



İSTANBUL
ÜNİVERSİTESİ
YAYINEVİ

jmed.istanbul.edu.tr

İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi



Journal of İstanbul
Faculty of Medicine



İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi

SAHİBİ VE SORUMLU MÜDÜR/OWNER AND RESPONSIBLE MANAGER

Bahaüddin ÇOLAKOĞLU
İstanbul Tıp Fakültesi Dekanı
Dean of Istanbul Faculty of Medicine

EDİTÖR/EDITOR

M. Lale ÖCAL
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

EDİTÖR YARDIMCILARI/ASSOCIATE EDITORS

Funda GÜNGÖR UĞURLUCAN
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Birsen KARAMAN
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKE

Ayşe KUBAT ÜZÜM
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

İsmail Cem SORMAZ
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Deniz TUĞCU
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Halil YAZICI
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

YAYIN KURULU/EDITORIAL BOARD

Atilla ARINCI
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Nilgün BOZBUĞA
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Şükrü H. EMRE
Yale Üniversitesi, ABD
Yale University, USA

Haluk ERAKSOY
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Hakan ERTİN
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Simin GÖRAL
Pennsylvania Üniversitesi, ABD
University of Pennsylvania, USA

Nilüfer GÖZÜM
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Hülya GÜL
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Çiğdem KEKİK ÇINAR
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Fahrettin KELEŞTEMUR
Türkiye Sağlık Enstitüleri (TÜSEB), TÜRKİYE
Health Institutes of Turkey, TURKEY

Abdullah KUTLAR
Augusta Üniversitesi, ABD
Augusta University, USA

Sacit Bülent OMAZ
Yale Üniversitesi, ABD
Yale University, USA

Betigül ÖNGEN
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Beyza ÖZÇINAR
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Altay SENCER
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Yasemin ŞANLI
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

M. Öner ŞANLI
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

E. Murat TUZCU
Cleveland Clinic, BAE
Cleveland Clinic, UAE

Pınar YAMANTÜRK ÇELİK
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

İSTATİSTİK DANIŞMANI/STATISTICS ADVISOR

Halim İŞSEVER
İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University Istanbul TURKEY



İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi

AMAÇ KAPSAM VE YAYIN STANDARTLARI

İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi (İst Tıp Fak Derg); bağımsız, önyargısız ve çift-kör hakemlik ilkeleri çerçevesinde yayın yapan İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi'nin uluslararası ve açık erişimli bilimsel yayın organıdır. Dergi Mart, Haziran, Eylül ve Aralık aylarında olmak üzere üç ayda bir yayınlanır ve dört sayıda bir cildi tamamlanır. Yayın dili Türkçe ve İngilizce'dir.

İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi (İst Tıp Fak Derg), tıbbın tüm alanlarında klinik ve deneysel özgün araştırmalar, ender görülebilecek olgu sunumları, özel ve aktüel konularda literatür derlemeleri ve editöre mektuplar yayınlamaktadır. Orijinal metot geliştirme, yeni bir girişim tekniği ve orijinal çalışmaların ön sonuçlarını içeren kısa raporlara da dergide yer verilmektedir.

Derginin hedef kitlesi; sağlık alanındaki tüm disiplinlerde çalışan hekimler ve akademisyenlerdir.

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

İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi (İst Tıp Fak Derg), Web of Science-Emerging Sources Citation Index ve TÜBİTAK ULAKBİM TR Dizin tarafından indekslenmektedir.

Makale değerlendirme ve yayın işlemleri için yazarlardan ücret talep edilmemektedir.

Derginin tüm masrafları İstanbul Üniversitesi tarafından karşılanmaktadır.

Dergide yayınlanan makalelerde ifade edilen görüşler ve fikirler İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi Editör, Editör Yardımcıları, Yayın Kurulu ve Yayıncısının değil, yazar(lar)ın bakış açılarını yansıtır. Editör, Editör Yardımcıları, Yayın Kurulu ve Yayıncı bu gibi durumlar için hiç bir sorumluluk ya da yükümlülük kabul etmemektedir. Yayınlanan içerik ile ilgili tüm sorumluluk yazarlara aittir.

Yayınlanan tüm içeriğe ücretsiz olarak erişilebilir.

Editör: M. Lale Öcal

Adres: İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Dekanlığı, Turgut Özal Cad. 34093 Çapa, Fatih, İstanbul, Türkiye

Tel.: +90 212 414 21 61

E-posta: itfdergisi@istanbul.edu.tr

Yayıncı: İstanbul Üniversitesi Yayınevi

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

Tel.: +90 212 440 00 00

Faks: +90 212 217 22 92



İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi

AIMS SCOPE AND PUBLICATION STANDARDS

Journal of İstanbul Faculty of Medicine (J Ist Faculty Med) 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, İstanbul Faculty of Medicine and it is published quarterly on March, June, September and December. The publication languages of the journal are Turkish and English.

Journal of İstanbul Faculty of Medicine (J Ist Faculty Med) aims to contribute to the literature by publishing manuscripts at the highest scientific level on all fields of medicine. The journal publishes original experimental and clinical research articles, reports of rare cases, reviews that contain sufficient amount of source data conveying the experiences of experts in a particular field, and letters to the editors as well as brief reports on a recently established method or technique or preliminary results of original studies related to all disciplines of medicine from all countries.

The journal's target audience includes researchers, physicians and healthcare professionals who are interested or working in all medical disciplines.

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).

Journal of İstanbul Faculty of Medicine is currently indexed in Web of Science-Emerging Sources Citation Index and TUBITAK ULAKBIM TR Index.

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 expenses of the journal are covered by the İstanbul University.

Statements or opinions expressed in the manuscripts published in Journal of İstanbul Faculty of Medicine 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.

All published content is available online, free of charge.

Editor: M. Lale Öcal

Address: İstanbul University, İstanbul Faculty of Medicine Deanery, Turgut Özal Cad. 34093, Çapa, Fatih, İstanbul, Turkey

Phone: +90 212 414 21 61

E-mail: itfdergisi@istanbul.edu.tr

Publisher: İstanbul University Press

Address: İstanbul Üniversitesi Merkez Kampüsü, 34452 Beyazıt, Fatih / İstanbul - Turkey

Phone: +90 212 440 00 00

YAZARLARA BİLGİ

İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi (İst Tıp Fak Derg); bağımsız, önyargısız ve çift-kör hakemlik ilkeleri çerçevesinde yayın yapan İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi'nin uluslararası ve açık erişimli bilimsel yayın organıdır. Dergi Mart, Haziran, Eylül ve Aralık aylarında olmak üzere üç ayda bir yayınlanır ve dört sayıda bir cildi tamamlanır. Yayın dili Türkçe ve İngilizce'dir.

İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi (İst Tıp Fak Derg), tıbbın tüm alanlarında klinik ve deneysel özgün araştırmalar, ender görülebilecek olgu sunumları, özel ve aktüel konularda literatür derlemeleri ve editöre mektuplar yayınlamaktadır. Orijinal metot geliştirme, yeni bir girişim tekniği ve orijinal çalışmaların ön sonuçlarını içeren kısa raporlara da dergide yer verilmektedir.

EDİTÖRYAL POLİTİKALAR VE HAKEM SÜRECİ

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

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

İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi'ne 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 Editördedir.

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 ağrı, acı ve rahatsızlık verilmemesi için yapılmış olanlar açık olarak makalede belirtilmelidir. Hasta onamları, Etik Kurul raporunun alındığı kurumun adı, onay belgesinin numarası ve tarihi ana metin dosyasında yer alan Gereç ve Yöntem başlığı altında yazılmalıdır. Hastaların kimliklerinin gizliliğini korumak yazarların sorumluluğundadır. Hastaların kimliğini açığa çıkarabilecek fotoğraflar için hastadan ya da yasal temsilcilerinden alınan imzalı izinlerin de gönderilmesi gereklidir.

Bütün makalelerin 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 koşullarını karşılaması gerekmektedir.

ICMJE, yazarların aşağıdaki 4 koşulu karşılamasını önermektedir:

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

YAZARLARA BİLGİ

Bir yazar, çalışmada katkı sağladığı kısımların sorumluluğunu almasına ek olarak, diğer yazarların çalışmanın hangi kısımlarından sorumlu olduğunu da tanımlayabilmelidir. Ayrıca, her yazar diğerlerinin katkı bütünlüğüne güven duymalıdır.

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

Yazarlık haklarına uygun hareket etmek ve hayalet ya da lütuf yazarlığın önlenmesini sağlamak amacıyla sorumlu yazarlar makale yükleme sürecinde <http://jmed.istanbul.edu.tr/tr/content/makale-gonderme-kilavuzu/makale-gonderme-kilavuzu> adresinden erişilebilen Yazar Katkı Formu'nu imzalamalı ve taranmış versiyonunu yazıyla birlikte göndermelidir. Yayın Kurulu'nun gönderilen bir makalede "lütuf yazarlık" olduğundan şüphelenmesi durumunda söz konusu makale değerlendirme yapılmaksızın reddedilecektir. Makale gönderimi kapsamında; sorumlu yazar makale gönderim ve değerlendirme süreçleri boyunca yazarlık ile ilgili tüm sorumluluğu kabul ettiğini bildiren kısa bir ön yazı göndermelidir.

İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi, 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. Editör, yazarlar ve hakemler ile ilgili potansiyel çıkar çatışması vakaları derginin Yayın Kurulu tarafından COPE ve ICMJE rehberleri kapsamında çözülmektedir.

Derginin Yayın Kurulu, itiraz ve şikayet vakalarını, COPE rehberleri kapsamında işleme almaktadır. Yazarlar, itiraz ve şikayetleri için doğrudan Yayıncılık Birimi ile temasa geçebilirler. İhtiyaç duyulduğunda Yayın Ku-

ru'nun kendi içinde çözemediği konular için tarafsız bir temsilci atanmaktadır. İtiraz ve şikayetler için karar verme süreçlerinde nihai kararı Baş Editör verecektir.

İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi her makalenin <http://jmed.istanbul.edu.tr/tr/content/makale-gonderme-kilavuzu/makale-gonderme-kilavuzu> adresinden erişebileceğiniz Telif 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 konuda ki yasal, mali ve cezai sorumluluk yazarlara aittir.

Dergide yayınlanan makalelerde ifade edilen görüşler ve fikirler İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi Editör, Editör Yardımcıları, Yayın Kurulu ve Yayıncısının değil, yazar(lar)ın bakış açılarını yansıtır. Editör, Editör Yardımcıları, Yayın Kurulu ve Yayıncı bu gibi durumlar için hiç bir 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, tanısallık 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://jmed.istanbul.edu.tr/tr/content/makale-gonderme-kilavuzu/makale-gonderme-kilavuzu> 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 Yayıncılık Birimi tarafından kontrol edilecek, dergi yazım kurallarına uygun hazırlanmamış makaleler teknik düzeltme talepleri ile birlikte yazarlarına geri gönderilecektir.

YAZARLARA BİLGİ

Yazarların; Telif Hakkı Devir Formu, Yazar Formu ve IC-MJE Potansiyel Çıkar Çatışmaları Formu'nu (bu form, tüm yazarlar tarafından doldurulmalıdır) ilk gönderim sırasında online makale sistemine yüklemeleri gerekmektedir. Bu formlara <http://jmed.istanbul.edu.tr/tr/content/makale-gonderme-kilavuzu/makale-gonderme-kilavuzu> adresinden erişilebilmektedir.

Kapak sayfası: Gönderilen tüm makalelerle birlikte ayrı bir kapak sayfası da gönderilmelidir. Bu sayfa;

- Makalenin Türkçe ve İngilizce başlığını ve 50 karakteri geçmeyen Türkçe ve İngilizce kısa başlığını,
- Yazarların isimlerini, kurumlarını, eğitim derecelerini ve ORCID numaralarını
- Finansal destek bilgisi ve diğer destek kaynakları hakkında detaylı bilgiyi,
- Sorumlu yazarın ismi, adresi, telefonu (cep telefonu dahil), faks numarası 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. Özgün Araştırma makalelerinin özetleri "Amaç", "Gereç ve Yöntem", "Bulgular" ve "Sonuç" alt başlıklarını içerecek biçimde hazırlanmalıdır. Olgu sunumu ve derleme türündeki yazıların Özet bölümleri alt başlık içermemelidir.

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 söz-

cükler National Library of Medicine (NLM) tarafından hazırlanan Medical Subject Headings (MeSH) veritabanından seçilmelidir.

Makale Türleri

Özgün Araştırma: Ana metin "Giriş", "Gereç ve Yöntem", "Bulgular" ve "Tartışma" alt başlıklarını içermelidir. Özgün Araştırmalarla ilgili kısıtlamalar 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 yansımış uzmanlar tarafından hazırlanmış yazılar değerlendirmeye alınır. Yazarları dergi tarafından da davet edilebilir. Bir bilgi ya da konunun klinikte kullanılması için vardığı son düzeyi anlatan, tartışan,

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 görsel
Derleme	5000	250	50	6	10 ya da toplamda 20 görsel
Olgu Sunumu	1000	200	15	Tablo yok	10 ya da toplamda 20 görsel
Editöre Mektup	500	Uygulanamaz	5	Tablo yok	Görsel yok

YAZARLARA BİLGİ

değerlendiren ve gelecekte yapılacak olan çalışmalara yön veren bir formatta hazırlanmalıdır. Ana metin "Giriş", "Klinik ve Araştırma Etkileri" ve "Sonuç" bölümlerini içermelidir. Derleme türündeki yazılarla ilgili kısıtlamalar için lütfen Tablo 1'i inceleyiniz.

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

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

Tablolar

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

Resim ve Resim Altyazıları

Resimler, grafikler ve fotoğraflar (TIFF ya da JPEG formatında) ayrı dosyalar halinde sisteme yüklenmelidir. Görseller bir Word dosyası dokümanı ya da ana doküman içerisinde sunulmamalıdır. Alt birimlere ay-

rılan 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 300 DPI 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.

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 hakemin yorumunun ardından yazarın cevabı gelmeli ve değişikliklerin yapıldığı satır numaraları da ayrıca belirtilmelidir. Revize makaleler karar mektubunu takip eden 30 gün içerisinde dergiye gönderilmelidir. Makalenin revize versiyonu belirtilen süre içerisinde yüklenmezse, revizyon seçeneği iptal olabilir. Yazarların revizyon için ek süreye ihtiyaç duymaları duru-

YAZARLARA BİLGİ

munda 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 formatta dergi web sitesinde yayına alınır. Kabul edilen makalelerin baskıya hazır PDF dosyaları sorumlu yazarlara iletilir ve yayın onaylarının 2 gün içerisinde dergiye iletilmesi istenir.

KAYNAKLAR

Atıf yapılırken en son ve en güncel yayınlar tercih edilmelidir. Atıf yapılan erken çevrimiçi makalelerin DOI numaraları mutlaka sağlanmalıdır. Kaynakların doğruluğundan 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 Arap rakamları kullanılmalıdır. Farklı yayın türleri için kaynak stilleri aşağıdaki örneklerde sunulmuştur:

Dergi makalesi: Blasco V, Colavolpe JC, Antonini F, Zieleskiewicz L, Nafati C, Albanèse J, et al. Long-term outcome in kidney recipients from donors treated with hydroxyethylstarch 130/0.4 and hydroxyethylstarch 200/0.6. *Br J Anaesth* 2015;115(5):797-8.

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

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

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

Toplantıda sunulan yazı: Bengissson S. Sothemin BG. Enforcement of data protection, privacy and se-

curity in medical informatics. In: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoff O, editors. *MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics*; 1992 Sept 6-10; Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992.p.1561-5.

