Bozucular ve Ergenlik Üzerine Etkileri. *Dicle Tıp Dergisi* 2009; 36(1): 59-66.

68. Erkekoglu P, Kocer-Gumusel B. Environmental Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals: A Special Focus on Phthalates and Bisphenol A, Environmental Health Risk -Hazardous Factors to Living Species, Marcelo L. Larramendy and Sonia Soloneski, 2016 IntechOpen. [CrossRef]
69. European Commission. (2008, 2015). Opinion on the safety of medical devices containing DEHP - plasticized PVC or other plasticizers on neonates and other groups possibly at risk. (Available from: https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenihr_o_047.pdf)(accessed 09.03.2017)
70. Combarnous Y, Nguyen TMD. Comparative Overview of the Mechanisms of Action of Hormones and Endocrine Disruptor Compounds. *Toxics* 2019; 7(1): 5. [CrossRef]
71. Heudorf U, Mersch-Sundermann V, Angerer J. Phthalates: Toxicology and exposure. *Int J Hyg Environ Health* 2007; 210: 623-34. [CrossRef]
72. Bizzari S, Oppenberg B, Isikawa Y. *Plasticizers, Chemical Economics Handbook*, Palo Alto, CA: SRI International, 2000.
73. Giuliani A, Zuccarini M, Cichelli A, Khan H, Reale M. Critical Review on the Presence of Phthalates in Food and Evidence of Their Biological Impact. *Int J Environ Res Public Health* 2020; 17(16): 5655. [CrossRef]
74. NRC, Phthalates Cumulative Risk Assessment - The Tasks Ahead. Committee on Phthalates Health Risks, National Research Council, National Academy of Sciences, Board on Environmental Science and Technology, National Academy Press, Washington, DC, 2008.
75. Swan S, Sathyanarayana S, Barrett E, Janssen S, Liu F, Nguyen R, et al. First trimester phthalate exposure and anogenital distance in newborns. *Human Reproduction* 2015; 30(4): 963-72. [CrossRef]
76. Pich CD, Sauvageau D, VanlianM, Erythrope IHC, Robaire B, Leask RL. Effects of di- (2-ethylhexyl) phthalate and four of its metabolites on steroidogenesis in MA-10 cells. *Ecotoxicol Environ Safety* 2012; 79: 108-15. [CrossRef]
77. Chen X, Zhou QH, Leng L, Chen X, Sun ZR, Tang NJ. Effects of di(n-butyl) and monobutyl phthalate on steroidogenesis pathways in the murine Leydig tumor cell line MLTC-1. *Environ Toxicol Pharmacol* 2013; 36: 332-8. [CrossRef]
78. Jeddi MZ, Janani L, Memari AH, Akhondzadeh S, Yunesian M. The role of phthalate esters in autism development: A systematic review. *Environmental Research* 2016; 151: 493-504. [CrossRef]
79. Marina T, Guerra Hayley C, Furlong Wilma G, Kempinas Warren G, Foster. Effects of in vitro exposure to butylparaben and di-(2 ethylhexyl) phthalate, alone or in combination, on ovarian function. *Applied Toxicology* 2016; 36:1235-45. [CrossRef]
80. Cimini AM, Sulli A, Stefanini S, Serafini B, Moreno S, Rossi L, et al. Effects of Di-(2-ethylhexyl)phthalate on peroxisomes of liver, kidney and brain of lactating rats and their pups. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France)* 1994; 40(8): 1063-76.
