

EXPERIMED

Volume/Sayı **81** Issue/Cilt **1** **April/Nisan** 2018

- » **GSBL Üreten Enterobacteriaceae'larda MEK'in Saptanması**
Gülşen Altınkanat Gelmez, Güner Söyletir
- » **SWAP-70 Deneysel MS Modeli**
Recai Türkoğlu, Canan Ulusoy, Vuslat Yılmaz
- » **Kronik Böbrek Yetmezliğinde Protein Oksidasyon Ürünleri**
Cihan Coşkun, Alev Kural, Macit Koldaş
- » **Pericytic Mediators in CIS Patients**
Tuncay Gündüz, Tuba Tanyel-Kiremitçi, Canan Ulusoy, Murat Kürtüncü,
Recai Türkoğlu
- » **Fosfoproteomikte Uygulama Basamakları**
Mustafa Gani Sürmen, Saime Sürmen, Sadrettin Pençe
- » **Ağır Malnutrisyon Smith Lemli Opitz Sendromu İlişkisi**
Işıl Özer
- » **Toe Walking Caused by Congenital Metabolic Diseases**
Işıl Özer



EXPERIMED

EDITORS/EDİTÖR

Erdem Tüzün

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

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

EDITORS/EDİTÖR KURULU

Ümit Zeybek

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

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

Cem İsmail Küçükali

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

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

Gaye Erten

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

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

Sema Sırma Ekmekçi

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

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

EDITORIAL BOARD/ YAYIN KURULU

İlhan Yaylım

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

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

Esin Aktaş Çetin

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

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

Özden Hatırnaz Ng

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

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

Numan Oezguen

Baylor College of Medicine,
Department of Pathology &
Immunology, Texas, USA

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

Gökçe Toruner

MD Anderson Cancer
Center, Department of
Hematopathology, USA

*MD Anderson Kanser
Merkezi, Hematoloji
Anabilim Dalı, ABD*

Elif Özkök

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

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

Aydın Çevik

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

*Istanbul Üniversitesi,
Aziz Sancar Deneysel
Tıp Araştırma Enstitüsü,
Laboratuvar Hayvanları
Bilimi Anabilim Dalı,
Istanbul, Türkiye*

Abid Hussaini

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

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

Ebba Lohmann

University of Tübingen,
Hertie Institute for Clinical
Brain Research, Department
Of Neurodegenerative
Diseases, Tübingen,
Germany

*Tübingen Üniversitesi,
Hertie Institute for
Clinical Brain Research,
Nörodejeneratif Hastalıklar
Anabilim Dalı, Tübingen,
Almanya*

Çağla Eroğlu

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

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

Gürol Tunçman

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

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



Publisher
İbrahim KARA

Publication Director
Ali ŞAHİN

Finance and Administration
Zeynep YAKIŞIRER

Deputy Publication Director
Gökhan ÇİMEN

Editorial Development
Gizem KAYAN

Publication Coordinators
Betül ÇİMEN

Özlem ÇAKMAK
Okan AYDOĞAN
İrem DELİÇAY
Büşra PARMAKSIZ
Nergis KALKAN
Arzu YILDIRIM

Project Assistants

Ecenur ASLİM
Neslihan KÖKSAL
Cansu ASLAN

Graphics Department

Ünal ÖZER
Deniz DURAN
Eylem SEZER

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

EXPERIMED

SECTION EDITORS/ BÖLÜM EDITÖRLERİ

Neurology/Sinirbilim

Atay Vural

Koç University School of Medicine,
Department of Neurology, İstanbul,
Turkey

*Koç University School of Medicine,
Department of Neurology, İstanbul,
Turkey*

Medical Biology/ Tıbbi Biyoloji

Duygu Gezen-Ak

İstanbul University Cerrahpaşa
School of Medicine, Department
of Medical Biology, İstanbul, Turkey

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

Immunology/İmmünoloji

Umut Can Küçüksezer

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

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

Molecular Medicine/ Moleküler Tıp

Bedia Çakmakoğlu

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

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

Genetics/Genetik

Evrım Kömürcü Bayrak

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

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

Laboratory Animals Science/ Laboratuvar Hayvanları

Rivaze Kalaycı

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

*İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar
Deneyel Tıp Araştırma Enstitüsü,
Laboratuvar Hayvanları Bilimi
Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye*

Medical Pharmacology/ Farmakoloji

Ahmet Gökhan Akkan

İstanbul University Cerrahpaşa
School of Medicine, Department
of Medical Pharmacology, İstanbul,
Turkey

*İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa
Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji
Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye*

Physiology/Fizyoloji

Gökhan Metin

İstanbul University Cerrahpaşa
School of Medicine, Department
of Physiology, İstanbul, Turkey

*İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp
Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı,
İstanbul, Türkiye*

Biochemistry/Biyokimya

Güzide Şule Seçkin

İstanbul University İstanbul School
of Medicine, Department of
Medical Biochemistry, İstanbul,
Turkey

*İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp
Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim
Dalı, İstanbul, Türkiye*

Sports Medicine/ Spor Bilimleri

Bülent Bayraktar

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

*İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp
Fakültesi, Spor Hekimliği Anabilim
Dalı, İstanbul, Türkiye*

Biyomedical/Biyomedikal

Olcay Güneş

İstanbul Technical University,
School of Electrical and
Electronics Engineering,
Department of Electronics and
Communication Engineering,
İstanbul, Turkey

*İstanbul Teknik Üniversitesi Elektrik-
Elektronik Fakültesi, Elektronik ve
Haberleşme Mühendisliği Bölümü,
İstanbul, Türkiye*

Internal Medicine/ Dahili Tıp Bilimleri

Esme Ekizoğlu

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

*İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp
Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı,
İstanbul, Türkiye*

General Surgery/ Cerrahi Tıp Bilimleri

Nihat Aksakal

İstanbul University İstanbul School
of Medicine, Department of
General Surgery, İstanbul, Turkey

*İstanbul Üniversitesi İstanbul
Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Dalı,
İstanbul, Türkiye*

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 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.

All published content is available online, free of charge at <http://experimed.istanbul.edu.tr/en/>

İstanbul University holds the international copyright of all the content published in the journal.

Editor in Chief: Prof. Erdem Tüzün

Address: Vakıf Gureba Avenue, İstanbul Medical Faculty Campus, 34093, Fatih, İstanbul, Turkey

Phone: 0212-4142000-33356

Fax: 0212-5324171

E-mail: erdemtuzun@istanbul.edu.tr

Publisher: AVES

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

Phone: +90 212 217 17 00

Fax: +90 212 217 22 92

E-mail: info@avesyayincilik.com

Web page: avesyayincilik.com

EXPERIMED

AMAÇ VE KAPSAM

Experimed; İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Araştırma Enstitüsü'nün çift-kör hakemli, 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/tr/_ sayfasındaki online makale değerlendirme sistemi kullanılarak dergiye gönderilmelidir. 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.

Yayınlanan tüm içeriğe http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/_ adresinden ücretsiz olarak erişilebilir.

Dergide yayınlanan içeriğin tüm telif hakları İstanbul Üniversitesi'ne aittir.

Baş Editör: Prof. Dr. Erdem Tüzün
Address: Vakıf Gureba Caddesi, İstanbul Tıp Fakültesi Kampüsü, 34093, Fatih, İstanbul, Türkiye
Phone: 0212-4142000-33356
Fax: 0212-5324171
E-mail: erdemtuzun@istanbul.edu.tr

Publisher: AVES
Address: Büyükdere Avenue, 105/9 34394 Mecidiyeköy, Şişli, İstanbul, Turkey
Phone: +90 212 217 17 00
Fax: +90 212 217 22 92
E-mail: info@avesyayincilik.com
Web page: avesyayincilik.com

EXPERIMED

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

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

Manuscripts submitted to 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.

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 de-

tailed 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.

All submissions are screened by a similarity detection software (iThenticate by CrossCheck).

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

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

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

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

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

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

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

EXPERIMED

short statement declaring that he/she accepts to undertake all the responsibility for authorship during the submission and review stages of the manuscript.

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 ombudsman 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.

When submitting a manuscript to Experimed, authors accept to assign the copyright of their manuscript to İstanbul University. If rejected for publication, the copyright of the manuscript will be assigned back to the authors. Experimed requires each submission to be accompanied by a Copyright Transfer Form (available for download at <http://experimed.istanbul.edu.tr/en/>). When using previously published content, including figures, tables, or any other material in both print and electronic formats, authors must obtain permission from the copyright holder. Legal, financial and criminal liabilities in this regard belong to the author(s).

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 Transfer Form,
- Author Contributions Form, and
- ICMJE Potential Conflict of Interest Disclosure Form (should be filled in by all contributing authors)

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

Preparation of the Manuscript

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

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

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

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

EXPERIMED

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

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

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

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

Case Reports: There is limited space for case reports in the journal and reports on rare cases or conditions that constitute challenges in diagnosis and treatment, those offering new therapies or revealing knowledge not included in the literature, and interesting and educative case reports are accepted for publication. The text should include Introduction, Case Presentation, Discussion, and Conclusion subheadings. Please check Table 1 for the limitations for Case Reports.

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

words, and Tables, Figures, Images, and other media should not be included. The text should be unstructured. The manuscript that is being commented on must be properly cited within this manuscript.

Tables

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

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

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)"

Table 1. Limitations for each manuscript type

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

EXPERIMED

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

Journal Article: Rankovic A, Rancic N, Jovanovic M, Ivanovi 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.299-308.

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

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

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

Scientific or Technical Report: Cusick M, Chew EY, Hoogwerf B, Agrón E, Wu L, Lindley A, et al. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Risk factors for renal replacement therapy in the Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS), Early Treatment Diabetic Retinopathy Study *Kidney Int*: 2004. Report No: 26.

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

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

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

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

REVISIONS

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

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

Editor in Chief: Prof. Erdem Tüzün
Address: Vakıf Gureba Avenue, Istanbul Medical Faculty Campus, 34093, Fatih, İstanbul, Turkey
Phone: 0212-4142000-33356
Fax: 0212-5324171
E-mail: erdemtuzun@istanbul.edu.tr

Publisher: AVES
Address: Büyükdere Cad. 105/9 34394 Mecidiyeköy, Şişli, İstanbul, Turkey
Phone: +90 212 217 17 00
Fax: +90 212 217 22 92
E-mail: info@avesyayincilik.com
avesyayincilik.com

EXPERIMED

YAZARLARA BİLGİ

Experimed; İstanbul Üniversitesi Aziz Sançar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nün çift-kör hakemli 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.

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

Özgünlük, yüksek bilimsel kalite ve atıf 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 süresinin hızlanmasını sağlayacaktır. Toplantılarda sunulan çalışmalar için, sunum yapılan organizasyonun tam adı, tarihi, şehri ve ülkesi belirtilmelidir.

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.

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 numarası 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.

Bütün makalelerin benzerlik tespiti denetimi, iThenticate yazılımı aracılığıyla yapılmaktadır.

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

Yazar olarak listelenen herkesin ICMJE (www.icmje.org) tarafından önerilen yazarlık kriterlerini karşılaması gerekmektedir. ICMJE, yazarların aşağıdaki 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 lütfü yazarlığın 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 "lütfü yazarlık" olduğundan şüphelenmesi durumunda söz konusu makale değerlendirme yapılmaksızın reddedilecektir. Makale gönderimi kapsamında; sorumlu yazar makale gönderim ve değerlendirme süreçleri boyunca yazarlık ile ilgili tüm sorumluluğu kabul ettiğini bildiren kısa bir ön yazı göndermelidir.

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 potansi-

EXPERIMED

Yayın dışı 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.

Experimed'e makale gönderirken yazarlar makalelerinin telif haklarını İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'ne devretmeyi kabul ederler. Reddedilen makalelerin telif hakları yazarlarına geri iade edilecektir. Experimed her makalenin http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/_ adresinden erişebileceğiniz Yayın Hakkı Devir Formu ile beraber gönderilmesini talep eder. Yazarlar, basılı ya da elektronik formatta yer alan resimler, tablolar ya da diğer her türlü içerik dahil daha önce yayınlanmış içeriği kullanırken telif hakkı sahibinden izin almalıdırlar. Bu konudaki yasal, mali ve cezai sorumluluk yazarlara aittir.

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, tanısıl değerli çalışmalar STARD, sistematik derleme ve meta-analizler PRISMA, hayvan deneyli çalışmalar ARRIVE ve randomize olmayan davranış ve halk sağlığıyla ilgili çalışmalar TREND kılavuzlarına uyumlu olmalıdır.

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

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

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

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

- Makalenin başlığını ve 50 karakteri geçmeyen kısa başlığını,
- Yazarların isimlerini, kurumlarını, ORCID numaralarını ve eğitim derecelerini,

- Finansal destek bilgisi ve diğer destek kaynakları hakkında detaylı bilgiyi,
- Sorumlu yazarın ismi, adresi, telefonu (cep telefonu dahil ve e-posta adresini),
- Makale hazırlama sürecine katkıda bulunan ama yazarlık kriterlerini karşılamayan bireylerle ilgili bilgileri içermelidir.

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

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

Makale Türleri

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

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

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

Editöryel Yorum: Dergide yayınlanan bir araştırmanın, o konunun uzmanı olan veya üst düzeyde değerlendirme yapan bir hakemi 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 atıf sayısı olarak yansıtmış 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.

EXPERIMED

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 yazılması 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 açıklamaları 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 olmalılardır.

Resim ve Resim Altyazıları

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

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

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

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

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

Kaynaklar

Atıf yapılırken en son ve en güncel yayınlar tercih edilmelidir. Atıf yapılan erken çevrimiçi makalelerin DOI numaraları mutlaka sağlanmalıdır. Kaynakların doğruluğundan yazarlar sorumludur. Dergi isimleri Index Medicus/Medline/PubMed'de yer alan dergi kısaltmaları ile uyumlu olarak kısaltılmalıdır. Altı ya da daha az yazar olduğunda tüm yazar isimleri listelenmelidir. Eğer 7 ya da daha fazla yazar varsa ilk 6 yazar yazıldıktan sonra "et al" kullanılmalıdır. 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: HHSIGOE 169200860.

Tablo 1. Makale türleri için kısıtlamalar

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

EXPERIMED

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 gönderil-

melidir. 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.

Editor in Chief: Prof. Erdem Tüzün

Address: Vakıf Gureba Avenue, Istanbul Medical Faculty Campus, 34093, Fatih, İstanbul, Turkey

Phone: 0212-4142000-33356

Fax: 0212-5324171

E-mail: erdemtuzun@istanbul.edu.tr

Publisher: AVES

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

Phone: +90 212 217 17 00

Fax: +90 212 217 22 92

E-mail: info@avesyayincilik.com

avesyayincilik.com

EXPERIMED

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

- 1** Determination of Mutant Prevention Concentration in Extended Spectrum Beta Lactamases Producing *Enterobacteriaceae*
Gülşen Altınkanat Gelmez, Güner Söyletir
- 7** Impact of Intraventricular Administration of SWAP-70 Antibody Positive Multiple Sclerosis Serum Antibodies on Motor Activity and Brain Histology
Recai Türkoğlu, Canan Ulusoy, Vuslat Yılmaz
- 11** Evaluation of Protein Oxidation Products in Patients With Chronic Renal Failure Receiving Dialysis or Not
Cihan Coşkun, Alev Kural, Macit Koldaş
- 18** Cerebrospinal Fluid Analysis of Pericytic Mediators in Clinically Isolated Syndrome and Multiple Sclerosis: A Preliminary Study
Tuncay Gündüz, Tuba Tanyel-Kiremitçi, Canan Ulusoy, Murat Kürtüncü, Recai Türkoğlu

REVIEW

- 23** An Overview of The Phosphoproteomic Workflow
Mustafa Gani Sürmen, Saime Sürmen, Sadrettin Pençe

CASE REPORTS

- 33** Smith–Lemli–Opitz Syndrome: A Rare Cause of Severe Malnutrition
Işıl Özer
- 37** Toe Walking Caused by Congenital Metabolic Diseases following a Specific Case
Işıl Özer

- S1** Abstracts for Aziz Sancar IEM Days 2017

EXPERIMED

İÇİNDEKİLER

ORJİNAL ARAŞTIRMALAR

- 1 Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz Üreten *Enterobacteriaceae*'larda Mutant Engelleme Konsantrasyonunun Saptanması**
Gülşen Altınkanat Gelmez, Güner Söyletir
- 7 SWAP-70 Antikoru Pozitif Multipl Skleroz Serum Antikorlarının İntraventriküler Uygulamasının Motor Aktivite ve Beyin Histolojisine Etkileri**
Recai Türkoğlu, Canan Ulusoy, Vuslat Yılmaz
- 11 Diyaliz Tedavisi Uygulanan ve Uygulanmayan Kronik Böbrek Yetmezlikli Hastalarda Protein Oksidasyon Ürünlerinin Değerlendirilmesi**
Cihan Coşkun, Alev Kural, Macit Koldaş
- 18 Klinik İzole Sendrom ve Multipl Skleroz Hastalarının Beyin Omurilik Sıvılarında Perisitik Mediatörlerin Analizi: Pilot Çalışma**
Tuncay Gündüz, Tuba Tanyel-Kiremitçi, Canan Ulusoy, Murat Kürtüncü, Recai Türkoğlu

DERLEME

- 23 Fosfoproteomik Uygulama Basamaklarına Genel Bakış**
Mustafa Gani Sürmen, Saime Sürmen, Sadrettin Pençe

OLGU SUNUMLARI

- 33 Ağır Malnutrisyon Nadir Bir Sebebi Olarak Smith Lemli Opitz Sendromu**
İşıl Özer
- 37 Bir Olgu Nedeniyle Doğumsal Metabolik Hastalıklara Bağlı Parmak Ucunda Yürüme**
İşıl Özer
- S1 IX. Aziz Sancar DETAE Günleri 2017 Özetleri**

Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz Üreten *Enterobacteriaceae*'larda Mutant Engelleme Konsantrasyonunun Saptanması

Determination of Mutant Prevention Concentration in Extended Spectrum Beta Lactamases Producing *Enterobacteriaceae*

Gülşen Altınkanat Gelmez , Güner Söyletir 

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

Cite this article as: Altınkanat Gelmez G, Söyletir G. Determination of Mutant Prevention Concentration in Extended Spectrum Beta Lactamases Producing *Enterobacteriaceae*. Experimed 2018; 8(1): 1-6.

ÖZ

Amaç: Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) üreten *Enterobacteriaceae* kökenleri ile gelişen enfeksiyonların tedavisinde karbapenemlerin sıklıkla kullanılması beraberinde karbapenem direnci gelişmesine neden olmuştur. Bu nedenle çalışmamızda karbapenemlerin mutant engelleme konsantrasyonlarının (MEK) saptanması ve tedavi sırasında gelişen dirence GSBL üretiminin herhangi bir etkisinin olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmaya test grubu olarak, imipenem ve meropenem Mik=<1 mg/L olan, fenotipik ve genotipik yöntemlerle GSBL enzimlerinden en az birine sahip olan (n=56) ve kontrol grubu olarak araştırılan enzimlerden hiçbirini içermeyen (n=19) *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* kökeni dahil edilmiştir. Kökenlerin imipenem, meropenem, ertapenem ve doripenem minimal inhibitör konsantrasyonları (Mik) ve mutant engelleme konsantrasyonları (MEK) agar dilüsyon yöntemiyle çalışılmıştır.

Bulgular: GSBL (-) kökenlerin MEK90 değerleri duyarlı sınırlarda kalır iken, GSBL üreten kökenlerde MEK90 değerleri 2-8 µg/mL'e kadar çıkmıştır. GSBL(+) kökenlerde karbapenem MEK değerleri GSBL(-) kökenlere kıyasla 2-9 kat daha yüksek bulunmuş ancak GSBL enzim türlerinin (TEM, SHV, CTX-M) bu dirence katkı açısından aralarında bir farklılık olmadığı saptanmıştır. GSBL(+) kökenlerde imipenem ve meropenem 0,015-0,06 µg/mL gibi çok düşük Mik değerlerinde bile yaklaşık %50 oranında mutant seçimine neden olmaktadır.

Sonuç: Bu verilere göre; i) Köken karbapenem duyarlı olsa da GSBL üretimi karbapenem dirençli mutant seçimine neden olabilir gibi gözükmektedir. ii) Doripenem ve ertapenem en az, imipenem ve meropenem en fazla mutant seçen karbapenemlerdir.

Anahtar Kelimeler: Mutant Engelleme Konsantrasyonu, GSBL, *Enterobacteriaceae*

ABSTRACT

Objectives: The use of carbapenems for treating infections caused by extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* has increased. Consequently, this practice has resulted in the emergence of carbapenem resistance. In this study, we aimed to determine mutant prevention concentrations (MPCs) of carbapenems and the development of carbapenem resistance in infections caused by ESBL-producing bacteria.

Material and Method: The test group included isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* that produced imipenem and meropenem minimum inhibitor concentration (MIC) <1 mg/L and at least one of the ESBL (n=56). Negatives isolates (n=19) for all tested enzymes comprised the control group. Carbapenems included in the study were imipenem, meropenem, doripenem, and ertapenem. The MIC and MPC values of these drugs were determined using the agar dilution method for all tested organisms.

Results: In ESBL-negative isolates, the MPC90 values were in the susceptible range. In contrast, in the ESBL positive isolates, MPC90 value increased to 2-8 mg/L. The MPC values were 2- to 9-fold higher in the ESBL-producing strains compared with the non-ESBL strains. However, the mutant selection rate was not affected by the ESBL enzymes types (TEM, SHV, and CTX-M). In ESBL-positive strains, imipenem and meropenem, even at very low MICs (0.015-0.06 µg/mL), showed selective carbapenem-resistant mutants at a rate of 50%.

Conclusion: Our results suggest the following conclusions. i) ESBL production seems to increase carbapenem resistance in mutant strains, even though these are carbapenem susceptible in routine tests. ii) Among carbapenems, doripenem and ertapenem have the least potential for mutant selection whereas imipenem and meropenem have the most potential.

Keywords: Mutant Prevention Concentration (MPC), ESBL, *Enterobacteriaceae*

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

Geliş Tarihi/Received Date: 11.01.2018 **Kabul Tarihi/Accepted Date:** 01.02.2018 **Çevrimiçi Yayın Tarihi/Available Online Date:** 09.05.2018

© Copyright 2018 by The Istanbul University Faculty of Science • Available online at <http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/>

© Telif Hakkı 2018 İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi • Makale metnine http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/_sayfasından ulaşılabilir.

GİRİŞ

Enterobacteriaceae üyelerinde beta laktam direncinden sıklıkla sorumlu olan mekanizma genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) üretimidir. Özellikle *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* kökenlerinde görülür ve sayıları 350'yi aşan genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar (GSBL) ile oluşan direnç tüm dünyada ve ülkemizde hızla artarak önemli bir sorun haline gelmiştir. Karbapenemler dışında hemen hemen tüm beta laktamlara direnç gelişimine neden olan GSBL üretimi tedavide kullanılacak etkin antibiyotik sayısını kısıtlamaktadır. Karbapenemler GSBL üreten mikroorganizmalar için oldukça etkili, sıklıkla başvuru birinci seçenek antibiyotiklerdir. Ancak yıllar içerisinde GSBL üreten *Enterobacteriaceae* üyelerinin neden olduğu enfeksiyonların artmasına paralel olarak karbapenemlerin sıklıkla kullanılması beraberinde karbapenem direnç oranlarında artışa neden olmuştur (1-3). Bunun en iyi göstergesi, hastanemizde *K. pneumoniae* kökenlerinde 2008 yılında karbapenem direnci %1 iken, 2012 yılı itibarıyla bu oran % 5, 2016 yılı itibarıyla %20'ye yükseldiği gözlemlenmiştir. *Enterobacteriaceae* üyelerinde karbapenem direncine neden olan en önemli mekanizma karbapenemleri hidroliz eden bir karbapenemaz üretimidir. Ancak son yıllarda karbapenemlerle tedavi sırasında dış membran proteinlerinde (OMP) meydana gelen nokta mutasyonlarının neden olduğu karbapenem direncinde de artış olduğu bildirilmektedir. Özellikle *E. coli*'de *OmpF* ve *OmpC*, *K. pneumoniae*'de *OmpK35* ve *OmpK36* porinlerinde meydana gelen mutasyonların karbapenem direncinde önemli rol oynadığı belirlenmiştir. Buna ek olarak, yapılan çalışmalarda GSBL veya *AmpC* beta laktamazların aşırı üretimine ilaveten OMP'lerde mutasyon meydana gelmesinin yüksek düzey karbapenem direncine yol açtığı gösterilmiştir (2, 4, 5). Bu şekilde gelişen karbapenem direncinin gelecekte yol açabileceği sorun düşündürücüdür. Ülkemizde enterik bakterilerdeki GSBL pozitif mikroorganizma oranlarının azımsanmayacak düzeylerde olması ve bunlara bağlı enfeksiyonların tedavisinde karbapenemlerin yaygın kullanımı gelecekte mutasyona bağlı karbapenem direnci ile karşı karşıya kalacağımızın göstergesi olabilir. Bu nedenle karbapenemlerle tedavi sırasında OMP mutantlarının oluşmasını engelleyecek yeni stratejilerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Son yıllarda araştırmacılar, mutant bakterilerin neden olduğu antimikrobiyal direncin önüne geçilmesinde yeni bir yaklaşım olan "Mutant Engelleme Konsantrasyonu (MEK)" kavramını gündeme getirmişlerdir. Araştırmacılar spontan nokta mutasyonları ile gelişen dirençli mutant kökenlerin ancak yüksek inokulum varlığında (10^{10} cfu/mL) saptanabileceğinden bahsetmektedirler. *In vitro* duyarlılık testlerinde yüksek bakteri yoğunluğunda birinci basamak mutant kökenlerin inhibisyonuna neden olan konsantrasyonun saptanmasının enfeksiyon bölgesindeki gerçek direnci daha iyi yansıtacağı belirtilmektedir. Geleneksel tedavi protokolleri ise antibiyotiklerin minimum inhibitör konsantrasyonlarına (MİK) göre belirlenmektedir. Ancak MİK sadece duyarlı bakteri popülasyonunu hedef alan ve dirençli mutant kökenler hakkında bilgi vermeyen bir parametredir. Bu nedenle tedavi sırasında mutant bakterilerin seleksiyona izin vermeyen MEK, direnç gelişiminin önlenmesinde yeni bir tedavi stratejisi olmaya adaydır (6-9).

Karbapenemlerin gram negatif bakterilerde MEK değerlerinin belirlenmesi, tedavide kullanılacak doz aralığının güvenli olup olmadığını belirleyecektir. Karbapenem grubu antibiyotiklerin etkilerini kaybetmeden, daha etkin kullanılabilmesi için oluşturabilecekleri mutant seleksiyon sıklığının ve MEK'in belirlenmesiyle gelecekte mutasyona bağlı gelişebilecek karbapenem direncinin önlenmesinde önemli bir adım olacaktır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bakterilerin Seçimi

Çalışmamızda, Marmara Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında çeşitli klinik örneklerden etken olarak izole edilen ve otomatize sistem (VITEK, BioMerieux, Fransa) ile tanımlanmış; i) İmipenem ve meropenem MİK değerleri $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ ii) GSBL enzimlerinden en az birini ürettiği fenotipik yöntemlerle saptanan iii) Genotipik olarak GSBL (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}) genlerinden en az birini taşıyan *E. coli* ve *K. pneumoniae* kökenleri çalışmaya dahil edilmiştir. Kontrol grubu olarak fenotipik ve genotipik olarak test edilen hiçbir enzimi üretmediği saptanan *E. coli* ve *K. pneumoniae* kökenleri alınmıştır.

Fenotipik Yöntemler: GSBL üretiminin fenotipik olarak doğrulanmasında CLSI önerileri doğrultusunda seftazidim (CAZ), seftaksim (CTX), seftazidim klavulanik asit (CAZ/CLA) ve seftaksim klavulanik asit (CTX/CLA) kullanılarak kombine disk yöntemi kullanılmıştır. Sefalosporinlerin tek başlarına oluşturdukları zon çapı ile klavulanik asitli bileşikler arasında >5mm fark olması GSBL üretimi açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir (10).

Genotipik Yöntemler: Kökenlerde GSBL (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}), genlerinin varlığı uygun primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu(PCR) ile araştırılmıştır. Kökenlerin DNA'ları üretici firmanın önerileri doğrultusunda High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) kullanılarak izole edilmiştir. 10X PCR buffer, 2 mM dNTP, 3 pmol primer, 2,5 mM MgCl₂, 1 U Taq DNA polimeraz ve 2 μl of genomik DNA içeren 50 μl 'lık PCR karışımı hazırlanıp her gen için uygun reaksiyon koşulları kullanılarak amplifikasyon gerçekleştirilmiştir (11).

Minimum İnhibitör Konsantrasyonu ve Mutant Engelleme Konsantrasyonunun Belirlenmesi:

Fenotipik ve genotipik yöntemlerle GSBL enzimlerinden en az birini ürettiği saptanan test kökenleri ile araştırılan enzimleri üretmediği belirlenen *E. coli* ve *K. pneumoniae* kontrol kökenlerinde imipenem, meropenem, ertapenem ve doripenem MİK'leri CLSI standartlarına uygun olarak agar dilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir (10). Mutant engelleme konsantrasyonunun belirlenmesi için her bir köken bir gece katyon eklenmiş Müeller Hinton Agar'da (CA-MHA) inkübe edildikten sonra üreyen tüm bakteriler bir eküvyon yardımıyla toplanarak 100 ml katyon eklenmiş Müeller Hinton Broth'da(CA-MHB) süspansiyon edilmiştir. Süspansiyonlar çalkalayıcı etüde bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, spektrofotometrede 600nm dalga boyunda absorbans 1 olacak şekilde bakteri süspansiyonu ($>10^{10}$ cfu/mL) hazırlanmıştır. Elden edilen süspansiyon +4°C'de 5000g'de 30 dakika santrifüj edilip sediment 4 ml CA-MHB ile tekrar süspansiyon edilmiştir. İmipenem (0,06-256 $\mu\text{g/mL}$) meropenem (0,008-256 $\mu\text{g/mL}$), dori-

penem (0,015-256 µg/mL) ve ertapenemin (0,004-256 µg/mL) belirtilen konsantrasyonlarını içeren CA-MHA besiyerleri hazırlanarak, >10¹⁰ cfu/mL içeren bakteri süspansiyonundan 100 µl inoküle edilip ve 48 saat 35-37 °C'de inkübe edilmiştir. Hem 24. hem de 48. saatlerde petriyeler kontrol edilip mutant kökenlerin üremesini inhibe eden en düşük konsantrasyon MEK değeri olarak kaydedilmiştir (12).

BULGULAR

Yapılan fenotipik test sonuçlarına göre 56 kökenin GSBL ürettiği tespit edilmiştir. Fenotipik olarak GSBL pozitif bulunan kökenlerin 23 tanesi tek gen [TEM(n=8), SHV(n=5), CTX-M(n=10)], 23 tanesi 2 gen [TEM+SHV(n=2), TEM+CTX-M(n=11), SHV+CTX-M(n=10)], 10 tanesi 3 geni(TEM+SHV+CTX-M) bir arada

içerdiği tespit edilmiştir. Araştırılan enzimlerden hiçbirini içermeyen 9 *E. coli*, 10 *K. pneumoniae* kökeni kontrol grubu olarak test edilmiştir.

GSBL negatif kökenler tüm karbapenmlere duyarlı bulunurken, GSBL pozitif kökenlerde, imipenem, meropenem ve doripenem MİK değerleri duyarlılık sınırlarında saptanmıştır. Ertapenem MİK'leri ise 1 *E. coli*, 2 *K. pneumoniae* kökeninde dirençlilik sınırının üzerinde (MİK=2-4 µg/mL) bulunmuştur (Tablo 1).