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

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

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

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

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

SON KONTROL LİSTESİ

- Editöre mektup
 - Makalenin türü
 - Başka bir dergiye gönderilmemiş olduğu bilgisi
 - Sponsor veya ticari bir firma ile ilişkisi (varsa belirtiniz)
 - İstatistik kontrolünün yapıldığı (araştırma makaleleri için)
 - İngilizce yönünden kontrolünün yapıldığı
 - Yazarlara Bilgide detaylı olarak anlatılan dergi politikalarının gözden geçirildiği
 - Kaynakların NLM referans sistemine göre belirtildiği



YAZARLARA BİLGİ

- Telif Hakkı Devir Formu
- Yazar Formu
- Daha önce basılmış materyal (yazı-resim-tablo) kullanılmış ise izin belgesi
- İnsan ögesi bulunan çalışmalarda "gereç ve yöntem" bölümünde Helsinki Deklarasyonu prensiplerine uygunluk, kendi kurumlarından alınan etik kurul onayının ve hastalardan "bilgilendirilmiş olur (rıza)" alındığının belirtilmesi
- Hayvan ögesi kullanılmış ise "gereç ve yöntem" bölümünde "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" prensiplerine uygunluğunun belirtilmesi
- Makale kapak sayfası
 - Makalenin kategorisi
 - Makalenin Türkçe ve İngilizce başlığı
 - Makalenin Türkçe ve İngilizce kısa başlığı
 - Yazarların ismi soyadı, unvanları ve bağlı oldukları kurumlar (üniversite ve fakülte bilgisinden sonra şehir ve ülke bilgisi de yer almalıdır), e-posta adresleri
 - Sorumlu yazarın e-posta adresi, açık yazışma adresi, iş telefonu, GSM, faks nosu
 - Tüm yazarların ORCID'leri
- Makale ana metni dosyasında olması gerekenler
 - Makalenin Türkçe ve İngilizce başlığı
 - Özetler 250 kelime Türkçe ve 250 kelime İngilizce, (olgu sunumunda 200 kelime Türkçe ve 200 kelime İngilizce)
 - Anahtar Kelimeler: 3-6 Türkçe ve 3-6 İngilizce
 - Makale ana metin bölümleri
 - Kaynaklar
 - Teşekkür (varsa belirtiniz)
 - Tablolar-Resimler, Şekiller (başlık, tanım ve alt yazılıyla)

Editör: M. Lale Öcal

Adres: İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi
Dekanlığı, Turgut Özal Cad. 34093 Çapa, Fatih,
İstanbul, Türkiye

Telefon: +90 212 414 21 61

E-mail: itfdergisi@istanbul.edu.tr

Yayıncı: İstanbul Üniversitesi Yayınevi

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

Tel.: +90 212 440 00 00

Faks: +90 212 217 22 92



INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Journal of İstanbul Faculty of Medicine (J Ist Faculty Med) 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 Faculty of Medicine of İstanbul University and it is published quarterly on March, June, September and December. The publication languages of the journal are Turkish and English.

Journal of İstanbul Faculty of Medicine (J Ist Faculty Med) aims to contribute to the literature by publishing manuscripts at the highest scientific level on all fields of medicine. The journal publishes original experimental and clinical research articles, reports of rare cases, reviews that contain sufficient amount of source data conveying the experiences of experts in a particular field, and letters to the editors as well as brief reports on a recently established method or technique or preliminary results of original studies related to all disciplines of medicine from all countries.

EDITORIAL POLICIES AND PEER REVIEW PROCESS

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

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

with detailed information on the organization, including the name, date, and location of the organization.

Manuscripts submitted to Journal of İstanbul Faculty of Medicine 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 detailed explanation of the procedures that they may undergo. For studies carried out on animals, the measures taken to prevent pain and suffering of the animals should be stated clearly. Information on patient consent, the name of the ethics committee, and the ethics committee approval number should also be stated in the Materials and Methods section of the manuscript. It is the authors' responsibility to carefully protect the patients' anonymity. For photographs that may reveal the identity of the patients, signed releases of the patient or of their legal representative should be enclosed.

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.



INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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.

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

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

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

Journal of İstanbul Faculty of Medicine requires each submission to be accompanied by a Copyright Transfer Form (available for download at <http://jmed.istanbul.edu.tr/en/content/manuscript-submission-guide/manuscript-submission-guide>). When using previously published content, including figures, tables, or any other material in both print and electronic formats, authors must obtain permission from the copyright holder. Legal, financial and criminal liabilities in this regard belong to the author(s).

Statements or opinions expressed in the manuscripts published in Journal of İstanbul Faculty of Medicine 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.

INSTRUCTIONS TO 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://jmed.istanbul.edu.tr/en/content/manuscript-submission-guide/manuscript-submission-guide> 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 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://jmed.istanbul.edu.tr/en/content/manuscript-submission-guide/manuscript-submission-guide>

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

- The full title of the manuscript as well as a short title (running head) of no more than 50 characters,

- Name(s), affiliations, highest academic degree(s) and ORCID ID(s) of the author(s),
- Grant information and detailed information on the other sources of support,
- Name, address, telephone (including the mobile phone number) and fax numbers, and email address of the corresponding author,
- Acknowledgment of the individuals who contributed to the preparation of the manuscript but who do not fulfil the authorship criteria.

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

Keywords: Each submission must be accompanied by a minimum of three to a maximum of six keywords for subject indexing at the end of the abstract. The keywords should be listed in full without abbreviations. The keywords should be selected from the National Library of Medicine, Medical Subject Headings database (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>).

Manuscript Types

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

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

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

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

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

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

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

Tables

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

Figures and Figure Legends

Figures, graphics, and photographs should be submitted as separate files (in TIFF or JPEG format)

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
Technical Note	1500	No abstract	15	No tables	10 or total of 20 images
Letter to the Editor	500	No abstract	5	No tables	No media

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

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

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

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

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

REVISIONS

When submitting a revised version of a paper, the author 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.

REFERENCES

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

Journal Article: Blasco V, Colavolpe JC, Antonini F, Zieleskiewicz L, Nafati C, Albanèse J, et al. Long-term outcome in kidney recipients from donor treated with hydroxyethylstarch 130/0.4 and hydroxyethylstarch 200/0.6. *Br J Anaesth* 2015;115(5):797-8.

Book Section: Suh KN, Keystone JS. Malaria and babesiosis. Gorbach SL, Barlett JG, Blacklow NR,

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

editors. Infectious Diseases. Philadelphia: Lippincott Williams; 2004.p.2290-308.

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

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

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

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

Thesis: Yılmaz B. Ankara Üniversitesindeki Öğrencilerin Beslenme Durumları, Fiziksel Aktivitelerine Beden Kitle İndeksleri Kan Lipidleri Arasındaki İlişkiler. H.Ü. SağlıkBilimleriEnstitüsü, DoktoraTezi. 2007.

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

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

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

SUBMISSION CHECKLIST

- Cover letter to the editor
 - The category of the manuscript
 - Confirming that "the paper is not under consideration for publication in another journal".
 - Including disclosure of any commercial or financial involvement.
 - Confirming that the statistical design of the research article is reviewed.
 - Confirming that last control for fluent English was done.
 - Confirming that journal policies detailed in Information for Authors have been reviewed.
 - Confirming that the references cited in the text and listed in the references section are in line with NLM.
- Copyright Transfer Form
- Author Form
- Permission of previous published material if used in the present manuscript
 - Acknowledgement of the study "in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional and national) and with the Helsinki Declaration.
 - Statement that informed consent was obtained after the procedure(s) had been fully explained. Indicating whether the institutional and national guide for the care and use of laboratory animals was followed as in "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals".
- Title page
 - The category of the manuscript
 - The title of the manuscript both in Turkish and in English
 - Short title (running head) both in Turkish and in English
 - All authors' names and affiliations (institution, faculty/department, city, country), e-mail addresses
 - Corresponding author's email address, full postal address, telephone and fax number
 - ORCIDs of all authors.



İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

- Main Manuscript Document
 - The title of the manuscript both in Turkish and in English
 - Abstracts both in Turkish and in English (250 words). (Case report's abstract limit is 200 words)
 - Key words: 3 - 6 words both in Turkish and in English
 - Main article sections
 - References
 - Acknowledgement (if exists)
 - All tables, illustrations (figures) (including title, description, footnotes)

Editor: M. Lale Öcal
Address: İstanbul University, İstanbul Faculty of
Medicine Deanery, Turgut Özal Cad. 34093, Çapa,
Fatih, İstanbul, Turkey
Phone: +90 212 414 21 61
E-mail: itfdergisi@istanbul.edu.tr

Publisher: İstanbul University Press
Address: İstanbul Üniversitesi Merkez Kampüsü,
34452 Beyazıt, Fatih / İstanbul - Turkey
Phone: +90 212 440 00 00

İÇİNDEKİLER / CONTENTS

ARAŞTIRMA / RESEARCH

- 69** İntraduktal Papillom Olgularının Cerrahi Sonrası Değerlendirilmesi; Radyolojik ve Patolojik Bulguların Korelasyonu
The Assessment of Cases with Intraductal Papillomas after Surgery; The Correlation of Radiological and Pathological Findings
Muhammet Ferhat ÇELİK, Ravza YILMAZ, Ahmet Cem DURAL, Fatma ÇELİK YABUL, Halil Fırat BAYTEKİN, Selin KAPAN, Halil ALIŞ
- 75** Sağ Atriuma Uzanım Gösteren Renal Tümörlerde İnfrarenal Vena Kava İnfierior Kanulasyonu – Hipotermik Dolaşım Durdurulmasını Engelleyen Yöntem
Infrarenal Inferior Vena Cava Cannulation during the Resection of Renal Tumors Extending into the Right Heart – No Need for Hypothermic Total Circulatory Arrest
Murat UĞURLUCAN, Didem Melis ÖZTAŞ, Selçuk ERDEM, Feza EKİZ, Zerrin SUNGUR, Başak ERGİNEL, Öner ŞANLI, Faruk ÖZCAN, Ali Haluk ANDER, İsmet NANE, Ufuk ALPAGUT
- 81** Genç Erişkin Hemodiyaliz Hastalarında Kırılgnlık ve Kognitif Bozukluk arasındaki İlişki
The Relationship between Frailty and Cognitive Impairment in Young Adult Hemodialysis Patients
Ertuğrul ERKEN, Gülsüm AKKUŞ, Fatma Betül GÜZEL, Neziha ULUSOYLAR, Orçun ALTINÖREN, Özkan GÜNGÖR
- 89** İki Farklı Meme Kanseri Hücre Hattında Floresan İşaretli Maackia Amurensis-Lektin-1 ve Wheat Germ Agglutin'in Hücre Yüzey Glikan Profillerindeki Farklı Etkileri
Effects of Fluorescent Marked Maackia Amurensis-Lectin-1 and Wheat Germ Agglutin on the Cell Surface Glycan Profiles in Two Different Breast Cancer Cell Lines
Günnur DEMİRCAN, Yosun MATER
- 96** İnsan Periferik Kanından Çok Küçük Embriyonik (VSEL) Kök Hücrelerin Elde Edilmesi ve Tanımlanması
Characterization and Isolation of Very Small Embryonic-Like (VSEL) Stem Cells Obtained from Human Peripheral Blood
Serap ERDEM KURUCA, Dolay Damla ÇELİK, Gülderen DEMİREL, Dilşad ÖZERKAN
- 107** Sıçanlarda PTZ-Kaynaklı Nöbetlerde Eritropoietinin Hipokampus ve Frontal Kortekste Nitrik Oksit Sentaz Türleri üzerine Etkileri
Effects of Erythropoietin on Nitric Oxide Synthase Types in the Hippocampus and Frontal Cortex in PTZ-Induced Seizures in Rats
Ayşegül KAPUCU
- 116** Sendromik ve Non-Sendromik Kraniosinostoz Olgularında FGFR1-3, TWIST1, MSX2, POR, FREM1 ve RAB23 Genlerinin Moleküler Analizi
Molecular Analysis of FGFR1-3, TWIST1, MSX2, POR, FREM1 and RAB23 Genes in Syndromic and Non-Syndromic Craniosynostosis Cases
Volkan KARAMAN, Güven TOKSOY, Birsen KARAMAN, Hülya KAYSERİLİ KARABEY, Seher BAŞARAN, Umut ALTUNOĞLU, Şahin AVCI, Zehra Oya UYGUNER

OLGU SUNUMU / CASE REPORT

- 123** Fetal Brain Shrinkage: A Rare, Mystifying Anomaly
Fetal Beyin Büzüşmesi: Nadir, İlgi Çekici bir Anomali
Gürcan TÜRKYILMAZ, Şahin AVCI, Umut ALTUNOĞLU, Emircan ERTÜRK, Melis CANTÜRK, Tuğba SİVRİKOZ, İbrahim KALELİOĞLU, Recep HAS, Atıl YÜKSEL

İNTRADUKTAL PAPİLLOM OLGULARININ CERRAHİ SONRASI DEĞERLENDİRİLMESİ; RADYOLOJİK VE PATOLOJİK BULGULARIN KORELASYONU

THE ASSESSMENT OF CASES WITH INTRADUCTAL PAPILLOMAS AFTER SURGERY; THE CORRELATION OF RADIOLOGICAL AND PATHOLOGICAL FINDINGS

Muhammet Ferhat ÇELİK¹ , Ravza YILMAZ² , Ahmet Cem DURAL³ , Fatma ÇELİK YABUL⁴ , Halil Fırat BAYTEKİN⁵ , Selin KAPAN⁶ , Halil ALIŞ⁶ 

¹Özel Yedikule Surp Pirgiç Ermeni Hastanesi, Genel Cerrahi Kliniği, İstanbul, Türkiye

²İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Radyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, ³Genel Cerrahi Kliniği,

⁴Radyoloji Kliniği, ⁵Patoloji Kliniği, İstanbul, Türkiye

⁶Aydın Üniversitesi, VM Medical Park Florya Hastanesi, Genel Cerrahi Kliniği, İstanbul, Türkiye

ORCID IDs of the authors: M.F.Ç. 0000-0002-3697-0418; R.Y. 0000-0001-8661-6751; A.C.D. 0000-0003-3479-725X; F.Ç.Y. 0000-0002-0156-0056; H.F.B. 0000-0002-7086-4758; S.K. 0000-0001-9339-4894; H.A. 0000-0002-8008-2776

Cite this article as: Celik MF, Yilmaz R, Dural AC, Celik-Yabul F, Baytekin HF, Kapan S, Alis H. The assessment of cases with intraductal papillomas after surgery; the correlation of radiological and pathological findings. J Ist Faculty Med 2019;82(2):69-74. doi: 10.26650/2018.0029

ÖZET

Amaç: İntraduktal lezyon ön tanısıyla biyopsi yapılan olguların radyolojik ve patolojik bulgularının değerlendirilmesini, ayrıca postoperatif intraduktal papillom (İDP) tanısı alan olguların cerrahi gereksiniminin tartışılmasını amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Kliniğimizde 2012-2014 arasında intraduktal papiller lezyon tanısıyla biyopsi yapılan hastalar retrospektif değerlendirildi. Çalışmaya dahil edilen hastalar ultrason (US), endikasyon varlığında mamografi (MMG) veya manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ile değerlendirildi. Hastalara tru-cut biyopsi veya ince iğne aspirasyon biyopsisi (İİAB) uygulandı. Cerrahi eksizeyon planlamasında; atipi, radyoloji-patoloji uyumsuzluğu, risk faktörü ve hasta isteği göz önüne alındı.

Bulgular: Çalışmaya 73 hasta dahil edildi, 59'u ≥40 yaş idi. Hastaların tümüne ultrasonografi, ≥40 yaş 59 hastaya MMG yapıldı, 8 hastaya MRG yapıldı. İİAB yapılan 11 hastadan birinde İDP, tru-cut biyopsi yapılan 40 hastanın 10'unda İDP saptandı. Eksizeyon yapılan 22 hastadan 3'ü histopatolojik olarak malign, 5'i pre-invaziv veya pre-neoplastik olarak değerlendirildi.

Sonuç: Tru-cut biyopsi veya İİAB sonrası benign papiller lezyonların yönetiminde hangi hastalara eksizeyon uygulanacağına dair konsensus bulunmamaktadır. Atipili papiller lezyonların karsi-

ABSTRACT

Objective: The aims of this study were firstly to evaluate the radiology and histopathology findings of patients diagnosed with intraductal lesions and who had undergone biopsies. The second objective was to investigate the surgery requirements in those cases diagnosed with intraductal papilloma (IDP) post operatively.

Material and Methods: Patients diagnosed with intraductal papillary lesions and who then underwent biopsy were retrospectively reviewed. An ultrasound (US) was performed on all patients, if required; a mammography (MMG) and Magnetic resonance imaging (MRI) was also performed on patients. A Tru-cut biopsy or fine needle aspiration biopsy (FNAB) was performed on patients. Atypia, any discordance between the radiology and pathology findings, risk factors and patient requests were taken into account for deciding on surgical excision.