81. Duty SM, Calafat AM, Silva MJ, Ryan L, Hauser R. Phthalate exposure and reproductive hormones in adult men. *Hum Reprod* 2005; 20(3): 604-10. [CrossRef]
82. Nakajima, Hopf NB, Schulte PA. Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) 2000 (Available from: <https://monographs.iarc.fr/ENG/Publications/techrep42/TR42-18.pdf>) (Accessed 08.03.2017)
83. Guo Y, Wu Q, Kannan K. Phthalate metabolites in urine from China, and implications for human exposures. *Environment International* 2011; 37(5): 893-8. [CrossRef]
84. Hines CJ, Hopf NB, Deddens JA, Silva MJ, Calafat AM. Estimated daily intake of phthalates in occupationally exposed groups. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology* 2011; 21(2): 133-41. [CrossRef]
85. European Commission. (2008, 2015). Opinion on the safety of medical devices containing DEHP - plasticized PVC or other plasticizers on neonates and other groups possibly at risk. (Available from:https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenihr_o_047.pdf.(Accessed 09.03.2017)
86. Green R, Hauser R, Calafat AM, Weuve J, Schettler T, Ringer S, et al. Use of di (2-ethylhexyl) phthalate-containing medical products and urinary levels of mono (2-ethylhexyl) phthalate in neonatal intensive care unit infants. *Environmental Health Perspectives* 2005; 1222-5. [CrossRef]
87. FDA (Food and Drug Administration) (2003). Safety Assessment of Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) Released from PVC Medical Devices. (Available from:: <https://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/.../UCM080457.pdf>). (Accessed 02.03.2017)
88. Carlstedt F, Jönsson B, Bornehag CG. PVC flooring is related to human uptake of phthalates in infants. *Indoor Air* 2013; 23(1): 32-9. [CrossRef]
89. Rudel RA, Perovich LJ. Endocrine disrupting chemicals in indoor and outdoor air. *Atmospheric Environment* 2009; 43(1): 170-81. [CrossRef]
90. Wittassek M, Angerer J. Phthalates: metabolism and exposure. *International Journal of Andrology* 2008; 31(2):131-8. [CrossRef]
91. Olsén L, Lind L, Lind PM. Associations between circulating levels of bisphenol A and phthalate metabolites and coronary risk in the elderly. *Ecotoxicol Environ Saf* 2012; 80: 179-83. [CrossRef]
92. Frederiksen H, Skakkebaek NE, Andersson AM. Metabolism of phthalates in humans. *Mol Nutr Food Res* 2007; 51(7): 899-911. [CrossRef]
93. Kim SH, Park MJ. Phthalate exposure and childhood obesity. *Ann Pediatr Endocrinol Metab* 2014; 19(2): 69-75. [CrossRef]
94. Ait Bamai Y, Araki A, Kawai T, Tsuboi T, Yoshioka E, Kanazawa A, et al. Comparisons of urinary phthalate metabolites and daily phthalate intakes among Japanese families. *Int J Hyg Environ Health* 2015; 218(5): 461-70. [CrossRef]
95. Pedersen H, Hartmann J. Greenpeace Investigations Corporate Crimes "The Walt Disney Company is always concerned with quality and safety" Letter To Greenpeace. Brussels, 2004; ISBN number: 90-73361-83-4, 2003.