GSBL negatif kökenlerin imipenem, meropenem, doripenem ve ertapenem MİK₉₀ değerleri 0,03-0,25 µg/mL iken MEK₉₀ değerleri 0,125-1µg/mL arasında olup duyarlılık sınırları içerisinde bulunmuştur. Ancak bu kökenlerde imipenem için saptanan MEK₉₀ değerlerinin 1µg/mL olarak bulunması karbapenem gru-

Tablo 1. Kökenlerin MİK50 ve MİK90 değerleri

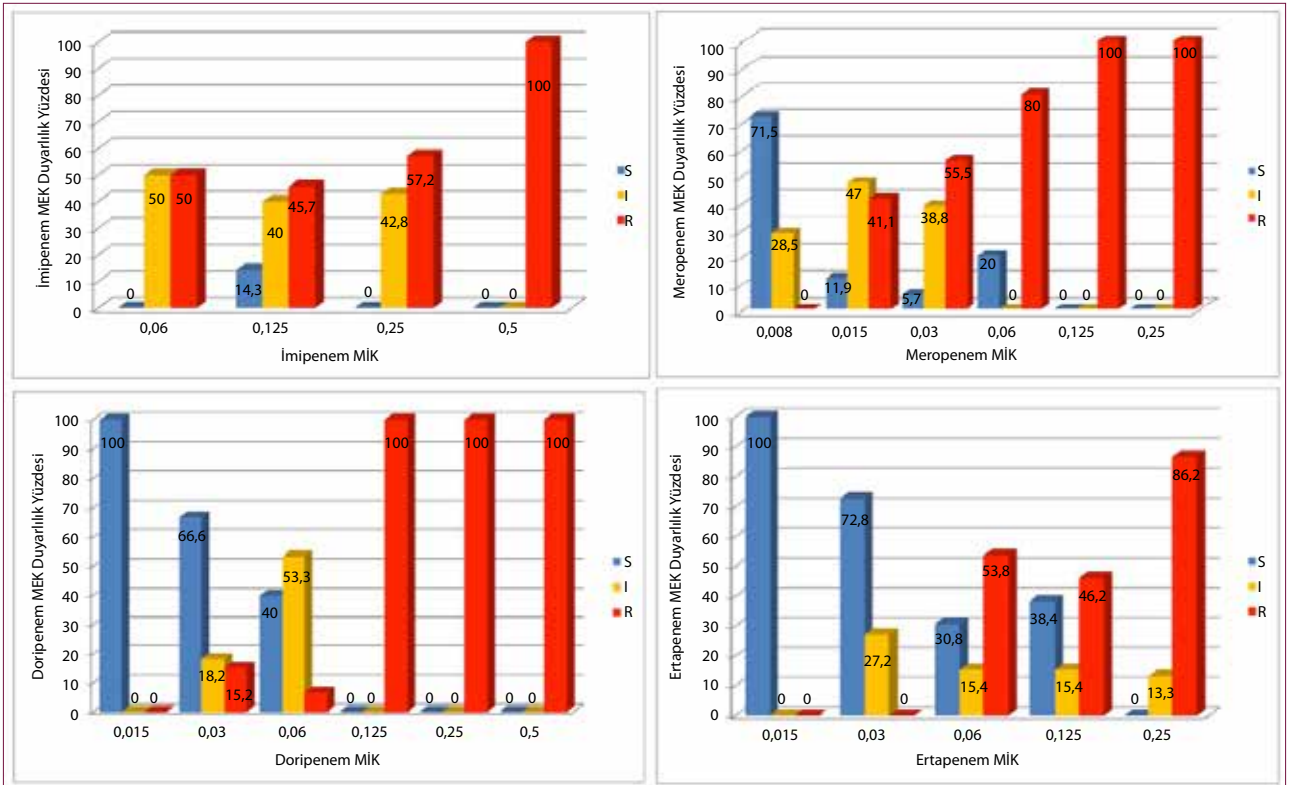
Kökenler	İmipenem			Meropenem			Doripenem			Ertapenem		
	MİK Aralığı	MİK ₅₀	MİK ₉₀	MİK Aralığı	MİK ₅₀	MİK ₉₀	MİK Aralığı	MİK ₅₀	MİK ₉₀	MİK Aralığı	MİK ₅₀	MİK ₉₀
GSBL(-) (n=19)	0,06-0,25	0,125	0,25	0,008-0,03	0,03	0,03	0,015-0,03	0,015	0,03	0,015-0,03	0,015	0,03
GSBL(+) (n=56)	0,06-0,5	0,125	0,25	0,008-0,25	0,015	0,06	0,015-0,06	0,03	0,06	0,015-4	0,125	0,25
CLSI Kriterlerine göre antibiyotik duyarlılıkları	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
	≤1	2	≥4	≤1	2	≥4	≤1	2	≥4	≤0,5	1	≥2

MİK: minimum inhibitör konsantrasyonu; GSBL: genişlemiş spektrumlu beta laktamaz

Tablo 2. Kökenlerin MEK50 ve MEK90 değerleri

Kökenler	İmipenem			Meropenem			Doripenem			Ertapenem		
	MEK Aralığı	MEK ₅₀	MEK ₉₀	MEK Aralığı	MEK ₅₀	MEK ₉₀	MEK Aralığı	MEK ₅₀	MEK ₉₀	MEK Aralığı	MEK ₅₀	MEK ₉₀
GSBL(-)												
<i>E. coli</i> (n=9)	1	1	1	0,25-0,5	0,25	0,5	0,06-0,25	0,06	0,125	0,06-0,125	0,125	0,125
<i>K. pneumoniae</i> (n=10)	1	1	1	0,25-0,5	0,5	0,5	0,125-0,5	0,125	0,25	0,125-0,25	0,25	0,25
GSBL(+)												
<i>E. coli</i> (n=32)	0,5-16	2	4	0,125-8	2	4	0,125-8	0,5	2	0,125-16	0,5	4
<i>K. pneumoniae</i> (n=24)	2-32	4	8	0,25-8	4	4	0,25-4	2	4	0,25-16	4	4
CLSI Kriterlerine göre antibiyotik duyarlılıkları	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
	≤1	2	≥4	≤1	2	≥4	≤1	2	≥4	≤0,5	1	≥2

MEK: mutant engelleme konsantrasyonu; GSBL: genişlemiş spektrumlu beta laktamaz



Şekil 1. GSBL pozitif kökenlerde imipenem, meropenem, doripenem, ertapenem MİK değerleri ile MEK duyarlılık etkileşimi

bu antibiyotikler için yüksek bir konsantrasyon olarak değerlendirilmiştir. GSBL pozitif kökenlerde ise tüm karbapenemler için MEK₉₀ değerleri 2-8 µg/mL olup dirençlilik sınırının üzerine çıkmıştır. GSBL negatif kökenlerle karşılaştırıldığında GSBL pozitif kökenlerin MEK₉₀ değerlerinin 2-9 kat daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Tablo 2). Bu sonuçlara göre, GSBL üretiminin mutant seçimine daha fazla katkı sağladığı, ancak kökenlerin farklı tip GSBL enzimleri içermelerinin mutant seleksiyon profili üzerinde bir farklılık yaratmadığı gözlemlenmiştir.

GSBL pozitif kökenlerde doripenem, ertapenem, meropenem ve imipenem MEK değerlerinin duyarlılık sınırlarında kalma oranları sırasıyla %58,9, %32,1, %25 ve %8,9 olarak tespit edilmiştir. MEK değeri orta kategorisinde yer alan kökenlerde dahil edildiğinde bu oranların sırasıyla %84, %48,2, %60 ve %50 olduğu gözlemlenmiştir.

GSBL pozitif kökenlerde karbapenemlerin MİK değerlerinin MEK'i öngörüp göremeyeceği analiz edildiğinde imipenem (MİK aralığı: 0,06-0,5 µg/mL) için en düşük MİK değeri olan 0,06 µg/mL'de bile %50 oranında mutant seçimine neden olduğu görülmüş, MİK 0,5 µg/mL olduğunda bu oranın %100'e çıktığı gözlemlenmiştir. Yani GSBL pozitif kökenlerde imipenem MİK değeri ne olursa olsun mutant seçimine büyük oranda katkıda bulunmaktadır. Meropenem (MİK aralığı: 0,008-0,25 µg/mL) için en düşük MİK değeri olan 0,008 µg/mL'de mutant seçimine neden olmazken, ≥0,06 µg/mL 'de %80 gibi büyük oranlarda mutant seçimine neden olmaktadır. Doripenem (MİK aralığı:

0,015-0,5 µg/mL) için en düşük MİK değeri olan 0,015 µg/mL'de mutant seçimine neden olmazken, ≥0,125 µg/mL üzerindeki tüm değerlerde ise %100 oranında mutant seçimi gerçekleşmektedir. Ertapenem (MİK aralığı: 0,015-0,25 µg/mL) için ise ≤0,03 µg/mL'de mutant seçimine neden olmazken, ≥ 0,25 µg/mL'de %80 oranında mutant seçimine neden olmaktadır (Şekil 1). Bu sonuçlar irdelendiğinde doripenem ve ertapenem mutant bakteri seçiminin en az olduğu karbapenemler olarak değerlendirilmiştir. Bir diğer deyişle MİK'i <0,125 µg/mL olan değerlerde doripenem ve ertapenem tedavide sorunsuz olarak kullanılabilirken meropenem için 0,015 µg/mL MİK değerine sahip kökenlerle gelişen enfeksiyonların tedavisinde bile neredeyse yarıya yakın oranda mutant seçiminin gerçekleşeceği gözlemlenmiştir.

TARTIŞMA

Mutant engelleme konsantrasyonu, özellikle antibiyotik kullanımı sırasında spontan mutasyonlarla gelişen mutant bakterilerin üremesini önleyecek konsantrasyonların belirlenmesi umuduyula geliştirilmiş bir kavramdır. Dolayısıyla klinikte ve *in vitro* ortamda gözlemlenen primer direnç mekanizmasının mutasyon kaynaklı olması durumunda MEK'in etkin bir parametre olacağından bahsedilmektedir. Bir antibiyotikğin tedavi başarısı, ilacın hedef dokuda ulaştığı konsantrasyonun ne kadar süre ile MEK'in üstünde olduğu ile orantılı olup seleksiyonun en sık gözlemlendiği mutant seleksiyon penceresi (MSP) aralığında bu mikroorganizmanın ne kadar az süreyle kaldığı ile

de ilişkilidir (6). Geleneksel tedavi doz ayarlamaları MİK değeri göz önünde bulundurularak yapılmakta ve antibiyotik konsantrasyonunun bu değerin üzerine çıkması sağlanmaktadır. MİK saptanması dünya çapında kabul görmüş bir testtir ancak mutant altpopülasyon hakkında bilgi vermemektedir. Dolayısıyla birçok antibiyotik için uygulanan ilaç konsantrasyonu mutant seleksiyon penceresi içinde kalmaktadır ve dirençli altpopülasyonun üremesine izin vermektedir. Günümüzde direnç probleminin engellenebilmesi için tedavide seleksiyon indeksi düşük olan antibiyotiklerin ve MEK üzerindeki serum/doku konsantrasyonlarına ulaşılacak antibiyotik dozlarının kullanılması gerekmektedir. Eğer antibiyotik konsantrasyonları bu pencerenin üzerinde tutulamiyorsa mutant bakterilerin seleksiyonunu engellemek için kombine tedavi tercih edilmelidir. Mutant seleksiyon profillerinin araştırıldığı farklı antibiyotikler için kısıtlı sayıda çalışmalar mevcut olmakla birlikte bugüne kadar en çok çalışılan antibiyotik grubu florokinolonlar olmuştur. Karbapenemlere ilişkin çalışma ise yok denecek kadar azdır. Ancak literatürdeki karbapenem kullanımı sırasında OMP'lerde meydana gelen mutasyonlar sonucu gelişen karbapenem direnci ile ilişkili saptamalar, karbapenemlerin mutant seleksiyonuna katkılarının araştırılmasını önemli hale getirmiştir (1, 8, 13, 14).

Karbapenem direncinden her ne kadar çoğunlukla bir karbapenemaz üretimi sorumlu olsa da son yıllarda porin kaybı ile ilişkili karbapenem direnci birçok ülkede önemli hale gelmiştir. Yapılan çalışmalar göstermektedir ki karbapenem tedavisi sırasında gelişen porin mutasyonları sonucu karbapenem dirençli olgular giderek artmaktadır (15-18).

GSBL negatif kökenlerde MEK₉₀ değerleri irdelendiğinde, meropenem, ertapenem ve doripenemin duyarlılık sınırlarında kalarak mutant geliştirmedeği gözlemlenmiştir. Ancak bu kökenlerde imipenem için saptanan MEK₉₀ değerinin 1 µg/mL olması karbapenem grubu bir antibiyotik için yüksek bir konsantrasyon olarak değerlendirilmiştir. Bu sonuç imipenem tedavisi sırasında GSBL negatif kökenlerde dahi mutant geliştirme olasılığını akla getirmekle birlikte bu kökenlerin karbapenemlerle tedavilerinde herhangi bir sorun söz konusu değildir. Ancak, GSBL üreten kökenlerin MEK₉₀ değerleri (2-8 µg/mL) bu kökenlerle gelişen enfeksiyonların karbapenemlerle tedavisinde sorunla karşılaşılabileceğini düşündürmektedir. GSBL pozitif kökenlerde MEK değerleri GSBL negatif kökenlere kıyasla 2-9 kat daha yüksek saptanmıştır. Dolayısıyla, GSBL üretimi mutant seleksiyonuna daha fazla katkı sağlamaktadır.

Dirençli mutant seleksiyonu hakkında bilgi veren MEK'in saptanması mikrobiyoloji laboratuvarı için önemlidir. Ancak MEK'in saptanmasının oldukça zahmetli olması ve 96 saat gibi uzun zaman gerektirmesi mikrobiyoloji laboratuvarında rutin olarak çalışılmasını zorlaştırmaktadır. Bu nedenle araştırmacılar MİK'e göre MEK'in yorumlanabilirliğini özellikle de florokinolonlarda değerlendirmişler ancak konuyu tam açıklığa kavuşturamamışlardır (5, 19, 20). Çalışmamızda karbapenemlerin MİK ile MEK değerleri arasında tam bir korelasyon bulunmamasına rağmen MEK'in öngörülmesine yardımcı olacak önemli veriler elde edilmiştir. İmpenemin test edilen en düşük konsantrasyonlarda

bile %50 oranında mutant seçimine neden olması mutant seleksiyonunu minimuma indirebilmek için imipenemin mutlaka farklı ilaç grupları ile kombine kullanılması gerekliliğini vurgulamaktadır. Meropenem 0,008 µg/mL gibi düşük MİK değerlerinde güvenli bir şekilde kullanılabilirken, MİK değeri ≥0,03 µg/mL'de mutant seçimine büyük oranda katkı sağlamaktadır. Doripenem ve ertapenem için ise MİK değeri ≥0,125 µg/mL'nin üzerindeki konsantrasyonlarda büyük oranda mutant seçimi gerçekleşmektedir. Bu veriler, geleneksel karbapenem dozları ile duyarlı bakteri popülasyonunun yok edilebileceğini ancak özellikle imipenem ve meropenemin tedavide kullanımı sırasında mutant kökenlerin gelişebileceğini göstermektedir. Ayrıca, tedavi sırasında bu mutant kökenlerin seleksiyona uğraması klinik başarısızlığa ya da tedavinin sonlandırılmasından kısa bir süre sonra dirençli mutant alt kökenlerle relapslara neden olabileceğini akla getirmektedir ki bu da imipenem ve meropenemin mümkün olduğunca tek başlarına kullanılmaması gerektiğini bir kez daha vurgulamaktadır.

Tedavide mutant engelleme konsantrasyonları göz önünde bulundurularak yeni doz ayarlamaları yapılabilir. Yapılan çalışmalarda karbapenemlerin uzamış infüzyon sürelerinin mutant seleksiyonunun önlenmesinde önemli olduğunu da vurgulanmaktadır (21). Görünen o ki, antibiyotik tedavisi sırasında gelişebilecek direncin sınırlandırılmasında etkili olabilecek en önemli parametre MEK'tir. Yaptığımız çalışma ile karbapenemlerin MEK ve mutant seleksiyon sıklıkları hakkında önemli bilgiler edinilmiştir. Ancak karbapenemlerin MEK'leri konusunda yapılan çalışmalar oldukça kısıtlı sayıda olup *in vitro* çalışmalardan ibarettir (22). Dolayısıyla MEK'in klinik önemini ortaya koyacak hayvan modelleri ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Klinik Araştırmalar Ön Değerlendirme Komisyonu'ndan alınmıştır (30.11.2010-09).

Hasta Onamı: N/A.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

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

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonu tarafından SAG-C-DRP-070211-0031 no'lu proje kapsamında desteklenmiştir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the Ethics Committee of Marmara University Institute of Health Sciences Clinical Research Commission (30.11.2010-09).

Informed Consent: N/A.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - G.A.G., G.S.; Design - G.A.G., G.S.; Supervision - G.A.G., G.S.; Resource - G.A.G., G.S.; Materials - G.A.G., G.S.; Data Collection and/or Processing - G.A.G., G.S.; Analysis and/or Interpretation - G.A.G., G.S.; Literature Search - G.A.G., G.S.; Writing - G.A.G., G.S.; Critical Reviews - G.A.G., G.S.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Disclosure: This study was supported by Scientific Research Fund of Marmara University.

KAYNAKLAR

- Gür D, Hascelik G, Aydin N, Telli M, Gültekin M, Oğulnç D, et al. Antimicrobial resistance in gram-negative hospital isolates: results of the Turkish HITIT-2 Surveillance Study of 2007. *J Chemother* 2009; 21: 383-9. [\[CrossRef\]](#)
- Oteo J, Delgado-Iribarren A, Vega D, Bautista V, Rodríguez MC, Velasco M, et al. Emergence of imipenem resistance in clinical *Escherichia coli* during therapy. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32: 534-7. [\[CrossRef\]](#)
- Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol* 2010; 300: 371-9. [\[CrossRef\]](#)
- Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm. *Trends Mol Med* 2012; 18: 263-72. [\[CrossRef\]](#)
- Song W, S.B, Choi JY, Jeong SH, Jeon EH, Lee YK, et al. In vivo selection of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* by OmpK36 loss during meropenem treatment. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 65: 447-9. [\[CrossRef\]](#)
- Drlica K. The mutant selection window and antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 11-7. [\[CrossRef\]](#)
- Drlica K, Zhao X. Mutant selection window hypothesis updated. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 681-8. [\[CrossRef\]](#)
- Sindelar G, Zhao X, Liew A, Dong Y, Lu T, Zhou J, et al. Mutant prevention concentration as a measure of fluoroquinolone potency against mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 3337-43. [\[CrossRef\]](#)
- Zhao X, Drlica K. A unified anti-mutant dosing strategy. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62: 434-6. [\[CrossRef\]](#)
- Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance of standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-two Information Supplement M100-S22. 2012; Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute.
- Öksüz L, Gürler N. Typing of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. strains and analysis of plasmid profiles. *Mikrobiyol Bul* 2009; 43: 183-94.
- Hansen G, Blondeau JM. Comparison of the minimum inhibitory, mutant prevention, and minimum bactericidal concentrations of ciprofloxacin, levofloxacin, and garenoxacin against enteric gram-negative urinary tract infection pathogens. *J Chemother* 2005; 17: 484-92. [\[CrossRef\]](#)
- Smith HJ, Nichol KA, Hoban DJ, Zhanel GG. Stretching the mutant prevention concentration (MPC) beyond its limits. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 1323-5. [\[CrossRef\]](#)
- Zhao X, Drlica K. Restricting the Selection of antibiotic-resistant mutants: a general strategy derived from fluoroquinolone studies. *Clin Infect Dis* 2001; 33(Suppl 3): 147-56. [\[CrossRef\]](#)
- D'Andrea MM, Giani T, Arena F, Borgianni L, Gesu G, Li Bergoli M, Manso E, Mussap M, Sambri V, Sarti M, Luzzaro F, Rossolini GM. Multifocal emergence of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* clone with differential non-carbapenemase-mediated resistance to carbapenems in Italian hospitals. 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 16 - 19 May 2009, Helsinki, Finland, p.1700.
- Kaczmarek FM, Dib-Hajj F, Shang W, Gootz TD. High-level carbapenem resistance in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate is due to the combination of bla ACT-1 beta lactamase production, porin OmpK35/36 insertional inactivation, and down-regulation of the phosphate transport porin PhoE. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 3396-406. [\[CrossRef\]](#)
- Lee K, Yong D, Choi YS, Yum JH, Kim JM, Woodford N, et al. Reduced imipenem susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with plasmid-mediated CMY-2 and DHA-1 beta-lactamases co-mediated by porin loss. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29: 201-6. [\[CrossRef\]](#)
- Poirel L, Heritier C, Spicq C, Nordmann P. In vivo acquisition of high-level resistance to imipenem in *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3831-3. [\[CrossRef\]](#)
- Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms. *J Hosp Infect* 2009; 73: 345-54. [\[CrossRef\]](#)
- Drlica K, Zhao X, Blondeau JM, Hesje C. Low correlation between MIC and mutant prevention concentration. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 403-4. [\[CrossRef\]](#)
- Roberts JA, Kruger P, Paterson DL, Lipman J. Antibiotic resistance: What's dosing got to do with it? *Crit Care Med* 2008; 36: 2433-40. [\[CrossRef\]](#)
- Credito K, Kosowska-Shick K, Appelbaum PC. Mutant prevention concentrations of four carbapenems against gram-negative rods. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 2692-5. [\[CrossRef\]](#)

SWAP-70 Antikoru Pozitif Multipl Skleroz Serum Antikorlarının İntraventriküler Uygulamasının Motor Aktivite ve Beyin Histolojisine Etkileri

Impact of Intraventricular Administration of SWAP-70 Antibody Positive Multiple Sclerosis Serum Antibodies on Motor Activity and Brain Histology

Recai Türkoğlu¹ , Canan Ulusoy² , Vuslat Yılmaz² 

¹Haydarpaşa Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Nöroloji Kliniği, İstanbul, Türkiye

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

Cite this article as: Türkoğlu R, Ulusoy C, Yılmaz V. Impact of Intraventricular Administration of SWAP-70 Antibody Positive Multiple Sclerosis Serum Antibodies on Motor Activity and Brain Histology. Experimed 2018; 8(1): 7-10.

ÖZ

Amaç: SWAP-70 antikoru yakın zaman önce multipl skleroz (MS) olgularında gösterilmiş ve hastalığın prognozu ile ilişkili oldukları bulunmuştur. Bu antikorumun sinir sistemi üzerine olan olası etkilerinin aydınlatılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: SWAP-70 antikoru pozitif ve negatif olan dörder MS olgusunun ve 5 sağlıklı olgunun serum havuzlarından IgG saflaştırıldı ve farelerin yan ventriküllerine uygulandı (her grup için n=10).

Bulgular: Tedavi grupları arasında motor aktivite testi ile değerlendirilen kas gücü açısından fark saptanmadı. Benzer şekilde farklı IgG grupları arasında beyin immünohistokimya özellikleri açısından fark bulunamadı.

Sonuç: Bu pasif transferle oluşturulan MS hayvan modelinde MS IgG'sinin belirgin bir nörotoksik veya nörokoruyucu etkisi gösterilemedi.

Anahtar Kelimeler: Multipl skleroz, IgG, lokomotor aktivite, santral sinir sistemi, histoloji

ABSTRACT

Objectives: Antibodies directed against SWAP-70 have been recently identified in multiple sclerosis (MS) patients and found to be associated with disease prognosis. Our aim was to find out the potential actions of these antibodies on the nervous system.

Material and Method: Purified IgG was obtained from pooled sera from 4 each MS patients with and without SWAP-70 antibodies and 5 healthy controls and administered into lateral ventricles of mice (n=10 for each group).

Results: There were no significant differences among treatment groups by means of muscle strength, which was evaluated by motor activity test. Similarly, no significant differences could be found in brain immunohistochemistry examinations among different IgG groups.

Conclusion: Our results argue against a profound neurotoxic or neuroprotective action of MS IgG on neurons in this passive transfer animal model of MS.

Keywords: Multiple sclerosis, IgG, locomotor activity, central nervous system, histology

GİRİŞ

Multipl skleroz (MS) santral sinir sisteminin kronik demyelinizan ve nörodejeneratif bir hastalıdır. Myelin proteinlerini tanıyan T hücreleri MS patogenezinin en önemli faktörleri olarak gösterilmekle beraber B hücrelerinin ve ilişkili humoral faktörlerin de hastalık patogenezinde önemli rol oynadığı artık bilinmektedir (1, 2). İntratekal IgG üretiminin varlığı, MS lezyonlarında IgG birikintilerinin oluşması ve antikor temizleyici tedavi yöntemlerinin bazı MS olgu-

larında iyileştirici olduğunun gösterilmesi antikorumun MS hastalığının klinik ilerleyişini kontrol ettiğini düşündüren faktörlerdir (1, 2).

Beyin cDNA ekspresyon kütüphanelerinin kullanıldığı protein makroarray tarama çalışmaları "switch-associated protein 70" (SWAP-70) antikorumun MS olgularının serum örneklerinde yaygın olarak bulunduğunu gösterdi (3). Daha da önemlisi bu antikorum MS atakları sırasında daha yüksek oranda pozitif bulunuyor ve daha düşük özürüllük skorlu hastalarda bu-

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Recai Türkoğlu **E-mail:** recaiturkoglu@yahoo.com

Geliş Tarihi/Received Date: 25.04.2018 **Kabul Tarihi/Accepted Date:** 25.04.2018 **Çevrimiçi Yayın Tarihi/Available Online Date:** 30.04.2018

© Copyright 2018 by The Istanbul University Faculty of Science • Available online at <http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/>

© Telif Hakkı 2018 İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi • Makale metnine http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/_sayfasından ulaşılabilir.

lunma eğilimi gösteriyordu (4-6). SWAP-70, bir protein kompleksinin parçası olup immunoglobulin ağır zincir geninin dönüşüm bölgeleri arasındaki DNA rekombinasyonunu katalizler (3). Ayrıca SWAP70'in sinyal ileti proteinlerinin özelliklerine sahip olduğu, hücre içi yollarını aktive edebileceği ve bazı durumlarda hücre membranında ifade edilerek hücre içi yolak sinyalizasyonunda da yer aldığı düşünülmektedir (7). SWAP-70 molekülünü nöron işlevlerine olan katkısı iyi bilinmemektedir.

Bu çalışmada MS olgularında iyi prognozla ilişkisi gösterilen SWAP-70 antikorlarının intratekal uygulamasının santral sinir sistemi işlevleri üzerine olan olası etkilerinin incelenmesi amaçlandı. Bu amaca uygun olarak SWAP-70 antikorlu pozitif ve negatif olan MS olgularının serum antikorları saflaştırılarak yabani tip farelerin ventriküllerine uygulandı. Farklı antikorlarla muamele edilen farelerin motor aktiviteleri ve santral sinir sistemi histolojik özellikleri karşılaştırıldı.

GEREÇ ve YÖNTEM

Olgular ve SWAP-70 Antikor Ölçümü

Revize 2017 McDonald kriterlerini dolduran ve henüz progresif evreye girmemiş 8 MS olgusunun serum örneği kullanıldı. Kontrol grubu olarak yaş ve cinsiyet olarak MS olgularına benzer özellikler taşıyan 5 olgusunun serumları kullanıldı (Tablo 1).

SWAP-70 antikorları E.coli tarafından üretilen rekombinan SWAP-70 proteininin kullanıldığı indirekt ELISA yöntemiyle önceki yayınlarda belirtildiği şekilde yapıldı (4-6). SWAP-70 antikorlu pozitif olguların serum antikor düzeylerinin (OD cinsinden) sağlıklı olguların ve seronegatif MS olgularının ortalama OD değerlerinin iki standart sapma üzerinde olduğu gözlemlendi.

Serum örnekleri deney anına kadar -80°C derin dondurucuda saklandı. Çalışma için gerekli etik kurullardan onay alındı ve çalışmaya dahil edilen hasta ve sağlıklılardan imzalı onam belgesi elde edildi.

IgG Saflaştırılması

IgG örnekleri sağlıklı ve MS olgularından protein-A-sefaroza CL-4B kolonu (Sigma, St. Louis, MO) ile önceki çalışmalarda

belirtildiği şekilde saflaştırıldı (8, 9). 1 mL serum 0.5 ml protein A-sefaroza ile 2 saat oda ısısında inkübe edildi. Serumun uzaklaştırılmasının ardından IgG 0.05 M pH 3.0 sitrat tamponu ile ekstrakte edildi ve pH 8.8 1.5 M Tris-tamponu ile nötralize edildi. IgG içeren solüsyon PBS içinde diyalizden geçirilerek filtre ile sterilize edildi. IgG varlığı jel elektroforezinde 45-55 kDa ağır zincir ve 25-35 kDa hafif zincir IgG bantlarının gösterilmesi ile doğrulandı. IgG solüsyonlarının protein konsantrasyonları Bradford yöntemi ile ölçüldü. Uygulanacak IgG konsantrasyonu 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ olacak şekilde solüsyonlar steril PBS ile sulandırıldı.

Fareler ve İntraventriküler IgG Uygulaması

Yabani tip erkek C57BL/6 (B6) fareleri (6-8 hafta yaşında) kullanıldı. Deneylerin başlamasından 1 hafta önce fareler deney odasında bekletildi ve ortama alışmaları sağlandı.

Antikor pozitif MS grubu, antikor negatif MS grubu ve sağlıklı kontrol grubu olmak üzere 3 deney grubu için grup başına 10 erkek fare kullanıldı. Her uygulamada 10 μL IgG solüsyonu enjeksiyon yoluyla ketamin (100 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) ile derin anestezi verildi ve sonra fareler stereotaksik çerçeveye yerleştirildi. Sağ lateral ventriküle yerleştirilen bir kanüle bağlanan Hamilton şırıngası ile IgG örnekleri uygulandı.

Kanülün yerleştirilme işleminden sonraki altıncı günde bazal motor aktivite testi değerlendirilmeleri yapıldı. Ardından 24 gün boyunca üç günde bir IgG enjeksiyonu yapıldı. Uygulamaların sonrasında motor aktivite testi tekrar yapıldı. Tüm motor değerlendirmeler sabah 9.00 ile 11.00 arasında gerçekleştirildi.

Motor Aktivite Testi

Farelerin motor aktivitesi motor aktivite monitorizasyon cihazı ile ölçüldü. Bilgisayara bağlı olan kare şeklindeki alanın (45x45 cm) tabanı dokunma sensörlü olup farenin hareketlerini bilgisayara bir yazılım aracılığıyla aktarmaktadır. Bilgisayar programı tarafından, bu bilgi, alanın hangi tarafında, ne kadar süre boyunca, kaç cm yürüdüğünü ve hareket ve dinlenme yüzdelerini kullanıcıya sunmaktadır. Deneye başlamadan önce tüm deney hayvanları 2 hafta süreyle motor aktivite alanına alıştırdı. Deney sırasında fareler bu alan içinde 5 dakika kadar tutulup hareketleri program aracılığıyla kayıt altına alındı.

İmmünohistokimya

IgG uygulama ve motor aktivite testlerinin ardından farelerin beyin örnekleri parafin bloklara gömüldü ve 10 μm kalınlığında kesitler alındı. Deparafinizasyon ve antijen açığa çıkarma işlemlerinin ardından beyin kesitleri hematoksil-eozin boyası ile değerlendirildi. Glial aktivite ve kompleman aktivasyonu, sırasıyla anti-glial fibriller asitik protein (GFAP) (1:400 dilüsyon, Abcam, Cambridge, İngiltere) ve C3b (1:100 dilüsyon, Biorbyt, Cambridge, İngiltere) antikorlarının kullanıldığı immünohistokimya çalışmaları ile incelendi. GFAP ve C3b antikorlarının %10 keçi serumu içinde hazırlanan solüsyonları ile kesitler gece boyunca 4°C sıcaklıkta inkübe edildi. Ertesi gün PBS ile yıkamanın ardından uygun biyotinli ikincil antikorlar (Abcam) ile inkübe edilen kesitlerde immün reaksiyon avidin-biyotin-peroksidaz yöntemi ile elde edildi (9).