Results: Of the seventy-three patients included in the study, 59 of them were ≥40 years. An ultrasound was performed on all patients, an MMG was performed on the 59 patients ≥40 years, and an MRI was performed on 8 patients. FNAB was performed on 11 patients, IDP was diagnosed in one of them, a tru-cut biopsy was performed on 40 patients and 10 of them were diagnosed

İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: cemdural@hotmail.com

Geliş tarihi/Received Date: 12.11.2018 • **Kabul tarihi/Accepted Date:** 18.02.2019

©Telif Hakkı 2019 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2019 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

nom riski ile ilişkili olduğu kabul edilmekte ve cerrahi eksizyon planlanmaktadır. Yayınlanan son çalışmalarda, hastaların beşte birinde tanıl sınıflamanın yukarı doğru (upgrade) değiştiği ve tedavi yaklaşımının da cerrahi lehine değiştiği gösterilmiştir. Serimizde, literatüre benzer şekilde, upgrade oranı %10,9'dur. Papiller lezyon tanılı hastalarda radyolojik görüntüleme iyi değerlendirilmelidir, radyoloji-patoloji uyumsuzluğunda total eksizyon yapılması önerilebilir.

Anahtar Kelimeler: Benign papiller lezyon, İntraduktal papillom, tru-cut biyopsi, ince iğne aspirasyon biyopsisi

with IDP. Three lesions were histopathologically malignant and 5 lesions were pre-invasive or pre-neoplastic in 22 of the patients who underwent surgical resection.

Conclusion: There is still no consensus on the management of patients diagnosed with benign papillary lesions after Tru-cut biopsy or FNAB. Lesions with atypia usually underwent surgical resection due to their malignant potential. Recent studies showed an upgrade in one-fifth of the patients' histopathological results and the treatment strategy was shifted in favor of surgery. In our series, the upgrade rate was 10.9 % which is similar to the literature. Imaging studies in patients diagnosed with papillary lesions should be evaluated carefully, and in the case of discordance between radiology and histopathology, total excision should be considered.

Keywords: Benign papillary lesion, Intraductal papilloma, tru-cut biopsy, fine needle aspiration biopsy

GİRİŞ

Memenin papiller lezyonları nadirdir ve tru-cut biyopsilerde görülme oranı yaklaşık %6 kadardır (1). Meme kanseri taramalarının yaygınlaşması sayesinde, papiller lezyonların çoğunluğu artık asemptomatik kitleler veya kalsifikasyon olarak ultrasonografi veya mamografi ile tespit edilebilmektedir. Papiller lezyonlar benign veya malign olarak kategorize edilirler. Buna rağmen atipili veya malign papillomlardan benign bir papillomu ayırt edici belirli bir radyolojik özellik yoktur (1, 2).

Benign papiller lezyonlar; soliter intraduktal papillom (İDP), multipl İDP ve papillom içerisinde atipik duktal hiperplaziyi (ADH) içerir. Malign papiller lezyonlar ise; papillomdan gelişen in-situ duktal karsinom (DCIS), papiller DCIS, intrakistik veya kapsüllü papiller karsinom, solid papiller karsinom, intrakistik papiller karsinomdan gelişen invaziv papiller karsinom ve invaziv papiller karsinomları içerir (2).

İntraduktal papillomlar etrafı epitel ve myoepitel hücre tabakası ile çevrili parmaklı fibrovasküler çekirdeklerden oluşan benign lezyonlardır (3). Apokrin değişiklikler sıklıkla bu lezyonlara eşlik eder. Atipi, periferik papillomlarda santral papillomlara göre daha sık görülür (4).

Intraduktal papillomlar genellikle menopoz öncesi kadınlarda görülür ve majör duktustan köken alır. Sıklıkla boyutu 0,5 cm'in altındadır ama 5 cm'ye kadar da ulaşabilir. En sık başvuru şikayeti seröz veya kanlı meme başı akıntısıdır. Hastalarda genellikle palpasyon bulgusu saptanmaz (5). Makroskopik olarak sıklıkla santral yerleşimli olup pembemsi renkte, frajil ve kaynaklandığı kanalın duvarına bir sap ile bağlı halde bulunur (4, 5).

Soliter İDP'lar sıklıkla 40-55 yaşları arasında görülür. Nadiren malign transformasyona uğrar; atipi ile birlikte olmadığında sürece meme kanseri gelişme riskini arttırmaz.

Bilateral görülme oranı ise oldukça azdır. Buna rağmen multipl İDP'lar (papillomatosis) daha genç yaşlarda ortaya çıkar, meme başı akıntısı ile daha az ilişkilidir ve malign dönüşüm riski daha fazladır (5).

Benign papiller neoplaziler, meme biyopsilerinin %1-5'ini ve tüm meme lezyonlarının da %10'undan azını oluşturmaktadır. Patolojik meme başı akıntılarının %40-70'ini papiller neoplaziler oluştururken papillom tanısı alan hastaların ancak yarısına yakınında kanlı veya patolojik akıntı görülmektedir. Papiller karsinomlar nadir olarak görülür ve tüm meme malignitelerinin %1 ila %2'sini oluşturur. Sıklıkla menopoz sonrası grupta görülür, ele gelen kitle ve meme başı akıntısı şikayeti bulunur (2). Lezyonların tam olarak çıkarılması, tanıl olduğu kadar tedavi açısından da anlam taşımaktadır (4).

Mamografi (MMG) 40 yaş üstü hastalarda rutin tarama için kullanılır. Ultrasonografi (US) ise kırk yaş altı hastaların değerlendirmesinde ilk tercih edilmesi gereken görüntüleme yöntemidir. Mamografiye tamamlayıcı olarak yoğun meme parankimine sahip veya semptomatik kadınlarda sonografik inceleme mutlaka yapılmalıdır. Mamografi ve US birbirlerini tamamlayıcı görüntüleme yöntemleri olup uygun endikasyonlarda bir arada kullanılmalıdır (6).

Soliter İDP'lar mamografide sıklıkla parankimal yapılar- dan ayırt edilemeyebilirler, yuvarlak veya oval, iyi sınırlı retroareolar kitle olarak görülürler. Multipl papillomlar genellikle periferik yerleşimli ve bilateraldir, mikrokalsifikasyonlar eşlik edebilirler. Karakteristik US bulgusu dilate duktus içerisinde solid mural nodüldür (2, 6). Doppler incelemede mural nodül içerisinde sıklıkla vaskülarizasyon mevcuttur. Duktal dilatasyon eşlik etmediği zaman tanı koymak zordur ve görüntüleme özelliklerine göre değişmekle birlikte fibroadenom veya meme kanseri ile karışabilir. Papiller lezyonlarda kistik komponent (mikst görünüm) ve arka plan güçlenmesi sık olarak görülür (6).

Duktografi özellikle tek duktus kanalından çıkan kanlı akıntı şikayeti olan olgularda değerli bir tanı yöntemidir. Radyolojik olarak İDP'lar kontrast madde ile çevrili dolmuş defekti, duktal dilatasyon, duktus duvarında düzensizlik ve distorsiyon şeklinde görülürler. Ancak duktografi duyarlılık ve özgüllüğünün düşük olması, invaziv bir görüntüleme yöntemi olması nedeniyle birçok merkezde rutin olarak kullanılmamaktadır (2, 4). Duktoskopi ise, meme başındaki kanal ağzından milimetrik fiberoptik endoskoplarla girilerek, süt kanallarının direkt incelenmesini sağlayan bir tekniktir (7). Duktal lavaj ve lezyonun eksizyonu gibi avantajları da içerir. Dezavantajı periferik yerleşimli ve derin lezyonlarda incelemenin güç olmasıdır (4).

Meme kanserinde Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) duyarlılığı en yüksek görüntüleme yöntemi olup birçok çalışmada %90'ın üzerindedir (8-10). Papillom tespitinde ise MRG bulguları çeşitlilik gösterse bile diğer görüntüleme yöntemlerinden daha duyarlıdır (11).

Tru-cut biyopside atipi ve malignite tanısı konulan papiller lezyonlar için cerrahi gerekliliği kabul görmüştür. Bununla beraber, çoğu yazar tru-cut biyopside benign saptanan papiller lezyonlar için yakın takip önerirken, cerrahiye savunan gruplar da mevcuttur (12).

Benign ve malign papiller lezyon ayırımı spesifik radyolojik ve histolojik bulgular yokluğunda zordur, cerrahi eksizyon gerekmektedir (13).

Çalışmamızda kliniğimiz meme hastalıkları polikliniğine 2012-2014 yılları başvuran ve intraduktal patoloji ön tanısıyla biyopsi yapılan olguların radyolojik ve patolojik bulgularının retrospektif olarak değerlendirilmesi ve postoperatif İDP tanısı alan olguların cerrahi gereksiniminin tartışılmasını amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Kliniğimiz meme hastalıkları polikliniğine 2012-2014 tarihleri arasında başvurup intraduktal papiller lezyon ön tanısıyla biyopsi yapılan hastalar retrospektif olarak değerlendirildi. İleri inceleme veya eksizyon önerisini kabul etmeyen hastalar değerlendirme dışı bırakıldı (n=7). Çalışmaya dahil edilen hastaların tümüne US, 40 yaş üzeri hastaların tümüne MMG ile görüntüleme yapıldı. Papiller lezyonlarda maligniteyi düşündüren bulguları (sınırları belirsiz, heterojen iç yapıda, hipoekoik, papiller projeksiyonu bulunan kompleks kistik lezyon, duktus içi düzensiz şekilli kitle, mammografide amorf/pleomorfik kalsifikasyon eşlik etmesi, multilobule veya spiküle kontur, patolojik meme başı akıntısı) ve lezyonun yaygınlığından şüphelenilen olgularda ek olarak MRG yapıldı.

Tüm hastalara standardizasyon açısından aynı radyologlar tarafından US, tru-cut biyopsi ve ince iğne aspirasyon biyopsisi (İİAB) uygulandı. Kistik yapısı olan lezyonlara İİAB,

solid yapısı olan lezyonlara tru-cut biyopsi uygulandı. Tru-cut biyopsiler US altında 14 Gauge iğne ile yapıldı. Patolojik örnekler formol ile fikse edilerek incelemeye gönderildi. Cerrahi eksizyon kararı; atipi, radyoloji ve patoloji uyumsuzluğu, risk faktörü ve hasta isteği göz önüne alınarak uygulandı. Cerrahi eksizyon da yine standardizasyon amaçlı aynı cerrahlar tarafından uygulandı.

Yazılı hasta onamı bu çalışmaya katılan tüm hastalardan alındı. Hasta kayıtları, anonimize edilip retrospektif olarak incelendiğinden etik kurul başvurusu yapılmadı. Ancak, çalışma bilimsel ilkelere uygun, güncel literatür bilgisi ile çatışmayacak biçimde tasarlanmış olup, çalışmaya katılan hastaların bilgilendirilmesi, çalışmanın yürütülmesi ve elde edilen kişisel bilgilerin anonimize edilerek işlenmesi, verilerin değerlendirilmesi Dünya Tabipleri Birliği Helsinki Bildirgesi'ne (Ekim 2013 – 7. Revizyonu) Bilimsel Gereklilikler ve Araştırma Protokolleri maddesinin kalan şartlarına uygun olarak gerçekleştirildi. Çalışmamız orijinal araştırma makalesi STROBE kılavuzuna uygun olarak hazırlanmıştır.

İstatistiksel Analiz

Çalışmada yer alan hastalara ait tüm veriler Excel 2007 programı (Microsoft Office®, USA) ile elektronik ortamda kaydedildi. İstatistiksel analiz için SPSS (Statistical Package for the Social Sciences for Windows), versiyon 22,0 (IBM Corp. Armonk, NY) programı kullanıldı. Sayısal veriler rakam ve yüzde ile ifade edildi. Parametrik tanımlamalar ortanca (aralık) olarak ifade edildi.

BULGULAR

Seksen hastanın 7'si önerilen tedaviyi kabul etmediğinden dolayı çalışmaya dahil edilmedi. Çalışmaya dahil edilen hastaların (n=73) ortanca yaşı 48 (30-76) idi. Hastaların %80,1'i (n=59) 40 yaş ve üstünde idi. Hastaların %16,4'ünde (n=12) semptom mevcut olup %83,6'sında (n=61) rutin tarama sırasında radyolojik olarak lezyon tespit edildi. Hastaların %12,3'ünde (n=9) akıntı şikayeti olup

Tablo 1. Hastaların demografik verileri

Parametre	Değer
Ortanca yaş (yıl-aralık)	48 (30-76)
Yaş dağılımı (n, %)	
<40	14 (%19)
≥40	59 (%81)
Semptom (n, %)	
Asemptomatik	61 (%84)
Meme başı akıntısı	9 (%12)
Mastodini	3 (%4)
Taraf (n, %)	
Sağ	39 (%53)
Sol	33 (%45)
Bilateral	1 (%2)

bunların 5'inde kanlı vasıfta idi. Üç hastada sadece mastodini şikayeti mevcuttu. Bir hastanın özgeçmişinde karşı memede (sağ) kanser hikayesi nedeniyle ameliyat öyküsü vardı (Tablo 1).

Yetmiş üç hastanın tümüne US, 40 yaş altı 2 hastaya MRG, 40 yaş üstündeki 59 hastaya MMG ve ek olarak 6 olguya MRG yapıldı. Hastaların 33'üne sol, 39'una sağ memeden biyopsi yapıldı. Bir hastaya ise 1 yıl arayla önce sağ sonra sol memeden biyopsi yapıldı. Kırk hastaya sadece tru-cut biyopsi, 11 hastaya sadece İİAB uygulandı ve daha ileri bir incelemeye gerek duyulmadı. İnce iğne aspirasyon biyopsisi yapılan 11 hastanın; 1'inde intraduktal papillom, 10'unda diğer benign lezyonlar (fibroadenom, sklerozan adenozis, mastit, fibrokistik değişiklik vb.) saptandı. Tru-cut biyopsi yapılan 40 hastanın 10'unda intraduktal papil-

lom, 30'unda diğer benign lezyonlar saptandı. Beş hastaya ise direkt olarak eksizyonel biyopsi uygulandı.

Tru-cut biyopsi yapılan hastaların 13'üne eksizyon, 3'üne mastektomi gerekirken, İİAB sonrası bir hastaya eksizyon uygulandı (Tablo 2). Eksizyon yapılan 22 hastadan 3'ü malign (1 intrakistik papiller karsinom, 1 invaziv papiller karsinom, 1 invaziv duktal karsinom) 5'i pre-invaziv veya pre-neoplastik (3 düşük dereceli duktal karsinoma in-situ, 1 atipik duktal hiperplazi, 1 atipili kolumnar hücreli hiperplazi) olarak değerlendirildi. Buna göre, tru-cut biyopsi veya İİAB'de papiller neoplazi ön tanısıyla değerlendirilen 6 hastanın 2'sinde, benign lezyon olarak değerlendirilen hastaların 6'sında piyesin histopatolojik incelemesinde tanıl sınıflamada yukarı doğru değişme (upgrade) (%10,9) olduğu gözlemlendi (Tablo 2).

Tablo 2. Eksizyon yapılan hastalarda biyopsi ve histopatoloji sonuçlarının karşılaştırılması

Olgu	Yaş	Şikayet	Taraf	Biyopsi türü	Biyopsi sonucu	Eksizyon sonrası histopatolojik sonuç
1*	50	Akıntı	Sağ	Tru-Cut	İDP†	İntrakistik papiller karsinom
2*	30	Yok	Sağ	Tru-Cut	İDP	Atipili kolumnar hücreli hiperplazi
3	63	Yok	Sağ	Tru-Cut	Papiller neoplazi	Multifokal invaziv papiller karsinom
4*	70	Yok	Sol	Tru-Cut	Papiller neoplazi	Low Grade DCIS‡
5*	76	Kanlı akıntı	Sol	Tru-Cut	Papiller neoplazi	Low Grade DCIS - Atipik İDP
6	57	Yok	Sol	Tru-Cut	Papiller neoplazi	İntraduktal papillomatosis, Apokrin metaplazi
7	55	Yok	Sol	Tru-Cut	Papiller neoplazi	İDP
8	69	Yok	Sağ	Tru-Cut	Papiller neoplazi	İDP
9*	67	Yok	Sağ	Tru-Cut	Duktal epitel hiperplazisi	Low Grade DCIS ve papillomatosis
10**	44	Yok	Sağ	İİAB§	İntraduktal neoplazi ve mastit	İnvaziv Duktal Karsinom
11*	46	Opere sağ meme karsinomu	Sol	Tru-Cut	Non-diagnostik	Atipik İDP
12	54	Yok	Sol	Tru-Cut	İDP	İDP
13	42	Yok	Sol	Tru-Cut	İDP	İDP
14	33	Kanlı akıntı	Sağ	Tru-Cut	İDP	İDP
15*	40	Kanlı akıntı	Sol	Tru-Cut	Papiller epitelyal hiperplazi	İDP
16*	35	Yok	Sağ	İİAB	Benign	İDP
17	59	Kanlı akıntı	Sağ	Tru-Cut	İDP	İDP

*Histopatolojik değerlendirmede biyopsiye göre tanıl upgrade olan hastalar

†İDP: İntraduktal Papillom,

‡DCIS: İn-situ Duktal Karsinom

**Bu hastaya ilk önce ince iğne aspirasyon biyopsisi, ardından Tru-Cut biyopsi yapılmıştır.

§İİAB: İnce iğne aspirasyon biyopsisi

TARTIŞMA VE SONUÇ

Eksizyonel biyopsi oranını büyük ölçüde azaltmasına rağmen, tru-cut biyopsi veya İİAB sonrası benign papiller lezyonların yönetiminde hangi hastalara eksizyon uygulanacağına dair standart bir tedavi yaklaşımı bulunmamaktadır. Tru-cut biyopsi veya İİAB ile tanı alan olguların önemli bir kısmının cerrahi eksizyon sonrası in-situ veya invaziv kansere upgrade olması nedeniyle eksizyonel biyopsi tavsiye edilmektedir (14). Geçmişte yapılan çalışmalar, tru-cut biyopsi sonrası tanı konulan atipi içermeyen benign papillomların eksizyonu sonrası malignite riskinde artış açısından farklı sonuçlar vermiştir (1).