The Association Between the Testis Microbiota and Male Infertility

Testis Mikrobiyotasının Erkek İnfertilitesi ile İlişkisi

Ayşe Altun¹ , Sibel Bulgurcuoğlu Kuran² , İlknur Keskin³ , Ateş Kadioğlu⁴ 

¹Department of Obstetrics and Gynaecology, Faculty of Medicine, Istanbul University, Turkey

²Department of Obstetrics and Gynaecology, Faculty of Medicine, Istanbul University, Turkey

³Department of Histology and Embryology, Medical Faculty, Istanbul Medipol University, Istanbul, Turkey

⁴Department of Urology, School of Medicine, Istanbul University, Turkey

ORCID ID: A.A. 0000-0002-2765-5766; S.B.K. 0000-0003-4267-2158; İ.K. 0000-0002-7059-1884; A.K. 0000-0002-4239-7638

Cite this article as: Altun A, Bulgurcuoğlu Kuran S, Keskin İ, Kadioğlu A. The association between the testis microbiota and male infertility. Experimed 2021; 11(2): 140-2.

ABSTRACT

In recent years, substantial findings have been reported about the effects of microbiota on human health. In our study, we aimed to compare the outcomes of microbiota assays of testicular tissue obtained by testicular sperm extraction (TESE) from 2 patients with male infertility. In the first patient who had azoospermia, Illumina sequencing detected the following bacterial flora in the collected tissue homogenates: Firmicutes (53%), Bacteroidetes (12%), Actinobacteria (12%), Proteobacteria (8%), Fusobacteria (8%), SR1 (7%), TM7-3 (3%) and OD-1 (1%). In the second patient who had oligozoospermia, Firmicutes (13%), Bacteroidetes (15%), Actinobacteria (7%) and Proteobacteria (64%) were detected in the testicular tissue. Our preliminary study confirmed that certain types of bacteria exist in testicular tissues of infertile men. Future studies with more infertile and healthy men are required to understand the importance of these microorganisms in the pathophysiology of male infertility.

Keywords: Testicular tissue, microbiota, male infertility

INTRODUCTION

The microbiota is a microorganism community operating in various parts of the human body (1). The bacterial microbiome (BM) has been described as an extracellular microenvironmental component (2). In recent years, much information has been collected about the effects of the microbiota on human health. Specifically, Alfano et al. (3) proved that the human testicle is not sterile and showed the content of microbiota in the testicular tissue. Another translational study revealed that intestinal microbiota could

ÖZ

Son yıllarda mikrobiyotanın insan sağlığı üzerindeki etkileri hakkında önemli bulgular rapor edilmiştir. Çalışmamızda erkek infertilitesi olan 2 hastadan testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) ile elde edilen testis dokusunun mikrobiyota analizinin sonuçlarını karşılaştırmayı amaçladık. Azospermik olan ilk hastada, toplanan doku homojenatlarında Illumina dizilemesi ile şu bakteri florasına saptandı: Firmicutes (%53), Bacteroidetes (%12), Actinobacteria (%12), Proteobacteria (%8), Fusobacteria (%8), SR1 (%7), TM7-3 (%3) ve OD-1 (%1). Oligozoospermi olan ikinci hastanın ise testis dokusunda Firmicutes (%13), Bacteroidetes (%15), Actinobacteria (%7) ve Proteobacteria (%64) bakterileri saptandı. Ön çalışmamızda, infertil erkeklerin testis dokusunda belirli bakteri türlerinin bulunduğu doğrulandı. Erkek infertilitesinin patofizyolojisinde bu mikroorganizmaların önemini anlamak için infertil ve sağlıklı erkeklerle yapılacak ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Testiküler doku, mikrobiyota, erkek infertilitesi

have an impact on sex hormone levels and consequently affect spermatogenesis (4).

In this preliminary study, we aimed to compare the outcomes of microbiota assays of testicular tissues obtained by testicular sperm extraction (TESE) from 2 infertile men (one with azoospermia and the other with oligozoospermia).

CASE REPORT

This study was approved by the Research Ethics Committee of Istanbul Medipol University on June 23, 2020

Corresponding Author/Sorumlu Yazar: Ayşe Altun **E-mail:** embaysealtun@gmail.com

Submitted/Başvuru: 30.06.2021 **Accepted/Kabul:** 03.08.2021



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

(E-10840098-604.01.01-6176). Both patients provided their written informed consent. After TESE surgery, testicular tissues were homogenized and stored at -80°C. Bacterial genes were obtained using 16S rRNA primers according to a DNA isolation kit protocol (Isolation kits for QuickGene, U.S.A). Then, bacterial variations and quantities were evaluated (5,6) using next-generation sequencing. Bacterial variations were distinguished through bioinformatics.

Case-1 and result

The first patient was a 34-year-old azoospermic man and TESE was performed twice for 2 *in vitro* fertilization (IVF) procedures. Serum Follicle-stimulating hormone (FSH), Luteinizing hormone (LH) and testosterone levels were normal, and the patient had 46 XY chromosomes with a normal karyotype. There was no microdeletion according to Y chromosome scanning. Only a low sperm count could be obtained from the patient by TESE and a small amount of the testicular tissue was used in microbiota analysis. The following bacteria were detected in the tissue by Illumina analysis: Firmicutes (53%), Bacteroidetes (12%), Actinobacteria (12%), Proteobacteria (8%), Fusobacteria (8%), SR1 (7%), TM7-3 (3%) and OD-1 (1%) (Figure 1).