Tablo 1. Çalışmaya dahil edilen MS ve sağlıklı olguların demografik ve klinik özellikleri

	MS (n=8)	Sağlıklı (n=4)
Cinsiyet (kadın/erkek)	6/2	3/1
Yaş (ortalama \pm standart sapma)	37,3 \pm 7,9	39,2 \pm 6,2
EDSS (ortalama \pm standart sapma)	3,2 \pm 1,1	-
Hastalık süresi (yıl; ortalama \pm standart sapma)	6,3 \pm 1,7	-
BOS oligoklonal bant pozitifliği	6	-
EDSS: expanded disability status scale; BOS: beyin-omurilik sıvısı		

BULGULAR

Hastaların Özellikleri

Bütün çalışmalarda 8 MS olgusunun (6 kadın, 2 erkek; ortalama yaş±standart sapma, 37,3±7,9) ve 4 sağlıklı kontrol olgusunun (3 kadın, 1 erkek; ortalama yaş±standart sapma, 39,2±6,2) serumları kullanıldı. MS ve sağlıklı kontrol olgularının yaş ve cinsiyet özellikleri arasında anlamlı fark yoktu. MS olgularının ortalama özürüllük skoru 3,2±1,1, hastalık süresi 6,3±1,7 idi. Altı olgusunun BOS incelemesinde patern 2 oluklonal bant saptandı. Serum alınması sırasında MS hastaları remisyonda idi ve immünsüpresan ilaç kullanmıyorlardı.

Motor Aktivite Sonuçları

Motor aktivite testinde SWAP-70 antikor pozitif serum, antikor negatif serum ve sağlıklı serum IgG uygulanan farelerin hareket yüzdesi ve test süresince kat ettikleri mesafe ölçüldü. Antikor pozitif IgG uygulanan grubun, antikor negatif IgG uygulanan grubun ve sağlıklı IgG uygulanan grubun hareket yüzdeleri sırasıyla %42,5±4,7, %39,4±3,1 ve %41,4±5,2 idi. ANOVA testi ile gruplar arasında anlamlı fark saptanamadı (p>0,05). Kat edilen mesafeler ise antikor pozitif IgG uygulanan, antikor negatif IgG uygulanan ve sağlıklı IgG uygulanan gruplarda 5,2±0,8, 5,4±0,3 ve 4,9±0,5 cm olarak ölçüldü. Bu parametre için de ANOVA testi ile gruplar arasında anlamlı fark saptanamadı (p>0,05).

Beyin Doku Çalışmaları

IgG uygulanan farelerin beyinlerinin her iki hemisferi ayrıntılı olarak hematoksilin-eozin boyaması ile incelendi ve nöronal yıkımın ve immünolojik infiltratların varlığı araştırıldı. Farklı olgu gruplarına ait IgG örneklerine maruz bırakılan farelerin beyin dokularında herhangi bir patolojik değişiklik saptanamadı. Tüm gruplarda kanüllerin beyin dokusuna girdiği bölgede korteks alanlarında minimal hücresele infiltrasyon gözlemlendi. Glial hücre aktivitesi tüm beyin bölgelerinde birbirine benzerdi. Bu bulgu MS serum antikorlarının glial aktivite artışına sebep olmadığını gösterdi. Benzer şekilde aktif C3 faktörü yıkım ürünü olan C3b depozitleri de incelenen beyin dokularında gözlenemedi. Bu bulgu da SWAP-70 antikorunun kompleman sistemini aktive etmediğini düşündürdü.

TARTIŞMA

MS olgularında B hücre temelli hastalık mekanizmalarının önemi giderek artan bir şekilde anlaşılmaktadır. B hücrelerini hedef alan tedavi yöntemlerinin klinik progresyonu engelleme- si B lenfositlerin MS patogenezindeki önemini daha da belirgin bir şekilde ön plana çıkarmıştır. MS olgularında tanımlanan serum antikorlarının sayısı da gün geçtikçe artmaktadır (10). Bu antikorlardan neurofascin antikorlarının intraventriküler uygulamasının deney hayvanlarında aksonal dejenerasyon ve kompleman aktivasyonuna yol açtığı bilinmektedir.

SWAP-70 antikorlu çeşitli çalışmalarda iyi prognozla ilişkilendirilmiş ve bu antikora sahip MS hastalarının özürüllük düzeylerinin düşük kalma eğiliminde olduğu ve SWAP-70 antikorunun MS gelişimini sınırlayan anti-inflamatuar sitokin üretimine katkıda bulunduğu bildirilmiştir (4-6). SWAP-70 antikoruna eklenen

periferik kan mononükleer hücre kültürlerinde işlevsel değişiklikler saptanması SWAP-70 antikorunun hedef molekülüne bağlanabildiğini ve anti-inflamatuar etkilerini bu şekilde gerçekleştirdiğini düşündürmektedir. SWAP-70 molekülünün santral sinir sisteminde de anlatımının bulunduğu ve nöron gelişimi ve myelin yapımına etkileri olduğu bilinmektedir (11).

Bu bilgiler ışığında SWAP-70 antikorlarının bağımsızlığı sistemi hücrelerinin yanı sıra sinir sistemi hücreleri üzerine de etkilerde bulunarak MS progresyonuna katkıda bulunabileceğini düşündük. Bu varsayımı sınamak amacıyla serum antikorlarının pasif transferi temeline dayanan bir deneysel MS hayvan modeli geliştirdik. Bu model geçmişteki çalışmalarda nöro-Behçet hastalarının serum antikorlarının motor aktivite ve beyin histolojisine olan etkilerinin araştırılması için kullanılmıştır (9). Bununla beraber çalışmamızda SWAP-70 antikorlu içeren veya içermeyen MS serum antikorlarının farelerde klinik veya histolojik bir değişikliğe yol açmadığı gösterilmiştir. Bulgularımız SWAP-70 antikorlarının MS hastalığı üzerine olan etkilerinin sinir sistemi hücrelerinden bağımsız olarak geliştiğini düşündürmüştür. Bununla beraber SWAP-70 antikorlarının motor sistem dışındaki nörolojik belirtilerle ilişkisinin olması ve farklı nöronal-gliyal işlevlerde görev alması mümkündür. Bu sebeple SWAP-70 antikorlarının gerçek potansiyelinin anlaşılabilmesi için primer nöron kültür hücrelerinin kullanıldığı ileri çalışmaların yapılması önerilmektedir.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden alınmıştır (2012/66-913).

Hasta Onamı: Yazılı hasta onamı bu çalışmaya katılan hastalardan alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - R.T., V.Y.; Tasarım - R.T., V.Y.; Denetleme - R.T., V.Y.; Kaynaklar - C.U., V.Y.; Gereçler - C.U., V.Y.; Veri Toplanması ve/veya İşlenmesi - R.T., C.U., V.Y.; Analiz ve/veya Yorum - R.T., V.Y.; Literatür Taraması - R.T., C.U., V.Y.; Yazıyı Yazan - R.T., C.U., V.Y.; Eleştirel İnceleme - R.T.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir (Proje no: 23979).

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the Ethics Committee of Istanbul University School of Medicine (2012/66-913).

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

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - R.T., V.Y.; Design - R.T., V.Y.; Supervision - R.T., V.Y.; Resource - C.U., V.Y.; Materials - C.U., V.Y.; Data Collection and/or Processing - R.T., C.U., V.Y.; Analysis and/or Interpretation - R.T., V.Y.; Literature Search - R.T., C.U., V.Y.; Writing - R.T., C.U., V.Y.; Critical Reviews - R.T.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Disclosure: This work was supported by the Research Fund of the İstanbul University (Project number: 23979).

KAYNAKLAR

1. Pröbstel AK, Sanderson NS, Derfuss T. B cells and autoantibodies in multiple sclerosis. *Int J Mol Sci* 2015; 16: 16576-92. [\[CrossRef\]](#)
2. von Büdingen HC, Palanichamy A, Lehmann-Horn K, Michel BA, Zamvil SS. Update on the autoimmune pathology of multiple sclerosis: B-cells as disease-drivers and therapeutic targets. *Eur Neurol* 2015; 73: 238-46. [\[CrossRef\]](#)
3. Vural B, Demirkan A, Ugurel E, Kalaylioglu-Wheeler Z, Esen BA, Gure AO, et al. Seroreactivity against PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1) in Turkish patients with Behçet's disease. *Clin Exp Rheumatol* 2009; 27(2 Suppl 53): S67-72.
4. Türkoğlu R, Özyurt S, Ulusoy C, Erdağ E, Tüzün E. Expression of switch-associated protein 70 is associated with lymphocyte activation and reduced disability in multiple sclerosis. *Immunol Lett* 2016; 177: 75-7. [\[CrossRef\]](#)
5. Türkoğlu R, Gencer M, Ekmekçi D, Ulusoy C, Erdağ E, Sehitoğlu E, et al. Switch-associated protein 70 antibodies in multiple sclerosis: possible association with disease progression. *Med Princ Pract* 2014; 23: 239-45. [\[CrossRef\]](#)
6. Erdağ E, Tüzün E, Uğurel E, Cavuş F, Sehitoğlu E, Giriş M, et al. Switch-associated protein 70 antibodies in multiple sclerosis: relationship between increased serum levels and clinical relapse. *Inflamm Res* 2012; 61: 927-30. [\[CrossRef\]](#)
7. Vural B, Demirkan A, Ugurel E, Kalaylioglu-Wheeler Z, Esen BA, Gure AO, et al. Seroreactivity against PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1) in Turkish patients with Behçet's disease. *Clin Exp Rheumatol* 2009; 27(2 Suppl 53): S67-72.
8. Giriş M, Bireller S, Küçükali Cİ, Hanağasi H, Değirmencioğlu S, Tüzün E. Impact of Neuro-Behçet disease immunoglobulin G on neuronal apoptosis. *Noro Psikiyatrs Ars* 2017; 54: 67-71. [\[CrossRef\]](#)
9. Erdağ E, Şahin C, Küçükali Cİ, Bireller S, Küçükkerden M, Kürtüncü M, et al. Effects of in vivo and in vitro administration of neuro-Behçet's disease IgG. *Neurol Sci* 2017; 38: 833-43. [\[CrossRef\]](#)
10. Housley WJ, Pitt D, Hafler DA. Biomarkers in multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2015; 161: 51-8. [\[CrossRef\]](#)
11. Takada N, Appel B. swap70 promotes neural precursor cell cycle exit and oligodendrocyte formation. *Mol Cell Neurosci* 2011; 48: 225-35. [\[CrossRef\]](#)

Diyaliz Tedavisi Uygulanan ve Uygulanmayan Kronik Böbrek Yetmezlikli Hastalarda Protein Oksidasyon Ürünlerinin Değerlendirilmesi

Evaluation of Protein Oxidation Products in Patients With Chronic Renal Failure Receiving Dialysis or Not

Cihan Coşkun¹ , Alev Kural² , Macit Koldaş² 

¹Sağlık Bilimleri Üniversitesi İstanbul Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyokimya Bölümü, İstanbul, Türkiye

²İstanbul Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Cite this article as: Coşkun C, Kural A, Koldaş M. Evaluation of Protein Oxidation Products in Patients With Chronic Renal Failure Receiving Dialysis or Not. Experimed 2018; 8(1): 11-7.

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada replasman tedavisi alan ve almayan kronik böbrek yetmezliği (KBY) hastalarının kan protein oksidasyon ürünlerinin düzeylerini değerlendirmek ve hasta kişiler ile sağlıklı kişileri karşılaştırmak için kontrol grubu (n=35) ve hasta grupları oluşturuldu.

Gereç ve Yöntem: Hasta grupları replasman tedavisi almayan KBY hasta grubu (n=36), hemodiyaliz (HD) tedavisi gören hasta grubu (n=64) ve periton diyaliz (PD) tedavisi gören hasta grubu (n=21) olmak üzere şekillendirildi. Daha sonra ileri düzey okside protein ürünleri (AOPP) ve ileri glikasyon son ürünleri (AGE)'in düzeyleri bakımından bu gruplar değerlendirildi.

Bulgular: Sonuç olarak, replasman tedavisi almayan KBY hasta grubunun AGE düzeyleri haricinde, diğer tüm grupların AOPP ve AGE düzeylerinin kontrol grubuna göre artmış olduğu saptandı. İstatistiksel olarak en önemli artışın ise HD hasta grubunda olduğu tespit edildi. Grup içi değerlendirmeler sonucunda hiçbir grupta AOPP ve AGE düzeyleri arasında ilişki saptanmadı.

Sonuç: Bu sonuçlara göre KBY'nin oksidatif stresle birlikte seyrettiği, replasman tedavisi gören KBY hastalarında ve özellikle de HD tedavisi gören hastalarda oksidatif stresin çok daha şiddetli olduğu gözlemlendi. Son olarak, HD tedavisi gören gruptaki hastaların diyabet olup olmasının sonuçları etkilemediği görüldü.

Anahtar Kelimeler: Kronik böbrek yetmezliği, hemodiyaliz, periton diyalizi, ileri düzey okside protein ürünleri, ileri glikasyon son ürünleri

ABSTRACT

Objective: In this study, control (n=35) and groups were formed to evaluate the levels of blood protein oxidation products in patients with chronic renal failure (CRF) who did and did not receive replacement therapy and to compare the patients with healthy subjects.

Material and Method: The groups were the CRF (n=36) group that did not receive replacement therapy, patients who were undergoing hemodialysis (HD) (n=64), and patients who were undergoing peritoneal dialysis (PD) (n=21). These groups were evaluated for the production of advanced oxidation protein product (AOPP) and advanced glycated end product (AGE) levels.

Results: As results, the AOPP and AGE values of all groups increased compared to the control group, except for the AGE levels of the patients with CRF who did not receive replacement therapy. The most significant increase was found in the HD patient group. No relationship was detected between the AOPP and AGE values in any group.

Conclusion: According to these results, CRF is accompanied by oxidative stress, and the oxidative stress is much more severe in patients with CRF receiving replacement therapy, particularly in patients undergoing HD. Is unknown if the results of patients undergoing HD were affected by the presence of diabetes.

Keywords: Advanced glycated end products, advanced oxidation protein products, chronic renal failure, hemodialysis, peritoneal dialysis

GİRİŞ

Normal metabolik süreçte sürekli olarak reaktif türler meydana gelmesine ve çeşitli fizyolojik süreçlerde görev almalarına rağmen, oksidatif ürünlerin aşırı üretimi pek çok

hastalıkta olduğu gibi kronik böbrek yetmezliği (KBY)'nin etyolojisinde de yer almaktadır. KBY'deki ilerleyici fonksiyon kaybını açıklamak üzere öne sürülen mekanizmalardan biri de oksidatif strestir. Özellikle nötrofil, miyeloperoksidaz (MPO) ve hipoklorik asit (HOCl) aracılı reaksiyonlar, KBY'de

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Cihan Coşkun **E-mail:** kuzeycihan2012@gmail.com

Geliş Tarihi/Received Date: 04.06.2018 **Kabul Tarihi/Accepted Date:** 04.06.2018

© Copyright 2018 by The Istanbul University Faculty of Science • Available online at <http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/>

© Telif Hakkı 2018 İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi • Makale metnine http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/_sayfasından ulaşılabilir.

gözlenen oksidatif stresin başlıca kaynağı olarak kabul edilmekte ve bu oksidatif reaksiyonlar, doğrudan enflamasyonla ilişkili görünmektedir (1, 2). Üremik hastalarda serbest radikal-lerin aşırı üretimi ya da yetersiz antioksidan kapasite nedeniyle oksidatif dengenin bozulduğuna dair görüşler giderek önem kazanmakta, hatta diyaliz ortamı oksidatif stres için bir model olarak düşünülmektedir (3). Yapılan çalışmalar sonucunda, idame hemodiyaliz (HD) tedavisi gören hastalarda yüksek düzeyde enflamasyon ve oksidatif stresin meydana geldiğini gösteren güçlü kanıtlar elde edilmiştir (4). Özellikle bu hastalarda kanın, kullanılan biyo-uyumlu olmayan diyaliz membranı ile etkileşimi sonucunda nötrofil aktivasyonunun tetiklenmesi ile süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikalleri (OH) ve HOCl gibi reaktif oksijen türleri (ROT)'nin yapımının arttığı (5) bildirilmektedir. Aynı zamanda in vivo olarak aktif nötrofillerce üretilen HOCl'nin, ileri düzey okside protein ürünleri (AOPP) olarak adlandırılan bir oksidatif stres belirteci oluşturduğu bildirilmiştir (6). Bunun yanı sıra, diyalizattan endotoksin parçacıklarının akışı, kateterler ve arteriyo-venöz greftler ile etkileşim, kronik enfeksiyonlar, aşırı demir yüklenmesi ve diyaliz hastalarında ki üremik toksinlerin yeterince uzaklaştırılmaması da KBY hastalarındaki oksidatif stresi arttıran diğer etkenlerdir. Ayrıca diyabet hastalığı (DM)'nin, KBY hastalarındaki oksidatif stresi ağırlaştırdığı iddia edilmektedir (7). Aynı zamanda, periton diyalizi (PD) hastalarında peritonun hiperosmolar, düşük pH'lı ve yüksek glukoz içerikli diyalizat ile sürekli olarak maruziyeti, düşük dereceli bir enflamasyona neden olmaktadır (8). Isıtma ile sterilizasyon ve uzun süreli saklama sonucunda ise, peritoneal diyaliz sıvısında glukoz yıkım ürünlerinin oluştuğu ve bu ürünlerin glikasyon reaksiyonlarıyla ileri glikasyon son ürünleri (AGE) gibi oksidatif stres belirteçlerinin oluşumunu hızlandırdığı ve peritoneal membran üzerinde olumsuz etkiler ortaya çıkarttığı düşünülmektedir (9, 10). Diğer taraftan PD hastalarında yüksek geçirgenliğe sahip peritonun diyalizer görevi yapması ve rezidüel renal fonksiyonun daha iyi olması nedeniyle, üremik toksinlerin peritondan daha etkili bir şekilde temizlendiği ve HD hastalarına göre PD hastalarında plazma ve doku düzeylerinin daha düşük olduğu bildirilmiştir (11).

Çalışmamızda, diyaliz tedavisi görmeyen KBY hastaları ile HD ve PD tedavisi gören hasta grupları arasında, AOPP ve AGE olarak tanımlanan protein oksidasyon ürünlerinin kan düzeyleri bakımından fark olup olmadığının tespit edilmesi amaçlandı. Aynı zamanda hasta gruplarından elde edilen AOPP ve AGE değerleri, kontrol grubu ile karşılaştırıldı. HD hastalarının hem diyaliz öncesi hem de diyaliz sonrası AOPP ve AGE düzeyleri karşılaştırmalarda dikkate alındı. Son olarak, hasta gruplarında DM'nin olup olmamasının protein oksidasyon ürünleri üzerine etkisi araştırıldı. Ancak HD grubu haricindeki hasta gruplarında istatistiksel değerlendirme açısından yeterli sayıda DM'li hasta bulunmadığından, bu değerlendirme sadece HD hasta grubunda yapıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Grupları

Çalışma grubu HD tedavisi alan 64 hasta (36 erkek; 28 kadın), PD tedavisi gören 21 hasta (13 erkek; 8 kadın) ve şimdiye kadar

diyaliz tedavisi olmayan 36 KBY'li hasta (20 erkek, 16 kadın) ile 35 sağlıklı birey (11 erkek; 24 kadın) içeren kontrol grubundan oluşturuldu. Bu çalışma Helsinki Deklarasyonuna uygun olarak yapıldı. Tüm hastalardan hasta onamı alındı. HD tedavisi alan hastaların yaş ortalaması $56,3 \pm 14,6$ idi ve özel iki hastanenin diyaliz ünitesinde haftada üç kez 4 saat bikarbonatlı HD tedavisi görüyorlardı. Hastalar ortalama 36 aydır HD'ye girmekteydiler. Numunelerin toplandığı iki diyaliz merkezinde de diyaliz işleminde sentetik membranlı diyalizerler kullanılmaktaydı. Hafta ortası seansından hemen önce ve diyaliz bittikten yaklaşık 30 dakika sonra hastalardan uygun örnekler alındı. PD hasta grubuna ait kan örnekleri, Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Periton Diyalizi Polikliniği'nden elde edildi. Yaş ortalaması $46,7 \pm 15,5$ olan hastaların 15 (%71)'i sürekli ayaktan periton diyalizi (SAPD) ve 6 (%29)'sı otomatik periton diyalizi (APD) programında idi ve hastalara ortalama 18 ± 7 aydır diyaliz uygulanmaktaydı. Hastaların hepsi düşük glukoz içerikli standart PD solüsyonları kullanıyordu. Önceden herhangi bir diyaliz tedavisi görmemiş KBY hasta grubu ise, Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nefroloji Polikliniği tarafından takipleri yapılan ve tedavileri programlanan hastalardı. Bu grubun yaş ortalaması $57,1 \pm 15,4$ idi. 35 sağlıklı birey ise kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edildi. Bu grubun yaş ortalaması $34,3 \pm 7,8$ idi. Çalışmaya dahil olanlardan gönüllü katılım için onaylar alındı.

Örneklerin Alımı, Hazırlanması ve Saklanması

AOPP çalışması için kan numuneleri kübital venden, EDTA'lı tüpe (Becton Dickinson, New Jersey, ABD) alındı. 1660 x g'de 4 °C'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra, porsiyonlara ayrılarak ependorf tüpleri içinde -20°C'de saklandı. AGE çalışması için ise kan numuneleri kübital venden antikoagülsansız jelli tüpe (Becton Dickinson, New Jersey, ABD) alındı. 1450 x g'de 4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi, porsiyonlara ayrılarak ependorf tüpleri içinde -20°C'de saklandı. Tüm örnekler ortalama 30 gün içinde çalışıldı. AOPP düzeyi Olympus AU 2700 otoanalizör (Beckman Coulter Inc, ABD)'de, AGE düzeyi ise Biorad marka spektrofloreometre (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, ABD)'de çalışıldı.

İstatistiksel Değerlendirmeler

Veriler "Statistical Package for Social Sciences for Windows 12.0" (SPSS Inc.; Chicago, IL, ABD) programı ile değerlendirildi. Grupların normal dağılıma uygunluğu "Kolmogorov-Smirnov", varyansların homojenliği "Levene" testi ile değerlendirildi. Kategorik verilerin karşılaştırılması "Ki-kare" testi ile yapıldı. Gruplar arası karşılaştırmalarda "Oneway ANOVA" ve "Kruskal Wallis" testleri kullanıldı. İkili karşılaştırmalarda çoklu karşılaştırma testleri (post-hoc) olarak "Bonferroni" ve "Dunn" testleri kullanıldı. HD grubundaki hastaların AOPP ve AGE düzeyleri yönünden diyaliz öncesi ve diyaliz sonrası ölçümleri arasında fark olup olmadığını test etmek için "Eşleştirilmiş T" testi kullanıldı. Kontrol ve hasta gruplarının grup içi AOPP ve AGE düzeyleri arasındaki ilişkiler "Pearson" ve "Spearman" korelasyon analizleri ile değerlendirildi. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0,05$ esas alındı.

AOPP Çalışma Prosedürü

Çalışma öncesinde oda ısısına getirilen örnekler ve standartlar daha önceden Olympus AU 2700 cihazına uyarlanmış olan programda çalışıldı. Bunun için:

- 40 µL standart veya plazma üzerine 160 µL PBS eklenip karıştırılarak 25 sn inkübe edildi. Karışımın absorbanı 340 nm'de okutuldu.
- Sonra 20 µL asetik asit eklenip, 25 sn inkübe edildi.
- Son olarak 10 µL KI çözeltisi eklendi ve tekrar 25 sn inkübe edilip absorban yeniden okutuldu.
- Tüm basamaklar 37°C'de tek küvette gerçekleştirildi ve zaman aralıkları her basamak için kullanılan analizörün program karakteristiklerine göre 25 sn veya daha uzun olacak şekilde ayarlandı (12).

5 standardın konsantrasyonuna karşılık gelen absorban (A) değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi oluşturuldu.

AGE Çalışma Prosedürü

Çalışma öncesinde oda ısısına getirilen örnekler Biorad marka spektrofotometre'de çalışıldı. Aşağıda tanımlanmış olan çalışma prosedürü uygulandı:

- Hasta ve kontrol grubuna ait serumlar PBS ile (pH 7,4) 1/50 oranında seyreltildi.
- Biorad marka spektrofotometrede maksimum eksitasyon 350 nm, maksimum emisyon 440 nm dalga boylarındaki floresans yoğunluğu "Arbitrary Units" (AU) olarak kaydedildi. Sonrasında AU/gram protein oranları bulundu (13). Ancak çalışma içinde sonuçlar AU olarak verildi.

BULGULAR

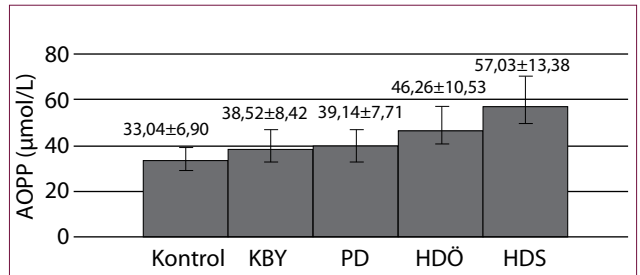
Gruplar yaş açısından karşılaştırıldığında kontrol grubu ile HD ve KBY grubu arasında çok ileri düzeyde fark var iken ($p=0,000$), kontrol grubu ile PD grubu arasında ileri düzeyde ($p<0,01$) fark bulundu. Gruplar cinsiyet açısından karşılaştırıldığında ise, kontrol grubu ile hasta grupları arasında anlamlı fark bulundu ($p<0,001$, her biri için). Bununla birlikte hasta grupları arasında anlamlı bir farklılık yoktu ($p>0,05$, her biri için). AOPP düzeyleri bakımından KBY ve PD grup ortalama değerleri kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksekti ($p<0,05$, her biri için). AOPP'nin hemodiyaliz öncesi (HDÖ) ve hemodiyaliz sonrası (HDS) düzeyleri de kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,001$, her biri için). KBY ile PD gruplarının AOPP düzeyleri arasında fark bulunmazken ($p>0,05$), HD grubunun HDÖ ve HDS'ye ait AOPP düzeyleri, hem KBY grubunun ($p<0,001$, her biri için) hem de PD grubunun AOPP düzeylerinden anlamlı derecede yüksekti (sırasıyla $p<0,05$, $p<0,001$). Benzer şekilde, HD grubundaki hastaların diyaliz öncesi AOPP düzeyleri de, diyaliz sonrasına göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,001$).

İleri glikasyon son ürünleri düzeyleri bakımından gruplar karşılaştırıldığında aralarında anlamlı fark olduğu görüldü ($p<0,001$). İkili karşılaştırmalarda sadece kontrol ile KBY grupları arasında fark bulunmazken ($p>0,05$), kontrol grubunun ortalama AGE düzeyi, hem PD grubununkinden ($p<0,05$) hem de HD hastalarının diyaliz öncesi ve sonrasına ait AGE düzeylerinden anlamlı derecede düşüktü ($p<0,000$, her biri için). Hasta grupları AGE düzeyleri bakımından ikili olarak karşılaştırıldığında KBY grubunun ortalaması, PD grubuna göre düşük-

Tablo 1. Çalışma gruplarının ortalama AOPP ve AGE düzeyleri

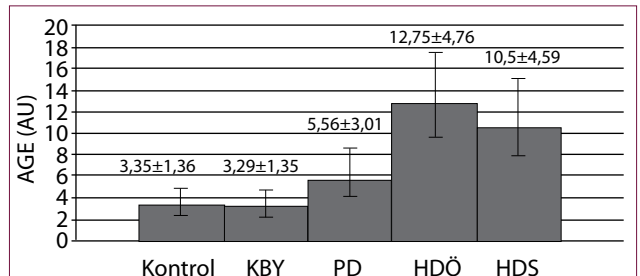
Kontrol ve hasta grupları	AOPP (µmol/L) Ortalama±SD	AGE (AU) Ortalama±SD
Kontrol grubu (n=35)	33,04±6,90	3,35±1,36
KBY grubu (n=36)	38,52±8,42	3,29±1,35
PD grubu (n=21)	39,14±7,71	5,56±3,01
HDÖ grup (n=64)	46,26±10,53	12,75±4,76
HDS grup (n=64)	57,03±13,38	10,50±4,59

AOPP: ileri düzey okside protein ürünleri; AGE: ileri glikasyon son ürünleri; KBY: kronik böbrek yetmezliği; PD: periton diyalizi; HDÖ: hemodiyaliz öncesi; HDS: hemodiyaliz sonrası; AU arbitrary units, SD standart sapma



Şekil 1. Grupların AOPP düzeylerini gösteren sütun grafiği

AOPP: ileri düzey okside protein ürünleri; KBY: kronik böbrek yetmezliği; PD: periton diyalizi; HDÖ: diyaliz öncesi; HDS: diyaliz sonrası



Şekil 2. Grupların AGE düzeylerini gösteren sütun grafiği

AGE: ileri glikasyon son ürünleri KBY kronik böbrek yetmezliği; PD: periton diyalizi; HDÖ: diyaliz öncesi; HDS: diyaliz sonrası

tü ($p<0,05$). KBY ve PD gruplarının AGE düzeyleri ise, HD grubunun diyaliz öncesi ve sonrası AGE düzeylerine göre belirgin şekilde düşüktü ($p<0,001$ her biri için). HD grubunun diyaliz öncesi ve sonrası AGE düzeyleri karşılaştırıldığı zaman, diyaliz işlemi sonrasında AGE düzeylerinin ciddi derecede düştüğü gözlemlendi ($p<0,001$) (Tablo 1).

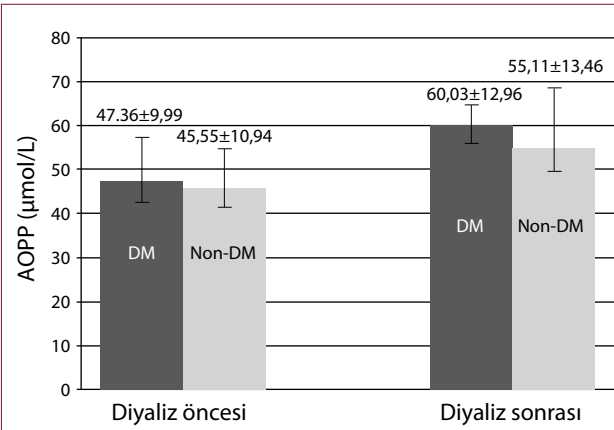
Tüm gruplara ait olan AOPP ve AGE düzeylerinin sütun grafikleri Şekil 1 ve 2'de gösterilmiştir.