Günümüzde genel kanı atipili papiller lezyonların karsinom riski ile ilişkili olduğu ve cerrahi eksizyon gerektirdiği yönündedir. Buna rağmen bazı yazarlar atipisiz papiller lezyonların radyoloji ve patolojik bulgular korele ise güvenle takip edilebileceğini öne sürdükleri gibi, kimi yazarlar da tüm lezyonların benign olup olmasına bakılmaksızın maligniteyi ekarte etmek için mutlaka çıkarılması gerektiğini savunmaktadır (1, 14). Bununla birlikte bazı yazarlar ise sadece atipi görülen lezyonların çıkarılmasını önermektedir (15, 16). Bu konudaki endişenin bir sebebi de biyopsi örneğinde atipi alanları veya karsinom odağının gözden kaçabilmesi olasılığıdır. Yayımlanan son çalışmalarda, hastaların beşte birinde upgrade saptandığı ve bu nedenle tedavi yaklaşımının da cerrahi lehine değiştiği gösterilmiştir (17).

Rizzo ve ark.'nın (18) atipisiz İDP içeren serisinde yaklaşık %25'lik bir upstage oranı bildirmesine rağmen Jaffer ve ark. (19) yaklaşık benzer hasta serisinde %16,4 oranında cerrahi eksizyon sonrası atipi veya malignite bulgusuna rastlamışlardır. Bizim çalışmamızda, literatüre benzer şekilde, %10,9 oranında tanısız upgrade saptandı (14, 17). Fakat upgrade görülen hastaların çoğunluğu tru-cut biyopsi ve İİAB sonrası benign lezyonlar olarak değerlendirilen hastalardı (10 hastanın 6'sı, %60). Postoperatif İDP tanısı alan olguların 3'ünde papiller neoplazi ön tanısı, 6'sında İDP veya benign lezyon ön tanısı rapor edildi.

Literatürdeki çeşitli çalışmalarda ileri yaş, postmenopozal durum, görüntüleme kompleks kistik ekopatren, periferik yerleşim, mikrokalsifikasyonlar, lezyonun büyük olması, patoloji-radyoloji uyumsuzluğu, yüksek Breast Imaging Reporting and Data Systems (BI-RADS) skoru ve meme başı akıntısı ile malignite arasında ilişki olduğu tespit edilmiştir (1). Çalışmamızda tanısız upgrade gözlenen 5 hastanın 4'ü 45 yaş ve üzerinde idi.

İntraduktal papillomlarda en sık başvuru şikayeti seröz veya kanlı meme başı akıntısıdır (5). Fakat çoğu hasta asemptomatiktir ve rutin incelemelerde patolojik radyolojik bulgular sonrası tanı alır (14). Çalışmamızda toplam 9 hastanın 5'i kanlı akıntı şikayetiyle başvururken bu hastaların sadece bir tanesinde malignite saptandı.

Birçok çalışma MMG'nin benign ve atipik papiller lezyon ayırımında güvenilir olmadığını bildirmiştir (20-22). McGhan (14) ve ark.'ı %89 oranında hastada biyopsi öncesi patolojik mamografi bulgusu olarak dansite artışı veya kitle saptadıklarını rapor etmişlerdir. Çalışmamızda İDP tanısı alan olguların MMG'lerinde papilloma özgü malign veya benign ayırıcı bir bulgu saptanmadı.

Literatürdeki birçok benzer çalışmanın aksine son yıllarda yapılan geniş serili bir retrospektif çalışmada atipili lezyonların eksizyon sonrasında upgrade göstermediği sonucu rapor edilmiştir (17). Bizim bulgularımız atipi gösteren papiller lezyonların eksizyonunu desteklemektedir.

İntraduktal patolojilerin değerlendirmesinde US vazgeçilmez bir yöntemdir, lezyonun yaygınlığından şüphelenen olgularda MRG yardımcı olduğu için önerilmelidir. Bu çalışmada biyopsi yapılan ve intraduktal proliferatif lezyon ön tanısı alan olguların %10,9'unun total eksizyon sonrası tanısız upgrade olduğu dikkat çekmektedir. Papiller lezyon tanısı alan hastalarda radyolojik görüntüleme iyi değerlendirilmeli, patolojik radyolojik uyumsuzluk olması durumunda total eksizyon yapılmasının uygun olacağı kanaatindeyiz.

ÇALIŞMA KISITLILIKLARI

Çalışmamızın retrospektif dizaynı ve örneklem büyüklüğü başlıca kısıtlılıklardır. Cerrahi eksizyon atipi içeren, risk faktörü, radyoloji ve patoloji uyumsuzluğu ve kendi isteği bu yönde olan hastalara uygulanmıştır.

Bilgilendirilmiş Onam: Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- M.F.Ç., R.Y., S.Ç.Y.; Veri Toplama- F.Ç.Y., R.Y.; Veri Analizi/Yorumlama- A.C.D., M.F.Ç.; Yazı Taslağı- M.F.Ç.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- A.C.D., R.Y., S.K.; Son Onay ve Sorumluluk- A.C.D., M.F.Ç., R.Y., F.Ç.Y., H.F.B., S.K., H.A.; Malzeme ve Teknik Destek- H.F.B.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

Informed Consent: Written consent was obtained from the participants.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study- M.F.Ç., R.Y., S.Ç.Y.; Data Acquisition- F.Ç.Y., R.Y.; Data Analysis/Interpretation- A.C.D., M.F.Ç.; Drafting Manuscript- M.F.Ç.; Critical Revision of Manuscript- A.C.D., R.Y., S.K.; Final Approval and Accountability- A.C.D., M.F.Ç., R.Y., F.Ç.Y., H.F.B., S.K., H.A.; Technical or Material Support- H.F.B.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.












Financial Disclosure: Authors declared no financial support.

KAYNAKLAR

1. Nayak A, Carkaci S, Gilcrease MZ, Liu P, Middleton LP, Bassett RL Jr, et al. Benign papillomas without atypia diagnosed on core needle biopsy: experience from a single institution and proposed criteria for excision. *Clin Breast Cancer* 2013;13(6):439-49. [CrossRef]
2. Jagmohan P, Pool FJ, Putti TC, Wong J. Papillary lesions of the breast: imaging findings and diagnostic challenges. *Diagn Interv Radiol* 2013;19(6):471-8. [CrossRef]
3. Weisman PS, Sutton BJ, Siziopikou KP, Hansen N, Khan SA, Neuschler EI, et al. Non-mass-associated intraductal papillomas: is excision necessary? *Hum Pathol* 2014;45(3):583-8. [CrossRef]
4. Özmen V, Cantürk Z, Çelik V, Güler V, Kapkaç M, Koyuncu A, Müslümanoğlu M, Utkan Z. *Meme Hastalıkları Kitabı, Güneş Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2012; pp:73-6.*
5. Brunicardi CF, Andersen DK, Billiar TR, Dunn DL, Hunter JG, Matthews JB, Pollock RE. *Schwartz's Principles of Surgery, McGraw-Hill Companies, New York, 10th edition, 2015; pp: 497-565.*
6. Eiada R, Chong J, Kulkarni S, Goldberg F, Muradali D. Papillary lesions of the breast: MRI, ultrasound, and mammographic appearances *AJR Am J Roentgenol* 2012;198(2):264-71. [CrossRef]
7. Bender Ö, Balcı FL, Kamalı S, Aykuter G, Sarı S, Deniz E ve ark. Patolojik meme başı akıntılarında duktoskopi. *Meme Sağlığı Dergisi* 2008;4(2):92-8.
8. Lee CH. Problem solving MR imaging of the breast. *Radiol Clin North Am* 2004;42(5):919-34. [CrossRef]
9. Davis PL, McCarty KS Jr. Sensitivity of enhanced MRI for detection of breast cancer: new, multicentric, residual and recurrent. *Eur Radiol* 1997;7:289-98. [CrossRef]
10. Morris EA, Liberman L, Ballon DJ, Robson M, Abramson AF, Heerdt A, et al. MRI of occult breast carcinoma in a high risk population. *AJR Am J Roentgenol* 2003;181:619-26. [CrossRef]
11. Son EJ, Kim EK, Kim JA, Kwak JY, Jeong J. Diagnostic Value of 3D Fast Low-Angle Shot Dynamic MRI of Breast Papillomas *Yonsei Med J* 2009;50(6):838-44.
12. Swapp RE, Glazebrook KN, Jones KN, Brandts HM, Reynolds C, Visscher DW, et al. Management of benign intraductal solitary papilloma diagnosed on core needle biopsy. *Ann Surg Oncol* 2013;20(6):1900-5. [CrossRef]
13. Shouhed D, Amersi FF, Spurrier R, Dang C, Astvatsaturyan K, Bose S, et al. Intraductal papillary lesions of the breast: clinical and pathological correlation. *Am Surg* 2012;78(10):1161-5.
14. McGhan LJ, Pockaj BA, Wasif N, Giurescu ME, McCullough AE, Gray RJ. Papillary lesions on core breast biopsy: excisional biopsy for all patients? *Am Surg* 2013;79(12):1238-42.
15. Ahmadiyah N, Stoleru MA, Raza S, Lester SC, Golshan M. Management of intraductal papillomas of the breast: an analysis of 129 cases and their outcome. *Ann Surg Oncol* 2009;16:2264-9. [CrossRef]
16. Renshaw AA, Derhagopian RP, Tizol-Blanco DM, Gould EW. Papillomas and atypical papillomas in breast core needle biopsy specimens: Risk of carcinoma in subsequent excision. *Am J Clin Pathol* 2004;122:217-21. [CrossRef]
17. Richter-Ehrenstein C, Tombokan F, Fallenberg EM, Schneider A, Denkert C. Intraductal papillomas of the breast: diagnosis and management of 151 patients. *Breast* 2011;20(6):501-4. [CrossRef]
18. Rizzo M, Lund MJ, Oprea G, Schniederjan M, Wood W, Mosunjac M. Surgical follow-up and clinical presentation of 142 breast papillary lesions diagnosed by ultrasound-guided core-needle biopsy. *Ann Surg Oncol* 2008;15(4):1040-7. [CrossRef]
19. Jaffer S, Nagi C, Bleiweiss I. Excision is indicated for intraductal papilloma of the breast diagnosed on core needle biopsy. *Cancer* 2009;115(13):2837-43. [CrossRef]
20. Soo MS, Williford ME, Walsh R, Bentley RC, Kornguth PJ. Papillary carcinoma of the breast: imaging findings. *Am J Roentgenol* 1995;164(2):321-6. [CrossRef]
21. Woods ER, Helvie MA, Ikeda DM, Mandell SH, Chapel KL, Adler DD. Solitary breast papilloma: comparison of mammographic, galactographic, and pathologic findings. *Am J Roentgenol* 1992;159(3):487-91. [CrossRef]
22. Agoff SN, Lawton TJ. Papillary lesions of the breast with and without atypical ductal hyperplasia. Can we accurately predict benign behavior from core needle biopsy? *Am J Clin Pathol* 2004;122(3):440-3. [CrossRef]

SAĞ ATRIUMA UZANIM GÖSTEREN RENAL TÜMÖRLERDE İNFRARENAL VENA KAVA İNFERİOR KANULASYONU – HİPOTERMİK DOLAŞIM DURDURULMASINI ENGELLEYEN YÖNTEM

INFARENAL INFERIOR VENA CAVA CANNULATION DURING THE RESECTION
OF RENAL TUMORS EXTENDING INTO THE RIGHT HEART – NO NEED FOR
HYPOTHERMIC TOTAL CIRCULATORY ARREST

Murat UĞURLUCAN¹ , Didem Melis ÖZTAŞ² , Selçuk ERDEM³ , Feza EKİZ⁴ , Zerrin SUNGUR⁵ ,
Başak ERGİNEL⁶ , Öner ŞANLI³ , Faruk ÖZCAN³ , Ali Haluk ANDER³ , İsmet NANE³ , Ufuk ALPAGUT⁷ 

¹Medipol Üniversite Hastanesi, Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²Bağcılar Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kalp ve Damar Cerrahisi Kliniği, İstanbul, Türkiye

³İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, ³Üroloji Anabilim Dalı, ⁴Genel Cerrahi Anabilim Dalı, ⁵Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı,

⁶Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, ⁷Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ORCID IDs of the authors: M.U. 0000-0001-6643-9364; D.M.Ö. 0000-0003-4108-6405; S.E. 0000-0002-3514-1394; F.E. 0000-0002-0472-8846; Z.S. 0000-0001-9805-8902; B.E. 0000-0001-7862-8445; Ö.Ş. 0000-0001-5801-6898; F.Ö. 0000-0001-7544-6638; A.H.A. 0000-0002-1750-8519; İ.N. 0000-0002-5079-1221; U.A. 0000-0001-6052-2773

Cite this article as: Ugurlucan M, Oztas DM, Erdem S, Ekiz F, Sungur Z, Erginel B, et al. Infrarenal inferior vena cava cannulation during the resection of renal tumors extending into the right heart-no need for hypothermic total circulatory arrest. J Ist Faculty Med 2019;82(2):75-80. doi: 10.26650/IUITFD.434476

ÖZET

Amaç: Vena kava trombektomisi ile birlikte yapılan radikal tümör eksizyonu, kavoatriyal tümör trombozlarının tedavisinde son derece önemlidir. Bu yazıda sağ atriuma uzanım gösteren renal tümörlerde uyguladığımız hipotermik dolaşım durdurulmasını engelleyen infrarenal vena kava inferior kanülasyon tekniğini anlatılmaktadır.

Yöntemler: Haziran 2013 - Aralık 2017 tarihleri arasında intrakar-diak uzanım gösteren böbrek kaynaklı tümör saptanan 5 hasta tarafımıza konsülte edilmiştir. Hastaların yaş ortalaması 43,2 yıl idi. Pediatrik ve 1 yetişkin hasta erkek, diğer 3 yetişkin hasta kadındı. Operasyonlarda vena kava superior, infrarenal vena kava inferior ve two-stage venöz kanüller takılı olan üçlü venöz kanülasyon sistemi kullanıldı. Vena kava superior ve infrarenal vena kava inferior kanülasyonlarını takiben tümör trombusu çıkarıldı. Atriotomi kapatılırken two-stage venöz kanül sağ atriuma yerleştirildi. Prosedüre usulünce devam edildi.

Bulgular: Operasyon sırasında ya da sonrasında mortalite gözlenmedi. Ortalama operasyon süresi 465 dk, kardiyopulmoner bypass süresi 48 dk ve miyokardial iskemik süresi 27 dk idi. Hepatik ve renal iskemik süreleri ortalama 15,4 dk oldu. Ortalama yoğun bakım ve hastanede kalış süreleri sırasıyla 28,4 saat ve 9,3 gün

ABSTRACT

Objective: Vena cava thrombectomy together with radical tumor excision in the case of cavoatrial tumor thrombosis is vitally important. In this document, we present the infrarenal inferior vena cava cannulation technique which overcomes the need of total circulatory arrest during the treatment of renal tumors extending into the right atrium.

Methods: Between June 2013 and December 2017, 5 patients with renal tumors extending into the right atrium, were diagnosed. The mean age of the patients was 43.2 years. One pediatric and 1 adult patient were male, the other 3 were adult females. The three-venous cannulation system containing vena cava superior, infrarenal vena cava inferior and two-stage venous cannulae was used. The tumor thrombus was removed following vena cava superior and infrarenal vena cava inferior cannulations. A two-stage venous cannula was placed in the right atrium while closing atriotomy. The procedure was continued.