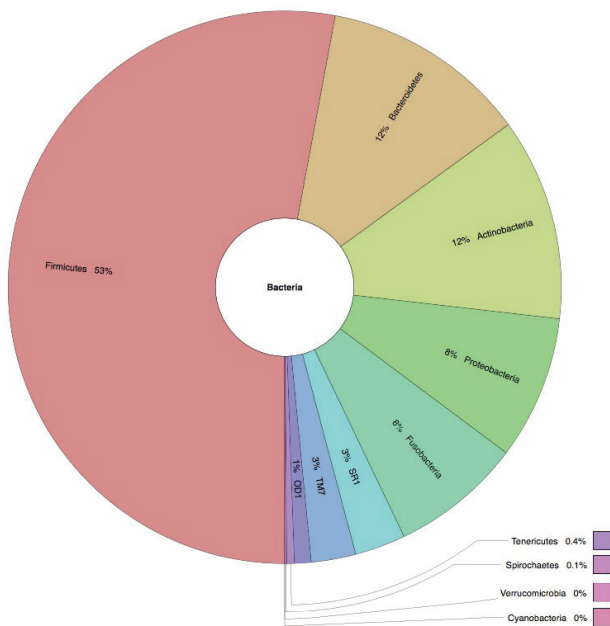


Figure 1. The precense of bacteria in the TESE microbiota of first patient.

Case-2 and result

The second patient was a 32-year-old man whose sperm concentration was 13 million/ml (total motility was 45% and sperm morphology was 6%). Testicular sperm cells were required for recurrent IVF failure. Serum FSH, LH and testosterone levels were normal, and the patient had 46 XY chromosomes and a normal karyotype. There was no microdeletion in the genetic scanning of the Y chromosome. Illumina testing revealed Firmicutes (13%), Bacteroidetes (15%), Actinobacteria (7%) and Proteobacteria (64%) (Figure 2).



Figure 2. The precense of bacteria in the TESE microbiota of second patient.

CONCLUSION

Sperm parameters are claimed to be affected by genetic and environmental factors (7). Sperm production occurs in the testes from spermatogonia in seminiferous tubules where Sertoli cells also provide structural and immunological support (8, 9). Spermatogenesis is claimed to be affected by the extracellular microenvironment as well (10). The testicular microbiome was initially demonstrated by Alfano et al in azoospermic men (3). This pivotal study showed that human testicles are not sterile and presented new findings about the testicular microbiome. However, the variety of the microorganisms in healthy, neoplastic and non-functioning testes (i.e., in infertile cases) has not been identified yet. Within this first time context, our results involved comparative analyses that were obtained from men with azoospermia and oligozoospermia, which revealed some differences in the distribution of the microorganisms.

In our pilot study, Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes and Proteobacteria were characterized as the dominant phyla. The involvement of Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria, SR1, TM7-3 and OD-1 bacteria in the azoospermic patient showed differences in the manner of variation. The Clostridia class of Firmicutes has been associated with sperm motility (11) and morphology (12). Thus, it can be associated with impaired sperm production. Proteobacteria, on the other hand, constituted the majority of the microorganisms in the oligozoospermic patient, suggesting that this class of bacteria may be a member of testicular flora in fertile male population. These findings may contribute to revealing

the role of microbiomes on male infertility. Future studies with more infertile and healthy men are required to understand the importance of these microorganisms in the pathophysiology of male infertility.

Acknowledgments: The authors would like to thank all participants and research assistants for their effort in soliciting cases and controls and conducting interviews.