Hemodiyaliz tedavisi gören hasta grubunun diyaliz öncesi AOPP ve AGE düzeyleri hastaların DM hastalığı olup olmama-

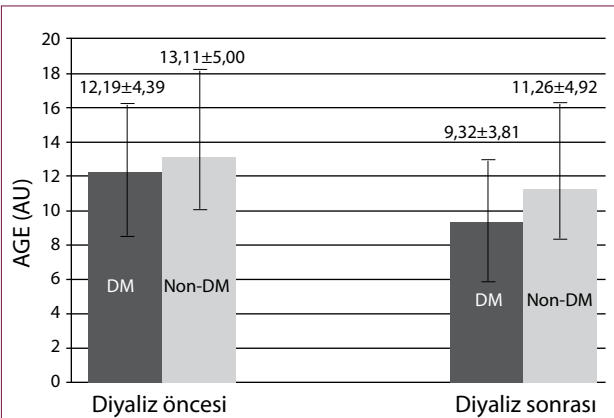
Tablo 2. Hemodiyaliz hasta grubunun diyabetli ve diyabetli olmayan alt gruplarının AOPP ve AGE düzeyleri

Hasta grupları	Diyaliz Öncesi Ortalama±SD	Diyaliz sonrası Ortalama±SD
Diyabetli grup (n=25) (AOPP, µmol/L)	47,36±9,99	60,03±12,96
Diyabet olmayan grup (n=39) (AOPP, µmol/L)	45,55±10,94	55,11±13,46
Diyabetli grup (n=25) (AGE, AU)	12,19±4,39	9,32±3,81
Diyabet olmayan grup (n=39) (AGE, AU)	13,11±5,00	11,26±4,92

AOPP: ileri düzey okside protein ürünleri; AGE: ileri glikasyon son ürünleri

**Şekil 3.** Hemodiyaliz grubunun diyaliz öncesi ve sonrasında AOPP düzeylerini diyabet mevcudiyetine göre karşılaştırmalı gösteren sütun grafik

DM: diabetes mellitus; Non-DM: diyabet hastalığı olmayanlar

**Şekil 4.** Hemodiyaliz grubunun diyaliz öncesi ve sonrasında AGE düzeylerini diyabet mevcudiyetine göre karşılaştırmalı gösteren sütun grafik

DM: diabetes mellitus; Non-DM: diyabet hastalığı olmayanlar

sına göre alt gruplara ayrılarak karşılaştırıldığında, DM olan hasta grubunun diyaliz öncesi AOPP düzeyi, DM olmayan hasta grubunkinden daha yüksek olmasına rağmen aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$). DM olan ve olmayan hastaların diyaliz sonrası AOPP düzeyleri karşılaştırıldığında da benzer sonuçlar elde edildi ($p>0,05$). HD hastalarının diyaliz öncesi AGE değerleri karşılaştırıldığında ise AOPP'nin aksine, AGE düzeyleri DM olan hastalarda daha düşüktü ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Diyaliz sonrası AGE düzeyleri karşılaştırıldığı zaman da benzer sonuçlar elde edildi ($p>0,05$ her biri için) (Tablo 2).

HD grubunun DM olan ve olmayan alt gruplarının diyaliz öncesi ve diyaliz sonrası AOPP ve AGE düzeylerini gösteren sütun grafikler şekil 3 ve 4'te gösterilmiştir.

Kontrol ve hasta gruplarının grup içi AOPP ve AGE düzeyleri arasında bir ilişki bulunup bulunmadığı korelasyon analizi ile değerlendirildi. Bu değerlendirme sonucunda grup içi AOPP ve AGE düzeyleri arasında bir ilişki yoktu ($r<0,250$, $p>0,05$ her biri için).

TARTIŞMA

Üremenin artmış oksidatif stres ile ilişkili olduğu ve özellikle HD ve PD tedavisinin oksidatif stresi arttırdığı ve antioksidan kapasiteyi azalttığına dair kuvvetli kanıtlar ortaya konmuştur (14, 15). Özellikle KBY sürecindeki oksidatif stresin ortaya konmasında güvenilir bir belirteç olarak kabul edilen AOPP (2), ilk kez 1996'da, kronik üremik hastaların plazmasında, yeni bir oksidatif stres belirtici olarak bildirilmiştir (5). Yaptığımız çalışma sonucunda KBY ve PD gruplarının AOPP düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmaz iken, her iki grubun AOPP düzeyleri, kontrol grubunkinden anlamlı derecede yüksekti. Replasman tedavisi alan/almayan tüm son dönem böbrek yetmezliği olan hastalar başlıca kaynağı MPO olan artmış bir oksidatif stresle karşı karşıyadır. Yapılan çalışmalarda plazma AOPP düzeylerinin en çok HD hastalarında (5, 16) olmak üzere, PD (5) ve diyaliz tedavisi almayan KBY hastalarında (5, 17) yüksek bulunduğu ortaya konmuştur. Üremik toksinlerin yanı sıra, diyaliz dolaşımdaki nötrofil ve monositleri serbest oksijen radikali (SOR) oluşturmak üzere tetikleme ile, diyaliz hastalarında oksidatif stresin indüklendiği varsayılmaktadır (18). HD esnasında ortaya çıkan SOR'nin en önemli kaynağı kullanılan membranlar ve diyalizat sıvılarının aktive ettiği polimorfonükleer lenfositlerdir (PMNL) (19, 20). PMNL'nin aktive olması ile ortaya çıkan solunum patlamasında rol alan NADPH oksidaz, süperoksit dismutaz ve MPO gibi enzimler, O_2^- , H_2O_2 ve HOCl gibi reaktif ürünlerin ortaya çıkmasına yol açar. Benzer şekilde çalışmamızda HD hastalarındaki diyaliz öncesi ve sonrasında tespit edilen AOPP düzeyleri, diğer tüm gruplardakinden yüksek bulundu. Ayrıca çalışmamızda, HD hastalarındaki AOPP düzeylerinin diyaliz işlemi sonrasında daha da arttığı tespit edildi. Benzer şekilde Witko-Sarsat ve arkadaşları da çalışmalarında HD işlemi sonrasında AOPP düzeylerinin arttığını bildirmişlerdir (5). AOPP molekülünün kendi klirensini önleyebilen yüksek molekül ağırlığına sahip olduğu, disülfid köprüleri ve/veya tirozin çapraz bağlanmalarını içeren albümin agregatlarından oluştuğu ve

in vitro şartlarda H₂O₂'den çok HOCl'ye maruz kalan saf/plazma albümin örneklerinde olduğu belirlendiğinden, in vivo olarak aktif nötrofillerle üretilen HOCl'in, AOPP oluşturabileceği düşünülmektedir (6, 18). HD işlemi sırasında kullanılan membranlar da, kan-membran etkileşimi nedeniyle immün hücrelerin tekrarlayan aktivasyonuna ve prooksidan durumun daha da kötüleşmesine neden olmaktadır (21). Ayrıca, kullanılan membranlar ve diyalizat sıvıları alternatif kompleman yolunun aktivasyonuna neden olarak hücre hasarının ilerlemesine yol açmaktadır (21-23). Diyaliz sırasında muhtemelen IgG ve kompleman komponentlerinin diyaliz membranına bağlanarak granülositler için biyoaktif bir yüzey oluşturduğu (24) ve membranla temas eden nötrofillerde degranülasyonun ve aktivasyonun indüklendiği de bildirilmiştir (25).

Oksidatif stresin erken aşamasında oluşan ve diğer oksidatif stres belirteçlerine göre dolaşımda daha uzun süre ve kararlı kalabilen AGE gibi protein karbonil bileşikleri (PCC) oksidan durumun değerlendirilmesinde güvenilir bir belirteç olarak bildirilmektedir (6, 26). Yaptığımız çalışmada kontrol ve KBY gruplarının AGE düzeyleri arasında fark bulamadık. Yapılan bir çalışmada üremik hastalardaki PCC'nin böbrek yetmezliğinin derecesine bağlı olarak giderek yükseldiği ve plazma kreatinin seviyeleriyle pozitif ilişkili olduğu ortaya konmuştur (27). Bir başka çalışmada ise, AGE gibi ürünlerin üremide artışını açıklayan iki mekanizma ileri sürülmüştür. İlk olarak bu ürünlerin renal klirensteki azalmaya bağlı olarak vücutta birikebileceği ikincisi ise, artan oksidatif stres nedeniyle lipid ve karbonhidrat kaynaklı reaktif karbonil bileşiklerinin oluşumunun daha da artmasıdır (28). Sonuç olarak çalışmamızdaki KBY grubunun hafif böbrek yetmezliğine sahip olması sebebi ile renal klirensteki hafif azalma, bu ürünlerin vücutta yeterince birikmemesi sonucu AGE düzeylerinin anlamlı derecede yükselmesine engel olmuş olabilir. Aynı zamanda oksidatif stresi artırıcı etkilerinden birçok çalışmada bahsedilen HD (2, 19-24, 29, 30) ve PD (2, 29, 30) gibi diyaliz işlemlerinin bu hasta grubunda uygulanmamış olması da bir diğer etken olarak düşünülebilir. Çalışmamızdaki KBY grubunun aksine, PD grubunun AGE düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti. HD öncesi AGE düzeyleri ise, hem kontrol grubunun hem de PD grubunun AGE düzeylerinden ciddi anlamda yüksek bulundu. Donate ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada benzer sonuçlar elde etmişlerdir (31). PD hastalarında okside/redükte albümin oranında ki artış, oksidatif strese bağlanmakta (32) ve diyalizatın yüksek glukoz içeriğinin karbonil ve oksidatif stres ile ilişkili olabileceği öne sürülmektedir. Otooksidasyon ve/veya ısıtma ile sterilizasyon sırasında glukoz yıkım ürünlerinin artışı ve glikasyon reaksiyonlarıyla AGE oluşumunun hızlandığı düşünülmektedir (33). Diğer taraftan PD hastalarında yüksek geçirgenliğe sahip peritonun diyalizer görevi yapması ve rezidüel renal fonksiyonun daha iyi olması nedeniyle üremik toksinlerin peritondan daha etkili bir şekilde temizlendiği ve HD hastalarına göre PD hastalarına plazma ve doku düzeylerinin daha düşük olduğu bildirilmiştir (11). Çalışmamızdaki HD hastalarının AGE düzeyleri diyaliz sonrasında azalma gösterse de, bu konu ile ilgili yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar elde

edilmiştir. Örneğin, Ward ve arkadaşları diyaliz sonrası AGE düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir yükselme gözler iken, Himmelfarb ve arkadaşları, seans sırasında, sonunda ve hatta seanstan 30 ve 60 dakika sonra bile değişmeyen PCC düzeylerini, diyaliz boyunca oksidasyon olmadığı şeklinde yorumlamışlardır (34).

Çalışmamızda HD grubundaki DM olan ve olmayan gruplar arasında diyaliz öncesi ve sonrası AOPP ve AGE düzeyleri bakımından fark bulamadık. Bu konu hakkında AOPP ile ilgili bir çalışma bulunmasa da, AGE düzeyleri ile ilgili yapılan bir çalışmada DM olan ve olmayan üremik hastalar arasında fark olmadığı bildirilmiştir (33).

Çalışmamızdaki her bir gruptaki AOPP ile AGE düzeylerini değerlendirdiğimizde aralarında herhangi bir ilişki bulamadık. Bu konu ile ilgili yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin Kalousov ve arkadaşları DM hastalarındaki AOPP ve AGE düzeyleri arasında ilişki bulurken (35), HD hastalarında yapmış oldukları bir başka çalışmada diyaliz öncesi AOPP ve AGE düzeyleri arasında gözlemledikleri ilişkiyi, diyaliz işlemi sonrasında elde edememişlerdir (36). Oysaki bazı çalışmalarda hem diyaliz tedavisi alan hem de almayan KBY hastalarının AOPP ve AGE düzeyleri arasında ilişki bulunmuştur (18, 28). Ayrıca, çalışmamızdaki kontrol ve hasta gruplarının yaşları ile protein oksidasyon ürünlerinin düzeyleri arasında ilişki saptanmadı. Kalousov ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada HD hastalarındaki AOPP ve AGE düzeyleri ile yaş arasında ilişki olmadığını bildirmişlerdir (36). Farklı olarak E. Matteucci ve ark. (37) yaş ile birlikte serum albümin ve total protein düzeylerinin azalmasına paralel olacak şekilde, protein oksidasyon ürünleri ile yaş arasında negatif ilişki olduğunu bildirmişlerdir.

Sonuç olarak, AOPP ve AGE düzeylerinin özellikle HD ve PD hastalarında belirgin bir şekilde yükseldiğini tespit ettik. İstatistiksel olarak en önemli artışın ise HD hasta grubunda olduğu tespit edildi. Sonuç olarak, replasman tedavisi gören KBY hastalarında ve özellikle de HD tedavisi gören hastalarda oksidatif stresin çok daha şiddetli olduğu gözlemlendi. Protein oksidasyon ürünlerinin kandaki düzeylerinin kreatinin klirens değerleri (28), yaş (37), cinsiyet (12), serum trigliserit (35, 37), üre (37) ve ferritin düzeyleri, intravenöz demir tedavisi alınması (38) gibi birçok faktörden etkilendiği bildirildiğinden dolayı replasman tedavisi alan ya da almayan tüm KBY hastalarında oksidatif stres oluşumunun çok yönlü olarak değerlendirilmesi gerektiği ve bu mekanizmaların multifaktöriyel nedenli olduğu düşüncesindeyiz.

Etik Komite Onayı: Yazarlar çalışmanın World Medical Association Declaration of Helsinki "Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects", (Ekim 2013'te gözden geçirilmiş) prensiplerine uygun olarak yapıldığını beyan etmişlerdir.

Hasta Onamı: Yazılı hasta onamı bu çalışmaya katılan hastalardan alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - C.C., M.K.; Tasarım - C.C., A.K.; Denetleme - A.K., M.K.; Kaynaklar - C.C., A.K.; Gereçler - C.C.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - C.C., A.K.; Analiz ve/veya Yorum - C.C., A.K., M.K.; Literatür Taratması - C.C., A.K., M.K.; Yazıyı Yazan - C.C.; Eleştirel İnceleme - A.K., M.K.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bilmemiştir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışmanın finansal destek alınmadan yapıldığını bildirmiştir.

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

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

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - C.C., M.K.; Design - C.C., A.K.; Supervision - A.K., M.K.; Resource - C.C., A.K.; Materials - C.C.; Data Collection and/or Processing - C.C., A.K.; Analysis and/or Interpretation - C.C., A.K., M.K.; Literature Search - C.C., A.K., M.K.; Writing - C.C.; Critical Reviews - A.K., M.K.

Conflict of Interest: Authors have no conflict interest to declare.

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

KAYNAKLAR

- Sosa V, Molin  T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh H, Lleonart ME. Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Res Rev* 2013; 12: 376-90. [CrossRef]
- Yazıcı C, K se K. Oxidative stress and "biomarker"s in chronic renal failure. *Turk Neph Dial Transpl* 2004; 13: 117-24.
- Himmerfalb J, Hakim RM. Oxidative stress in uremia. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003; 12: 593-8. [CrossRef]
- Danielski M, Ikizler A, McMonagle E, et al. Linkage of hypoalbuminemia, inflammation, and oxidative stress in patients receiving maintenance hemodialysis therapy. *Am J Kidney Dis* 2003; 42: 286-94. [CrossRef]
- Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 1996; 49: 1304-13. [CrossRef]
- Massy ZA, Nguyen-Khoa T. Oxidative stress and chronic renal failure: markers and management. *J Nephrol* 2002; 15: 336-41.
- Vaziri ND. Oxidative Stress in Uremia: nature, mechanisms, and potential consequences. *Semin Nephrol* 2004; 24: 469-73. [CrossRef]
- Sundl I, Roob JM, Meinitzer A, et al. Antioxidant status of patients on peritoneal dialysis: Associations with inflammation and glycoxidative stress. *Periton Dialysis Int* 2008; 29: 89-101.
- Witowski J, Jorres A, Korybalska K, et al. Glucose degradation products in peritoneal dialysis fluids: do they harm? *Kidney Int Suppl* 2003; 84: 148-51. [CrossRef]
- Miyata T, Devuyst O, Kurokawa K, et al. Toward better dialysis compatibility: advances in the biochemistry and pathophysiology of the peritoneal membranes. *Kidney Int* 2002; 61: 375-86. [CrossRef]
- Lameire N, Vanholder R, De Smet R. Uremic toxins and peritoneal dialysis. *Kidney Int* 2001; 59: 292-7. [CrossRef]
- Selmeci L, Seres L, Antal M, Luk cs J, Reg ly-M rei A, Acs dy G. Advanced oxidation protein products (AOPP) for monitoring oxidative stress in critically ill patients, fast and inexpensive automated technique. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43: 294-7. [CrossRef]
- Kaluosova M, Skrha J, Zima T. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. *Physiol Res* 2002; 51: 597-604.
- Toborek M, Wasik T, Dr dz M et al. Effect of hemodialysis on lipid peroxidation and antioxidant system in patients with chronic renal failure. *Metabolism* 1992; 41: 1229-32. [CrossRef]
- Epperlein MM, Nourooz-Zadeh J, Jayasena SD, Hotherhall JS, Noronha-Dutra A, Neild GH. Nature and biological significance of free radicals generated during bicarbonate hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 457-63.
- Nguyen-Khoa T, Massy ZA, De Bandt PJ, et al. Oxidative stress and hemodialysis: role of inflammation and duration of dialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 335-40. [CrossRef]
- Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen-Khoa T, et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol* 1998; 161: 2524-32.
- Descamps-Latscha B, Witko-Sarsat V. Importance of oxidatively modified proteins in chronic renal failure. *Kidney Int Suppl* 2001; 59: 108-13. [CrossRef]
- Chen MF, Chang CL, Liou SY. Increase in resting levels of superoxide anion in the whole blood of uremic patients on chronic hemodialysis. *Blood Purif* 1998; 16: 290-300. [CrossRef]
- Ward R, Meleisin K. Polymorphonuclear leukocyte oxidative burst is enhanced in patients with chronic renal insufficiency. *J Am Soc Nephrol* 1994; 5: 1697-702.
- Craddock PR, Hammerschmidt DE. Complement-mediated granulocyte activation and down-regulation during hemodialysis. *ASAIO J* 1984; 7: 50-6.
- H rl WH, Riegel W, Schollmeyer P, Rautenberg W, Neumann S. Different complement and granulocyte activation in patient dialyzed with PMMA dialyzers. *Clin Nephrol* 1986; 25: 304-7.
- Stroncek DF, Keshaviah P, Craddock PR, Hammerschmidt DE. Effect of dialyzer reuse on complement activation and neutropenia in hemodialysis. *J Lab Clin Med* 1984; 104: 304-11.
- H llgren R, Venge P, Danielson BG. Neutrophil and eosinophil degradation during hemodialysis are mediated by the dialysis membrane. *Nephron* 1982; 32: 329-34. [CrossRef]
- H rl WH, Riegel W, Steinhauer HB, et al. Granulocyte activation during hemodialysis. *Clin Nephrol* 1986; 26: 30-4.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2003; 329:23-38. [CrossRef]
- Mimi c-Oka J, Simi  T, Plje a M, N Stupar N, Turkovi  S. Oxidative modification of plasma proteins in different stages of chronic renal failure. *Med Biol* 2001; 8: 1-5.
- Witko-Sarsat V, Nguyen-Khoa T, Jungers P, Dr eque TB, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as a novel molecular basis of oxidative stress in uremia. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 76-8. [CrossRef]
- Amore A, Coppo R. Immunological basis of inflammation in dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 16-24. [CrossRef]
- K ken T, Kahraman A, Serteser M, et al., Hemodiyaliz ve Oksidatif Stres. *Kocatepe Tıp Dergisi* 2004; 5 (Ek Sayı): 9-13.
- Donate T, Herreros A, Martinez E, et al. Protein oxidative stress in dialysis patients. *Adv Perit Dial* 2002; 18: 15-17.

32. Kumano K, Yokota S, Go M, et al. Quantitative and qualitative changes of serum albumin in CAPD patients. *Adv Perit Dial* 1992; 8: 127-30.
33. Miyata T, Sugiyama S, Saito A, et al. Reactive carbonyl compounds related uremic toxicity (carbonyl stress). *Kidney Int* 2001; 59: 25-31. [\[CrossRef\]](#)
34. Himmelfarb J, Mc Monagle E, McMenamin E. Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. *Kidney Int* 2000; 58: 2571-8. [\[CrossRef\]](#)
35. Kalousov M, Krha J, Zima T. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. *Physiol Res* 2002; 51: 597-604.
36. Kalousová M, Zima T, Tesar V, Lachmanová J. Advanced glycation end products and advanced oxidation protein products in hemodialyzed patients. *Blood Purif* 2002; 20: 531-6. [\[CrossRef\]](#)
37. Matteucci E, Biasci E, Giampietro O. Advanced oxidation protein products in plasma: stability during storage and correlation with other clinical characteristics. *Acta Diabetol* 2001; 38: 187-9. [\[CrossRef\]](#)
38. Witko-Sarsat V, Gausson V, Descamps-Latscha B. Are advanced oxidation protein products potential uremic toxins? *Kidney Int* 2003; 63: 11-4. [\[CrossRef\]](#)

Cerebrospinal Fluid Analysis of Pericytic Mediators in Clinically Isolated Syndrome and Multiple Sclerosis: A Preliminary Study

Klinik İzole Sendrom ve Multipl Skleroz Hastalarının Beyin Omurilik Sıvılarında Perisitik Mediyatörlerin Analizi: Pilot Çalışma

Tuncay Gündüz¹, Tuba Tanyel-Kiremitçi², Canan Ulusoy³, Murat Kürtüncü¹, Recai Türkoğlu²

¹Department of Neurology, İstanbul University İstanbul School of Medicine, İstanbul, Turkey

²Department of Neurology, Haydarpaşa Numune Training and Research Hospital, İstanbul, Turkey

³Department of Neuroscience, Institute of Experimental Medicine, İstanbul University, İstanbul, Turkey

Cite this article as: Gündüz T, Tanyel-Kiremitçi T, Ulusoy C, Kürtüncü M, Türkoğlu R. Cerebrospinal fluid analysis of pericytic mediators in clinically isolated syndrome and multiple sclerosis: A preliminary study. Experimed 2018; 8(1): 18-22.

ABSTRACT

Objectives: In many studies, blood brain barrier has been shown to be compromised in multiple sclerosis patients. Pericytes play an active role in ensuring the continuity of the blood brain barrier along with a series of cells. In this study, the effect of pericytic dysfunction on the development of demyelinating plaques in patients with multiple sclerosis was investigated.

Material and Method: Concentrations of pericyte dysfunction mediators (PDGFbb, MMP9, TIMP3 and ADAM17) in cerebrospinal fluid of patients with clinically isolated syndrome (CIS), relapsing remitting multiple sclerosis (RRMS) and healthy control group were measured by ELISA and oligoclonal bands (OCB) were investigated. We aimed to determine whether the concentration of these mediators differed between groups and whether they correlated with lesion load, number of attacks, and EDSS scores.

Results: Concentrations of all four mediators were similar in patients with CIS and RRMS. However, both groups were found to be higher than the healthy group. In the CIS and RRMS groups, the levels of the mediators were not correlated with any parameters examined. However, the levels of PDGFbb ($p=0.045$), MMP9 ($p=0.037$), and TIMP3 ($p=0.033$) were higher in OCB positive patients than in those without OCB, whereas ADAM17 levels remained unchanged.

Conclusion: This study shows that pericytes may play a role in the pathogenesis of MS from early stages of the disease. The presence of higher levels in patients with OCB suggests that pericyte dysfunction may be associated with OCB formation.

Keywords: Multiple sclerosis, clinically isolated syndrome, pericyte, cerebrospinal fluid, neuroinflammation

ÖZ

Amaç: Multipl skleroz'da kan beyin bariyerinin bozulduğu pek çok çalışmada gösterilmiştir. Perisitler bir dizi hücre yanında kan beyin bariyerinin devamlılığının sağlanmasında aktif rol üstlenir. Bu çalışmada multipl skleroz hastalarında perisit disfonksiyonunun demyelizan plakların gelişimindeki etkisi araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Klinik izole sendrom (KİS), relapsing remitting multipl skleroz (RRMS) ve sağlıklı kontrol grubundan alınan beyin omurilik sıvılarında perisit disfonksiyon mediyatörlerinin (PDGFbb, MMP9, TIMP3 ve ADAM17) konsantrasyonları ELISA ile ölçüldü ve oligoklonal bantlar (OKB) araştırıldı. Bu mediyatörlerin, gruplar arasındaki farklılıkları lezyon yükü, atak sayısı ve EDSS skorları ile korelasyon gösterip göstermediği belirlendi.

Bulgular: Her dört mediyatörün konsantrasyonları KİS ve RRMS hastalarında benzer bulundu. Bununla beraber her iki grupta sağlıklı kontollerden yüksek bulundu. KİS ve RRMS grubunda, mediyatörlerin seviyelerinin bakılan hiçbir parametre ile korelasyon göstermediği saptandı. Buna karşın, beyin omurilik sıvılarında OKB bulunan hastalarda PDGFbb ($p=0,045$), MMP9 ($p=0,037$) ve TIMP3 ($p=0,033$) düzeylerinin OKB bulunmayanlara göre daha yüksek olduğu, ADAM17 seviyelerinin ise değişmediği görüldü.

Sonuç: Bu çalışma perisit disfonksiyon mediyatörlerinin MS'in patogenezinde hastalığın erken dönemlerinden itibaren rol alabileceğini göstermektedir. Oligoklonal band bulunan hastalarda daha yüksek seviyelerdeki mevcudiyeti, perisit disfonksiyonunun OKB oluşumu ile bir ilgisi olabileceğini akla getirmektedir.

Anahtar Kelimeler: Multipl skleroz, klinik izole sendrom, perisit, beyin omurilik sıvısı, nöroinflamasyon

Corresponding Author/Sorumlu Yazar: Tuncay Gündüz **E-mail:** drtuncaygun@gmail.com

Geliş Tarihi/Received Date: 16.06.2018 **Kabul Tarihi/Accepted Date:** 17.06.2018

© Copyright 2018 by The İstanbul University Faculty of Science • Available online at http://experimed.istanbul.edu.tr/_

© Telif Hakkı 2018 İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi • Makale metnine http://experimed.istanbul.edu.tr/_sayfasından ulaşılabilir.

INTRODUCTION

Disruption of the blood-brain barrier (BBB) is an important physiopathological aspect of multiple sclerosis (MS), which enables hazardous humoral and cellular immunological elements to gain access into the central nervous system (1). BBB integrity is maintained by the neurovascular unit, which is made up of astrocytes, endothelial cells and pericytes (2). Although involvement of glial cells and endothelial inflammation in BBB disruption and MS pathogenesis has been extensively studied (1), little is known about the contribution of pericytes to the formation of active demyelinating lesions. Pericyte dysfunction is known to lead to the release of various mediators of inflammation (e.g. matrix metalloproteinase 9; MMP9), which lead to the disruption of the BBB (2). Platelet-derived growth factor (PDGF) bb-PDGF receptor β signaling pathway in pericytes is crucial for BBB functioning (3). Interaction of metalloproteinases (e.g. MMP9 and a disintegrin and metalloproteinase-17; ADAM17) with their inhibitors (e.g. tissue inhibitor of metalloproteinases-3; TIMP3) modulate pericyte functions and thus BBB permeability (4, 5). Notably, mice with inborn pericyte dysfunction show defective remyelination in response to the experimental MS model induced by lysolecithin (6). Moreover, several mediators released by pericytes and/or endothelial cells (e.g. PDGFbb, MMP9, TIMP3, and ADAM17) have been shown to be associated with MS physiopathology (7-9). These findings suggest a link between pericyte dysfunction, onset of BBB disruption and formation of demyelinating lesions and bring forward the notion of using pericytic mediators as biomarkers or therapeutic targets of MS.

METHODS

To investigate the significance of pericytic mediators, cerebrospinal fluid (CSF) samples were collected from 18 patients with clinically isolated syndrome (CIS) and 19 patients with relapsing remitting MS (RRMS). All samples were collected during the

remission period. CSF samples of CIS patients were collected after the cessation of steroid treatment within the first two months of the first clinical episode. None of the patients were under immunosuppressive or immunomodulating treatment during sampling. RRMS patients had higher number of relapses, MRI lesions and EDSS scores than CIS patients, as expected (Table 1). Oligoclonal bands (OCB) were investigated in all patients. Twenty age/gender-matched healthy individuals, whose CSF samples had been collected for differential diagnosis of acute-onset headache, were used as controls. These individuals did not have any disorders, had normal neurological and systemic examination, brain MR imaging, CSF cell count, protein and glucose content, total blood count and blood chemistry findings. They also gave prompt response to non-steroidal anti-inflammatory drugs and remained healthy for a follow-up period of six months. CSF samples were kept at -80°C until use and thawed at the same time prior to experiments. CSF levels of PDGFbb, MMP9, TIMP3, and ADAM17 were measured by ELISA as per manufacturer's instructions (Abcam, Cambridge, UK). A standard curve was constructed based on a range of standard concentrations. The unknown concentrations in the samples were calculated from the standard curve and results were expressed as pg/ml or ng/L. $p < 0.05$ was considered as significant in statistical tests. Ethics committee approval was received for this study from the ethics committee of Istanbul University (11.01.2016 – 2015/KK/96).

RESULTS

Both CIS and MS patients had significantly higher PDGFbb ($p=0.022$), MMP9 ($p=0.039$), TIMP3 ($p=0.010$), and ADAM17 ($p=0.018$) levels than healthy controls. However, no significant differences could be found between CIS and MS patients by Tukey's post-hoc test (Figure 1). Spearman tests, performed to seek a correlation between CSF levels of pericytic mediators and age, disease duration, number of relapses, number of brain MRI lesions and EDSS scores failed to identify a significant cor-

Table 1. Clinical and demographic features of clinically isolated syndrome (CIS) patients, multiple sclerosis (MS) patients and healthy controls (HC)

	CIS (n=18)	MS (n=19)	HC (n=20)	p
Gender (women/men)	10/8	12/7	11/9	0.850*
Age	26.4 \pm 7.9	29.9 \pm 7.1	28.6 \pm 6.3	0.512**
Disease duration (years)	-	5.9 \pm 1.3	-	-
Number of relapses	1.0 \pm 0.0	6.4 \pm 3.1	-	NA
Number of MRI lesions	1.8 \pm 1.0	7.1 \pm 1.9	-	<0.001***
Number of patients with CSF OCB	10	13	-	0.640*
EDSS score	1.7 \pm 0.7	3.1 \pm 1.0	-	<0.001 [†]

CSF: cerebrospinal fluid; OCB: oligoclonal bands; EDSS: expanded disability status scale; NA: not applicable
Numerical values are signified in the form of average \pm standard deviation.
*Chi-square test; **ANOVA; ***Student's t-test; [†]Mann-Whitney U test

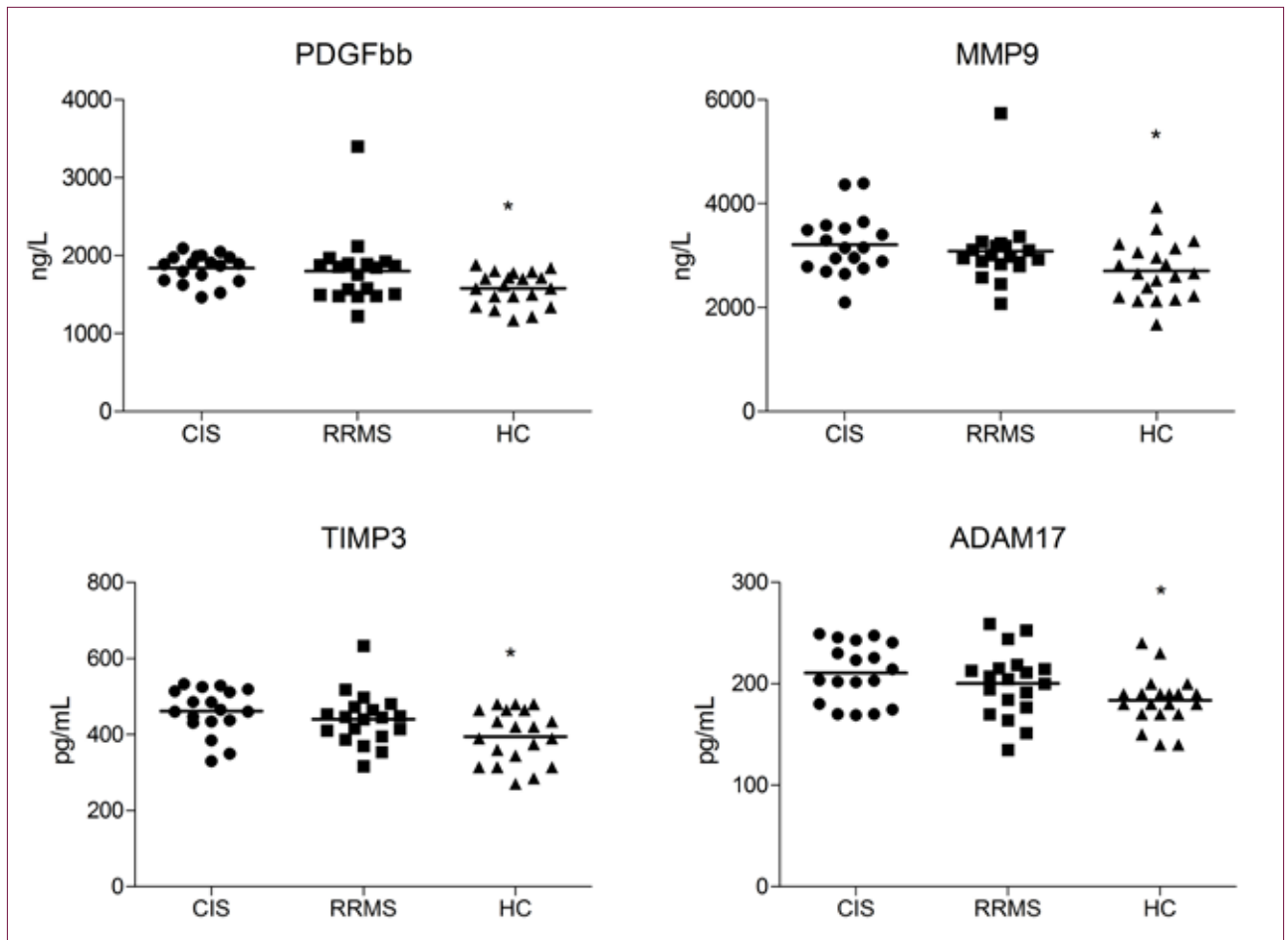


Figure 1. Cerebrospinal fluid PDGFbb, TIMP3, ADAM15, and MMP9 levels of clinically isolated syndrome (CIS) patients, relapsing remitting multiple sclerosis (MS) patients and healthy controls (HC). Horizontal lines indicate mean values. *p<0.05 by ANOVA

relation. CSF levels of PDGFbb (p=0.045), MMP9 (p=0.037) and TIMP3 (p=0.033) were higher in MS patients with pattern 2 or 3 OCB than those without CSF OCB. By contrast, ADAM17 levels were comparable among OCB positive and negative groups (p=0.499) (Figure 2).