Results: There was no mortality in the perioperative and postoperative period. The mean operation time was 465 minutes, the duration of cardiopulmonary bypass was 48 minutes and myocardial ischemia time was 27 minutes. The mean hepatic and renal ischemia time was 15.4 minutes. The mean intensive

İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: muratugurlucan@yahoo.com

Geliş tarihi/Received Date: 18.06.2018 • **Kabul tarihi/Accepted Date:** 05.03.2019

©Telif Hakkı 2019 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2019 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

hesaplandı. Toplam takip süresi 12 ay idi. Hiç bir hastada uzun dönem takiplerde mortalite ile karşılaşılmadı.

Sonuç: Tümörün tamamen çıkarılması ve rezidü trombüs bırakılmaması bu hasta grubunun mortalitesini belirleyen en önemli etkenlerdendir. Uyguladığımız teknikte birlikte hastalarda hipotermik dolaşıma gereksinim duyulmadan orta hipotermide tam bir tümör eksizyonu sağlanmış ve trombüs dokusu bırakılmadığından emin olunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Vena kava inferior, Böbrek kanseri, Tümör trombüsü, kardiopulmoner bypass

care unit and hospital stay were 28.4 hours and 9.3 days, respectively. The total follow-up period was 12 months. There was no mortality in long term follow-up.

Conclusion: Complete tumor resection without any remnant is the main predictor of mortality in this particular patient population. This technique allows tumor resection in moderate hypothermia without needing hypothermic circulation and provides a safe procedure for complete resection.

Keywords: Inferior vena cava, Kidney cancer, Tumor thrombus, Cardiopulmonary bypass

GİRİŞ

Böbrek tümörlerinin vena kava inferior yolu ile kalbe doğru yayılımlarının serilerde yüksek oranlarda olabileceği bildirilmektedir (1). Cerrahi tedavi sırasında tümörün vena kava inferior ve hatta kalp içindeki tümör trombüsü ile birlikte tamamen çıkarılması uzun dönem prognoz ve sağ kalım için son derece önemlidir (2). Ancak, modern çağda her türlü medikal ve cerrahi gelişmelere rağmen gerçekleştirilecek bu ölçekte büyük bir cerrahi önemli mortalite ve morbidite oranlarına sahiptir (1,3).

Renal hücreli karsinom erişkin malignitelerinin yaklaşık %3'ünü oluşturmaktadır. Ürolojik kanserler içinde mortalitesi en yüksek olan kanser türüdür (4). Renal hücreli karsinom vakalarının yaklaşık %10'unda vena kava inferiorde trombüs saptanmaktadır ve cerrahi rezeksiyon tek küratif tedavi olarak karşımıza çıkmaktadır (5, 6). Olguların yaklaşık %1'inde ise tümör trombüsü sağ atriuma kadar uzanmaktadır (4).

Vena kava inferiorde subhepatik düzeyde saptanan tümör trombüslerinin cerrahisi komplike değildir ve genellikle standart cerrahi yaklaşımlar uygulanmaktadır. Ancak trombüsün daha üst seviyelere ve sağ atriuma uzanması durumunda daha kompleks cerrahi yaklaşımlar gerekmektedir. Supradyafragmatik ve özellikle intrakardiyal uzanım gösteren renal hücreli karsinomların güvenli cerrahi rezeksiyonunda kardiopulmoner bypass ve kardiyak arrest, hatta total sirkülatuar arrest sıklıkla gerekebilmektedir (5). Cerrahi tedavi kompleks olabileceği; lenf nodu metastazı ve uzak metastaz olmayan olgularda kür olasılığı sağlar. Vena kava inferiorde tümör trombüsü bulunan fakat uzak metastazı olmayan böbrek tümörlerinde komplet rezeksiyon sonrası 5 yıllık sağ kalım yaklaşık %47-68 oranındadır (4).

Bu yazıda vena kava inferior yoluyla intrakardiyal uzanım gösteren renal kaynaklı tümörlerin tedavisinde kliniğimizde uyguladığımız, total sirkülatuar arrest gereksinimini ortadan kaldıran tekniği anlatmayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

İstanbul Tıp Fakültesinde ilgili branşlar tarafından tanı konulduktan sonra, intrakardiyal uzanım gösteren böbrek

kaynaklı tümörler nedeniyle 5 hasta Haziran 2013 - Aralık 2017 tarihleri arasında tarafımıza konsülte edilmişlerdir (Resim 1). Bu 5 hasta dışında vena kava inferior içinde tümör trombüsü olan ancak tümörün sağ atriuma uzanım göstermediği hastalar kardiopulmoner bypass gereksinimi göstermemeleri nedeniyle bu gruba dahil edilmişlerdir. Hastaların yaş ortalaması 43,2 yıl idi. Hastalarda makrohematüri, karın ağrısı, halsizlik gibi semptomlar mevcuttu. 1 hastada diyabetes mellitus ve iskemik kalp hastalığı, 1 hastada hipertansiyon mevcuttu. Pediatrik ve 1 yetişkin hasta erkek, diğer 3 yetişkin hasta kadındı. Yapılan biopsi neticelerinde pediatrik vakada Wilm's tümörü, geri kalan erişkin hastalarda renal hücreli karsinom olarak



Resim 1: Tomografide böbrek kaynaklı tümörün renal ven invazyonu ve vena kava inferior yoluyla sağ atriuma uzanan tümör trombüsü görülmekte.

Tablo 1: Hastaların demografik özellikleri

Demografik Özellikler	Hasta Sayısı
Erkek	2
Kadın	3
Diyabetes Mellitus	1
Hipertansiyon	1
İskemik kalp hastalığı	1
Sol böbrek tutulumu	3
Sağ böbrek tutulumu	2

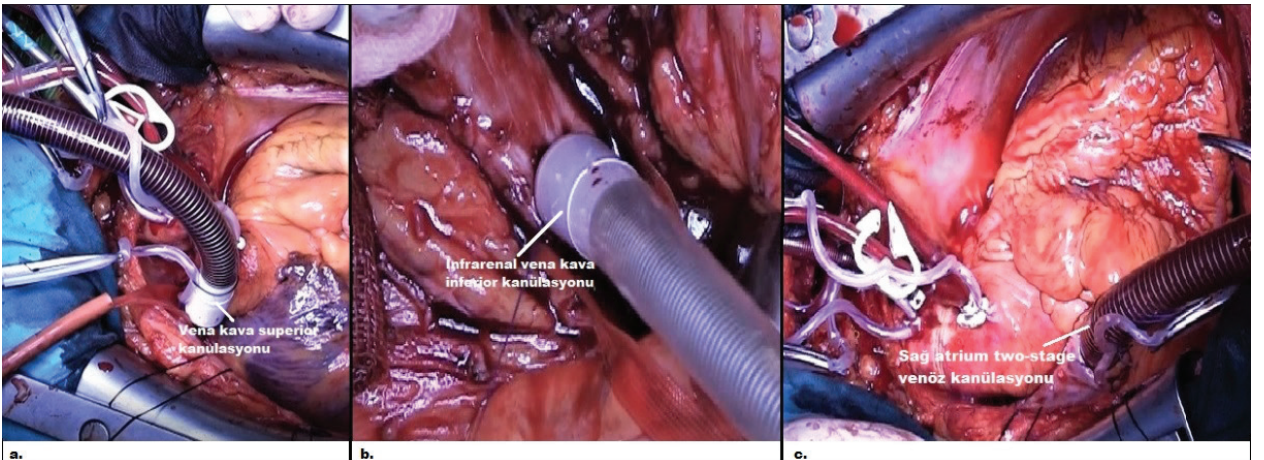
teşhis edilmişlerdir. Hastaların 3'ünde tümör sol böbrekten, 2'sinde tümör sağ böbrekten kaynaklanmaktaydı. Uzak metastaz 1 hastada mevcuttu. 2 hastada intraoperatif eritrosit süspansiyonu kullanımı gerekti. Tüm hastalara operasyon öncesi dönemde kemoterapi uygulanmış ve tümör boyutlarında azalma sağlanmıştı. Hastalara ait demografik özellikler Tablo 1'de gösterilmiştir.

Cerrahi Teknik

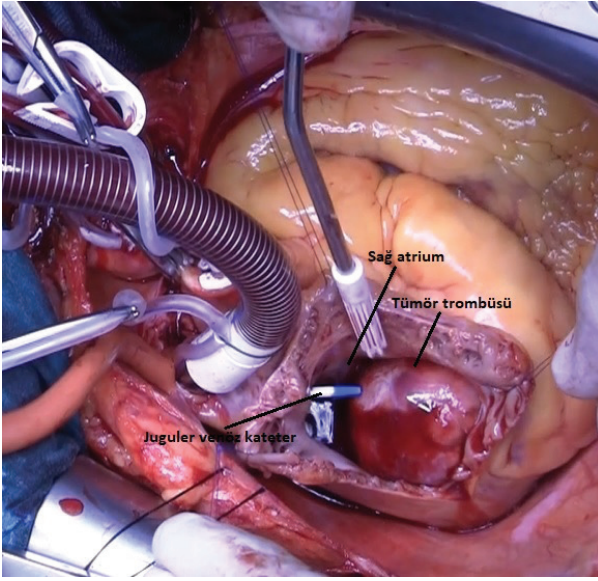
Tüm operasyonlar kalp ve damar cerrahisi, üroloji ve genel cerrahi ya da çocuk cerrahisi uzmanlarından oluşan ekip ile gerçekleştirildi. Genel anestezi altında gerekli invaziv arter ve santral venöz kateterizasyonları ve monitörizasyonları sonrası hastaların tüm vücutları betadin ile silindikten sonra toraks, batin ve dize kadar bacaklar açık kalacak şekilde örtüldü. Özellikle olası pulmoner emboli durumunu hızlıca değerlendirebilmek amacıyla hastalara transözofageal ekokardiyografi probu yerleştirilerek devamlı ekokardiyografi monitörizasyonu yapıldı.

Operasyona cerrahi ve üroloji ekipleri birlikte başladı. Median laparotomi (2 hasta) ya da bilateral subkostal insizyonla (3 hasta) batin açılıp tümörün kaynaklandığı böbrek

ve renal arter ile vena kava inferiora dökülen hepatik venöz yapılar ve hepatoduodenal ligaman prepare edildikten sonra kardiyovasküler cerrahi ekibi operasyona dahil oldu. İnfrarenal vena kava inferior prepare edildi, tape ile dönüldü ve kanülasyon için hazırlandı. Median sternotomi yapıp perikard açıldıktan sonra asendan aort ve vena kava superior prepare edildi, tape ile dönüldü. Bir ucuna vena kava superior, başka bir ucuna infrarenal vena kava inferior ve farklı bir ucuna da two-stage venöz kanüller takılmak üzere üçlü venöz kanülasyon sistemi (Resim 2a, 2b, 2c) hazırlandı. Heparinizasyon (300 Ünite/kg) sonrası asendan aorta, vena kava superior ve infrarenal vena kava inferior kanülasyonları yapıldı. Two-stage kanülün bağlı olduğu hat klemlendi. Kardiyopulmoner bypass başlatıldı. Orta derecede hipotermide (32°C) asendan aortaya kros klemp koyuldu, antegrad kan kardiyoplejisi ile kardiyak arrest sağlandı. Venöz kanüllerin snareleri sıkıldı. Portal ven ve hepatik arteri de içeren hepatoduodenal ligaman klempe edildi. Tümörün olmadığı renal ven klempe edildi. Tümörün kaynaklandığı böbreğe nefrektomi uygulandı ve o renal ven açık bırakıldı. Sağ atriotomi yapıldı. Atrium ve vena kava inferiora invaze olan tümör trombüsü (Resim 3) elevatör yardımıyla duvardan kazınarak çıkarıldı. Açık bırakılan renal ven ile atrium arasındaki tümörün tamamen çıkarıldığından emin olunduktan sonra (intratoraksik vena kava inferior ile renal ven arasının inspeksiyon ile tamamen tümör trombüsünden temizlendiği görülerek) renal ven primer suture edildi. Hepatoduodenal ligaman ve sağlıklı böbreğin renal venindeki klemler kaldırıldı. Atrium kapatıldı. Two-stage venöz kanül sağ atrioma yerleştirildi. Vena kavalardaki snareler açıldı. Kros klemp kaldırıldı. Hasta ısıtılırken infrarenal vena kava inferior ve vena kava superiordeki venöz kanüller klempe edildi ve çıkarıldı. Uygun hemodinami ve ısıda kardiyopulmoner bypasstan çıkıldıktan sonra hasta dekanüle edildi. Heparin protamin (450 Ünite/kg) ile nötralize edildi. Hemostaz



Resim 2: Üçlü venöz kanülasyon sistemi. a. Vena kava superior kanülasyonu. b. İnfrarenal vena kava inferior kanülasyonu. c. Tümör tamamen atrium ve vena kavadan çıkarıldıktan sonra two-stage sağ atrium kanülasyonu.



Resim 3: Peroperatif atrium ve vena kava inferiora invaze olan tümör trombüsü.

yapıldı. Lojlara uygun drenler yerleştirildikten sonra batın ve toraks boşlukları usulüne uygun olarak kapatıldı.

Operasyon sonrası tüm hastalar kardiyovasküler cerrahi yoğun bakım ünitesine transfer edildiler. Uygun şartlarda ekstübasyonları sağlandıktan sonra üroloji servisine alınarak taburculuğa kadar orada takipleri yapıldı. Tüm hastalara 6 ay boyunca antikoagülan tedavi uygulandı.

BULGULAR

Operasyon sırasında ya da sonrasında mortalite gözlenmedi. Tüm hastalar operasyonu tolere etti ve komplikasyonla karşılaşmadı. Ortalama operasyon süresi 465 dk, kardiyopulmoner bypass süresi 48 dk ve myokardial iskemi süresi 27 dk idi. Hepatik ve renal iskemi süreleri ortalama 15,4 dk oldu. Sadece 2 hastaya kardiyopulmoner bypass sonrası ve postoperatif yaklaşık 4 saat boyunca 5µgr/kg/dk dozunda dopamin inotropik desteği gerekti. Hastalar ortalama 5,7 saat içinde ekstübe edildiler. Ortalama yoğun bakım ve hastanede kalış süreleri sırasıyla 28,4 saat ve 9,3 gün hesaplandı.

Toplam takip süresi 12 ay idi. Hiç bir hastada uzun dönem takiplerde mortalite ile karşılaşmadı. Uzak metastazları olan 18 yaşındaki hastanın akciğer ve karaciğerindeki metastazları takiplerinde çıkarıldı. Bir hastaya postoperatif 1. ayında adjuvan kemoterapi başlandı, 1 yıl sonunda PET-CT'de sol paraaortik alandan paravertebral alana ulaşan ve nefrektomi loujında nüks olabilecek lezyon saptandı, tedavisinin değiştirilmesine karar verildi. 4 hastada uzun dönem takiplerde nüks saptanmadı. Tüm hastalar yaşamlarını sağlıklı bir şekilde devam ettirmektedirler. Hastalara ait operatif ve postoperatif veriler Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2: Hastaların operatif/postoperatif özellikleri

Operatif/postoperatif özellikler	Hasta Sayısı
İntraoperatif komplikasyon	-
İntraoperatif mortalite	-
Postoperatif morbidite	-
Eritrosit süspansiyonu gereksinimi	2
Renal ven invazyonu	5
İnotrop destek ihtiyacı	2
Nüks	1

TARTIŞMA

Renal hücreli karsinomun tedavi stratejileri, bu hastalığın moleküler ve genetik özelliklerinin anlaşılmasıyla birlikte değişmeye devam etmektedir (7). İnför vena kava'ya uzanım gösteren renal hücreli karsinom varlığında vena kaval trombektomi ile birlikte nefrektomi operasyonu ilk olarak Berg tarafından 1913 yılında tanımlanmıştır (8). Bu tarihten itibaren vena kaval trombektomi ile birlikte yapılan radikal tümör eksizyonu kavoatrial tümör trombozlarında güvenilir bir metot olarak kullanılmaktadır (8).