Ethics Committee Approval: This study was approved by the Research Ethics Committee of Istanbul Medipol University on June 23, 2020 (E-10840098-604.01.01-6176). The two men in the study were given oral and written information about the study and ample time to consider their participation; both gave written consent. Furthermore, both men were informed about possible publication and gave written consent for their cases to be published.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study - A.A., S.B.K., İ.K., A.K.; Data Collection - A.A., S.B.K., İ.K., A.K.; Analysis and/or Interpretation - A.A., S.B.K., İ.K., A.K.; Drafting Manuscript - A.A., S.B.K., İ.K., A.K.; Final Approval and Accountability - A.A., S.B.K., İ.K., A.K.

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

Financial Disclosure: The financial part of our study was provided by our own budget and was supported by Diagen Biotechnological Systems.

Teşekkür: Yazarlar tüm katılımcılara ve araştırma görevlilerine vakaları ve kontrolleri talep etme ve görüşme yapma çabalarından dolayı teşekkür eder.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma, Medipol Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 23 Haziran 2020 tarihinde onaylanmıştır (E- 10840098-604.01.01-6176). İki erkek hastaya çalışma hakkında sözlü ve yazılı bilgi verilerek katılımlarını düşünmeleri için yeterli zaman verilmiştir. Her iki gönüllü yazılı olarak onay vermiştir. Ayrıca, her iki katılımcı olası yayın hakkında bilgilendirilerek yayınlanma için yazılı onay alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarımı - A.A., S.B.K., İ.K., A.K.; Veri Toplama - A.A., S.B.K., İ.K., A.K.; Veri Analizi/Yorumlama - A.A., S.B.K., İ.K., A.K.; Yazma - A.A., S.B.K., İ.K., A.K.; Son Onay ve Sorumluluk - A.A., S.B.K., İ.K., A.K.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Çalışmamızın mali kısmı kendi bütçemizden sağlanmış ve Diagen Biyoteknolojik Sistemler tarafından desteklenmiştir.

REFERENCES

1. Gevers D, Knight R, Petrosino JF, Huang K, McGuire AL, Birren BW, et al. The Human Microbiome Project: A community resource for the healthy human microbiome. *PLoS Biol* 2012; 10(8): e1001377.
2. Blaser M, Bork P, Fraser C, Knight R, Wang J. The microbiome explored: recent insights and future challenges. *Nat Rev Microbiol* 2013; 11: 213-7. [CrossRef]
3. Alfano M, Ferrarese R, Locatelli I, Ventimiglia E, Ippolito S, Gallina P, et al. Testicular microbiome in azoospermic men: first evidence of the impact of an altered microenvironment. *Hum Reprod* 2018; 33: 1212-7. [CrossRef]
4. Markle JG, Frank DN, Mortin-Toth S, Robertson CE, Feazel LM, Rolle-Kampczyk U, et al. Sex differences in the gut microbiome drive hormone-dependent regulation of autoimmunity. *Science* 2013; 339: 1084-8. [CrossRef]
5. Magoc T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* 2011; 27: 2957-63. [CrossRef]
6. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J* 2012; 6(8): 1621-4. [CrossRef]
7. Barazani Y, Katz BF, Nagler HM, Stember DS. Lifestyle, environment, and male reproductive health. *Urol Clin North Am* 2014; 41: 55-66. [CrossRef]
8. Vogl AW, Soucy LJ, Foo V. Ultrastructure of Sertoli-cell penetrating processes found in germ cells of the golden-mantled ground squirrel (*Spermophilus lateralis*). *Am J Anat* 1985; 172: 75-86. [CrossRef]
9. Hai Y, Hou J, Liu Y, Liu Y, Yang H, Li Z, et al. The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2014; 29: 66-75. [CrossRef]
10. Ryu BY, Orwig KE, Oatley JM, Avarbock MR, Brinster RL. Effects of aging and niche microenvironment on spermatogonial stem cell self-renewal. *Stem Cells* 2006; 24: 1505-11. [CrossRef]
11. Hou D, Zhou X, Zhong X, Settles ML, Herring J, Wang L, et al. Microbiota of the seminal fluid from healthy and infertile men. *Fertil Steril* 2013; 100: 1261-69. [CrossRef]
12. Weng SL, Chiu CM, Lin FM, Huang WC, Liang C, Yang T, et al. Bacterial communities in semen from men of infertile couples: metagenomic sequencing reveals relationships of seminal microbiota to semen quality. *PLoS One* 2014; 9: e110152.