DISCUSSION

Cerebrospinal fluid levels of pericytic mediators are higher in MS patients compared to healthy controls, starting shortly after the first clinical episode during the CIS stage indicating altered pericytic activity in early stages of MS. Absence of a significant difference between CIS and RRMS patients imply that CSF levels of pericytic mediators are unlikely to be used as biomarkers to predict conversion from CIS to MS. Additionally, MMP9 levels have been found comparable among MS and CIS patients (10). By contrast, OCB positive RRMS patients display elevated levels of PDGFbb, MMP9 and TIMP3, all of which participate in the BBB functions. MMP9 is a well-known mediator of BBB dysfunction (7). Although PDGFbb is required for pericyte generation, high levels of PDGFbb

may lead to pericyte loss (3). Thus a likely hypothesis is that pericyte dysfunction emerges during the progression of MS further increasing the BBB permeability and ultimately leading to increased B cell access and enhanced OCB formation. TIMP3 is required for the BBB integrity and has previously been shown to be overexpressed in MS lesions (9). This mediator is possibly released in increasing amounts as a compensating factor to avert the BBB dysfunction in MS.

Pathogenic differences between OCB positive and negative MS patients have been scarcely investigated. OCB positivity has been associated with increased lesion load and disability in some studies (11). Our results suggest that pericytic dysfunction, and ensuing BBB dysfunction might be one of the underlying causes of OCB formation.

Many other pericytic mediators such as chemokines, cytokines and adhesion molecules were not investigated since they are produced by a variety of cell types and therefore are not useful in dissecting specific involvement of pericytes (2). Evidently, mediators involved in this study may also be produced by

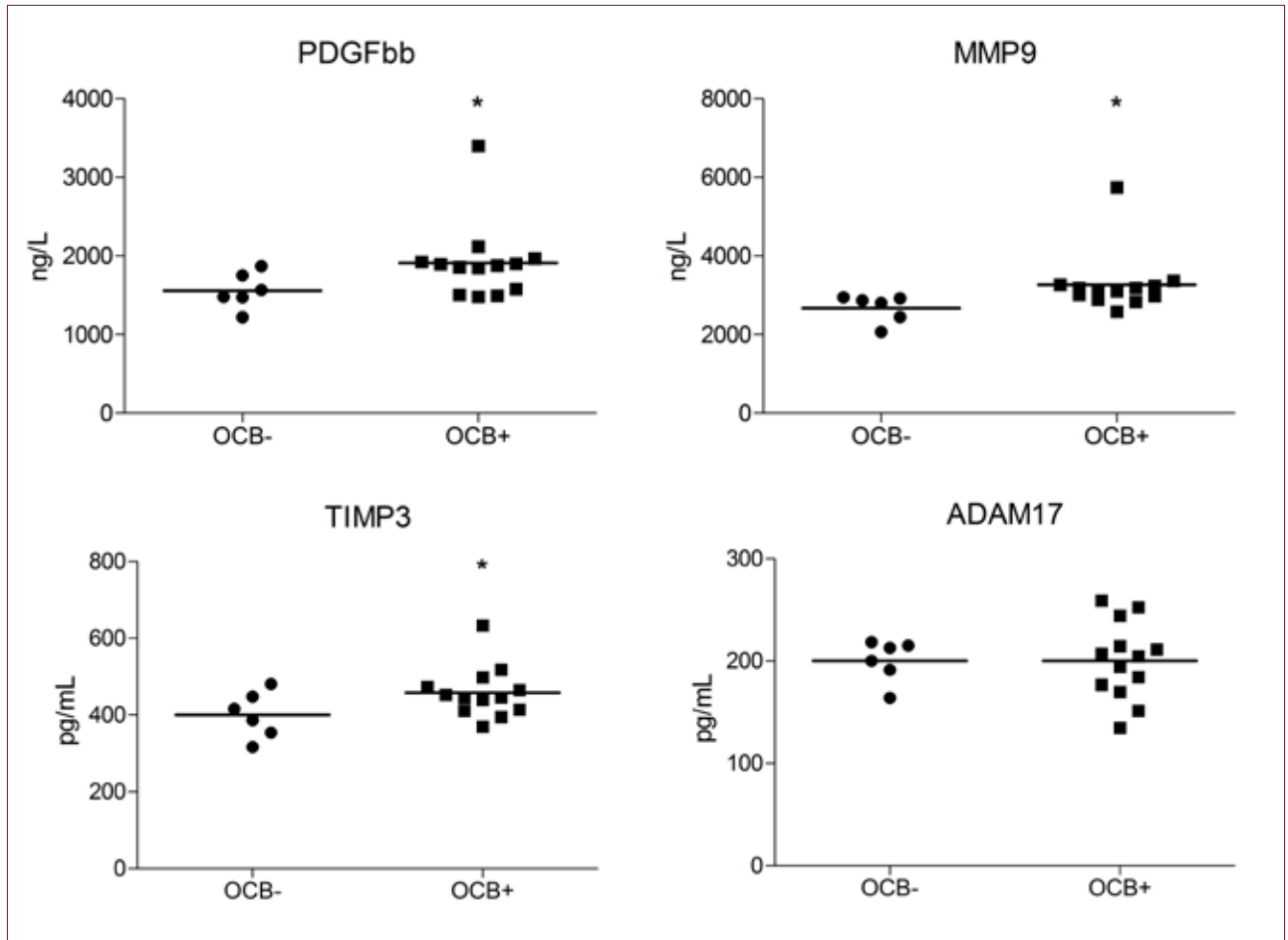


Figure 2. Cerebrospinal fluid PDGFbb, TIMP3, ADAM15, and MMP9 levels of oligoclonal band (OCB) positive (pattern 2 or 3) and OCB negative relapsing remitting multiple sclerosis (MS) patients. Horizontal lines indicate mean values.
* $p < 0.05$ by Student's t-test

endothelial cells and even glial cells to a certain degree and finding a factor exclusively produced by pericytes is a major challenge.

Our preliminary study gives a hint on involvement of pericytes in MS pathogenesis in early stages and indicates that pericytes are probably not innocent bystanders. Increased levels of pericytic dysfunction mediators in OCB positive patients compared to OCB negative patients suggests the need for further investigations. Novel methods for specific assessment of pericytes are also required for better characterization of the neurovascular unit in MS.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the ethics committee of İstanbul University (11.01.2016 – 2015/KK/96).

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

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - T.G., T.T.-K., R.T.; Design - T.G., T.T.-K., M.K., R.T.; Supervision - M.K., R.T.; Resource - M.K., R.T.; Materials - T.G., T.T.-K., R.T.; Data Collection and/or Processing - T.G., T.T.-K., M.K., R.T.; Analysis and/or Interpretation - M.K., R.T.; Literature Search - T.G., T.T.-K., R.T.; Writing - T.G., M.K., R.T.; Critical Reviews: M.K., R.T.

Conflict of Interest: Authors have no conflict of interest to declare.

Financial Disclosure: This study was supported by the Research Fund of the İstanbul University, Project number: 23979.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı İstanbul Üniversitesi etik kurulundan alınmıştır (11.01.2016 – 2015/KK/96).

Hasta Onamı: Yazılı hasta onamı bu çalışmaya katılan hastalardan alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

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

Çıkar Çatışması: Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması olmadığını bildirmişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir, Proje no: 23979).

REFERENCES

1. Minagar A, Alexander JS. Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2003; 9: 540-9. [\[CrossRef\]](#)
2. Hill J, Rom S, Ramirez SH, Persidsky Y. Emerging roles of pericytes in the regulation of the neurovascular unit in health and disease. *J Neuroimmune Pharmacol* 2014; 9: 591-605. [\[CrossRef\]](#)
3. Niu F, Yao H, Liao K, Buch S. HIV Tat 101-mediated loss of pericytes at the blood-brain barrier involves PDGF-BB. *Ther Targets Neurol Dis* 2015; 2: pii: e471.
4. Shukla V, Shakya AK, Shukla M, Kumari N, Krishnani N, Dhole TN, et al. Circulating levels of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases during Japanese encephalitis virus infection. *Virusdisease* 2016; 27: 63-76. [\[CrossRef\]](#)
5. Candelario-Jalil E, Yang Y, Rosenberg GA. Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. *Neuroscience* 2009; 158: 983-94. [\[CrossRef\]](#)
6. Muramatsu R, Kuroda M, Matoba K, Lin H, Takahashi C, Koyama Y, et al. Prostacyclin prevents pericyte loss and demyelination induced by lysophosphatidylcholine in the central nervous system. *J Biol Chem* 2015; 290:1 1515-25.
7. Fainardi E, Castellazzi M, Bellini T, Manfrinato MC, Baldi E, Casetta I, et al. Cerebrospinal fluid and serum levels and intrathecal production of active matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as markers of disease activity in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2006; 12: 294-301. [\[CrossRef\]](#)
8. Gold SM, Chalifoux S, Giesser BS, Voskuhl RR. Immune modulation and increased neurotrophic factor production in multiple sclerosis patients treated with testosterone. *J Neuroinflammation* 2008; 5: 32. [\[CrossRef\]](#)
9. Haddock G, Cross AK, Plumb J, Surr J, Buttle DJ, Bunning RA, et al. Expression of ADAMTS-1, -4, -5 and TIMP-3 in normal and multiple sclerosis CNS white matter. *Mult Scler* 2006; 12: 386-96. [\[CrossRef\]](#)
10. Ljubisavljevic S, Stojanovic I, Basic J, Vojinovic S, Stojanov D, Djordjevic G, et al. The role of Matrix Metalloproteinase 3 and 9 in the pathogenesis of acute neuroinflammation. Implications for disease modifying therapy. *J Mol Neurosci* 2015; 56: 840-7. [\[CrossRef\]](#)
11. Farina G, Magliozzi R, Pitteri M, Reynolds R, Rossi S, Gajofatto A, et al. Increased cortical lesion load and intrathecal inflammation is associated with oligoclonal bands in multiple sclerosis patients: a combined CSF and MRI study. *J Neuroinflammation* 2017; 14: 40. [\[CrossRef\]](#)

Fosfoproteomik Uygulama Basamaklarına Genel Bakış

An Overview of The Phosphoproteomic Workflow

Mustafa Gani Sürmen¹ , Saime Sürmen¹ , Sadrettin Pençe^{1,2} 

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

²Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Cite this article as: Sürmen MG, Sürmen S, Pençe S. An overview of the phosphoproteomic workflow. Experimed 2018; 8(1): 23-32.

ÖZ

Proteomik çalışmalar, kütle spektrometresi ve kromatografi alanındaki teknolojik gelişmeler sayesinde patolojik ya da fizyolojik olayları daha detaylı olarak değerlendirebilmemize imkan sağlamaktadır. Kütle spektrometresi tabanlı proteomik çalışmaların önemli bir araştırma alanı olan protein fosforilasyonları, hücresel işleyişin patolojik değişiminde moleküler aktivitenin dinamik belirteçleri olarak etkin rol oynar. Bu nedenle hastalıkların moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasında ve etkin tanı-tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde fosfoproteomik çalışmalar artan öneme sahiptir. Fosfoproteinlerin tanımlanması ve miktar analizlerinin yapılabilmesi oldukça verimli tekrarlanabilir yöntemlerin kullanılmasını gerektirir. Bu amaçla fosfoproteomik uygulamalardaki verimliliğin en üst düzeye çıkarılmasında mevcut yöntemler geliştirilmeye devam etmektedir. Kütle spektrometresi tabanlı fosfoproteomik araştırmaların temel metodolojisinin anlatıldığı ve uygulamalarda karşılaşılan zorlukların tartışıldığı bu çalışmanın, MS tabanlı fosfoproteomik alanına ilgi duyan araştırmacılara yardımcı olacağını umuyoruz.

Anahtar Kelimeler: Fosfoproteomik, örnek hazırlığı, zenginleştirme, niceliksel fosfoproteomik, kütle spektrometresi

ABSTRACT

Proteomic studies permit the evaluation of pathological or physiological events in more detail through technological developments in the fields of mass spectrometry and chromatography. Protein phosphorylation, an important research area of mass spectrometry-based proteomic studies, plays an active role as a dynamic marker of molecular activity in the pathological alteration of cellular processes. Therefore, phosphoproteomic studies are gaining importance in the elucidation of molecular mechanisms of diseases and the development of effective diagnostic and treatment methods. Identification and quantitative analysis of phosphoproteins requires the use of highly efficient and reproducible methods. The development of existing methods is ongoing in order to maximize the efficiency of phosphoproteomic applications. We hope that this study, which explains the basic methodology of mass spectrometry-based phosphoproteomic research and discusses its practical challenges, will be useful for researchers interested in MS-based phosphoproteomics.

Keywords: Phosphoproteomics, sample preparation, enrichment, quantitative phosphoproteomics, mass spectrometry

GİRİŞ

İnsan genom projesinin tamamlanmasıyla birlikte - protein kodlayan yaklaşık 20.000 gen ortaya çıkarılmış, bu genlere ait mutasyonlar ve ekspresyon farklılıkları ortaya konulmuştur (1). İnsan genomunun haritalanması hastalıkların moleküler mekanizmasının anlaşılmasında, erken tespitinde ve tedavisinde büyük umut kaynağı olmuştur. Kapsamlı genomik çalışmalarla tespit edilen mutasyonlar ve ekspresyon farklılıkları çeşitli hastalıklarda rol oynayan sinyal yollarına olan bakış açımızın gelişmesini sağlarken kanser gibi moleküler mekanizması kompleks olan heterojen hastalıkların araştırılmasında sadece genomik analizlerin yeterli olmadığı da anlaşılmıştır. Bununla birlikte yaşanan genomik

devrim; protein, transkript, metabolit veya lipid profillerinin biyoinformatik destekle topluca değerlendirildiği genom sonrası "omik" platformlarının gelişmesine zemin hazırlamıştır (2, 3). Hücrenin fonksiyonel makromolekülleri olan proteinlerin; fizyolojik ve patolojik süreçlerdeki rolünü daha iyi anlamaya yönelik yapılan proteomik çalışmalar son onbeş yıl içerisinde özellikle kanser araştırmalarında önem kazanmıştır (4, 5). Post translasyonel değişiklikler (PTM'ler) ve izoform varyasyon nedeniyle genomun aksine çok daha çeşitli olan proteom aynı zamanda dinamik yapıdadır. Genellikle geri dönüşümlü modifikasyonlar olan fosforilasyonlar, proteinleri aktif ya da inaktif formlarına dönüştürürler. Buna bağlı olarak sinyal iletimi, büyüme ve apoptoz gibi hücrenel süreçlerin düzenlenmesinde rol oynayan fosforilasyonlar,

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Mustafa Gani Sürmen **E-mail:** mtsurmen@gmail.com

Geliş Tarihi/Received Date: 17.04.2018 **Kabul Tarihi/Accepted Date:** 24.04.2018

© Copyright 2018 by The Istanbul University Faculty of Science • Available online at <http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/>

© Telif Hakkı 2018 İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi • Makale metnine http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/_sayfasından ulaşılabilir.

en sık çalışılan modifikasyonlar arasında yer alır. Ancak belirli bir protein popülasyonunda yalnızca küçük bir bölüm, belirli bir zaman aralığında ve kısa süreli olarak fosforile olur. Bu nedenle fosfoproteinler, bir hücre lizatı içinde bulunan tüm proteinlerin küçük bir bölümünü temsil eder. Bu durum ise fosfoproteomik analizleri zorlaştıran çok hassas ve spesifik stratejiler gerektirir (6-8). Günümüzde gerçekleştirilen fosfoproteomik çalışmaların ışığı; kütle spektrometresi tabanlı analizler için kritik bir adım olarak kabul edilen zenginleştirme basamağının uygulandığı örnek hazırlığı aşaması, MS analizi ve informatik analiz olmak üzere üç ana başlıkta toplanır (9).

FOSFOPROTEOMİK

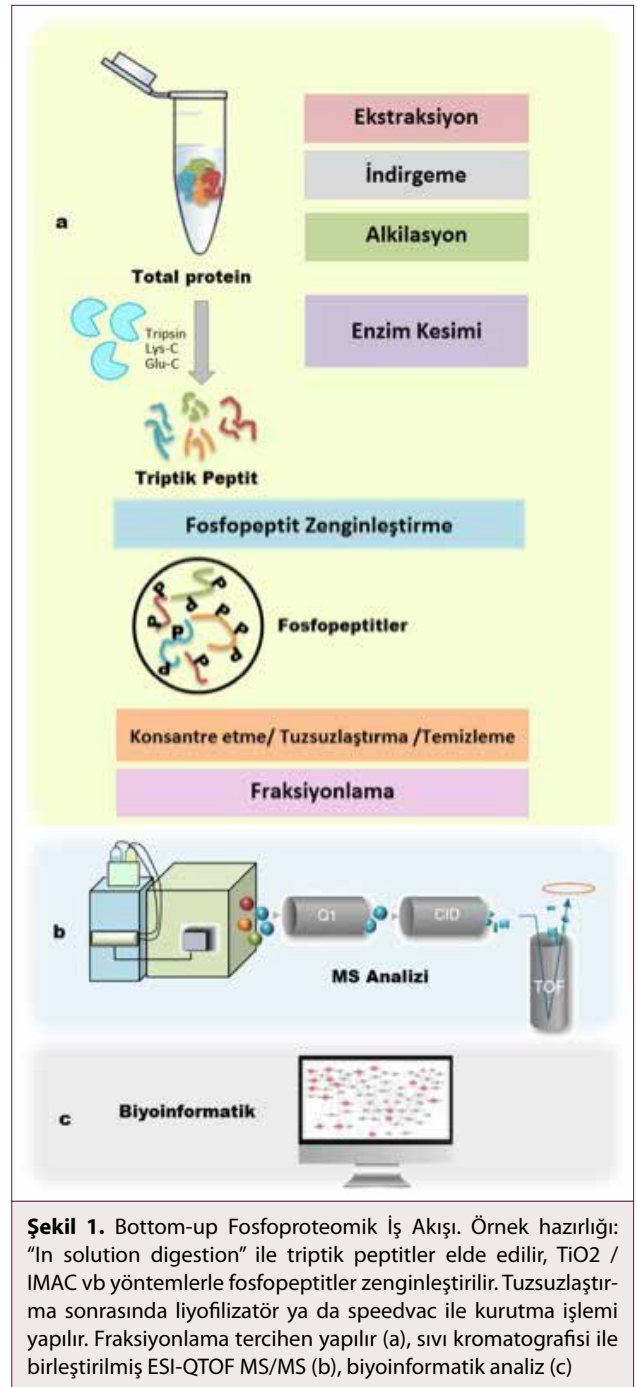
Hücrenin başlıca fonksiyonel makromolekülleri olan proteinler buldukları doku, hücre ve hücresel kompartmanlara göre farklılıklar göstermekle birlikte organizmanın fizyolojik ya da patolojik olan faaliyetleri boyunca dinamik bir profil sergilemektedir. Proteinlerin fonksiyonlarının, ifade farklılıklarının ya da etkileşimlerinin bir bütün halinde incelendiği proteomik çalışmalar; bu dinamik profili, sürekli olarak gelişen MS tabanlı teknolojiler ve preparasyon yöntemleri sayesinde her geçen gün daha net ve daha detaylı bir şekilde açığa çıkarmaktadır. Günümüzde tek bir örnekte binlerce proteini profillemeye kabiliyeti olan bu güçlü teknoloji, fosforile proteinlerin karakterizasyonunda büyük ölçekli çalışmaların önünü açmıştır (8, 10).

MS tabanlı fosfoproteomik çalışmalar için zorunlu bir adım olarak kabul edilen zenginleştirme teknikleri ile ön fraksiyonlama yöntemlerinin kombinasyonel kullanımı; fosfoproteomun kapsamlı profillerinin elde edilmesini sağlayarak proliferasyon, migrasyon, farklılaşma ve apoptoz gibi temel hücresel süreçlerdeki fosforilasyonların kritik rollerinin ortaya çıkarılmasını kolaylaştırmaktadır. Ancak düşük stokiyometri, geniş dinamik aralık ve fosforile proteinlerin çeşitli izoformları nedeniyle geniş ölçekli bir fosfoproteomik çalışmanın farklı basamaklarında aşılması gereken çeşitli zorluklar ortaya çıkmaktadır (11-13).

Geniş ölçekli fosfoproteomik stratejilerde genellikle, ters faz sıvı kromatografisi ile birleştirilmiş elektrosprey iyonizasyonu (ESI) ve tandem MS kullanımı tercih edilmektedir (14-16). Kütle spektrometresi tabanlı bir çok çalışmadaki fosfoproteomik iş akışı, genellikle kompleks biyolojik örneklerin hazırlanması, örnek içindeki bazı bileşenlerin zenginleştirilmesi ve konsantre edilmesi, LC-MS/MS analizi ve biyoinformatik basamaklarından oluşur (Şekil 1). Örnek hazırlığı ve uygulama adımları, deneyin sonraki tüm basamaklarını telafi edilemez bir şekilde etkilediği için tanımlama, doğrulama ve miktar analizlerinin net bir şekilde yapılabilmesinde kritik öneme sahiptir. Bu nedenle aşağıda belirtilen protein ekstraksiyonu, enzim kesimi, fraksiyonlama (isteğe bağlı), zenginleştirme ve temizleme (clean up, desalting vb.) basamakları örnek hazırlığı başlığı altında daha detaylı olarak incelenecektir.

Örnek Hazırlığı

Proteomik çalışmaların yıllar içerisindeki gelişim sürecinde amaca yönelik olarak Bottom-up ve Top-down yaklaşımları benimsenmiştir. Bu yaklaşımlar iş akışı ve örnek hazırlığı süreçlerinde temel farklılıklar gösterir. MS tabanlı fosfoproteomik ça-

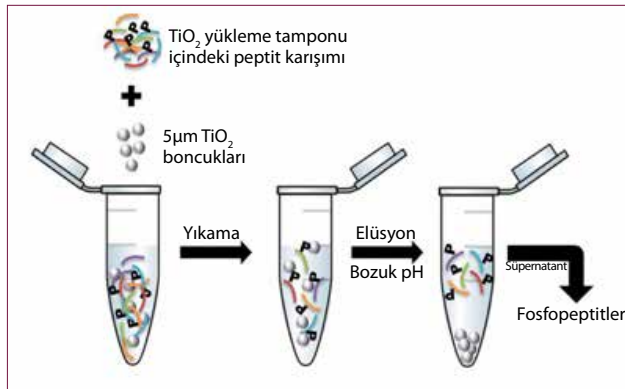


Şekil 1. Bottom-up Fosfoproteomik İş Akışı. Örnek hazırlığı: "In solution digestion" ile triptik peptitler elde edilir, TiO₂ / IMAC vb yöntemlerle fosfopeptitler zenginleştirilir. Tuzsuzlaştırma sonrasında liyofilizatör ya da speedvac ile kurutma işlemi yapılır. Fraksiyonlama tercihen yapılır (a), sıvı kromatografisi ile birleştirilmiş ESI-QTOF MS/MS (b), biyoinformatik analiz (c)

ışmalarda özellikle Bottom-up yaklaşımına ait iş akışı uygulanır (Şekil 1). Fosfopeptitlerin MS analizi sürecine katıldığı ve bunun için proteolitik sindirimin yapıldığı Bottom-up yaklaşımda, triptik peptitler 3 farklı şekilde elde edilir. Bunlar: proteolitik sindirimin ve protein ayrımının jelde gerçekleştirildiği "in gel digestion", triptik peptitlerin sıvı ortamda elde edildiği "in solution" ve filtre destekli örnek hazırlığı olarak bilinen FASP (Filter-aided sample preparation) yöntemleridir (17-20).

Örnek Toplama ve Protein Ekstraksiyonu

Fosfoproteinlerin incelenmesindeki ilk adım numunenin doğ-



Şekil 2. TiO_2 Zenginleştirme İş Akışı. a) TiO_2 boncukları ile zenginleştirme: TFA-Asetonitril-Glikolik asit içeren TiO_2 yüklemes tamponuna triptik peptitler ve TiO_2 boncukları alınır. 5-10 dk inkübasyondan sonra santrifüj yapılır. Süpernatant temiz bir tüpe alınarak daha az miktarda TiO_2 boncuklarıyla tekrar inkübasyon ve santrifüj yapılır. Bu işlem istenirse birkaç kez tekrarlanabilir. Süpernatant atılarak tüm TiO_2 boncukları toplanır. TFA ve asetonitrilden oluşan yıkama tamponu ile 2 kez yıkama yapılır. TiO_2 boncukları kısa bir süre kurutulur ve son olarak amonyum hidroksit ile elüsyon yapılır (39).

ru şekilde toplanması ve tüm hücre lizatından veya özel olarak hücresel alt birimlerden proteinlerin izolasyonunun gerçekleştirilmesidir. Burada dikkat edilmesi gereken çok önemli bir nokta, biyolojik sistemdeki orijinal durumun korunması için enzimatik aktivitenin durdurulmasıdır. Bu nedenle toplanan numune, gerekli işlemler yapılarak hızlı bir şekilde dondurulur ve -80°C 'de saklanır. Protein ekstraksiyonu aşaması ise istenmeyen protein degradasyonlarının önlenmesi için enzimatik aktivitenin minimum olduğu $+4^\circ\text{C}$ 'lik bir ortamda ya da buz üzerinde gerçekleştirilir. Çünkü hücrenin lizis aşamasında proteaz ve fosfatazlar aktifleşir ve gerekli önlemler alınmadığı takdirde proteinler bozulabilir ve değişen pH'la birlikte fosfoproteinler üzerindeki fosfat grupları kaybolabilir (21). Bununla birlikte en iyi korumanın sağlanması için örneğin çözündürülmesinde ve ekstraksiyonun ilk adımlarında, kullanılan tamponlara proteaz ve fosfataz inhibitörleri eklenir (22). Hem proteaz hem de fosfataz inhibitörlerini uygun oranlarda içeren hepsi bir arada kokteyller ticari olarak satılmaktadır.

Triptik Peptit Eldesi

Rastgele degradasyonun önlenmesi MS analizinde elde edilen sonuçlara net bir şekilde yansımaktadır. Enzim kesiminin yeterli verimlilikte gerçekleşmemesi durumunda MS spektrumundan yeterli ürün bilgisi elde edilemez. Proteaz enziminin kesim bölgesine ulaşabilmesi için polipeptit zincir primer hale getirilir. Polipeptit zincirindeki arjinin ve lizin kalıntılarını kesen tripsin, bu süreçte en sık kullanılan proteazdır. Bunların dışında Asp-N, Glu-C ve Lys-C olarak adlandırılan çeşitli proteazlar da kullanılmaktadır (23).

Tuzsuzlaştırma-Konsantr Etme

Lizis aşamasında protein dışı makromoleküller ve iyonlar, proteinlerle aynı ortamı paylaşır. Ayrıca homojenizasyon ve triptik

peptidin elde edilmesinde kullanılan çeşitli kimyasallar da kirliliğe neden olur. Sonuçların verimliliğini etkileyen bu kontaminant moleküller analiz öncesinde doğru bir şekilde uzaklaştırılmalıdır. Bu amaçla, farklı uygulama yolları olan temizleme, tuzsuzlaştırma ve konsantr etme işlemleri zenginleştirme öncesinde ya da zenginleştirme sonrasında yapılabilmektedir. Bu işlemlerin bir arada ya da ayrı ayrı yapıldığı C18 materyal içeren çeşitli yöntemler ve ticari ürünler mevcuttur (24, 25). Kontaminantları uzaklaştırmak üzere zenginleştirme sonrasında grafit kolonları kullanılabildiği gibi örnek, analiz cihazına verildikten sonra analitik kolon öncesi trapping kolonu ve metodu kullanılarak da uzaklaştırma yapılabilmektedir (26). MS analizi öncesinde fosfoproteinlerin uzun süre saklanabilmesi ve konsantr edilmesi için genellikle liyofilizatör ya da vakum konsantratör (speedvac) cihazları kullanılır. Liyofilizasyon sonrasında örnekler -80°C 'de analiz sürecine kadar saklanabilir.