Operasyon ile ilişkili mortalite oranları %2,7-13, beklenen 5 yıllık sağ kalım ise %30 ile %72 arasında değişmektedir (9). Skinner ve arkadaşlarının çalışmasına (10) göre tümör trombozu olan olgularda, tümörün uzanım gösterme derecesinden bağımsız olarak, yağ dokusu veya lokal nod metastazı yok ise, 5 yıllık sağ kalım oranları renal kapsül içinde sınırlı kalan tümörlerle benzerdir. Bununla birlikte, tamamlanmamış tümör rezeksiyonu kötü prognoz ile ilişkilidir. İnkompakt tümör rezeksiyonu yapılan hastalarda cerrahi takip eden 5 yıllık sağ-kalım oranları %0-17,5 arasındadır (2).

Renal hücreli karsinom kemoterapi ve radyoterapi gibi konvansiyonel yöntemlere cevapsızdır; bu nedenle cerrahi tedavi bu tümörün tedavisinde en güvenilir ve etkili metottur (8). Tümör trombüsü infrahepatik inferior vena kavada lokalize olduğunda (tip I veya II), tümör genelde inferior vena kava proksimal ve distali kontrol altına alındıktan sonra çıkarılmaktadır (8). İnför vena kava trombüslerinin yarısı infrahepatiktir ve %10'u sağ atriumda yerleşmektedir (11). Tümör trombüsü sağ kardiyak boşluklara kadar uzandığında ise (tip IV), en-blok tümör eksizyonu kardiyopulmoner bypass altında yapılmaktadır (8). Bununla birlikte, inferior vena kava trombozu ile birlikte renal hücreli karsinomu olan hastalar operasyon sonrası adjuvan terapilerin faydasını göremeden masif pulmoner emboli veya operasyon süresince kanama gibi komplikasyonlarla karşılaşabilmektedirler (2, 3, 10). TEE preoperatif olarak tümörün uzandığı yeri göstermede, tümör veya gaz embolisini saptamada, intraoperatif olarak ise trombüsün tamamen çıkarıldığını konfirme etmede faydalıdır

(10, 12). İntraoperatif pulmoner embolinin inferior vena kava veya böbreğin manipülasyonu sırasında olabileceği bildirilmiştir ve TEE'nun prosedürün her basamağında rutin kullanılması önerilmektedir (13).

Pulmoner emboli, etkilenen inferior vena kava bölümünün direkt görülerek proksimalinin kontrol altına alınması için uygun cerrahi saha sağlanması ile önlenebilir (13). Karaciğer transplantasyon tekniklerini kullanarak karaciğer mobilizasyonu ile tümör fragmentasyonu olmadan trombusun tamamı çıkarılabilir (14). Bu teknik inferior vena kavanın kontrol altına alınmasını sağlamaktadır. Fakat duodenal yaralanma, karaciğer laserasyonu, pulmoner emboli gibi komplikasyon riski olup III. ve IV. basamak hastalar ile kullanımı sınırlı tutulmuştur (14). Seçilmiş grup II vakalarda da uygulanabilir (14, 15). Saha tamamen kontrol altına alınmadan, körlemesine yapılan trombus eksizyonu, postoperatif embolilere, tümör fragmentasyonu ve lümen içinde trombus kalması sebebiyle oluşabilecek erken dönemde rekürren hastalığa sebep olabilir (16). Kaval duvarda tümör invazyonu olan olgularda medial venotominin kaval duvar eksizyonu ve renal ven onarımı sonrası duvarı daraltma riskinin yüksek olduğu ve kaval duvar rekonstrüksiyonu gerektirdiği düşünülmektedir (13).

Pulmoner emboliyi engellemek amacıyla kullanılan diğer stratejiler arasında suprarenal inferior vena kava kontrolünü sağlamak amacıyla suprarenal inferior vana kavaya klip kullanımı, sternotomi ile direk klempleme, sütür/staple ligasyonu ile inferior vena kavayı ayırma ve suprarenal inferior vena kava filtresi yerleştirilmesi sayılabilir (17). Operasyon sonrası rekürren inferior vena kava trombozunu önlemede antikoagülanların rolü literatürde kesin olarak bulunmamaktadır. Erken postoperatif dönemde derin ven trombozunu önlemek amacıyla düşük molekül ağırlıklı heparin ve dekstran kullanılmaktadır (17).

Ekstrakorporeal sirkülasyonun dahil olduğu metotlar uzun operasyon süresi, artmış kanama riski, renal disfonksiyon ve nörolojik komplikasyonlar içermektedir (8). Tıp IV trombus görülen bazı vakalarda, trombus veya tümör dokusu lokalize olarak inferior vena kava duvarı, hepatik ven, endokard veya triküspid kapağa güçlü olarak tutunabilir (18). Cerrahi tedavinin esas amacı neoplastik dokunun tamamen çıkarılmasıdır. Kardiyopulmoner bypass ile birlikte hipotermik sirkulatuar arrest kullanılması; kanamasız bir cerrahi alan sağlanması, pulmoner emboli ve fatal hemoraji ile hepatik ve renal iskemii riskini azaltması gibi yönlerden avantaj sağlamaktadır. Böylece tümör eksizyonu sırasında tümör dokusu bırakma riski azalır ve inferior vena kava lümeni (özellikle hepatik ven) ile sağ atriumun optimal değerlendirilmesine olanak sağlar (9).

Derin hipotermik sirkulatuar arrest ile birlikte olsun veya olmasın kardiyopulmoner bypass, atriya uzanan tümör trombusu olan hastalarda trombektomi için kansız bir alan sağlamak için uygulanan geleneksel yaklaşımdır. De-

rin hipotermik sirkulatuar arrest kullanımında daha uzun ameliyat süresi, daha yüksek postoperatif koagülopati, böbrek yetmezliği ve retroperitoneal kanama görülmektedir. Literatürde kardiyopulmoner bypass kullanılmadan uygulanan teknikler de mevcuttur; fakat manipülasyon ile daha yüksek intraoperatif tümör embolizasyonu riski, tümör yükü belirsizliği, sınırlı hasta örneği ve daha büyük atriyal trombusu olan hastalarda sınırlı uygulama nedeniyle tartışmalıdır (19). Vena kava superior, femoral ven ve aort kanülasyonu ile derin hipotermik sirkulatuar arrest altında kardiyopulmoner bypass, derin hipotermik sirkulatuar arrest oluşturmadan sadece kardiyopulmoner bypass ve kardiyopulmoner bypassa ek olarak vakum yardımıyla venöz drenaj sağlanması veya kavaatrial şant yoluyla yaklaşım teknikleri de tanımlanmıştır. Derin hipotermik sirkulatuar arrest ve kardiyopulmoner bypass kullanılarak yapılan kardiyak cerrahi girişimler sonrası nörolojik hasar riski %5-20 arasında rapor edilmiştir (4). Anestezi ve cerrahi uygulamalarındaki gelişmeler, teknikler arasındaki tartışmaları ortadan kaldırmıştır ve kardiyopulmoner bypassın ameliyathanede alternatif olarak bulunması gerekli görülmektedir (19). Santrifujal bir pompa kullanılarak venö-venöz bypass (IVK ve sağ atriyum kanülasyonu ile), minimal invaziv ve perkutan bypass teknikleri de literatürde bildirilmiştir (20).

Bizim olgularımızda trombus sağ atriya kadar uzanmaktaydı. Bu sebeple hastalarda kardiyopulmoner gereksinimi mevcuttu. Çalışmamızdaki majör sınırlayıcı faktör hasta sayısı olup; uyguladığımız teknikle birlikte hastalarda hipotermik dolaşıma gereksinim duyulmadan orta hipotermide tam bir tümör eksizyonu sağlanmış ve trombus dokusu bırakılmadığından emin olunmuştur. Böylece bu hasta popülasyonu için güvenilir ve etkin bir metot olarak kullanılmıştır.

Etik Komite Onayı: Etik komite onayı bu çalışma için, yerel etik komiteden alınmıştır.

Bilgilendirilmiş Onam: Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- M.U., U.A., D.M.Ö.; Veri Toplama- M.U., D.M.Ö., S.E., F.E., Z.S., B.E., Ö.Ş., F.Ö.; Veri Analizi/Yorumlama- M.U., A.H.A., İ.N.; Yazı Taslağı- M.U., D.M.Ö., U.A.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- M.U., D.M.Ö., U.A., F.E., S.E., B.E., Ö.Ş., F.Ö., A.H.A., İ.N.; Son Onay ve Sorumluluk- M.U., D.M.Ö., S.E., F.E., Z.S., B.E., Ö.Ş., F.Ö., A.H.A., İ.N., U.A.; Süpervizyon- M.U., U.A.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the local ethics committee.

Informed Consent: Written consent was obtained from the participants.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study- M.U., U.A., D.M.Ö.; Data Acquisition- M.U., D.M.Ö., S.E., F.E., Z.S., B.E., Ö.Ş., F.Ö.; Data Analysis/Interpretation- M.U., A.H.A., İ.N.; Drafting Manuscript- M.U., D.M.Ö., U.A.; Critical Revision of Manuscript- M.U., D.M.Ö., U.A., F.E., S.E., B.E., Ö.Ş., F.Ö., A.H.A., İ.N.; Final Approval and Accountability- M.U., D.M.Ö., S.E., F.E., Z.S., B.E., Ö.Ş., F.Ö., A.H.A., İ.N., U.A.; Supervision- M.U., U.A.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: Authors declared no financial support.

KAYNAKLAR

1. Nouh MA, Inui M, Kakehi Y. Renal Cell Carcinoma with IVC Thrombi; Current Concepts and Future Perspectives. Clin Med Oncol 2008;2:247-56. [CroosRef]
2. Hatcher PA, Anderson EE, Paulson DF, Carson CC, Robertson JE. Surgical management and prognosis of renal cell carcinoma invading the vena cava. J Urol 1991;145(1):20-3;23-4.
3. Ciancio G, Livingstone AS, Soloway M. Surgical management of renal cell carcinoma with tumor thrombus in the renal and inferior vena cava: the University of Miami experience in using liver transplantation techniques. Eur Urol 2007;51(4):988-94;994-5.
4. Eryıldırım B, Kuyumcuoğlu U, İdiz M, Faydacı G, Erbay E. Sağ atriuma tümör trombüs uzanımı gösteren böbrek hücreli kanser olgusu. Turk J Urol 2005;31(1):142-5.
5. Adams LC, Ralla B, Bender YY, Bressemer K, Hamm B, Busch J, Fuller F, Makowski MR. Renal cell carcinoma with venous extension: Prediction of inferior vena cava wall invasion by MRI. Cancer Imaging 2018;18(1):17. [CroosRef]
6. Gedik HS, Alp İ, Arslan G, Dereli Y, Korkmaz K, Yılmaz AT. A different approach in the treatment of left renal cell carcinoma with tumor thrombus extension into the vena cava inferior. Turk Gogus Kalp Dama 2012;20(2):396-8. [CroosRef]
7. Rini BI, Rathmell WK, Godley P. Renal cell carcinoma. Curr Opin Oncol 2008;20:300-6. [CroosRef]
8. Noguchi K, Hori D, Nomura Y, Tanaka H. Renal cell carcinoma with tumor-thrombus extension into the right ventricle. Ann Vasc Dis 2012;5(3):376-80. [CroosRef]
9. Dedeilias P, Koletsis E, Rousakis AG, et al. Deep hypothermia and circulatory arrest in the surgical management of renal tumors with cavoatrial extension. J Card Surg 2009;24:617-23. [CroosRef]
10. Skinner DG, Pritchett TR, Lieskovsky G, et al. Vena caval involvement by renal cell carcinoma. Surgical resection provides meaningful long-term survival. Ann Surg 1989;210:387-92, discussion 392-4. [CroosRef]
11. Kirkali Z, Van Poppel H. A critical analysis of surgery for kidney cancer with vena cava invasion. Eur Urol. 2007;52:658-62. [CroosRef]
12. Zini L, Haulon S, Decoene C, Amara N, Villers A, Biserte J, Leroy X, Koussa M. Renal cell carcinoma associated with tumor thrombus in the inferior vena cava: Surgical strategies. Ann Vasc Surg 2005;19:522-8. [CroosRef]
13. Kwon TW, Kim H, Moon KM, Cho YP, Song C, Kim CS, Ahn H. Surgical treatment of inferior vena cava tumor thrombus in patients with renal cell carcinoma. J Korean Med Sci 2010;25(1):104-9. [CroosRef]
14. Kaplan S, Ekici S, Dogan R, Demircin M, Ozen H, Pasaoglu I. Surgical management of renal cell carcinoma with inferior vena cava tumor thrombus. Am J Surg 2002;183:292-9. [CroosRef]
15. Jibiki M, Iwai T, Inoue Y, Sugano N, Kihara K, Hyochi N, Sunamori M. Surgical strategy for treating renal cell carcinoma with thrombus extending into the inferior vena cava. J Vasc Surg 2004;39:829-35. [CroosRef]
16. Gallucci M, Borzomati D, Flammia G, Alcini A, Albino G, Caricato M, Esposito A, Vincenzi B, Rossi M, Coppola R, Berloco P. Liver harvesting surgical technique for the treatment of retro-hepatic caval thrombosis concomitant to renal cell carcinoma: perioperative and long-term results in 15 patients without mortality. Eur Urol 2004;45:194-202. [CroosRef]
17. Wellons E, Rosenthal D, Schoborg T, Shuler F, Levitt A. Renal cell carcinoma invading the inferior vena cava: use of a "temporary" vena cava filter to prevent tumor emboli during nephrectomy. Urology 2004;63:380-2. [CroosRef]
18. Hedderich GS, O'Connor RJ, Reid EC, Mulder DS. Caval tumor thrombus complicating renal cell carcinoma: A surgical challenge. Surgery 1987;102:614-21.
19. Mavrigiannaki E, Fesatidis I, Kalogridaki E, Katralis IP, Filippou D, Skandalakis P, et al. Synchronous nephrectomy and cavoatrial tumor thrombectomy under normothermic extracorporeal circulation and beating heart. J Surg Case Rep 2018;2018(5):rjy095. [CroosRef]
20. Kayalar N, Özkaynak B, Gümüş F, Kuplay H, Nuhoğlu B, Erentuğ V. IVC Thrombus in Renal Cell Carcinoma. JAREM 2013;3:47-52. [CroosRef]

GENÇ ERİŞKİN HEMODİYALİZ HASTALARINDA KIRILGANLIK VE KOGNİTİF BOZUKLUK ARASINDAKİ İLİŞKİ

THE RELATIONSHIP BETWEEN FRAILTY AND COGNITIVE IMPAIRMENT IN YOUNG ADULT HEMODIALYSIS PATIENTS

Ertuğrul ERKEN¹ , Gülsüm AKKUŞ² , Fatma Betül GÜZEL² , Neziha ULUSOYLAR³ , Orçun ALTINÖREN¹ ,
Özkan GÜNGÖR¹ 

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi, ²İç Hastalıkları Anabilim Dalı, ¹Nefroloji Bilim Dalı, Kahramanmaraş, Türkiye

³Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Geriatri Bilim Dalı, İzmir, Türkiye

ORCID IDs of the authors: E.E. 0000-0002-7054-1203; G.A. 0000-0002-3819-8169; F.B.G. 0000-0003-1569-9654; N.U. 0000-0002-4878-1569; O.A. 0000-0002-8913-4341; O.G. 0000-0003-1861-5452

Cite this article as: Erken E, Akkus G, Guzel FB, Ulusoylar N, Altunoren O, Gungor O. The relationship between frailty and cognitive impairment in young adult hemodialysis patients. J Ist Faculty Med 2019;82(2):81-8. doi: 10.26650/2018.0037

ÖZET

Amaç: Kırılğanlık; geriyatrik popülasyonlarda oluşturulmuş, fiziksel inaktiviteyi ve hastalık komplikasyonlarına duyarlılığı anlatan bir tanımlamadır. Hemodiyaliz (HD) hastalarında kırılğanlığı inceleyen çalışmaların çoğu yaşlı popülasyonlardadır. Kognitif bozukluk HD hastalarının göz ardı edilen bir sorunudur. Bu çalışmanın amacı genç erişkin HD hastalarında kırılğanlıkla kognitif bozukluk arasındaki ilişkiyi araştırmaktır.

Yöntemler: Çalışmaya 18-65 yaş arası 102 HD hastası alındı. Kırılğanlık; klinik kırılğanlık indeksi (KKİ) ile, kognitif durum Montreal Cognitive Assesment (MoCA) ile değerlendirildi. KKİ puanı 5-7 arası olan hastalar kırılğan, 4-7 arası olanlar duyarlı veya kırılğan olarak belirlendi. MoCA skoru <24/30 olanlar kognitif bozukluk olarak değerlendirildi.