EXPERIMED

AIMS AND SCOPE

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Editor in Chief: Prof. Bedia Çakmakoğlu

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

Phone: +90 212 414 2000-33305

Fax: +90 212 532 4171

E-mail: bedia@istanbul.edu.tr

Publisher: İstanbul University Press

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

Phone: +90 212 440 0000

EXPERIMED

AMAÇ VE KAPSAM

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

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

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

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

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

Derginin tüm masrafları İstanbul Üniversitesi tarafından karşılanmaktadır.

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

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

Baş Editör: Prof. Dr. Bedia Çakmakoğlu

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

Telefon: 0212 414 2000-33305

Faks: 0212 532 4171

E-posta: bedia@istanbul.edu.tr

Yayıncı: İstanbul Üniversitesi Yayınevi

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

Telefon: 0212 440 0000

EXPERIMED

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Context

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

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

Editorial Policy

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

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

Peer-Review Policy

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

Ethical Principles

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

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

Plagiarism

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

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

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

Authorship

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

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

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

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

EXPERIMED

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

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

Conflict of Interest

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

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

Copyright and Licensing

Authors publishing with the journal retain the copyright to their work licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (HYPERLINK "<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>" CC BY-NC 4.0) (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted, non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Open Access Statement

The journal is an open access journal and all content is freely available without charge to the user or his/her institution. Except for commercial purposes, users are allowed to read, download, copy, print, search, or link to the full texts of the articles in this journal without asking prior permission from the publisher or the author. This is in accordance with the HYPERLINK "<https://www.budapestopenaccessinitiative.org/read>" BOAI definition of open access.

The open access articles in the journal are licensed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Interna-

tional (HYPERLINK "<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/deed.en>" CC BY-NC 4.0) license. (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/deed.en>)

Disclaimer

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

MANUSCRIPT PREPARATION

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

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

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

Authors are required to submit the following:

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

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

Preparation of the Manuscript

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

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

EXPERIMED

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

Keywords: Each submission must be accompanied by a minimum of three to a maximum of six keywords for subject indexing at the end of the abstract. The keywords should be listed in full without abbreviations. The keywords should be selected from the National Library of Medicine, Medical Subject Headings database (<https://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>).

Manuscript Types

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

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

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

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

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

tion, Clinical and Research Consequences, and Conclusion sections. Please check Table 1 for the limitations for Review Articles.

Case Reports: There is limited space for case reports in the journal and reports on rare cases or conditions that constitute challenges in diagnosis and treatment, those offering new therapies or revealing knowledge not included in the literature, and interesting and educative case reports are accepted for publication. The text should include Introduction, Case Presentation, Discussion, and Conclusion subheadings. Please check Table 1 for the limitations for Case Reports.

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

Tables

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

Figures and Figure Legends

Figures, graphics, and photographs should be submitted as separate files (in TIFF or JPEG format) through the submission system. The files should not be embedded in a Word document or the main document. When there are figure subunits, the subunits should not be merged to form a single image. Each subunit should be submitted separately through the submission system. Images should not be labeled (a, b, c, etc.) to indicate figure subunits. Thick and thin arrows, arrowheads, stars, asterisks, and similar marks can be used on the images to support figure legends. Like the rest of the submission, the figures too should be blind. Any information within the images that may indicate an individual or institution should be

Table 1. Limitations for each manuscript type

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

EXPERIMED

blinded. The minimum resolution of each submitted figure should be 300 DPI. To prevent delays in the evaluation process, all submitted figures should be clear in resolution and large in size (minimum dimensions: 100 × 100 mm). Figure legends should be listed at the end of the main document.