Zenginleştirme Stratejileri

Kompleks biyolojik numunelerde çok düşük ve çok yüksek miktarda bulunan proteinlerin MS analiz sürecine birlikte katılması, protein profilinin doğru bir şekilde oluşturulmasında önemli bir sorun teşkil eder. Çok düşük miktarda bulunan fosfoproteinlerin genellikle peptit seviyesinde zenginleştirildiği bu basamak bu nedenle kritik öneme sahiptir. Fosfat grubunun kimyasal özellikleri temel alınarak geliştirilen çeşitli zenginleştirme stratejileri; immobilize metal afinite kromatografisi (IMAC), metal oksit afinite kromatografisi (MOAC), immun afinite ve kimyasal türevlendirme şeklinde gruplandırılır (27-33). En eski zenginleştirme stratejilerinden olan IMAC yönteminde, genellikle Fe^{+3} , Al^{+3} ve Ga^{+3} metal iyonları bir matriks ortamında (kromatografik kolon, MALDI plate ya da manyetik boncuklar gibi) şelatlanmış olarak bulunur ve pozitif yüklü bu metal iyonlarının, negatif yüklü fosfat gruplarını yakalaması esasına dayanır. Kuvvetli asidik tamponların kullanıldığı MOAC yönteminde de benzer prensipten faydalanılır ancak TiO_2 , ZrO_2 , Fe_3O_4 gibi metal oksitler fosfoproteinlere kovalent bağlanır. Farklı asit türleri ve farklı pH'da tamponlar kullanılarak IMAC ve MOAC yöntemlerinin çok sayıda modifiye formu geliştirilmiştir (34-38). Şekil 2'de temel adımları anlatılan TiO_2 ile zenginleştirme global fosfoproteomik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Her iki fosfoprotein zenginleştirme yöntemiyle ilgili temel sorunlardan birisi, negatif yüklü karboksil grupları ile pozitif yüklü metal iyonları arasındaki zayıf afiniteden dolayı fosforile olmamış asidik peptitlerin spesifik olmayan tutunmasıdır (39). Fosforile serin ve treonin kalıntılarında kimyasal grubun eklendiği türevlendirme yöntemlerinin hassasiyeti ise IMAC ve MOAC yöntemlerinden çok daha düşüktür. Türevlendirme basamaklarında oluşabilecek yan reaksiyonlar ve düşük hassasiyet nedeniyle bu yöntem fosfoproteomik çalışmalarda çok az tercih edilmektedir (39, 40). Literatürde reseptör tirozin kinazların hedef alındığı çok sayıda fosfoproteomik çalışma mevcuttur. Bu tür çalışmalarda serin ve treonin kalıntılarındaki fosforilasyona göre çok daha az görülen tirozin fosforilasyonu için spesifik antikörlerin geliştirildiği immün afinite zenginleştirme yöntemi kullanılır (27, 41).

Bu temel yöntemler daha verimli bir zenginleştirme protokolünün geliştirilmesi amacıyla çeşitli fraksiyonlama yöntemleriyle

kombine edilmiştir. Ayrıca SIMAC, PolyMAC ve Phostag gibi geliştirilen farklı yöntemler de bulunmaktadır (42-44).

Fraksiyonlama

Ters faz, SAX (Güçlü Anyon Değişimi), HILIC (Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi), SCX (Güçlü Katyon Değişimi) ve ERLIC (Elektrostatik İtme Hidrofilik Etkileşim Kromatografisi) gibi tercihen kullanılan kromatografik yöntemler zenginleştirme basamağının verimliliğini arttırmaktadır. Özgünlükleri farklılık gösteren bu yöntemler, biyolojik örneğin karmaşık içeriğinin sadeleştirilmesinde farklı avantajlar sunar. Bu nedenle kullanılacak ön-fraksiyonlama yöntemi, çalışmanın amacına ve tercih edilecek diğer uygulama tekniklerine göre değişkenlik gösterir (45-50).

Kütle Spektrometresi Analizi

İyonizasyon: Binlerce fosfopeptidin ya da fosforilasyon bölgesinin tanımlanması, yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrelerinin yine yüksek basınçlı sıvı kromatografileriyle birleştirilmesiyle sağlanır. Zenginleştirme sonrası analize hazır hale getirilen fosfopeptit preparatları, kromatografi sistemlerinde polaritelerine göre ayrılır. Daha sonra yumuşak iyonizasyon sağlayan bir iyonizasyon kaynağı ile gaz faz iyonlar elde edilir. Fosfoproteomik çalışmalarda genellikle ESI kullanılmakla birlikte MALDI ve DESI gibi farklı iyonizasyon kaynakları da vardır.

Elektrosprey iyonizasyonu, sıvı kromatografisinden gelen faz ile örnek enjeksiyonundan oluşan karışımın, MS cihazı öncesinde iyonizasyon kaynağına alınarak, pozitif veya negatif yüklü iyonlar elde etmek üzere şartlandırılması esasına dayanır. Sıvı fazı spreyleyecek olan iğne, izole bölmenin duvarlarına ve spreyleyecek içeriğinin dağılımını yönlendirmeye yardımcı olan geniş silindirik elektrota karşı yüksek voltajla yüklenmiş olarak uzanır. İğne ucunda oluşan elektriksel alan, spreylene sıvının yüklenmesini sağlar. Elektrik alanına maruz kalan damlacıkların çapı, iğne etrafından bölme içine verilen basınçlı sıcak gazın yardımıyla giderek küçülür. Damlacıklar belirli bir süre sonra bir patlama şeklinde çok daha küçük taneciklere ayrılarak iyonik moleküllerden oluşan bir buhar haline gelirler ve yayılan iyonlar ince bir hattan (cone) geçerek MS cihazının iç kısımlarına yönlendirilirler. İyonlar daha sonra kütle analizöründen geçerek, kütle/yük (m/z) oranına göre dedektöre ulaşır. Oluşan sinyaller m/z oranına bağlı olarak göreceli bolluklarını temsil eden bir kütle spektrumu grafiği şeklinde görüntülenir. Elektrosprey iyonizasyon tekniği, karmaşık biyolojik örnekleri oldukça etkin bir şekilde analiz edilebilecek forma getirerek MS sistemlerinin klinik çalışmalarda kullanılmasına büyük katkı sağlamıştır (51, 52). Ancak ESI kaynağının bazı sınırlamaları vardır. Kontaminant madde içeren ve göreceli olarak düşük konsantrasyonda olan örneklerin iyonizasyon verimliliği düşük olur ve buna bağlı olarak analiz sonrası sekans bilgisinin ve dolayısıyla tanımlanacak protein sayısının da düşük olmasına neden olur. Analiz gücündeki yetersizliğin üstesinden gelmek üzere triptik peptit karışımı halinde örneklerde fosfopeptitlerin zenginleştirilmesi amacıyla zaman içinde birçok yeni metot geliştirilmiş ya da metot iyileştirmeleri yapılmıştır. Bu bağlamda ilgili olmayan peptitler büyük ölçüde ortamdaki uzaklaştırılmış ve sinyal güçleri artan

fosfopeptitlerin daha fazla sayıda ve daha doğru bir şekilde tanımlanması hedeflenmiştir (53-55).

Yaklaşık 30 yıl önce biyolojik örneklerin analizinde kullanılmaya başlanan MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) teknolojisi, yapılan çeşitli iyileştirmelerle fosfoproteomik çalışmalar dahil olmak üzere günümüzde de kullanılmaya devam etmektedir (56, 57). MALDI-TOF kütle spektrometresi, analit moleküllerini içinde barındıran ve iyonizasyonu sağlayan kimyasal bir matriksin lazerle vurulması yoluyla gaz fazına geçmiş iyonik moleküllerin MS analizörlerine yönlendirilmesi esasına göre çalışır (58). MALDI çalışmalarında fosforile peptidlerin iyonizasyon verimliliğini arttırmak amacıyla çeşitli kimyasallardan oluşan kombinasyonlarla yeni matriksler oluşturulmaya çalışılmıştır. Matriks kombinasyonu olarak metandifosfonik asit ve 2,5-dihidroksibenzoik asitin uygulandığı bir çalışmada hem fosfopeptit sinyallerinin anlamlı bir şekilde yükseltildiği hem de ortamdaki başka iyonik ürünlere dair sinyal gürültülerinin temizlendiği bildirilmiştir (59, 60).

Yöntemlerin verimliliğini artırmak ve örnek hazırlığı sırasındaki uzun ve zahmetli süreçleri kısaltmak için farklı zamanlarda iyon kaynağıyla ilgili çeşitli alternatif çalışmalar yapılmıştır. Karmaşık matrislerden çok çeşitli moleküllerin analizine imkan sağlayan DESI-MS (Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry) metotlarında elektrosprey voltajı, solvent infüzyon oranı ve kompozisyonu gibi enstrümental değerler analiz gücünü etkilemektedir (61). 2013 yılında yayınlanan bir çalışmada fosfopeptitlerin etkili bir şekilde iyonlaştırılmasında nispeten hızlı bir metot geliştirilmiştir. Çalışmada peptit zincirleri üzerindeki fosfat gruplarının deprotonasyonunu baskılamak amacıyla, hazırlanan örnek preparatının pH değeri oldukça düşürülmüş ve desorpsiyon elektrosprey iyonlaştırma kütle spektrometresi kullanılarak doğrudan analiz yapılmıştır (62). Biyolojik örneklerin analizinde DESI kullanımına olan ilgi son yıllarda yapılan çalışmalarda da görülmektedir (63, 64).

Fragment iyonların elde edilmesi: İyonize olan peptitler önce analizöre ardından da parçalanma hücrelerine gönderilirler. Peptitler, enerji yüklenmiş inert gaz yardımıyla spektrumları verecek fragmentlere parçalanırlar. Peptit iskeletinin parçalanmasında çarpışma kaynaklı ayrışmanın (Collision-induced dissociation; CID) kullanımı fosfat gruplarının kaybına neden olabilir. Buna bağlı olarak oluşan nötr kayıplar, parçalanma verimliliğini düşürür ve peptit dizisinin doğru bir şekilde yorumlanmasını zorlaştırır. Alternatif olarak daha az nötr kayıpların gözlemlendiği elektron transfer ayrımı (electron transfer dissociation; ETD), elektron yakalama ayrımı (electron capture dissociation; ECD) ve ışın tipi CID (beam-type CID veya high-energy collision dissociation; HCD) gibi farklı parçalanma türleri de kullanılmaktadır. Birbirini tamamlayan iki teknik olarak ETD ve CID'in birlikte kullanımı, parçalanma verimliliğini arttırabilmektedir (65-68).

Spektrumların elde edilmesi: Parçalanma sonrasında peptit fragmentleri kütle ve iyonik yüklerine göre belirli bir hızla yol alarak detektörün önündeki plakaya çarparlar ve elektrovolt

cinsinden bir enerji üretilmesine sebep olurlar. MS analizi sonucunda fragmentlerden, kütle/yük (m/z) oranlarına göre spektrumlar oluşturulur (69-71).

Diğer proteomik çalışmalarda olduğu gibi fosfoproteomik çalışmalarda da cihazın çözünürlük gücü, kütle doğruluğu, dinamik aralık, hassasiyet ve parçalanma teknikleri gibi özellikler, elde edilecek sonuçları dolayısıyla da MS analizlerini de içine alan bütün bir çalışmanın gidişatını doğrudan etkileyen önemli parametrelerdir (72).

Biyoinformatik

MS analizi sürecinde elde edilen spektrumlardan oluşan ham verilerin analizi, güçlü yazılımlarla yapılmaktadır. PLGS (Waters Corp., Milford, MA), Progenesis (Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK), Mascot (Matrix Science, London, UK), Proteome Discoverer (ThermoScientific, Bremen, Germany) ve MaxQuant (<http://www.maxquant.org>) gibi programlar, ham verilerin dijital olarak belirli filtrelerle göre değerlendirilmesini sağlamaktadır (73, 74). Phospho.ELM (<http://phospho.elm.eu.org/>), PhosidaPHOSIDA (<http://www.phosida.com/>) UniprotKB/Swiss-Prot (<http://www.uniprot.org>) ise fosfoproteomik çalışmalarda veritabanı olarak en çok kullanılan araçlardır. Genel olarak internet üzerinden erişilebilen veri tabanlarından yola çıkarak tanımlanan proteinlerin etkileşimlerini, hangi yolla bulduklarını ve ne tür görevlere sahip olduklarını belirlemek için Reactome (<http://www.reactome.org/>), IPA (IPA, QIAGEN, Redwood City, CA, USA, www.qiagen.com/ingenuity), Cytoscape (<http://www.cytoscape.org/>) ve KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) gibi programlar kullanılabilir (75-78).

NİCELİKSEL FOSFOPROTEOMİK

Niceliksel fosfoproteomik çalışmalar, protein ya da peptit seviyesinde olabilir. Protein seviyesinde yapılan miktar tayinlerinde jelli sistemler kullanılır. Geleneksel proteomik olarak adlandırılan 1D (Tek boyutlu jel elektroforezi), 2D-PAGE (iki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi) ve 2D-DIGE (diferansiyel jel elektroforezi) gibi jelli sistemlerde proteinler polarite ve moleküler büyüklüklerine göre ayrılır. 2D yaklaşımda fosfoproteinler öncelikle pozitif ya da negatif yüklerine göre belirli bir pH yönünde hareket eder. Her bir fosfoprotein net yükünün sıfır olduğu izoelektrik noktasında (pI) göç tamamlanır. İkinci boyutta ise proteinler, SDS gibi denatüre eden ajan içeren bir tampon içerisinde moleküler büyüklüklerine göre ayrılır. Daha sonra comasie mavisi ve gümüş nitrat gibi çeşitli boyaların kullanılmasıyla proteinlerin spotlar halinde görüntülenmesi sağlanır. Floresan boyamanın yapıldığı 2D-DIGE yöntemiyle tek bir jelde daha fazla sayıda proteinin daha hassas miktar analizi yapılabilmektedir (78-81). Bununla birlikte miktar analizi için western-blot gibi antikor tabanlı yöntemler de kullanılmaktadır. MS tabanlı bir fosfoproteomik çalışmanın sonucunda bulunan belirli proteinlerin doğrulanması bu yöntemlerle yapılabilir (82).

Uzun yıllar boyunca protein kantifikasyonu çalışmalarında kullanılan temel yöntemler, proteinleri izoelektrik değerlerine ve moleküler ağırlıklarına göre ayıran jelli sistemler olmuştur. Ancak jel tabanlı yöntemler; belirli molekül ağırlığına veya pl

değerlerine sahip proteinlerin tespitinin zorluğu, bir tek nokta üzerinde farklı proteinlerin bulunabilmesi ve görece az sayıda örneğin çalışılabilmesi gibi sınırlılıklara sahiptir (83, 84).

MS yöntem ve teknolojilerindeki gelişmelere bağlı olarak büyük ölçekli protein ekspresyonu ve karakterizasyonu çalışmalarını gerçekleştirme imkanı sunan "shotgun" proteomik teknikleri jelli yöntemlerin yerini almaya başlamıştır. MS tabanlı kantitatif proteomik uygulamaları içerisinde yer alan kararlı izotop etiketli yöntemler, izotopların kütle dışındaki özelliklerinin ortak olması nedeniyle gelişmiş kütle dedektörlerinin kullanıldığı MS tabanlı kantitatif çalışmalarda büyük avantaj sağlamıştır. Ancak etiketli kantifikasyon çalışmalarında da, kullanılan tekniklere göre değişen bazı zorluklar söz konusudur. Etiketlemenin tam olarak gerçekleşmemesi, metabolik olaylar ile etiketli molekülün başka bir moleküle dönüşebilmesi, bazı yöntemlerde etiketlemenin gerçekleşmesi için örnek materyalinin metabolik olarak aktif olması gerekliliği, sadece az sayıda örneğin bir arada çalışılabilmesi, preparasyon sürecinin çok uzun sürmesi, maliyetlerin yüksek olması ve informatik yazılımlarının yeteri kadar güvenilir olmaması gibi zorluklar, etiketli yöntemlere dair sınırlılıkların önemli bir kısmını oluşturmaktadır (85, 86).

Bu bağlamda hasta-kontrol eşleştirmesi yapılarak çok sayıda numunenin analiz edildiği biyobelirteç çalışmalarında etiketsiz yöntemlerin tercih edildiği görülmektedir. Örnek hazırlığı aşamasındaki bir takım kolaylıklar, gelişmiş hesaplama araçlarıyla informatik programlarının daha güçlü hale gelmesi, özellikle global protein ekspresyon farklılıklarının araştırıldığı çok sayıda numune içeren çalışmalarda etiketsiz yöntemlerin tercih edilmesini sağlamıştır (87).

Etiketli Yöntemler

Etiketlemeler metabolik, enzimatik ve kimyasal olarak gerçekleştirilebilir. Fosfoproteomik çalışmalarda, en çok metabolik etiketlemenin yapıldığı SILAC (stable isotope labeling with amino acids in cell culture) yöntemi kullanılır (88). Bu yöntemde etiketleme, hücrelerin iki farklı hücre kültürü ortamında büyütilmesiyle gerçekleştirilir (89). Hücre popülasyonlarından birinin besiyerine hafif diğer bir deyişle doğal ¹²C, ¹⁴N atomlarına sahip arjinin ve lizin aminoasitleri eklenirken diğerine ağır izotop (¹³C, ¹⁵N) etiketli arjinin ve lizin aminoasitleri eklenir. Hücre ortamlarından biri 5-6 pasaj sonrasında, ağır izotoplu aminoasitlerle etiketlenmiş olur. Etiketleme sürecinin tamamlanmasından sonra her iki ortamdaki hücreler birleştirilerek kesim ve zenginleştirme basamakları uygulanır. Etiketli peptit çiftleri arasındaki pik yoğunluklarının (intensity) oranı, fosfoproteinlerin miktar değişimlerinin göreceli olarak belirlenmesini sağlar. Yüksek etiketleme oranına sahip SILAC yönteminin en önemli avantajlarından biri, etiketli örneklerin iş akışının ilk basamaklarında birleştirilmesiyle yapılan hataların en aza indirgenmesidir. Bu nedenle güvenilir, doğru ve tekrarlanabilir bir miktar tayini için oldukça sık tercih edilen kolay uygulanabilir kantitatif yöntemlerdir. SILAC uygulamalarında genellikle iki farklı hücresel durumun karşılaştırması yapılır. Bununla birlikte üç farklı izotop formlarının kullanıldığı 3-pleks ya da 5-pleks SILAC ile tek bir deneyde ikiden fazla hücresel du-

Tablo 1. Fosfoproteomik çalışmalarda kullanılan yöntem, teknik ve yaklaşımlar

Sindirim işlemi	Sıvı içinde (In-solution) kesim, Jelde kesim, Filtre-destekli örnek hazırlığı (FASP)
Zenginleştirme Yöntemleri	IMAC, MOAC, SIMAC, Antikor tabanlı Immünoafinite, Kimyasal türevlendirme, PolyMAC, PhosTag
Tuzsuzlaştırma (Desalting)	ZipTip, Katı-Faz Ekstraksiyon (SPE), Spin-tip kolon, Trapping kolon
Fraksiyonlama	SCX, SAX, HILIC, ERLIC, Ters faz sıvı kromatografisi
Niceliksel Analiz	Etiketli (SILAC, ITRAQ, TMT) , Etiketsiz
İyonizasyon Kaynağı	ESI, MALDI, DESI
Parçalanma Türü	CID/CAD, ETD, ECD, HCD
Analiz Programları	Mascot, Progenesis, PLGS, X!TANDEM, MaxQuant
Veri tabanları	PHOSIDA, Phospho.ELM, NetworkKIN, Motif-X, KEGG, IPA, DAVID, STRING, Cytoscape

IMAC: immobilized metal affinity chromatography; MOAC: metal-oxide affinity chromatography; SIMAC: sequential elution from IMAC; SCX: strong cationic ion-exchange chromatography; SAX: strong anionic ion-exchange chromatography; HILIC: hydrophilic interaction liquid chromatography; ERLIC: electrostatic repulsion-hydrophilic interaction chromatography; SILAC: stable isotope labeling with amino acids in cell culture; ITRAQ: isobaric tags for absolute and relative quantification; TMT: tandem mass tag; ESI: electrospray ionization; MALDI: matrix-associated laser desorption/ionization; DESI: desorption electrospray ionization mass spectrometry; CID/CAD: collision-induced dissociation; ETD: electron transfer dissociation; ECD: electron capture dissociation; HCD: high-energy collision dissociation

rum karşılaştırılabilmektedir (90, 91). SILAC yönteminin, hücre hatları dışında zebrafish, drosophila, nematod ve fare gibi organizmalarda da uygulaması yapılmıştır (92-95). Ancak bu organizmalardaki metabolik hızın düşük olması nedeniyle etiketleme verimliliği azdır. Sınırlı sayıda hücresel durumun karşılaştırdığı SILAC yönteminin bu nedenle en büyük dezavantajı doku ya da biyolojik sıvılar için uygulanabilirliğinin düşük olmasıdır. Dahili standartların kullanıldığı Pulsed-SILAC ve Super-SILAC tekniklerinin geliştirilmesiyle bu dezavantajların önüne geçilmeye çalışılmaktadır (92, 96).

Fosfoproteomik çalışmalarda kullanılan diğer etiketli yöntemler ise ITRAQ (Isobaric tags for absolute and relative quantification) ve TMT (tandem mass tag)'dir. SILAC yöntemine alternatif olarak ITRAQ ve TMT yöntemleri daha fazla sayıda örneği etiketleme imkanı sunar (88, 97). Bununla birlikte doku ve biyolojik sıvılar gibi farklı biyolojik numunelerde uygulanabilir olması önemli bir avantaj sağlar. SILAC ve diğer etiketli yöntemler ilaç hedeflerinin, ilaç direncinin, hücre döngüsü gelişiminin ya da sinyal yollarının araştırıldığı çalışmalarda kullanılabilir (6, 98).

Etiketsiz Yöntemler

Etiketli yöntemlerin aksine etiketsiz kantitatif yöntemlerde numunelerin preparasyonu ayrı ayrı yapılır ve preparatlar tek tek MS analizine tabi tutulurlar. Protein kantifikasyonunda kromatografideki pik yüksekliği veya peptit pik alanları gibi bolluğu ifade eden parametrelerin değişimi üzerinden hesaplama yapılabilmektedir. Kantifikasyonun diğer bir aracı ise MS analizi sonrasında tanımlanan proteinlerin spektral sayımıdır. Bu araçların kullanımı ile belirli bir biyolojik örnek içindeki her bir proteinin bolluğu, diğer örneklerdekine göre etiketsiz olarak tespit edilebilmektedir (99). Etiketsiz kantifikasyon; preparasyon aşamasının nispeten daha ucuz, kolay, hızlı olması ve analiz sırasında

etiketleme verimliliğine bağlı varyasyonların görülmemesi nedeniyle ciddi avantajlar sağlamaktadır (100).

Pik Yoğunluğu ve Spektral Sayım

MS analizi sonucu elde edilen kromatogramlardaki belirli bir analite ait nispi yoğunluk ile aynı analitin örnek preparatındaki konsantrasyonu arasında doğrusal bir ölçütün bulunması, pik yoğunluğu hesabı ile yapılan rölatif kantifikasyonun temelini oluşturmaktadır. Protein bolluğundaki bir artış doğal olarak preparatta bulunan ilgili proteinin triptik peptitlerinin artışına ve MS/MS spektrumlarının artışına neden olacaktır (101). Temel olarak örnek içerisinde daha bol bulunan proteinin, daha fazla peptit ile ifade edileceği prensibine dayanan spektral sayım tekniği; protein abundance index (PAI ve emPAI), absolute protein expression (APEX), normalized spectral index (SIN) gibi hesaplama araç ve stratejilerinin geliştirilmesiyle hem rölatif hem de mutlak kantifikasyonun aynı örneklerle uygulanabilmesine imkan verir. Spektral sayıma dayalı kantifikasyon, pik yoğunluğu hesaplamasına göre geniş ölçekli proteomik çalışmalara daha uygun ve daha tekrarlanabilir özelliktedir (102, 103).

SONUÇ

Fosfoproteinlere ait ifade farklılıklarının, fonksiyonel özelliklerin ya da etkileşimlerin yüksek verimlilikle değerlendirilmesinde kütle spektrometreleri popüler araçlar haline gelmiştir. Çalışmaların hassasiyeti ve tekrarlanabilirliği için numune seçimi, toplama süreci ve kullanılan yöntemler dikkat edilmesi gereken önemli unsurlardır. Örnek hazırlığının her bir aşaması farklı yöntemler kullanılarak yapılabilir de genel eğilim belirli teknikleri öne çıkarmaktadır. Örneğin; çok sayıda zenginleştirme yöntemi olmasına rağmen fosfopeptitler genellikle TiO₂ ile zenginleştirilmektedir. Diğer fosfopeptitlere nazaran düşük miktarda bulunan fosfotirozin içeren peptitler için de immünoafinite zenginleştirme yöntemi kullanılmaktadır.

Farklı hücrel koşulların bilgisini taşıyan her bir örneğin protein çeşitliliğini doğru nicel değerlendirmelerle ortaya koyabilmek moleküler olayların aydınlatılmasında, hastalıklara dair biyobelirteçlerin tespit edilmesinde veya geliştirilecek ilaç hedeflerini bulmada büyük önem taşımaktadır. Proteomik alanında istenilen bu doğru nicel değerlendirmeleri elde edebilmek için etiketsiz yöntemlerin yanısıra çeşitli etiketleme teknikleri halen geliştirilmeye devam etmektedir. Etiketsiz yöntemler büyük ölçekli kantitatif proteomik çalışmalarda avantaj sağlasa da özellikle numune hazırlığı sırasında meydana gelebilecek olumsuzluklar analiz gücünü etkileyebilen bazı sınırlamalara sebep olmaktadır. Ağır ve hafif etiketli numunelerle göreceli kantifikasyonun gerçekleştirildiği kararlı izotop etiketleme ise yaygın bir yöntem haline gelmiştir. Çalışmalarda hücre hatlarının kullanılması, hem verilerin daha doğru yorumlanmasında hem de daha öncesinde bahsettiğimiz fosfoproteomik örnek hazırlığı aşamasında büyük avantajlar sağlamaktadır. Bu nedenle çalışmaların büyük çoğunluğunda özellikle kantifikasyonda kolaylık sağlaması açısından hücre hatları kullanılmaktadır. Hücre kültürü çalışmalarında protein ekspresyon farklılıkları genellikle SILAC ile değerlendirilirken doku ve serum gibi biyolojik örneklerin kullanıldığı çalışmalarda TMT, ITRAQ ve etiketsiz yöntemler avantaj sağlamaktadır (Tablo 1).

Son on yılda yapılan yoğun araştırmalar, fosfoproteomik çalışmalarda özellikle fosfopeptit zenginleştirme için daha spesifik tekniklerin geliştirilmesine katkı sağlamıştır. Ancak geliştirilen çok sayıda yöntem ve ekipmana rağmen kompleks numunelerle yapılan geniş ölçekli çalışmalardaki birinci sınırlayıcı faktör, oldukça spesifik ve tekrarlanabilir bir fosfoproteomik iş akışının olmamasıdır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

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

Teşekkür: Yazarlar, destekleri için Prof. Dr. Nesrin Emekli'ye teşekkür ederler.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

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

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - M.G.S., S.S.; Design - M.G.S., S.S.; Supervision - S.P.; Resource - M.G.S., S.S.; Data Collection and/or Processing - M.G.S., S.S.; Analysis and/or Interpretation - S.P., M.G.S., S.S.; Literature Search - M.G.S., S.S.; Writing - M.G.S., S.S.; Critical Reviews - S.P.

Acknowledgements: The authors would like to thank Prof. Dr. Nesrin Emekli for her supports.

Conflict of Interest: Authors have no conflict of interest to declare.

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

KAYNAKLAR

1. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004; 431: 931-45. [CrossRef]
2. Ram PT, Mendelsohn J, Mills GB. Bioinformatics and systems biology. *Mol Oncol* 2012; 6: 147-54. [CrossRef]
3. Li L, Wei Y, To C, et al. Integrated omic analysis of lung cancer reveals metabolism proteome signatures with prognostic impact. *Nat Commun* 2014; 5: 5469. [CrossRef]
4. Kisluk J, Ciborowski M, Niemira M, Kretowski A, Niklinski J. Proteomics biomarkers for non-small cell lung cancer. *J Pharm Biomed Anal* 2014; 101: 40-9. [CrossRef]
5. Shukla HD, Vaitiekunas P, Cotter RJ. Advances in membrane proteomics and cancer biomarker discovery: current status and future perspective. *Proteomics* 2012; 12: 3085-104. [CrossRef]
6. Harsha HC, Pandey A. Phosphoproteomics in cancer. *Mol Oncol* 2010; 4: 482-95. [CrossRef]
7. Zhang Z, Wu S, Stenoien DL, Paša-Tolić L. High-throughput proteomics. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)* 2014; 7: 427-54. [CrossRef]
8. Aebersold R, Mann M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature*. 2016; 537: 347-55. [CrossRef]
9. Leitner A. Enrichment strategies in phosphoproteomics. *Methods Mol Biol* 2016; 1355: 105-21. [CrossRef]
10. de Hoog CL, Mann M. Proteomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2004; 5: 267-93. [CrossRef]
11. Piersma SR, Knol JC, de Reus I, et al. Feasibility of label-free phosphoproteomics and application to base-line signaling of colorectal cancer cell lines. *J Proteomics* 2015; 127(Pt B): 247-58.
12. Herring LE, Grant KG, Blackburn K, Haugh JM, Goshe MB. Development of a tandem affinity phosphoproteomic method with motif selectivity and its application in analysis of signal transduction networks. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2015; 988: 166-74. [CrossRef]
13. Macek B, Mann M, Olsen JV. Global and site-specific quantitative phosphoproteomics: principles and applications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2009; 49: 199-221. [CrossRef]
14. Zhang Y, Zhang Y, Yu Y. Global Phosphoproteomic Analysis of insulin/Akt/mTORC1/S6K Signaling in Rat Hepatocytes. *J Proteome Res* 2017; 16: 2825-35. [CrossRef]
15. Rolland D, Basrur V, Conlon K, et al. Global phosphoproteomic profiling reveals distinct signatures in B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Am J Pathol* 2014; 184: 1331-42. [CrossRef]
16. Zahari MS, Wu X, Pinto SM, et al. Phosphoproteomic profiling of tumor tissues identifies HSP27 Ser82 phosphorylation as a robust marker of early ischemia. *Sci Rep* 2015; 5: 13660. [CrossRef]
17. Han C, Yang P. Two dimensional gel electrophoresis-based plant phosphoproteomics. *Methods Mol Biol* 2016; 1355: 213-23. [CrossRef]
18. Grandjean M, Sermeus A, Branders S, et al. Hypoxia integration in the serological proteome analysis unmasks tumor antigens and fosters the identification of anti-phospho-eEF2 antibodies as potential cancer biomarkers. *PLoS One* 2013; 8: e76508. [CrossRef]
19. Zawadzka AM, Schilling B, Cusack MP, et al. Phosphoprotein secretome of tumor cells as a source of candidates for breast cancer biomarkers in plasma. *Mol Cell Proteomics* 2014; 13: 1034-49. [CrossRef]