Bulgular: Hastaların yaş ortalaması 48,3±12,4 yıl idi. Duyarlı-veya-kırılğan olma %26,7, kırılğanlık %12,7 sıklıkta bulundu. Kognitif bozukluk sıklığı %69,6 idi. Kognitif bozukluğu olan ve olmayan HD hastaları karşılaştırıldığında, kognitif bozukluğu olanlarda hem kırılğan olma sıklığı hem de duyarlı veya kırılğan olma sıklığı anlamlı düzeyde artmıştı (sırasıyla %22,4; %0,0 p=0,011 ve %57,7; %3,3 p<0,001). KKİ puanı ile MoCA skoru arasında anlamlı negatif korelasyon vardı (-r=0,607, p<0,001). Bu korelasyon yaş, diyabets mellitus ve kardiyovasküler hastalıkla yapılan regresyon analizinden sonra anlamlılığını korudu (p=0,012).

Sonuç: Bu çalışma genç erişkin HD hastalarında kırılğanlığın kognitif bozukluk ile ilişkili olabileceğini gösterdi. HD hastalarında kırılğanlığın belirlenmesi, inaktivite ve komorbiditeler dışında, kognitif bozukluğa karşı da önlem almamızı gerektirebilir.

Anahtar Kelimeler: Kırılğanlık, kognitif bozukluk, hemodiyaliz

ABSTRACT

Objective: Frailty is a definition used in relation to geriatric populations, indicating physical inactivity and susceptibility to disease. Studies investigating frailty in hemodialysis (HD) patients mostly include the elderly. Cognitive impairment is overlooked in HD patients. This study aims to investigate associations between frailty and cognitive impairment in young-adult HD patients.

Methods: The study included 102 HD patients aged 18-65 years old. Frailty was evaluated using the clinical frailty index (CFI) and cognition was evaluated using the Montreal Cognitive Assessment (MoCA). A CFI value between 5 and 7 was defined as frail, and 4-7 was defined as vulnerable-or-frail. An MoCA value <24/30 was determined as cognitive impairment.

Results: Mean patient age was 48.3±12.4 years. Vulnerable-or-frail patients accounted for 26.7%, frailty, 12.7%. Frequency of cognitive impairment was 69.6%. The likelihood of Frailty and being vulnerable-or-frail were increased in patients with cognitive impairment compared with those without cognitive impairment (22.4%; 0.0% p=0,011 and 57.7%; 3,3% p<0,001). CFI and MoCA were negatively correlated (-r=0,607, p<0,001), which was still significant after adjusting for age, diabetes mellitus and cardiovascular disease (p=0.012).

Conclusion: This study showed that frailty may be associated with cognitive impairment in young-adult HD patients. Determining frail HD patients may necessitate dealing with inactivity, comorbidities and also cognitive impairment.

Keywords: Frailty, cognitive impairment, hemodialysis

İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: ertugrulerken@hotmail.com

Geliş tarihi/Received Date: 10.12.2018 • **Kabul tarihi/Accepted Date:** 04.03.2019

©Telif Hakkı 2019 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2019 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

GİRİŞ

Kronik hemodiyaliz (HD) programında takip edilen son dönem böbrek yetersizliği (SDBY) hastalarının yaş ortalaması giderek yükselirken, genellikle yaşlı insanların problemleri olan fiziksel kırılabilirlik ve kognitif bozukluğun genç HD hastalarında da sıkça bulunabildiği anlaşılmıştır (1-3). Kırılabilirlik; geriyatrik popülasyonlar üzerinde oluşturulmuş olan ve genel anlamıyla fiziksel inaktivite ve hastalıklarla ilişkili komplikasyonlara duyarlı olmayı ifade eden bir tanımlamadır (4, 5). Bu tanımlamanın temelinde yaşlanma ile ortaya çıkan ve birçok organ sistemini etkileyen işlevsel eksilmeler bütünü yer alır (1, 6). HD hastalarında kırılabilirlik sıklığı artmış olup, kırılabilirlik durumu yaş ve komorbiditelerden bağımsız olarak mortalite ile ilişkili bulunmuştur (7, 8). Bu hastalarda kognitif bozukluk sıklığı ise tahmin edilenden çok daha fazladır ve bu durumun temelinde mikrovasküler hastalık, kronik inflamasyon ve malnutrisyon yer alır (9).

HD hastalarında vasküler yaşlanma belirgin artmıştır (2). Dolayısıyla bu popülasyon için fiziksel kırılabilirlik ve kognitif bozukluk sıklıklarında artış ve bu ikisinin arasında olası bir ilişki beklenebilir. Üstelik kognitif bozukluğun kişiyi daha hareketsiz, isteksiz, genel sağlık durumunu fark edemeyen ya da önemsemeyen bir duruma sokarak kırılabilirliğe katkı yapması da olasıdır. Biz bu çalışmada, genç erişkin kronik HD hastalarımızdaki kırılabilirlik sıklığını ve bu durumun kognitif bozukluk ve komorbid durumlarla olası ilişkilerini incelemeyi amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hasta seçimi ve veri eldesi

Bu kesitsel çalışmaya, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Nefroloji Bilim Dalı takibinde olan ve kronik HD tedavisi gören SDBY hastaları dahil edildi. Çalışmaya dahil etme kriteri; haftada 3 seans rutin hemodiyaliz tedavisi gören, 18-65 yaş arası SDBY hastaları olarak belirlendi. Dışlama kriterleri; malign hastalık, görme bozukluğu, bakım yurdu veya palyatif tedavi merkezinde yaşamak, kalp yetersizliği tanısı veya kardiyak pacemaker olması, demans tanısı, tanı konmuş serebrovasküler hastalık, tiroid fonksiyon bozukluğu, depresyon ve psikoz tanısı olmak veya ilgili ilaç kullanmak, romatoid artrit, ankilozan spondilit, ülseratif kolit gibi kronik inflamatuvar hastalığı olmak, tek havuz Kt/V değerinin < 1,2 olması, serum albumin değerinin < 3 gr/dl olması, aktif pnömoni veya şiddetli enfeksiyon bulunması olarak belirlendi. Bu kriterleri karşılayan 102 kronik HD hastası çalışma popülasyonu olarak seçildi. Dahil edilen hastaların beden kitle indeksi (BKİ), HD tedavi süresi ve eğitim durumunu da içeren demografik bulgularla birlikte, komorbid hastalıkları belirlendi. Hastaların serum paratiroid hormon (PTH), hemoglobin (Hb), albumin, C-reaktif protein (CRP), diyaliz yeterliliği (Kt/V) verileri kayıt altına alındı. Eğitim durumu, eğitim gördükleri yıl sayısı olarak; hipertansiyon (HT), en

az bir adet antihipertansif ilaç kullanıyor olmak; kardiyovasküler hastalık (KVH), gösterilmiş periferik veya kardiyak damar hastalığı öyküsü olarak belirlendi. Diyaliz yeterliliği; Daugirdas denklemi tek-havuz Kt/V ile hesaplandı (10). Ağustos - Eylül 2018 arasında yapılan çalışma için hastalardan bilgilendirilmiş onam alındı. Çalışma, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylandı.

Kırılabilirlik durumu ve kognitif değerlendirme

HD hastalarının kırılabilirlik durumunun değerlendirilmesinde klinik kırılabilirlik indeksi (KKİ) (Clinical Frailty Scale / Rockwood Frailty Index) kullanıldı (5, 11). "Canadian Study of Health and Aging" kapsamındaki çalışmalardan türetilmiş olan bu indeks hastaların günlük aktivite durumunu, hastalık semptomları yaşayıp yaşamadığını ve başkalarının yardımına ihtiyaç duyup duymadığını 1-9 arasında puanlandırılan bir skala olup, daha yüksek puanı olan kişiler hastalıklarla ilgili komplikasyonlar açısından daha riskli kişiler olarak kabul edilmektedir. KKİ puanlama sisteminde 1-3 arası puan alan hastalar genel olarak iyi durumda, 4 puan alanlar kırılabilirliğe duyarlı, 5-7 puan alanlar ise kırılabilir olarak değerlendirilir. İyileşmesi beklenmeyen ağır hastalar ve yaşamın son dönemindeki kişiler ise 8-9 puan alırlar (5, 11). Çalışmamızda KKİ değerlendirmesi deneyimli bir hekim tarafından hastanın kendisi, birinci derece yakını ve sorumlu hemodiyaliz hemşiresi ile görüşülerek yapıldı. Buna göre KKİ puanı 5-7 arası olan hastalar kırılabilir ve KKİ puanı 4-7 arası olanlar ise duyarlı veya kırılabilir olarak sınıflandırıldı. Bu yöntemle hem kırılabilir olan hastaları (KKİ; 5-7) diğerleri ile karşılaştırma hem de KKİ değerlendirmesinden 4 puan alan kırılabilirliğe duyarlı hastaları da dahil edip (KKİ; 4-7), sadece iyi durumdaki hastaları dışarıda bırakan ikinci karşılaştırma yapma imkanı elde edildi. Çalışma için belirlediğimiz dışlama kriterleri KKİ puanı 8-9 olabilecek ağır hastaları çalışma dışında bıraktı. KKİ sınıflamasına ait puanlama ve tanımlamalar Şekil 1'de görülmektedir.

HD hastalarında kognitif değerlendirme için Montreal Cognitive Assessment (MoCA) testi (orijinal versiyon 7,1) kullanıldı. Testler hastalara rutin bir HD seansının hemen öncesinde ayrı bir oda ve sakin bir ortamda, hekim eşliğinde uygulandı (12-14). MoCA testinde; yürütme (sayı takibi, küp ve saat çizme), adlandırma (hayvan adları), hafıza (hemen ve gecikmiş kelime hatırlama), dikkat (sayı ve harfleri yakalama, çıkarma işlemi), lisan (kelime ve cümle düzgünlüğü), soyutlama (benzer anlamlar) ve oryantasyon (zaman ve mekân uyumu) olacak şekilde toplam 7 alt grup puanlamasının toplamı, test uygulanan kişinin toplam MoCA skoru olarak belirlenmektedir. Maksimum MoCA skoru 30/30 olup, çalışmamızda toplam MoCA skoru < 24/30 olanlar, kognitif bozukluğa sahip HD hastaları olarak değerlendirildi (2, 14, 15). Tüm HD hastalarının kırılabilirlik durumu ve kognitif skorları belirlendikten sonra, kırılabilirlik ile kognitif bozukluk arasında olası ilişkiler araştırıldı.

1	Çok zinde	Oldukça hareketli, egzersiz yapan, dirençli, motive ve zinde kişiler
2	İyi	Genel olarak hareketli olup, aktif hastalık semptomu olmayan kişiler
3	İdareli iyi	Hastalıkları genel olarak kontrol altında olup, rutin yürütme dışında hareketli olmayan kişiler
4	Duyarlı	Başkalarına bağımlı olmayıp, çabuk yorulan veya hastalık semptomları nedeniyle aktivitesi kısıtlanan kişiler
5	Kırılabilir	Genel olarak yavaş hareket eden, ağır ev işleri ve seyahat için yardıma ihtiyaç duyabilen kişiler
6	Orta kırılabilir	Ev işleri ve ev dışı aktivitelerin tamamında yardım alan, merdiven çıkmakta zorlanan kişiler
7	İleri kırılabilir	Kişisel bakımda tamamen başkalarının bakımına muhtaç olan ancak genel durumu stabil kişiler

Şekil 1: Klinik kırılabilirlik indeksi (KKİ) puanlama; 1-7 (5, 11).

İstatistiksel analiz

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, for Windows, Version 18,0. Cicago: SPSS inc.) programı kullanıldı. Veriler ortalama±SD veya % olarak sunuldu. Sürekli verilerin normal dağılımı gösterip göstermediği Shapiro-Wilk yöntemiyle değerlendirildi. Kategorik değişkenlerin yorumu için Ki-kare ve Fischer's exact testleri kullanıldı. Sürekli değişkenlerin karşılaştırılmasında normal dağılım gösterenler için Student t-testi, normal dağılımda olmayanlar için Mann Whitney-U testi uygulandı. Korelasyon analizleri normal dağılım gösteren sürekli değişkenler için Pearson, normal dağılım göstermeyen sürekli değişkenler için Spearman testleri ile yapıldı. Çoklu lineer regresyon analizleri enter yöntemi ile yapılırken KKİ puanı bağımlı değişken olarak kullanıldı. Regresyon modeli oluşturulurken öncelikle KKİ puanına önemli etkisi olan değiştirici faktörler belirlendi. Diğer bağımsız değişkenler içinde, regresyona birer birer eklendiklerinde bu önemli değişkenlerin beta yükünde etki yaratmayan bazı bağımsız değişkenler modelinin dışında bırakılırken, yaş, cinsiyet ve komorbid hastalıklar modelin içinde sabit tutuldu. İstatistiksel yorumda p<0,05 olması anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Klinik bulgular, kırılabilirlik durumu ve kognitif değerlendirme

Hastaların yaş ortalaması 48,33±12,46 yıl olup, %64,7'si erkek cinsiyette idi. Kronik HD tedavisi gördükleri ortalama süre 64,6±50 ay ve ortalama eğitim süreleri ise 7,4±3,1 yıl olarak belirlendi. Diyabetes mellitus (DM), HT ve KVH sıklıkları ise sırasıyla %18,6, %45 ve %21,5 oranlarında saptandı. Tek havuzlu Kt/V değerleri ortalaması 1,51±0,15 bulundu. Tablo 1, çalışmaya dahil olan HD hastalarının demografik, klinik ve laboratuvar bulgularını içermektedir. Ortalama kırılabilirlik puanı, 102 HD hastasında 3,02±1,15 olarak bulundu. Klinik kırılabilirlik indeksi değerlendirmesine göre duyarlı veya kırılabilir olarak değerlendirilen hastaların toplamı 27 olurken (%26,5), yalnızca kırılabilir olarak sınıflandırılan hasta sayısı 13 (%12,7) bulundu. Hastaların

Tablo 1. HD hastalarının demografik, klinik ve laboratuvar bulguları

Değişken	HD hastaları (n=102)
Yaş; yıl	48,33±12,46
Yaş; yıl, min./maks.	21/65
Cinsiyet; erkek/kadın (%)	66 (64,7)/36 (35,3)
HD tedavi süresi; ay	64,66±50,08
Eğitim süresi; yıl	7,41±3,17
BKİ; kg/m ²	24,70±4,32
DM; n (%)	19 (18,6)
HT; n (%)	46 (45,0)
KVH; n (%)	22 (21,5)
Albumin; g/dL	4,03±0,32
CRP; mg/L	11,24±13,82
PTH; pg/mL	520,96±480,05
Hb; g/dL	11,67±1,73
Kt/V	1,51±0,15

BKİ, beden kitle indeksi; DM, diyabetes mellitus; HT, hipertansiyon; KVH, kardiyovasküler hastalık; CRP, C-reaktif protein; PTH, paratiroid hormon; Hb, hemoglobin.

Tablo 2. HD hastalarının kırılabilirlik durumu ve kognitif değerlendirmesi

Değişken	HD hastaları (n = 102)
KKİ	3,02±1,15
KKİ; min./maks.	2/6
KKİ 4-7; n (%)	27 (26,5)
KKİ 5-7; n (%)	13 (12,7)
MoCA	21,07±3,76
MoCA; min./maks.	12/29
MoCA < 24/30; n (%)	71 (69,6)

KKİ, klinik kırılabilirlik indeksi; MoCA, Montreal Cognitive Assessment.

ortalama MoCA toplam kognitif skoru $21,07 \pm 3,76$ olup, kognitif bozukluk olarak değerlendirilen hasta oranı ise %69,6 olarak saptandı. HD hastalarının kırılabilirlik durumu ve kognitif değerlendirmesine ait bulgular Tablo 2'de sunulmuştur.

Kırılabilirlik ile kognitif bulguların karşılaştırılması

HD hastalarında kırılabilirlik puanı ile kognitif skor arasında kuvvetli negatif korelasyon saptandı ($r = -0,607$, $p < 0,001$) (Tablo 3). Bu negatif korelasyon, kırılabilirliğe etki edebilecek hasta yaşı ve DM, KVH gibi komorbid hastalıklar için yapılan regresyon modelinden sonra anlamlılığını korudu ($p = 0,012$). Çoklu lineer regresyon analizinde KKI puanına önemli etki eden değişirici faktörler yaş, MoCA skoru ve KVH olarak belirlendi. (Tablo 4). Kognitif bozukluğu olan HD hastalarının (MoCA $< 24/30$) ortalama kırılabilirlik puanı, kognitif bozukluğu olmayanlardan anlamlı derecede yüksekti ($3,37 \pm 1,18$; $2,23 \pm 0,49$, $p < 0,001$). Kırılabilir olma (KKI; 5-7), kognitif bozukluğu olan HD hastalarında, olmayanlara göre anlamlı düzeyde artmıştı (%22,4; %0,0 $p = 0,011$). Duyarlı veya kırılabilir olma durumu da (KKI; 4-7), kognitif bozukluğu olan HD hastalarında olmayanlara nazaran artmış bulundu (%57,7; %3,3 $p < 0,001$). Kırılabilir olarak de-

ğerlendirilen 13 hastanın hepsinde kognitif bozukluk da mevcuttu. HD hastalarında kognitif skorum kırılabilirlik puanına göre dağılımı Şekil 2'de görülmektedir.