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

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

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

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

References

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

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

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

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

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

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

Scientific or Technical Report: Cusick M, Chew EY, Hoogwerf B, Agrón E, Wu L, Lindley A, et al. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Risk factors for renal replacement therapy in the Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS), Early Treatment Diabetic Retinopathy Study *Kidney Int*: 2004. Report No: 26.

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

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

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

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

REVISIONS

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

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

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

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

EXPERIMED

YAZARLARA BİLGİ

İçerik

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

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

Yayın Politikası

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

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

Değerlendirme Süreci

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

Etik İlkeler

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

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

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

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

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

Yazarlık

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

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

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

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

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

EXPERIMED

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

Çıkar Çatışması

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

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

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

Telif ve Lisans

Yazarlar dergide yayınlanan çalışmalarının telif hakkına sahiptirler ve çalışmaları Creative Commons Atıf-GayriTicari 4.0 Uluslararası (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/deed.tr>) CCBY-NC 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/deed.tr>) olarak lisanslıdır. 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.

Açık Erişim İlkesi

Dergi açık erişimlidir ve derginin tüm içeriği okura ya da okurun dahil olduğu kuruma ücretsiz olarak sunulur. Okurlar, ticari amaç haricinde, yayıncı ya da yazardan izin almadan dergi makalelerinin tam metnini okuyabilir, indirebilir, kopyalayabilir, arayabilir ve link sağlayabilir. Bu HYPERLINK "<https://www.budapestopenaccessinitiative.org/translations/turkish-translation>" BOAI açık erişim tanımıyla uyumludur.

Derginin açık erişimli makaleleri Creative Commons Atıf-GayriTicari 4.0 Uluslararası (HYPERLINK "<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/deed.tr>") CC BY-NC 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/deed.tr>) olarak lisanslıdır.

Sorumluluk Reddi

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

MAKALE HAZIRLAMA

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

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

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

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

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

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

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

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

Makale Türleri

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

EXPERIMED

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

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

Editöryel Yorum: Dergide yayınlanan bir araştırmanın, o konunun uzmanı olan veya üst düzeyde değerlendirme yapan bir hakemi tarafından kısaca yorumlanması amacını taşımaktadır. Yazarları, dergi tarafından seçilip davet edilir. Özet, anahtar sözcük, tablo, şekil, resim ve diğer görseller kullanılmaz.

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

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

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

Tablolar

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

Resim ve Resim Altyazıları

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

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

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

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

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

Kaynaklar

Atıf yapılırken en son ve en güncel yayınlar tercih edilmelidir. Kaynakların doğruluğundan yazarlar sorumludur. Kaynaklar Vancouver referans stiline uygun olarak hazırlanmalıdır. Atıf yapılan erken çevrimiçi makalelerin DOI numaraları mutlaka sağlanmalıdır. Dergi

Tablo 1. Makale türleri için kısıtlamalar

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

EXPERIMED

isimleri Index Medicus/Medline/PubMed'de yer alan dergi kısaltmaları ile uyumlu olarak kısaltılmalıdır. Altı ya da daha az yazar olduğunda tüm yazar isimleri listelenmelidir. Eğer 7 ya da daha fazla yazar varsa ilk 6 yazar yazıldıktan sonra "et al" konulmalıdır. Ana metinde kaynaklara atıf yapılırken parantez içinde Arabik numaralar 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: 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: Bengissson S, Sothemin BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoff O, editors. *MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics*; 1992 Sept 6-10; Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992.p.1561-5.

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

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

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

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

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

REVİZYONLAR

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

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

Baş Editör: Prof. Dr. Bedia Çakmakoğlu

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

Telefon: 0212 414 2000-33305

Faks: 0212 532 4171

E-posta: bedia@istanbul.edu.tr

Yayıncı: İstanbul Üniversitesi Yayınevi

Adres: İstanbul Üniversitesi Merkez Kampüsü,

34452 Beyazıt, Fatih / İstanbul - Türkiye

Telefon: 0212 440 0000