20. Zhang H, Xu Y, Filipovic A, et al. SILAC-based phosphoproteomics reveals an inhibitory role of KSR1 in p53 transcriptional activity via modulation of DBC1. *Br J Cancer* 2013; 109: 2675-84. [\[CrossRef\]](#)
21. Espina V, Edmiston KH, Heiby M, et al. A portrait of tissue phosphoprotein stability in the clinical tissue procurement process. *Mol Cell Proteomics* 2008; 7: 1998-2018. [\[CrossRef\]](#)
22. Rothenberg DA, Gordon EA, White FM, Lourido S. Identification of direct kinase substrates using analogue-sensitive alleles. *Methods Mol Biol* 2016; 1355: 71-84. [\[CrossRef\]](#)
23. Wiśniewski JR, Mann M. Consecutive proteolytic digestion in an enzyme reactor increases depth of proteomic and phosphoproteomic analysis. *Anal Chem* 2012 20; 84: 2631-7. [\[CrossRef\]](#)
24. Bath TS, Olsen JV. Offline High pH reversed-phase peptide fractionation for deep phosphoproteome coverage. *Methods Mol Biol* 2016; 1355: 179-92. [\[CrossRef\]](#)
25. Jersie-Christensen RR, Sultan A, Olsen JV. Simple and reproducible sample preparation for single-shot phosphoproteomics with high sensitivity. *Methods Mol Biol* 2016; 1355: 251-60. [\[CrossRef\]](#)
26. Premsler T, Lewandowski U, Sickmann A, Zahedi RP. Phosphoproteome analysis of the platelet plasma membrane. *Methods Mol Biol* 2011; 728: 279-90. [\[CrossRef\]](#)
27. Rush J, Moritz A, Lee KA, et al. Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 94-101. [\[CrossRef\]](#)
28. Boersema PJ, Foong LY, Ding VM, et al. In-depth qualitative and quantitative profiling of tyrosine phosphorylation using a combination of phosphopeptide immunoaffinity purification and stable isotope dimethyl labeling. *Mol Cell Proteomics* 2010; 9: 84-99. [\[CrossRef\]](#)
29. Thaler F, Valsasina B, Baldi R, et al. A new approach to phosphoserine and phosphothreonine analysis in peptides and proteins: chemical modification, enrichment via solid-phase reversible binding, and analysis by mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2003; 376: 366-73. [\[CrossRef\]](#)
30. Tsumoto H, Ra M, Samejima K, Taguchi R, Kohda K. Chemical derivatization of peptides containing phosphorylated serine/threonine for efficient ionization and quantification in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2008; 22: 965-72. [\[CrossRef\]](#)
31. Negroni L, Claverol S, Rosenbaum J, Chevet E, Bonneau M, Schmitter JM. Comparison of IMAC and MOAC for phosphopeptide enrichment by column chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2012; 891-892: 109-12. [\[CrossRef\]](#)
32. Aryal UK, Ross AR. Enrichment and analysis of phosphopeptides under different experimental conditions using titanium dioxide affinity chromatography and mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2010; 24: 219-31. [\[CrossRef\]](#)
33. Ruprecht B, Koch H, Medard G, Mundt M, Kuster B, Lemeer S. Comprehensive and reproducible phosphopeptide enrichment using iron immobilized metal ion affinity chromatography (Fe-IMAC) columns. *Mol Cell Proteomics* 2015; 14: 205-15. [\[CrossRef\]](#)
34. Tsai CF, Hsu CC, Hung JN, et al. Sequential phosphoproteomic enrichment through complementary metal-directed immobilized metal ion affinity chromatography. *Anal Chem* 2014; 86: 685-93. [\[CrossRef\]](#)
35. Larsen MR, Thingholm TE, Jensen ON, Roepstorff P, Jørgensen TJ. Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. *Mol Cell Proteomics* 2005; 4: 873-86. [\[CrossRef\]](#)
36. Wan H, Yan J, Yu L, et al. Zirconia layer coated mesoporous silica microspheres used for highly specific phosphopeptide enrichment. *Talanta* 2010; 82: 1701-7. [\[CrossRef\]](#)
37. Blacken GR, Volný M, Diener M, et al. Reactive landing of gas-phase ions as a tool for the fabrication of metal oxide surfaces for in situ phosphopeptide enrichment. *J Am Soc Mass Spectrom* 2009; 20: 915-26. [\[CrossRef\]](#)
38. Chen SY, Juang YM, Chien MW, Li KI, Yu CS, Lai CC. Magnetic iron oxide nanoparticle enrichment of phosphopeptides on a radiate microstructure MALDI chip. *Analyst* 2011; 136: 4454-9. [\[CrossRef\]](#)
39. Thingholm TE, Jensen ON, Larsen MR. Analytical strategies for phosphoproteomics. *Proteomics* 2009; 9: 1451-68. [\[CrossRef\]](#)
40. McLachlin DT, Chait BT. Improved beta-elimination-based affinity purification strategy for enrichment of phosphopeptides. *Anal Chem* 2003; 75: 6826-36. [\[CrossRef\]](#)
41. van der Mijl JC, Labots M, Piersma SR, et al. Evaluation of different phospho-tyrosine antibodies for label-free phosphoproteomics. *J Proteomics* 2015; 127(Pt B): 259-63.
42. Thingholm TE, Jensen ON, Robinson PJ, Larsen MR. SIMAC (sequential elution from IMAC), a phosphoproteomics strategy for the rapid separation of monophosphorylated from multiply phosphorylated peptides. *Mol Cell Proteomics* 2008; 7: 661-71. [\[CrossRef\]](#)
43. Iliuk A, Jayasundera K, Schluttenhofer R, Tao WA. Functionalized soluble nanopolymers for phosphoproteome analysis. *Methods Mol Biol* 2011; 790: 277-85. [\[CrossRef\]](#)
44. Kinoshita-Kikuta E, Kinoshita E, Koike T. Phosphopeptide detection with biotin-labeled phos-tag. *Methods Mol Biol* 2016; 1355: 17-29. [\[CrossRef\]](#)
45. Boersema PJ, Mohammed S, Heck AJ. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics. *Anal Bioanal Chem* 2008; 391: 151-9. [\[CrossRef\]](#)
46. Edelman MJ. Strong cation exchange chromatography in analysis of posttranslational modifications: innovations and perspectives. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 936508. [\[CrossRef\]](#)
47. Han G, Ye M, Zhou H, et al. Large-scale phosphoproteome analysis of human liver tissue by enrichment and fractionation of phosphopeptides with strong anion exchange chromatography. *Proteomics* 2008; 8: 1346-61. [\[CrossRef\]](#)
48. Zarei M, Sprenger A, Metzger F, Gretzmeier C, Dengjel J. Comparison of ERLIC-TiO₂, HILIC-TiO₂, and SCX-TiO₂ for global phosphoproteomics approaches. *J Proteome Res* 2011; 10: 3474-83. [\[CrossRef\]](#)
49. Zarei M, Sprenger A, Gretzmeier C, Dengjel J. Rapid combinatorial ERLIC-SCX solid-phase extraction for in-depth phosphoproteome analysis. *J Proteome Res* 2013; 12: 5989-95. [\[CrossRef\]](#)
50. Zarei M, Sprenger A, Rackiewicz M, Dengjel J. Fast and easy phosphopeptide fractionation by combinatorial ERLIC-SCX solid-phase extraction for in-depth phosphoproteome analysis. *Nat Protoc* 2016; 11: 37-45. [\[CrossRef\]](#)
51. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989; 246: 64-71. [\[CrossRef\]](#)
52. Ho CS, Lam CW, Chan MH, et al. Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clin Biochem Rev* 2003; 24: 3-12.
53. Dunn JD, Reid GE, Bruening ML. Techniques for phosphopeptide enrichment prior to analysis by mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 2010; 29: 29-54.
54. Beltran L, Cutillas PR. Advances in phosphopeptide enrichment techniques for phosphoproteomics. *Amino Acids* 2012; 43: 1009-24. [\[CrossRef\]](#)
55. Carruthers NJ, Rosenspire AJ, Caruso JA, Stemmer PM. Low level Hg(2+) exposure modulates the B-cell cytoskeletal phosphoproteome. *J Proteomics* 2018; 173: 107-14. [\[CrossRef\]](#)

56. Caprioli RM, Farmer TB, Gile J. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Anal Chem* 1997; 69: 4751-60. [\[CrossRef\]](#)
57. Jiang J, Sun X, Li Y, Deng C, Duan G. Facile synthesis of Fe(3)O(4)@PDA core-shell microspheres functionalized with various metal ions: A systematic comparison of commonly-used metal ions for IMAC enrichment. *Talanta* 2018; 178: 600-7. [\[CrossRef\]](#)
58. Karas M, Krüger R. Ion formation in MALDI: the cluster ionization mechanism. *Chem Rev* 2003; 103: 427-40. [\[CrossRef\]](#)
59. Stensballe A, Jensen ON. Phosphoric acid enhances the performance of Fe(III) affinity chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization tandem mass spectrometry for recovery, detection and sequencing of phosphopeptides. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2004; 18: 1721-30. [\[CrossRef\]](#)
60. Kuyama H, Sonomura K, Nishimura O. Sensitive detection of phosphopeptides by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: use of alkylphosphonic acids as matrix additives. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2008; 22: 1109-16. [\[CrossRef\]](#)
61. Chen H, Talaty NN, Takáts Z, Cooks RG. Desorption electrospray ionization mass spectrometry for high-throughput analysis of pharmaceutical samples in the ambient environment. *Anal Chem* 2005; 77: 6915-27. [\[CrossRef\]](#)
62. Pan N, Liu P, Cui W, Tang B, Shi J, Chen H. Highly efficient ionization of phosphopeptides at low pH by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Analyst* 2013; 138: 1321-24. [\[CrossRef\]](#)
63. Carson RH, Lewis CR, Erickson MN, et al. Imaging regiospecific lipid turnover in mouse brain with desorption electrospray ionization mass spectrometry. *J Lipid Res* 2017; 58: 1884-92. [\[CrossRef\]](#)
64. Honarvar E, Venter AR. Ammonium bicarbonate addition improves the detection of proteins by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 2017; 28: 1109-17. [\[CrossRef\]](#)
65. Olsen JV, Macek B, Lange O, Makarov A, Horning S, Mann M. Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis. *Nat Methods* 2007; 4: 709-12. [\[CrossRef\]](#)
66. Zubarev RA. Electron-capture dissociation tandem mass spectrometry. *Curr Opin Biotechnol* 2004; 15: 12-6. [\[CrossRef\]](#)
67. Qi Y, Volmer DA. Electron-based fragmentation methods in mass spectrometry: An overview. *Mass Spectrom Rev* 2017; 36: 4-15. [\[CrossRef\]](#)
68. Nardiello D, Palermo C, Natale A, Quinto M, Centonze D. Strategies in protein sequencing and characterization: multi-enzyme digestion coupled with alternate CID/ETD tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 2015; 854: 106-17. [\[CrossRef\]](#)
69. Choudhary C, Mann M. Decoding signalling networks by mass spectrometry-based proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11: 427-39. [\[CrossRef\]](#)
70. Mann M, Hendrickson RC, Pandey A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem* 2001; 70: 437-73. [\[CrossRef\]](#)
71. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003; 422: 198-207. [\[CrossRef\]](#)
72. Silva AM, Vitorino R, Domingues MR, Spickett CM, Domingues P. Post-translational modifications and mass spectrometry detection. *Free Radic Biol Med* 2013; 65: 925-41. [\[CrossRef\]](#)
73. Ravikumar V, Macek B, Mijakovic I. Resources for assignment of phosphorylation sites on peptides and proteins. *Methods Mol Biol* 2016; 1355: 293-306. [\[CrossRef\]](#)
74. Hoos MD, Richardson BM, Foster MW, et al. Longitudinal study of differential protein expression in an Alzheimer's Mouse model lacking inducible nitric oxide synthase. *J Proteome Res* 2013; 12: 4462-77. [\[CrossRef\]](#)
75. Song L, Wang F, Dong Z, Hua X, Xia Q. Label-free quantitative phosphoproteomic profiling of cellular response induced by an insect cytokine paralytic peptide. *J Proteomics* 2017; 154: 49-58. [\[CrossRef\]](#)
76. Kanshin E, Giguère S, Jing C, Tyers M, Thibault P. Machine learning of global phosphoproteomic profiles enables discrimination of direct versus indirect kinase substrates. *Mol Cell Proteomics* 2017; 16: 786-98. [\[CrossRef\]](#)
77. Jünger MA, Aebersold R. Mass spectrometry-driven phosphoproteomics: patterning the systems biology mosaic. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2014; 3: 83-112. [\[CrossRef\]](#)
78. Croft D, Mundo AF, Haw R, et al. The Reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res* 2014; 42: D472-7. [\[CrossRef\]](#)
79. May C, Brosseron F, Chartowski P, Meyer HE, Marcus K. Differential proteome analysis using 2D-DIGE. *Methods Mol Biol* 2012; 893: 75-82. [\[CrossRef\]](#)
80. May C, Brosseron F, Pfeiffer K, Meyer HE, Marcus K. Proteome analysis with classical 2D-PAGE. *Methods Mol Biol* 2012; 893: 37-46. [\[CrossRef\]](#)
81. Dyballa N, Metzger S. Fast and sensitive coomassie staining in quantitative proteomics. *Methods Mol Biol* 2012; 893: 47-59. [\[CrossRef\]](#)
82. Li R, Liao G, Nirujogi RS, et al. phosphoproteomic profiling reveals Epstein-Barr virus protein kinase integration of DNA damage response and mitotic signaling. *PLoS Pathog* 2015; 11: e1005346. [\[CrossRef\]](#)
83. Wang G, Wu WW, Zeng W, Chou CL, Shen RF. Label-free protein quantification using LC-coupled ion trap or FT mass spectrometry: Reproducibility, linearity, and application with complex proteomes. *J Proteome Res* 2006; 5: 1214-23. [\[CrossRef\]](#)
84. Abdallah C, Dumas-Gaudot E, Renaut J, Sergeant K. Gel-based and gel-free quantitative proteomics approaches at a glance. *Int J Plant Genomics* 2012; 2012: 494572. [\[CrossRef\]](#)
85. Gouw JW, Krijgsveld J, Heck AJ. Quantitative proteomics by metabolic labeling of model organisms. *Mol Cell Proteomics* 2010; 9: 11-24. [\[CrossRef\]](#)
86. van der Wal L, Demmers JAA. Quantitative Mass Spectrometry-based Proteomics. Mahdeldin S (ed). *Recent Advances in Proteomics Research*. London: InTech Open; 2015.
87. Zhao Z, Wu F, Ding S, et al. Label-free quantitative proteomic analysis reveals potential biomarkers and pathways in renal cell carcinoma. *Tumour Biol* 2015; 36: 939-51. [\[CrossRef\]](#)
88. Bantscheff M, Lemeer S, Savitski MM, Kuster B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present. *Anal Bioanal Chem* 2012; 404: 939-65. [\[CrossRef\]](#)
89. Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2002; 1: 376-86. [\[CrossRef\]](#)
90. Ong SE, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nat Chem Biol* 2005; 1: 252-62. [\[CrossRef\]](#)
91. Chen X, Wei S, Ji Y, Guo X, Yang F. Quantitative proteomics using SILAC: Principles, applications, and developments. *Proteomics* 2015; 15: 3175-92. [\[CrossRef\]](#)
92. Nolte H, Hölper S, Housley MP, et al. Dynamics of zebrafish fin regeneration using a pulsed SILAC approach. *Proteomics* 2015; 15: 739-51. [\[CrossRef\]](#)
93. Sury MD, Chen JX, Selbach M. In vivo stable isotope labeling by amino acids in *Drosophila melanogaster*. *Methods Mol Biol* 2014; 1188: 85-93. [\[CrossRef\]](#)
94. Fredens J, Færgeman NJ. Quantitative proteomics by amino acid labeling identifies novel NHR-49 regulated proteins in *C. elegans*. *Worm* 2012; 1: 66-71. [\[CrossRef\]](#)

95. Geiger T, Velic A, Macek B, et al. Initial quantitative proteomic map of 28 mouse tissues using the SILAC mouse. *Mol Cell Proteomics* 2013; 12: 1709-22. [\[CrossRef\]](#)
96. Shenoy A, Geiger T. Super-SILAC: current trends and future perspectives. *Expert Rev Proteomics* 2015; 12: 13-9. [\[CrossRef\]](#)
97. Wang J, Gao L, Lee YM, et al. Target identification of natural and traditional medicines with quantitative chemical proteomics approaches. *Pharmacol Ther* 2016; 162: 10-22. [\[CrossRef\]](#)
98. Harsha HC, Pinto SM, Pandey A. Proteomic strategies to characterize signaling pathways. *Methods Mol Biol* 2013; 1007: 359-77. [\[CrossRef\]](#)
99. Yu F, F. Qiu, and J. Meza. Design and statistical analysis of mass-spectrometry-based quantitative proteomics data. Ciborowski P, Silberring J (eds). *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry: The Crossroads*. New York: Elsevier Inc; 2016: p.211. [\[CrossRef\]](#)
100. Drabovich AP, Pavlou MP, Batruch I, Diamandis EP. Proteomic and mass spectrometry technologies for biomarker discovery. Issaq HJ, Veenstra TD (eds). *Proteomic and metabolomic approaches to biomarker discovery*. Boston: Elsevier/AP; 2013: pp.17-37. [\[CrossRef\]](#)
101. Ishihama Y, Oda Y, Tabata T, et al. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol Cell Proteomics* 2005; 4: 1265-72. [\[CrossRef\]](#)
102. Martins-de-Souza D, ed. *Shotgun Proteomics*. *Methods in Molecular Biology* 1156. Berlin: Springer; 2014.
103. Silberring JA, Ciborowski P. *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry: The Crossroads* New York: Elsevier Inc; 2016: p.145.

Ağır Malnutrisyon Nadir Bir Sebebi Olarak Smith Lemli Opitz Sendromu

Smith–Lemli–Opitz Syndrome: A Rare Cause of Severe Malnutrition

İşil Özer 

Department of Pediatric Metabolism, Ondokuz Mayıs University School of Medicine, Samsun, Turkey

Cite this article as: İşil Ö. Smith–Lemli–Opitz syndrome: a rare cause of severe malnutrition. Experimed 2018; 8(1): 33-6.

ÖZ

Ağır malnutrisyon etiolojisinde kolesterol sentez bozukluklarından biri olan Smith Lemli Opitz (SLOS) klasik ayırıcı tanı şemalarında yer almamaktadır. Dikkatli fizik muayene ile ipuçları yakalanabilen bu hastalığa malnutrisyon etiolojisinde dikkat çekmek için bu olgu seçilmiştir. Akrabalığı olmayan ailenin ilki abortus 2. gebeliğinden yaşayan tek çocuk olan kız hasta kilo alamama şikayeti ile 4 aylık ağır akut malnutrisyon tanısı ile polikliniğimize yönlendirilmişti. Fizik muayenede tartı, boy, baş çevresi 3. persentil ve altında olup, ayak 2-3. parmak arası sindaktilisi, dismorfik yüz görünümü mevcuttu. Nöromotor gelişimi yaşına uygundu. Fenotipten şüphelenilerek istenen lipid analizinde hipolipidemi olduğu görüldü. SLOS ayırıcı tanıda düşünümlü biyomarkeri 7 dehidrokolesterol (7DHK) istendi. 7DHK düzeyi 1772 ($n < 10$ mmol/L) yüksek saptanıp; moleküler tetkikle p.Tyr432cys (c.1295 A>G) htr p.Arg446Trp(c.1336C>T) heterozigot mutasyonu tespit edildi. Hastanın steroid hormonları, safra asidi sentezi, yağda eriyen vitamin emilimi, merkezi sinir sistemi gelişimi etkilenebileceği için ayrıntılı değerlendirildi. Patent foramen ovale dışında patoloji saptanmadı. Tedavide safra asitleri (ursodeoksikolik asid 15-25 mg/kg/gün), kolesterol (50-100 mg/kg/gün) yerine koyma tedavisi başlandı. Diyet kolesterolden zengin olarak düzenlendi. 1 ay sonra Tartı: 5935 g, boy: 69 cm, baş çevresi: 38 cm, total kolesterol: 83mg/dL, HDL: 30mg/dL, LDL: 32mg/dL, bulundu. Hastanın besin tüketiminin yeterli olmadığı öğrenildi. Perkütan endoskopik gastrotomi enteral beslenmeye geçildikten sonra kilo ve kolesterol düzeyleri düzeldi. Smith Lemli Opitz tanısı için tam fizik muayene yapılarak, çorapları çıkarmak parmak yapısına bakmak, uvulayı kontrol edip bifid uvula aramak gibi ayrıntıya dikkat etmek gerekir. Malnutrisyon rutin tetkikleri arasında trigliserid, kolesterol kontrolü yoktur. Dismorfik malnutrisyonlu hastalarda lipid profili kontrolü unutulmamalıdır.

Anahtar Kelimeler: Smith Lemli Opitz, dislipidemi, malnutrisyon, dismorfik, sindaktili

ABSTRACT

Smith–Lemli–Opitz syndrome (SLOS) is a cholesterol synthesis disorder, with an etiology of severe malnutrition, which is often excluded from typical differential diagnostic strategies. However, SLOS can be detected during a careful physical examination; thus, it was selected to draw attention to the malnutrition etiology. It was selected to exemplify how an inborn error in cholesterol metabolism can induce malnutrition. A four month old girl was referred to our polyclinic with a diagnosis of severe acute malnutrition since 4 months. She was the only child from a second pregnancy; the first child of her non-consanguineous parents was lost due to an abortion. Physical examination involving weight, height, and head circumference were at third centimeter percentile and below; additionally, dysmorphic facial appearance and syndactyly between the second and third finger of the foot feet was noted. Neuro-motor development was normal for her age. Suspecting a phenotype suggesting a congenital problem, a lipid analysis was performed that revealed hypolipidemia. SLOS was considered as a differential diagnosis. Accordingly, the level of biomarker 7 dehydrocholesterol was assessed controlled and was found to be 1772, which was considerably higher than normal (normal < 10 mmol/L). Subsequently, molecular assay revealed pTyr432Cys (c.1295A> G) htr pArg446Trp (c.1336C> T) heterozygous mutation. Steroid hormone levels, bile acid synthesis, fat-soluble vitamin absorption, and central nervous system development may be negatively affected because they were evaluated in detail. No other pathology was detected except for a patent foramen ovale. A replacement therapy comprising of bile acids (ursodeoxycholic acid 15–25 mg/kg/day) and cholesterol (50–100 mg/kg/day) was initiated, along with a cholesterol-rich diet. After 1 month, the patient weighed 5935 g, with a height of 69 cm, head circumference of 38 cm, total cholesterol level of 83 mg/dL, High density lipoprotein (HDL) level of 30 mg/dL, and Low density lipoprotein (LDL) level of 32 mg/dL. However, the patient's nutrient intake was not adequate, and percutaneous endoscopic gastrostomy was initiated, following which the patient's weight and cholesterol levels improved. To reach SLOS diagnosis, it is necessary to conduct full physical examination, including taking out the socks; looking at toe finger structure; evaluating head size, palate, uvula, and external genitals; and observing signs of mental retardation. In routine tests for assessing malnutrition, triglyceride and cholesterol control are not performed. The evaluation of the serum lipid profile should not be overlooked in patients with dysmorphic malnutrition.

Keywords: Smith-Lemli-Opitz Syndrome, dyslipidemia, malnutrition, dysmorphic, syndactyly

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: İşil Özer **E-mail:** isil.ozar@yahoo.com; isil.ozar@omu.edu.tr

Geliş Tarihi/Received Date: 04.06.2018 **Kabul Tarihi/Accepted Date:** 04.06.2018

© Copyright 2018 by The Istanbul University Faculty of Science • Available online at <http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/>

© Telif Hakkı 2018 İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi • Makale metnine http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/_sayfasından ulaşılabilir.

GİRİŞ

Malnutrisyon etiolojisinde bir çok farklı etken rol alabilir. İlk akla gelen nutrisyonel eksiklikler olmakla birlikte, dikkatli ve ayrıntılı fizik muayene ile nadir etkenler farkedilebilir. Ağır malnutrisyon etiolojisinde kolesterol sentez bozukluklarından biri olan Smith Lemli Opitz (SLOS) klasik ayırıcı tanı şemalarında yer almamaktadır (1). SLOS'a özgü fenotipik bulgular erkek hastalarda özellikle genital bulgular nedeniyle daha belirgindir (2, 3). Ancak kız



Resim 1. Smith Lemli Opitz tipik yüz görünümü olan uzun filtrum, küçük çene, yukarı kalkık burun, düşük geride kulaklar

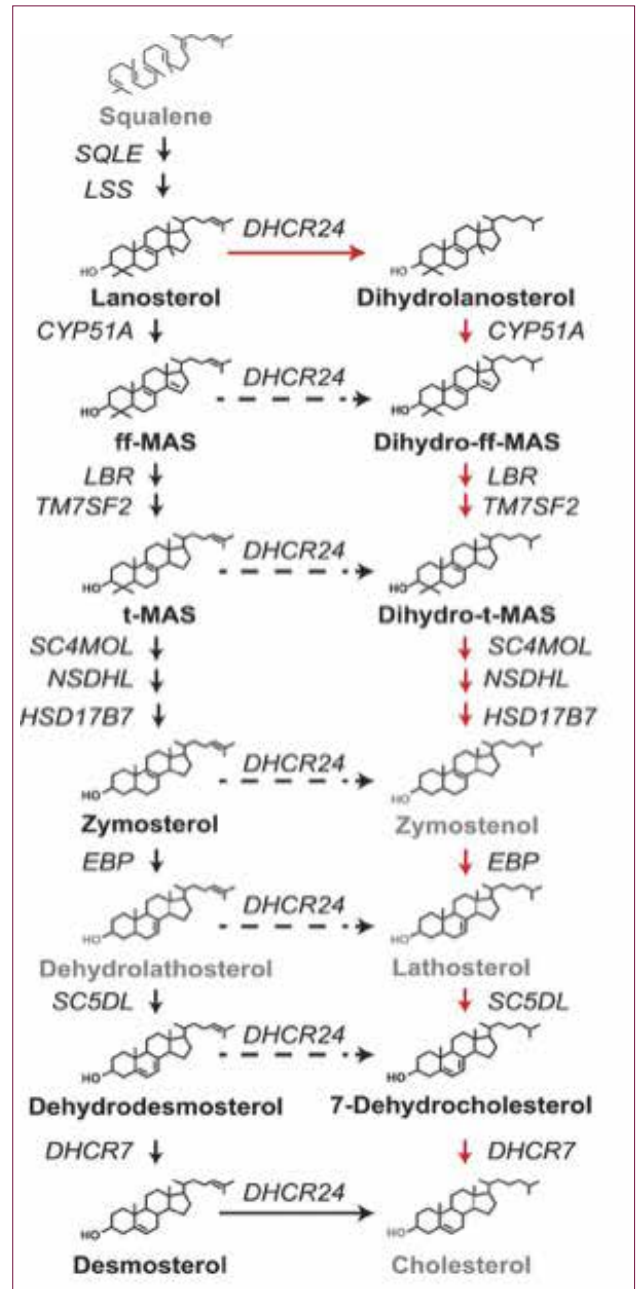


Resim 2. Smith Lemli Opitz için tipik ayak 2-3. parmaklar arasında sindaktili

çocuklarda ayrıntılı fizik muayene ile dismorfik varlığı araştırılıp hayatı tehdit edebilecek, sekel bırakabilecek bu sendrom atlanmamış olur.

OLGU SUNUMU

Akrabalığı olmayan ailenin ilki abortus ikinci gebeliğinden yaşayan tek çocuk olan kız hasta kilo alamama şikâyeti ile 4 aylık ağır akut malnutrisyon tanısı ile polikliniğimize yönlendirilmişti. Fizik muayenede tartı 4210 g (<3p), boy 59,5cm (3p), baş çevresi 37 cm (< 3p). Fizik muayenede mikrosefali, düşük,



Şekil 1. Bloch ve Kandutsch-Russell (K-R) yolları ile skualenin kolesterole dönüşüm şeması (7)

geride dış kulak yapısı, mikrognatti, yanlardan basık kafa yapısı, ptozis, yukarı kalkık burun, geniş burun kökü, uzun filtrum (Resim 1) ve ayak 2-3. parmak arası sindaktili vardı (Resim 2), uvula normaldi. Nöromotor gelişimi yaşına uygundu. Hastanın intrauterin gelişim geriliği nedeniyle sezeryan ile 2790 g doğduğu,

Tablo 1. Tedavi öncesi ve sonrası hastalının nutrisyonel ve lipid düzey değerlendirme sonuçları

Tedavi zamanı	Relatif Tartı	Total Kolesterol	LDL	HDL
İlk	% 60	86	33,8	31
2. ay	% 73	123	70	29

LDL: low density lipoprotein; HDL: high density lipoprotein

post natal sorunu olmadığı, 2 ve 3 aylık 2 kez ingüinal herni operasyonu yapıldığı öğrenildi. Fenotipten şüphelenilerek istenen total kolesterol 86 mg/dl, HDL: 31 mg/dL, LDL: 33,8 mg/dL, TG: 106 mg/dL bulunup, SLOS ön tanısı ile ileri tetkikler istendi. Laboratuvar spesifik değerlendirmesi için sonraki yollar blokaja uğradığı için düzeyinin artması beklenen serum 7dehidrokolesterol (7DHK) düzeyi 1772(n<10mmol/L) olarak yüksek bulundu. SLOS tanısı p.Tyr432cys (c.1295 A>G); p.Arg446Trp (c.1336C>T) birleşik heterozigot mutasyonu gösterilerek moleküler olarak da kanıtlanmış oldu.

Hastanın steroid hormonları, safra asitleri sentezi, yağda eriyen vitamin emilimi, merkezi sinir sistemi gelişimi etkilenebileceği için kontrol edildi. Patent foramen ovale dışında patoloji sap-

Tablo 2. Smith Lemli Opitz klinik ve laboratuvar açısından tanıtıcı bulgular ve hastamızda bulunanlar (OMIM 270400)

Etkilenen sistem	Hastamızda bulunan	Hastamızda bulunmayan
Büyüme	Boy kısalığı, düşük doğum ağırlığı, kilo almada duraklama	
Baş - Boyun	Mikrosefali, düşük, geride dış kulak yapısı, mikrognatti, yanlardan basık kafa yapısı, ptozis, yukarı kalkık burun, geniş burun kökü, uzun filtrum	katarakt, epikantal kıvrımlar, hipertelorizm, strabismus, yarık damak, orta hatta büyük dişler, büyük diş alveolleri, hipoplastik dil
Kalp damar sistemi	Patent duktus arteriosus	Atrial septal defekt, ventriküler septal defekt, Aort koarktasyonu
Solunum sistemi		Küçük, lob sayısı anomalili akciğerler
Mide barsak sistemi	Emme güçlüğü, kusma, kabızlık	Malrotasyon, pilor sitenozi
Genitoüriner sistem		<u>Erkek çocuk için</u> Hipospadias, ambigü genitalia, mikropenis, hipoplastik skrotum, bifid skrotum, mikroüretre, kriptoorşidizm <u>Her iki cinsde</u> Renal agenezi, hidronefroz, tek böbrek, kistik böbrek, üreteropelvik bileşke darlığı
İskelet Sistemi	Ayakta 2-3. parmak arası sindaktili	Epifizde yapısal bozukluk, kalça displazisi, kısa ekstremiteler, kısa el- ayak başparmağı, yukarıda yerleşen ayak başparmakları, polidaktili, pes kalkaneovarus, üstüste binmiş ayak parmakları, kısa metatarslar
Deri, tırnaklar, saçlar	Ciddi ışığa duyarlılık, egzama	Sarı saç, yüzde kapiller hemanjiom
Nörolojik bulgular	Nöromotor gerilik, hipotoni (erken çocuklukta), uyku bozukluğu, hırçınlık	Konvülsiyon, hipertoni (çocukluk dönemi), hidrocefali, frontal lob hipoplazisi, periventriküler gri cevher heterotopisi, kendine zarar verme, tiz çılgılık, otizm benzeri davranışlar
Perinatal bulgular		Az hareketli fetüs, kalça prezentasyonu geliş
Laboratuvar bulguları	Kolesterol düşüklüğü, 7-dehidrokolesterol artışı, Delta-7-dehidrokolesterol redüktaz gen mutasyonu (DHCR7, 602858.0001)	

tanmadı. Tedavide safra asidi ursodeoksikolik asid (Ursofalk; Ali Raif İlaç Sanayi, İstanbul, Türkiye) 15-25 mg/kg/gün, kolesterol: (Cholesterol modüle; Nutricia, İtalya) 50-100 mg/kg/gün başlandı, diyet kolesterolden zengin olarak düzenlendi. 1 ay sonra kontrolde tartı ağırlığı yetersizliği tespit edilip perkütan endoskopik gastrotomi (PEG) ile enteral beslenme önerildi ve aile ikna edilerek önce nazogastrik, sonra PEG ile beslenme başlandı. Uygun tedavi ile nutrisyonel ve lipid düzeylerinde iyileşme saptandı (Tablo 1). Hasta klinik tanıtıcı özellikleri nedeniyle yayınlanmaya karar verilip, bu konuda ailenin onayı alındı.

TARTIŞMA

Smith Lemli Opitz otozomal resesif geçişli düşük veya normal kolesterol; yüksek 7 ve 8DHK düzeyi ile karakterize, kolesterol sentezi son basamağındaki enzim olan dehidrokolesterol Δ^7 -redüktaz eksikliği nedeniyle oluşan hastalıktır (Şekil 1) (7). Kolesterol eksikliği nedeniyle ondan sentezlenen steroid hormonların, safra asitlerinin eksikliği, sinir sistemi miyelin kılıfları gibi kolesterolden zengin dokularda anormallikler şeklinde patolojik bulguları ve bunların farklı şiddette klinik yansımalarını oluşturur (Tablo 2) (3-5). Eksik kolesterol, safra asitleri ve hormonları yerine koyma, sinir doku miyelin kılıf eksikliği nedeniyle oluşan nöromotor gerilik ve davranış bozuklukları tedavisi gereklidir. 7DHK birikimini önlemek için önerilen 3hid-roksi-3-metilglutaril (HMG) Koenzim A redüktaz inhibitörleri iskelet kası, kalp kası ve karaciğer üzerine yan etkileri nedeniyle hastamız yaş grubunda uygulanamamıştır (2). SLOS otizm bulgularına sebep olabilmesine rağmen yaşı küçük hastamızda davranış sorunları tespit edilmemiştir. Ancak klinik izlemde yaşı büyüdükçe kullanılan oral kolesterol preparatı hormonal dengesizliği ve nutrisyonel yetersizliği düzeltmesine rağmen kan beyin bariyerini geçemediği için muhtemelen yaşanabilecek nöropsikiyatrik bulguları düzeltmek için HMG Koenzim A redüktaz inhibitörleri başlanması gerekecek. Ancak klinik değişkenlik nedeniyle tedavinin intrauterin dönemden itibaren oluşacak dismorfik fenotipi düzeltmek için planlanması gerektiği konusunda görüş belirten yazarlar da mevcuttur (6).

SONUÇ

Erkek çocuklarda hipospadias vb genital anomaliler ile SLOS erken fark edilebilir. Ancak kız bebeklerde bu şans yoktur. Tam fizik muayene yapılarak, çorapları çıkarmak parmak yapısına bakmak, uvulayı kontrol edip bifid uvula aramak gibi ayrıntıya dikkat etmek gerekir.

Malnutrisyon rutin tetkikleri arasında trigliserid, kolesterol kontrolü yoktur. Dismorfik hastalarda lipid profili kontrolü un-

tulmamalıdır. Klinik izlemde hiperlipidemiler dikkati çekmekte, düşük lipid düzeylerinin önemi göz ardı edilmektedir. Biyokimya sonuçlarında alt sınır değerleri yazılması bile ihmal edilmektedir. Kolesterol sentez bozuklukları, yağda emilen vitaminlerin eksiklikleri, steroid hormonların ve safra asitlerinin yetersizlik bulguları, demiyelinizasyona bağlı nörolojik gelişim geriliği gibi birçok sistemi etkileyen ciddi sonuçlara sebep olabilir.

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

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Çıkar Çatışması: Yazar çıkar çatışması olmadığını bildirmiştir.

Finansal Destek: Yazar bu çalışma için hiçbir finansal destek alınmadığını beyan etmiştir.

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

Peer-review: Externally peer-reviewed.

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

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

KAYNAKLAR

1. Alberda C, Graf A, McCargar L. Malnutrition: Etiology, consequences, and assessment of a patient at risk. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20: 419-39. [CrossRef]
2. Porter FD. Smith-Lemli-Opitz syndrome: pathogenesis, diagnosis and management. *Eur J Hum Gen* 2008; 16: 535-41. [CrossRef]
3. Nowaczyk MJ, Irons MB. Smith-Lemli-Opitz Syndrome: Phenotype, natural history, and epidemiology. *Am J Med Gen* 2012; 160C: 250-62. [CrossRef]
4. Xu L, Porter NA. Free radical oxidation of cholesterol and its precursors: Implications in cholesterol biosynthesis disorders. *Free Radic Res* 2015; 49: 835-49. [CrossRef]
5. Slominski AT, Li W, Kim TK, et al. Novel activities of CYP11A1 and their potential physiological significance. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2015; 151: 25-37. [CrossRef]
6. Boland MR, Tatonetti NP. Investigation of 7-dehydrocholesterol reductase pathway to elucidate off-target prenatal effects of pharmaceuticals: a systematic review. *Pharmacogenomics J* 2016; 16: 411-29. [CrossRef]
7. Mitsche MA, McDonald JG, Hobbs HH, Cohen JC. Flux analysis of cholesterol biosynthesis in vivo reveals multiple tissue and cell-type specific pathways. *Elife* 2015; 4: 1-21. [CrossRef]

Toe Walking Caused by Congenital Metabolic Diseases following a Specific Case

Bir Olgu Nedeniyle Doğumsal Metabolik Hastalıklara Bağlı Parmak Ucunda Yürüme

Işıl Özer 

Department of Pediatric Metabolism, Ondokuz Mayıs University School of Medicine, Samsun, Turkey

Cite this article as: Işıl Ö. Toe walking caused by congenital metabolic diseases following a specific case. Experimed 2018; 8(1): 37-40.

ABSTRACT

According to the literature on cases of toe walking, neural tube defects generally refer to orthopedic and neurologic case reports. The case of toe walking has been selected to present the information obtained from our patient group monitored for 6 years and to draw attention to Methylene Tetra Hydro Folate Reductase (MTHFR) polymorphisms. A 10 year-old female patient has been applied for toe walking and mild neurologic retardation. Her family history was unremarkable, except for family history of stroke in her grandfather. Her prominent clinical findings were obesity, sacral dimple and toe walking. The laboratory assessment showed that moderately high lipid levels and MTHFR A1298C heterozygote mutation. A hypoplastic disc, spondylolisthesis and filar lipoma were detected in a spinal MRI. The final diagnoses of 20/8000 patients (11 female, 9 male) monitored in our clinic due to the symptoms of toe walking were as follows: 3 late diagnosed phenylketonuria (PKU), 2 metachromatic leuko-dystrophy (MLD), 1 L (OH) glutaric aciduria, 3 fatty acids oxidation defect (FAO), 1 mitochondrial disease and 10 MTHFR. A problem was detected in medium chain fatty acids in the patients with FAO. The complaint was considered to be muscle cramp due to increased muscle enzymes and aches throughout the complaint period. Considering neurological findings, the difficulties in walking were apparent in PKU and MLD patients. A short Achilles tendon was included in neurological findings in the patients diagnosed with L2 glutaric aciduria and mitochondrial diseases. From MTHFR patients, syringomyelia was found in one patient with sacral central line asymmetry and filar lipoma was detected in the remaining patients with deep sacral center lines whereas spondylolisthesis was observed in 2 patients and the presence of tethered cord was found in 1 patient. Toe walking refers to a finding defined as an early symptom of autism. MTHFR has been associated with autism. The autism like symptom was found only in one patient. The treatment of walking on the tip of the toe is not as simple as achieving success with local Achilles tendon surgery alone. It would be vital to find out the underlying cause.

Keywords: Toe walking, congenital metabolic diseases, autism, MTHFR

ÖZ

Parmak ucunda yürüme ve nöral tüp defektleri, genellikle nörolojik ve ortopedik olgu sunumları olarak yayınlarda sunulmaktadır. Altı yıllık poliklinik tecrübemiz nedeniyle parmak ucunda yürüme de Metilen Tetra Hidro Folat Redüktaz (MTHFR) polimorfizmlerine dikkat çekmek için bu olgu seçildi. On yaşındaki kız hasta parmak ucunda yürüme ve hafif nörolojik gerilikle başvurdu. Aile öyküsünde anneannede inme dışında önemli bulgu yoktu. Öne çıkan klinik bulguları obezite, sakral gamze ve parmak ucunda yürüme idi. Laboratuvar değerlendirmesinde orta derecede lipid yüksekliği, MTHFR A1298C heterozigot mutasyonu görülmekteydi. Spinal manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ile incelemede hipoplazik disk, spondilolistezis ve filar lipom tespit edildi. Klinik hasta izlemimiz sırasında 8000 hastanın 11 kız 9 erkek cinsiyette olan toplam 20 hastada parmak ucunda yürüme tespit edildi. Bunların hastalıklarına göre dağılımı 3 geç tanı fenilketonüri (PKU), 2 metakromatik lökoadistrofi (MLD), 1 L (OH) glutarik asidüri, 3 yağ aside oksidasyon bozukluğu (FAO), 1 mitokondriyal hastalık ve 10 MTHFR şeklindeydi. FAO grubunda ağırlı kas krampten atakları ve kas enzim artışları sırasında parmak ucunda yürüme gözlenmişti. PKU ve MLD'li hastalarda kalıcı nörolojik sorunlarla parmak ucunda yürüme ilişkisi görülmekteydi. Kısa Aşil tendonu L2 (OH) Glutarik asidüri hastası parmak ucunda yürüme nedeni idi. MTHFR'li hastalarda nöral tüp defektleri ön plandaydı (1 sirengomyeli, 1 filar lipom, 2 spondilolistezis ve 1 gergin kord). Erken dönemde parmak ucunda yürüme tanımlanan otizm etiolojisinde MTHFR de yer almaktadır. Hastalarımızdan birinde otizm tanısı vardı. Parmak ucunda yürüme sadece Aşil tendon ameliyatı ile düzeltilebilecek kadar basit bir sorun değildir. Altta yatan sorunun araştırılması gerekir.

Anahtar Kelimeler: Parmak ucunda yürüme, kalıtsal metabolik hastalıklar, Otizm, MTHFR

Corresponding Author/Sorumlu Yazar: Işıl Özer **E-mail:** isil.ozer@yahoo.com; isil.ozer@omu.edu.tr

Geliş Tarihi/Received Date: 07.06.2018 **Kabul Tarihi/Accepted Date:** 07.06.2018

© Copyright 2018 by The Istanbul University Faculty of Science • Available online at <http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/>

© Telif Hakkı 2018 İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi • Makale metnine http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/_sayfasından ulaşılabilir.

INTRODUCTION

In the medical literature, the causes of toe walking are thought to be storage diseases leading to neuromuscular involvement, mitochondrial diseases and urea cycle disorders (1). Furthermore, toe walking is also reported as an early symptom of autism (2, 3). According to the literature on cases of toe walking, neural tube defects generally refer to orthopedic and neurologic case reports affiliated with spinal deformities or case series considered as atypical due to the lack of definition in such reports (1, 4-9). However, signs of Methylene Tetra Hydro Folate Reductase (MTHFR) polymorphisms in etiologies of autism and neural tube defects fail to be found in congenital metabolism diseases and neurology-oriented journals. The case of toe walking has been selected to present the information obtained from our patient group, who were monitored for 6 years, and to draw attention to MTHFR polymorphisms as the primary cause found by searching similar complaints from the patients monitored in our clinic for neuro-motor deficiencies.

CASE PRESENTATION

A 10-year-old woman was admitted due to walking on her finger tip and poor schooling. The patient born prematurely (27th gestational week) with neonatal jaundice and a history of exchange transfusion had walked on her tiptoes since her first

steps, however, the patient’s neurological development complied with her age. As the patient had been unable to stand at school, she was sent to our polyclinic for metabolic assessment.

The patient with healthy parents from unrelated families and healthy brothers aged 11 and 7 has a family history of stroke in her grandfather but symptoms were not found in neonatal screening. The weight-for-height rate was measured as 45 kg to 136 cm whereas relevant characteristics were not available in other systems excluding the cases of apple type obesity, striae, sacral dimple and toe walking (Figure 1) in physical examination.

Hemogram levels were found to be normal in laboratory assessment as well as blood glucose rate, electrolytes, liver and kidney functions, muscle enzymes, B12 level and folate, homocysteine and insulin levels. The cholesterol level was 238 mg/dl whereas the triglyceride level is 211 mg/dl. In tandem screening, it was observed that C8, C10 and C10:1 levels were high. Neuroradiologic reexamination of the patient revealed normal results from cranial MRI, lumbar spinal MRI and EMG processes 12 years ago, hypoplastic disc and spondylolisthesis were detected in an entire spinal MRI at the filar lipoma rate (1.7 mm) between T9 and T10 (Figure 2). In addition, MTHFR 1298 c Heterozygote mutation was detected during a genetic examina-



Figure 1. Toe walking



Figure 2. Hypoplastic discs, spondylolisthesis and filar lipoma is showed in spinal Magnetic Resonance Imaging

Table 1. Clinical etiologic disturbance of the patients with toe walking

Disease Groups N:20	N (%)	Special note
Methylenetetra hydro reductase deficiency polymorphisms	10 (50)	No vertebral pathology 4 patients Spondylolisthesis 2 patients Syringomyelia 1 patient Filar lipoma 1 patient Tethered cord 1 patient Autism 1 patient
Phenylketonuria	3 (15)	Late diagnosed patient (Neurologic pathology)
Fatty Acid Oxidation defects	3 (15)	During acute symptomatic period
Methochromatic Leucodystrophy	2 (10)	Short Achilles tendon and neuromotor pathology
Mitochondrial Disease	1 (5)	Neuromotor pathology
LOH Glutaric Aciduria	1 (5)	Short Achilles tendon and neuromotor pathology

tion required for sacral dimple. The carnitine (Carnitene; Santa Farma Medical, Istanbul, Turkey) was loaded to the patient at the rate of 100 mg/kg/day together with folate (Folbiol; İbrahim Ethem Ulugay Medical, İstanbul, Turkey) at the rate of 2.5 g/day. In tandem screening performed during medical control after 2 weeks, free and acyl carnitine profile and urinary organic acid analysis were found normal. L-Carnitine (Carnitene; Santa Farma medical, Istanbul, Turkey) loading was ceased while folate application continued. The patient was also directed to neurosurgical monitoring.

DISCUSSION

The final diagnoses of 8000 patients monitored in our clinic for 6 years for symptoms of toe walking were as follows: from the 20 patients (11 females and 9 males) late diagnosed phenylketonuria was found in 3 patients (PKU), 2 had metachromatic leuko-dystrophy (MLD), 1 had L (OH) glutaric aciduria, 3 had fatty acids oxidation defect (FAO), 1 had mitochondrial disease and 10 had methylene tetra hydro folate reductase (MTHFR) (Table 1). A sacral dimple was present in only one person among all the MTHFR patients although any finding related to the spiral channel was not found on examination of the remaining patients. A mutation check was required for the patients due to MTHFR suggestive symptoms in family medical history including stroke, early MI, abortus in mother and epilepsy. A problem was detected in medium chain fatty acids in the patients with fatty acid oxidation. The case of toe walking was only defined during the attacks. The complaint was considered to be muscle cramp due to increased muscle enzymes and aches throughout the complaint period. Considering neurological findings, the difficulties in walking were apparent in PKU and MLD patients. A short Achilles tendon was included in neurological findings in the patients diagnosed with L2 glutaric aciduria and mitochondrial diseases. From MTHFR patients, syringomyelia was found in one patient with sacral central line asymmetry and filar lipoma was detected in the remaining patients with deep sacral center lines and spondylolisthesis was

observed in 2 patients and the presence of a tethered cord was found in 1 patient. Since toe walking refers to a finding defined as early symptom of autism in literature and MTHFR was associated with autism, the patients were examined in respect to autism. Autism like symptoms were found only in one patient.

The case of toe walking could be affiliated with metabolic diseases. Especially of MTHFR with its standing in neural tube etiology and its relatively increased frequency among society in comparison to other diseases due to hereditary risks and the exposure to more than one system, it is also required to consider fatty acid oxidation defects, mitochondrial diseases, storage disorders leading to neuro-motor involvement, organic academia and late diagnosed classical phenylketonuria with neurological sequels.

The treatment for toe walking is not a simple case to be recovered locally (by means of Achilles tendon surgery). It is vital to find out the underlying cause.

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

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Conflict of Interest: The author declared no conflict of interest.

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

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

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Çıkar Çatışması: Yazar herhangi bir çıkar çatışması olmadığını bildirmiştir.

Finansal Destek: Yazar bu çalışma için hiçbir finansal destek alınmadığını beyan etmiştir.

REFERENCES

1. Vavken P, Kathleen A, Ganal-Antonio B, Shen F.H, Chapman, JR, Samartzis D. Fundamentals of clinical outcomes assessment for spinal disorders: study designs, methodologies, and analyses. *Global Spine J* 2015; 5: 156-64. [\[CrossRef\]](#)
2. Accardo PJ, Monasterio E0, Oswald D. Toe walking in autism. Patel VB, Preedy VR, Martin CR, editors. *The Comprehensive Guide to Autism*. New York: Springer; 2014: p.519-532.
3. Barrow WJ, Jaworski M, Accardo PJ. Persistent toe walking in autism. *J Child Neurol* 2011; 26: 619-21. [\[CrossRef\]](#)
4. O'Neill BR, Gallegos D, Herron A, Palmer C, Stence NV, Hankinson TC, et al. Use of magnetic resonance imaging to detect occult spinal dysraphism in infants. *J Neurosurg Pediatr* 2017; 19: 217-26. [\[CrossRef\]](#)
5. Donmez FY, Basaran C, Ulu EM, Guvenc Z, Tarhan NC. Unusual association of tethered cord, filum terminale lipoma, and myxopapillary ependymoma. *Spine (Phila Pa 1976)* 2008; 33: E849-51. [\[CrossRef\]](#)
6. Souweidane MM, Drake, JM. Retethering of sectioned fibrolipomatous filum terminale: report of twocases. *Neurosurgery* 1998; 42; 1390-3. [\[CrossRef\]](#)
7. Kucera JN, Coley I, O'Hara S, Kosnik EJ, Coley BD. The simple sacral dimple: Diagnostic yield of ultrasound in neonates. *Pediatr Radiol* 2015; 45; 211-6. [\[CrossRef\]](#)
8. Williams CM, Tinley P, Curtin M, Nielsen S. Vibration perception thresholds in children with idiopathic toe walking gait. *J Child Neurol* 2012; 27: 1017-21. [\[CrossRef\]](#)
9. Stone JJ, Rozzelle CJ. Retethering of sectioned fibrolipomatous filum terminale in an adult: case report and review of the literature. *Spine J* 2010; 10: e1-e4. [\[CrossRef\]](#)

IX. Aziz Sancar DETAE Günleri

Deneyisel Tıpta Yenilikler

7 - 8 Aralık 2017

Genç Sporadik Prolaktinoma Hasta Kohortunda AIP Gen Mutasyonlarının Tespit Edilmesi

Yeliz Ekici¹, Sema Yarman², Feyza N. Tuncer¹

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

²İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Endokrinoloji Ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Amaç: Prolaktinoma, en yaygın hipofiz adenomudur. Genellikle iyi huylu tümörler olmalarına karşın, tümör büyüklüğüyle orantılı olarak kandaki prolaktin miktarının artması çeşitli metabolik sorunlara neden olmaktadır. Prolaktinoma çeşitli genetik sendromların bir komponenti olarak ortaya çıkabilmektedir. Bu sendromlardan en yaygın olanı çoklu endokrin neoplazi tip 1 (MEN1)'dir. Prolaktinoma MEN1 vakalarının %20'sinde hastalığın ilk manifestasyonu olarak gözlemlenmiştir. Yakın zamanlarda hipofiz makroadenomlu ve ailede MEN1 öyküsünden yoksun genç hastalarda aril hidrokarbon reseptör etkileşimli protein (AIP) genindeki mutasyonların hastalık oluşumunda etkili olduğu bulunmuştur. Bu bilgiler doğrultusunda, klinik takipte olan 31 sporadik prolaktinoma hastasında AIP gen mutasyon incelemesi gerçekleştirilmiştir.

Gereç ve Yöntem: Hastalara ait genomik materyal periferik kandan izole edilmiştir. AIP geninin tüm ekzonları, ekzon-intron aralıkları ile translyasyona uğramayan bölgeleri (UTR) polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılmış ve Sanger dizilemesine tabi tutularak olası mutasyon tespiti açısından incelenmiştir. Elde edilen ham dizi verileri CLC_Main Workbench programı kullanılarak NM_003977.3 referans dizisi ile karşılaştırılmıştır. Varyant analizi ClinVar veri tabanı ile literatür taraması yapılarak gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: AIP mutasyonu taraması gerçekleştirilen 31 hastadan yalnızca 1 tanesinde heterozigot c.911G>A (p.R304Q; rs104894190) klinik mutasyonu tespit edilmiştir. Ayrıca 12 hastada homozigot c.682C>A (p.Q228K; rs641081; MAF=0,15 (C)) ve 2 hastada da homozigot c.920A>G (p.Q307R; rs4930199; MAF<0,01 (A)) SNP'leri tespit edilmiştir.

Tartışma: Tespit edilen iki SNP de toplum sıklıkları yüksek olduğundan hastalığa doğrudan etki ettiği düşünülmemektedir. Öte yandan p.R304Q klinik mutasyonu tespit edilen makroprolaktinomlu hastanın ilaç tedavisine intolerans gösterdiği tespit edilmiştir. 2012'de yapılan bir çalışmada ise aynı mutasyon mikroprolaktinomlu bir hastada rapor edilmiş ve bu hastanın ilaç tedavisine yanıt verdiği belirtilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Prolaktinoma, AIP, R304Q, rs104894190, rs4930199

PCSK9 Geni Y142X Mutasyonu Statin Tedavisinin Serum Kolesterol Düzeylerindeki Etkisini Artırıyor Mu?

Başak Akadam Teker^{1,2}, Özlem Küçükhuşeyin¹, Gülçin Özkara¹, Ezgi I. Aslan¹, Zahra Javadova¹, Zehra Buğra³, Oğuz Öztürk¹, Hülya Yılmaz Aydoğan¹

¹İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

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

³İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Kardiyoloji Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Amaç: Proprotein konvertaz subtilisin/keksin tip 9 (PCSK9)enzimi LDL reseptör (LDLR)degradasyonunda fonksiyon gördüğünden hücre yüzeyinde bulunan reseptör sayısını belirleyen başlıca faktörlerden biridir. PCSK9'un diyetsel ve hücrel kolesterol tarafından güçlü bir şekilde aşağı düzenlendiği (down-regüle), aşağı düzenlenme sürecinin proteozom ve lizozomlardan bağımsız olduğu bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı PCSK9 fonksiyon kaybettiren mutasyonun statin tedavisi alan ve almayan erkek koroner arter hastalarında (KAH) ve sağlıklı erkek kontrollerdeki etkilerinin ve KAH riskindeki etkilerinin araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: Çalışma grupları 202 erkek KAH hastası (119'u statin tedavisi alan, 83'ü statin tedavisi almayan) ve 75 sağlıklı erkek kontrolden oluşmuştur. PCSK9 geni Y142X varyasyonu PCR-RFLP yöntemiyle çalışılmıştır. İstatistik analiz SPSS 20.0 programı ile yapılmıştır.

Bulgular: Statin tedavisi alan ve PCSK9 142-X alleli taşıyan hastalarda serum total kolesterol (p=0.05) ve LDL-kolesterol (p=0.07) düzeylerinin normal 142-YY genotipi taşıyanlara göre daha düşük olduğu gözlemlenmiştir.

Tartışma: Sonuçlarımız PCSK9 142-X allelinin erkek koroner arter hastalarında statin tedavisinde serum kolesterol düzeylerinde daha etkin azalma ve dolayısı ile hiperkolesterolemi riskine karşı protektif rolüne işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: PCSK9, fonksiyon kaybı mutasyonu, Y142X, hiperkolesterolemi, KAH

HNF1A Geni rs1169288 (A>C) Mutasyonunun MODY3 Alt-Tipi Üzerine Etkisinin Araştırılması

Deniz Kanca Demirci^{1,2}, Nurdan Gül³, Yıldız Tütüncü³, Hülya Yılmaz Aydoğan², Oğuz Öztürk², İlhan Satman³

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

²İstanbul Üniversitesi, ASDETAE, Moleküler Tıp Anabilim Dalı, İstanbul

³İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı, İstanbul

Amaç: Gençlerin Erişkin Başlangıçlı Diyabeti (MODY) otozomal dominant kalıtmı ve monogenik bir diyabet formu olmasına rağmen kliniği oldukça heterojendir. Günümüzde artan sedanter yaşam ve beslenme alışkanlıklarındaki değişimle birlikte diyabet vakaları giderek artmaktadır. Çoğunlukla başlangıç yaşı ile tip 1 ve klinik profili ile tip 2 diyabet olarak yanlış tanı alan MODY hastalarının doğru tanı ile uygun tedavi protokollerine yönlendirilmesi önemlidir. Bu amaçla, projemizde HNF1A gen mutasyonları ile gelişen MODY3'te etken rs1169288 (p.I27L) yanlış anlamalı mutasyonunun hastalığın klinik ve biyokimyasal parametreleri üzerine etkisi incelenmesi hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya 79 kontrol ve 75 MODY ön tanılı hasta alınmış olup HNF1A geni rs1169288 (A>C) mutasyonu yeni nesil dizileme (NGS) ile yapılmış, sözkonusu mutasyonun klinik ve laboratuvar parametreleriyle ilişkisi SPSS(20.0) istatistik programıyla araştırılmıştır.

Bulgular: MODY3 alt tipinden sorumlu HNF1A geni rs1169288 (A>C) mutasyonu genotiplerinin kontrol grubundaki etkileri incelendiğinde mutant-CC genotipi taşıyan bireylerde A alleli taşıyanlara kıyasla Gama glutamil transferaz (GGT) ve Hemogloblin (Hb) düzeylerinin (p=0.014; p=0.027) yüksek; hasta grubunda ise, CC genotipi taşıyanlarda normal A alleli taşıyanlara kıyasla başvuru kan şekerinin (BKŞ) yüksek (p=0,016) ve üre düzeyinin düşük (p=0,022) olduğu gözlenmiştir (307,86±28,11 vs 175,65±25,59). Ancak bu genotipin diğer klinik ve biyokimyasal parametreler üzerine anlamlı bir etkisi gözlenmemiştir (p>0.05).

Tartışma: HNF1A-MODY yaygın MODY formlarından biri olup literatür çalışmaları hastalığın klinik tanısını kolaylaştıracak yeterli ayırt edici parametre olmadığı yönündedir. Bu anlamda çalışmamız hastalığın klinik ve biyokimyasal bulgularının anlamlandırılmasına katkı sağlamak ve MODY kliniğinde HNF1A geni rs1169288 (A>C) mutasyonunun serum GGT, Hb, BKŞ ve üre düzeylerinde etkili olabileceğine dikkat çekmektedir.

Anahtar Kelimeler: MODY, HNF1A, rs1169288 (c.79A>C; p.I27L), NGS

Primer İmmün Yetersizliklerde Genetik Alt Yapının Yeni Nesil Dizilme Yöntemi ile Belirlenmesi

Sinem FIRTINA¹, Yuk Yin NG², Özden Hatırnaz NG¹, Tuğçe SUDUTAN¹, Uğur ÖZBEK³, Müge SAYITOĞLU¹

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

²İstanbul Bilgi Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik ve Genetik Bölümü, İstanbul, Türkiye

³Acibadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Amaç: Primer immün yetersizlikler (PİY), 100'den fazla hastalığı kapsayan ve immün sistem üyelerinin yokluğu ya da fonksiyon kaybı ile karakterize nadir hastalıklar grubudur. PİY'lerin Avrupa sıklığı 1/10.000 olarak kabul edilirken ülkemizde yapılan çalışmalar mevcut akraba evlilikleri nedeniyle sıklığının beklenenden fazla olduğunu göstermektedir.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışma ile PİYlerin en yaygın grubu olan primer antikor yetersizlikleri (PAY) ve en ağır seyirli grubu ağır kombine immün yetersizliklerde (AKİY) hastalık ile ilişkili olduğu bilinen genleri kapsayan genetik tanı panelleri geliştirilmiş ve toplam 112 hasta (PAY:64, AKİY:48) yeni nesil dizileme (YND) panelleri ile dizilenmiştir. Tespit edilen varyantlar Sanger dizileme ile doğrulanmış ve ailesel kalımları incelenmiştir.

Bulgular: AKİY hastalarının %58'inde ve PAY hastalarının %14,2'sinde hastalık ile ilişkili varyantlar tespit edilmiştir. Bulunan varyantların 11 tanesi ilk defa bu çalışma ile gösterilmiştir. AKİY panelinde en sık varyant tespit edilen genler RAG1, RAG2 ve ADA genleri, PAY panelinde ise BTK geni olmuştur. Hastalar alt gruplarına göre incelendiğinde, NK (natural killer) lenfopenisi ile seyreden AKİY hastalarında panel ile tanı koyma başarısı %90 iken, NK eksikliği görülmeyen grupta tanı başarısı %39,3'tür. PAY hasta grubunda ise en yüksek varyant belirleme başarısı agammaglobulinemilerde (%31,5) olmuştur. Tasarlanan ampikon panelleri ile tanı koulamayan 1 hasta ekzom dizilemeye yönlendirilmiş ve hastada ATM geninde daha önce tanımlanmamış patojenik bir varyant (p.Y2036*) belirlenmiştir.

Tartışma: Bu çalışma ile YND teknolojisinin primer immün yetersizlik gibi heterojen hastalıklarda hızlı, özgün ve düşük maliyetli bir tanı yöntemi olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. Ayrıca elde edilen sonuçlar ile ülkemizdeki varyant ve gen dağılımları geniş bir hasta grubunda gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Primer immün yetersizlikler, yeni nesil dizileme, amplikon dizileme, ekzom dizileme

Anti-Nöronal Antikoru Pozitif Hastalarda Prognostik Faktörler

Çağla Aydın, Erdem Tüzün

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

Amaç: Anti-nöronal antikolar (ANA), paraneoplastik sendrom ve otoimmün ensefalit olgularında bulunur. Çalışmamızda ANA seropozitifliği ile ilişkili prognostik faktörlerin saptanması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: ANA seropozitifliği saptanan ardışık 27 olgu çalışmaya dahil edildi. ANA, immüno Floresan boyama, immüno blot ve hücre temelli test yöntemleri ile saptandı. Tüm olgular standart bir tedavi protokolü ile izlendi. Hastaların klinik sendromları, tümör türleri, modifiye Rankin skorları, kranyal MR ve oligoklonal bant (OKB) bulguları kaydedildi. Klinik-laboratuvar özelliklerine ve ANA türlerine göre alt gruplara ayrılan olguların iyi prognoz, tedaviye yanıt ve sağkalım oranları karşılaştırıldı.

Bulgular: PNS olgularında N-metil-D-aspartat reseptörü (NMDAR) (6 olgu), Hu (6 olgu), Ma2 (5 olgu), glutamik asit dekarboksilaz (GAD) (3 olgu), Yo (3 olgu), amfifizin (1 olgu), gama-amino bütirik asit B reseptörü (GABABR) (1 olgu), Ri (1 olgu) ve Zic4 (1 olgu) saptandı. İlişkili nörolojik sendromlar limbik ensefalit (8 olgu), serebellar dejenerasyon (7 olgu), beyin sapı ensefaliti (5 olgu), saf duysal nöronopati (4 olgu), stiff-person sendromu (2 olgu) ve opsoklonus-myoklonus (1 olgu) idi. Altı olguda, ilk başvuru sırasında tümör (duktal meme ve küçük hücreli akciğer kanseri) saptandı. Ortalama $1,0 \pm 1,5$ yıllık takip süresinde 6 olgu kaybedildi. Kliniğe ilk başvuru sırasında tümör, kranyal MR lezyonu ve OKB varlığının prognoza etkisi olmadığı, ekstrasellüler veya sinaptik hedef anti-jenli ANA pozitifliğinin ise iyi prognozla ve tedaviye yanıtla ilişkili olduğu saptandı.

Tartışma: Türk hastalarında yapılan bu ilk antikör tarama çalışmasında en sık saptanan antikörlerin NMDAR, Hu ve Ma2 olduğu belirlendi. ANA seropozitifliği olan olgularda temel prognostik faktörün antikör türü olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Paraneoplastik, antikör, sağkalım, prognoz, kanser