Kırılabilirlik ve kognitif skor ile klinik özelliklerin karşılaştırılması

Korelasyon analizinde kırılabilirlik puanı hasta yaşı ile kuvvetli pozitif korelasyon gösterirken ($r = 0,641$, $p < 0,001$), eğitim süresi, serum albumin düzeyi ve Kt/V ile negatif korelasyonlar gösterdi. HD süresi, CRP, PTH ve Hb değerleri KKI puanı ile korelasyon göstermedi. (Tablo 3). Duyarlı veya kırılabilir olarak değerlendirilen hastaların yaş ortalaması diğerlerinden anlamlı derecede yüksek bulunurken (59,9; 44,4, $p < 0,001$), benzer şekilde kognitif bozukluğu olan hastaların da yaş ortalaması artmıştı (51,7; 40,5, $p < 0,001$). Cinsiyete göre; erkek ve kadın hastaların ortalama KKI puanları ve ortalama MoCA skorları farklı değildi (sırasıyla E/K; $3,20 \pm 1,28$ / $2,69 \pm 0,78$ $p = 0,097$ ve E/K; $20,77 \pm 3,75$ / $21,61 \pm 3,75$ $p = 0,328$). Kırılabilirlik durumu ile ortalama BKİ arasında ilişki saptanmadı ($p = 0,541$).

HD hastalarında DM, HT ve KVH bulunması durumlarında, ortalama KKI puanlarının bu tanılara sahip olmamaya

Tablo 3. HD hastalarında kırılabilirlik ve kognitif skorla ilişkili faktörlerin korelasyon analizi

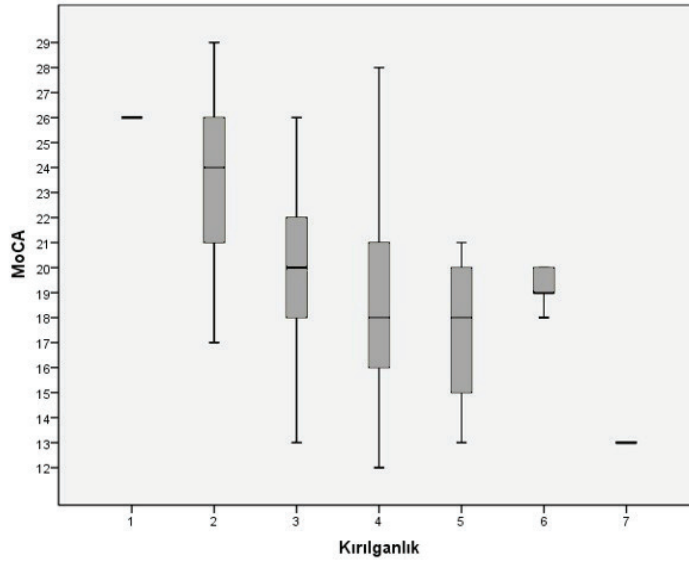
	KKI		MoCA	
	r	p	r	p
KKI	1	-	-0,607	<0,001
Yaş	0,641	<0,001	-0,539	<0,001
Eğitim süresi	-0,334	0,001	0,463	<0,001
HD süresi	-0,160	0,108	-0,001	0,992
Albumin	-0,204	0,039	0,233	0,018
CRP	0,184	0,065	-0,111	0,266
PTH	0,030	0,766	0,103	0,303
Hb	-0,171	0,086	0,097	0,334
Kt/V	-0,289	0,003	0,224	0,024

KKI, klinik kırılabilirlik indeksi; MoCA, Montreal Cognitive Assessment; CRP, C-reaktif protein; PTH, paratiroid hormon; Hb, hemoglobin.

Tablo 4. HD hastalarında kırılabilirlik puanına etki edebilecek faktörlerin regresyon analizi

	B	p	%95 GA
Yaş	0,034	<0,001	0,018~0,049
MoCA	-0,067	0,012	-0,120~-0,015
Cinsiyet	-0,036	0,173	-0,407~-0,282
DM	0,428	0,046	0,008~0,849
HT	0,228	0,175	-0,104 ~0,562
KVH	0,801	<0,001	0,368~1,234

GA, güven aralığı; MoCA, Montreal Cognitive Assessment; DM, diyabetes mellitus; HT, hipertansiyon; KVH, kardiyovasküler hastalık.



Şekil 2: HD hastalarında kognitif skorun kırılgnlık puanına göre dağılımı; box-plot grafiği. KKI, klinik kırılgnlık indeksi; MoCA, Montreal Cognitive Assessment.

göre anlamlı düzeylerde arttığı görüldü (sırasıyla; 3,5; 2,9, $p=0,004$, 3,3; 2,7, $p=0,002$ ve 4,1; 2,7, $p<0,001$). MoCA ortalama toplam kognitif skoru ile ilişkili saptanan tek komorbidite ise KVH idi ($p<0,001$). Kırılgnlık durumu (KKI; 5-7) ile komorbiditeler birebir karşılaştırıldığında ise, KVH tanısı ile anlamlı ilişki saptandı ($p<0,001$). Kırılgnlık puanı üzerine etki eden faktörlerin lineer regresyon analizi sonrasında da KVH tanısının kırılgnlık üzerine olan anlamlı etkisi görülmekteydi (Tablo 4). DM ve HT mevcudiyetleri ile birebir kırılgnlık arasında ilişki saptanmadı (sırasıyla; $p=0,659$ ve $p=0,202$).

TARTIŞMA

Fiziksel kırılgnlık ve kognitif bozukluk özellikle yaşlı insanları başkalarının yardımına muhtaç hale getirebilen sorunlardır. HD hastalarında kırılgnlık, daha sık hastane yatışı, düşme riski ve artmış mortalite ile ilişkili bulunmuştur (1, 3, 8, 16). KBH'yi; hızlanmış ateroskleroz, kemik mineral bozukluğu, immün yetersizlik, fiziksel inaktivite ve kognitif bozukluk gibi komplikasyonları bünyesinde barındıran bir geriyatrik sendrom olarak değerlendirmek mümkündür (6, 16, 17). Bu nedenle genç erişkin KBH olgularında ve özellikle de HD popülasyonunda kırılgnlık durumunu değerlendirmek akılcı olabilir. HD hastalarında oldukça sık rastlanan bir sorun olan kognitif bozukluk bu hastaların medikal tedavi ve diyet uyumlarını olumsuz etkileyerek mortaliteye katkı yapmaktadır (9, 17). SDBY hastalarında kırılgnlık ve kognitif bozukluğun temelinde yaşlanmanın yanı sıra iskemik hasar ve vasküler olmayan bazı faktörlerin bulunması nedeniyle, bu iki problem arasında takvim yaşından bağımsız bir ilişki ve hatta bir sebep sonuç ilişkisi bulunması olasıdır. Bu çalışmada genç erişkin

HD hastalarında kırılgnlık ile kognitif bozukluk arasındaki ilişki araştırıldı. Sonuçlar duyarlı ve/veya kırılgn olmanın kognitif bozukluk ile ilişkili olabildiğini ve KKI puanı ile MoCA kognitif skoru arasında yaş ve komorbid hastalıklardan bağımsız bir negatif korelasyon bulunabildiği gösterdi.

Kırılgnlık sağlık sorunlarının kötü sonlanım noktalarına ulaşabileceğine işaret eden bir tanımlardır. Kırılgnlık tanımı ilk kez Fried L. ve ark. tarafından fizyolojik rezervleri azalmış, hastalıklara duyarlı ve yardıma ihtiyacı olan yaşlı kimseleri anlatmak için kullanılmıştır (kırılgn fenotip) (4). Bu tanımlama kapsamındaki temel özellikler sarkopeni olup, değerlendirmesinde kilo kaybı, kuvvet kaybı, çabuk yorulma, hareketlerde yavaşlama ve fiziksel inaktivite gibi ölçütler kullanılır (4, 6). Fried yöntemi, 65 yaş üstü sağlıklı kabul edilen bireylerde kas gücü ve yürüme hızı değerlendirilerek oluşturulan bir yöntem olduğu için, HD hastaları gibi özel popülasyonlarda komorbid hastalıklar veya depresyon gibi faktörlerin varlığında kırılgnlık sıklığının olduğundan yüksek saptanmasına neden olabilir düşüncesindeyiz. Öyle ki, bu yöntemle HD hastalarını değerlendiren çalışmalarda kırılgnlık sıklığı oldukça değişkendir (~%15-70) (7, 18-20).

Kırılgnlık durumunun belirlenmesinde kabul görmüş diğer bir değerlendirilme ise KKI'dir (5, 11). KKI, hastanın organ sistemindeki bozulmaları ve komorbiditelerin etkilerini topluca ele alabilen kullanışlı bir değerlendirme yöntemidir. Bu yöntem kırılgnlık durumuna sayısal bir ölçüt sağladığı için hastanın durumundaki iyileşme veya kötüleşmeyi zaman içinde takip etmek mümkün olabilir. KKI ile kırılgnlık değerlendirmesinin kronik HD popülasyonu

için daha uygun bir yöntem olduğunu düşünmekteyiz. Yaşlı HD hastalarını KİK ile değerlendiren bir çalışmada (n=122) kırılgnlık sıklığı %42,6 olarak saptanmıştır (21). Alfaadhel ve ark.'nın yaş ortalaması 63 olan 390 HD hastasını KİK ile inceleyen bir çalışmalarında ise kırılgnlık sıklığını (KİK; 5-7) %26 bulunmuştur (22). Çalışmamızda HD hastalarında KİK'ye göre kırılgnlık sıklığını %12,7, duyarlı veya kırılgn olmayı ise (KİK; 4-7) %26,5 oranda saptadık. Olgu sayımız düşük olsa da dışlama kriterlerimiz düşünüldüğünde, yaş ortalaması 48,3 olan hastalarımızdaki bu sonucun kıymetli olabileceği kanısındayız.

Sağlıklı yaşlılarda kırılgnlık durumu ile takvim yaşı arasında daima kuvvetli bir korelasyon bulunur. Yaşlı SDBY hastalarında ise kırılgnlık sıklığı aynı yaş grubundaki sağlıklı popülasyondan yaklaşık 3 kat daha yüksektir (7). HD hastalarında kırılgnlık ve kognitif bozukluğun yaşlanma ile artıyor olmasına rağmen, her iki durumun da takvim yaşından bağımsız olarak mortalite ile ilişkili olabildiği görülmüştür (9, 23, 24). Yine de HD hastalarında kırılgnlık durumunu ve kognitif bozukluğu inceleyen meta-analizlere göre, değerlendirilen hastaların büyük oranda 60 yaşın üstünde olduğu ve yaşam beklentisi kısalmış ağır hastaların da dahil edilebildiği görülmektedir (7, 17, 23). Genç erişkin HD hastalarında kırılgnlık durumunu değerlendiren yeterince çalışma bulunmamaktadır. Çalışma sonuçlarımız kırılgnlık puanının beklendiği üzere yaşlanma ile birlikte arttığını ancak HD hastaları özelinde komorbid hastalıklar ve kognitif bozukluğun da kırılgnlık durumuna yaşlanma kadar etki edebildiğini gösterdi.

Kognitif bozukluk HD hastalarında oldukça sık görülür ve bu hasta popülasyonunda kognitif bozukluğun başta KVH olmak üzere komorbid durumlar ve mortalite ile ilişkili olabildiği gösterilmiştir (1, 14). MoCA SDBY hastalarında kognitif işlevleri değerlendirmek için oldukça kullanışlı ve güvenilirliği kanıtlanmış bir testtir. Bu testte yürütme ve hafıza becerileri ile ilgili kognitif değerlendirmelere kapsamlıca yer verilmiştir. Bu özellikler sayesinde KBH ilişkili kognitif bozukluğu daha yüksek bir oranda ve daha erken safhalarda saptayabilmek mümkün olmaktadır (2, 14). Daha önceki çalışmalarda MoCA kognitif testi ile HD hastalarında kognitif bozukluğun belirlenmesi için kabul görmüş olan sınır değerler <25/30 ve <24/30 olarak belirtilmiştir (14, 15). Çalışmamızda spesifiteyi artırabilmek adına hasta popülasyonumuzun eğitim durumunu da göz önüne alarak <24/30 sınır değerini kullandık. Buna göre HD hastalarımızda kognitif bozukluk sıklığını %69,6 bulduk. Güncel literatürde HD hastalarında kognitif bozukluk sıklığı ~%60-80 arasında belirtilmektedir (2, 9, 14). Çalışmamızın sonuçları genç HD hastalarında dahi kognitif bozukluğun oldukça sık görülebildiğine işaret etmektedir. Kognitif bozukluğun sıklığı düşünüldüğünde, bu durumun genç erişkin HD hastalarını isteksiz, hareketsiz ve kendi sağlık durumlarını umursamaz bir hale sokarak kırılgnlığa yol açabildiği kanısındayız. Literatürde de HD hastalarında

kognitif bozukluk ile kırılgnlık durumu arasında ilişki olabildiğini gösteren sonuçlar mevcuttur (1, 17, 23).

HD hastalarında kırılgnlık ile ilişkili olan durumlar arasında KVH ve DM, HT gibi kardiyovasküler risk faktörleri önemli yer tutar (7, 23). Çalışmamızda KVH tanısı olan hastalarımızda hem kırılgnlık hem de kognitif bozukluk sıklığını anlamlı düzeyde artmış bulduk. HD hastalarında kognitif bozukluk ve/veya kırılgnlığın önemli bir sebebi de serebrovasküler hastalıktır (2). Kognitif bozukluğun doğrudan sebebi olabileceği ve kognitif bozukluk ile kırılgnlık arasındaki ilişkiyi etkileyebileceği için serebrovasküler hastalık tanısı olan hastaları çalışmamıza dahil etmedik. Diğer yandan HD hastalarında kanıtlanmış serebrovasküler hastalık olmadan beyinde mikrovasküler, subklinik iskemiyeye bağlı beyaz cevher hasarı oluşabildiği ve bunun da kognitif bozuklukla ilişkili olabildiği belirtilmiştir (2, 25). Kalp beyin ve böbrek yüksek volümlü ve düşük vasküler dirençli dolaşıma sahip organlardır (17). Sonuçta bu durum her üçünü de mikrovasküler hasara karşı duyarlı ya da başka bir deyişle kırılgn hale getirebilmektedir.

Yaşlı HD hastalarında malnutrisyon, inflamasyon, anemi, hormonal dengesizlikler ve kognitif bozukluğun kırılgnlığa yol açabildiği bildirilmiştir (6, 23). Dolayısıyla HD hastalarında kırılgnlık durumu vasküler yaşlanma ve sarkopeninin ötesinde başka faktörlerle de ilişkili olabilir gibi görülmektedir (6). Kırılgnlık ile anemi arasında ilişki gösteren sonuçlar mevcuttur. Bunun nedeni aneminin çabuk yorulmaya ve kas kuvvetinde azalmaya yol açmasıdır (26). Buna karşın anemi ile kognitif bozukluk arasında gösterilmiş net bir ilişki yoktur (17, 27). Çalışmamızda HD hastalarının Hb düzeyleri, KİK puanı ve kognitif skor ile ilişkili bulunmadı. Yaşlı insanlarda yüksek PTH seviyeleri ile kırılgnlık arasında ilişki gösterilmiştir. PTH, D vitamini eksikliği ve hücre içi kalsiyum artışı üzerinden kas işlevlerini bozarak kırılgnlığa yol açabilmektedir (7, 28). Hastalarımızın PTH düzeyleri ile KİK puanları arasında ilişki gözlenmedi. Çalışmamızda Kırılgnlık puanı ile serum albumin düzeyleri ve tek havuzlu Kt/V değerleri arasında negatif korelasyonlar izlendi ancak ciddi kısıtlamaları olmayan genç HD hastalarında kognitif bozukluğun kırılgnlık durumuna etkisini araştırdığımız için, malnutrisyonu olan, diyaliz yetersizliği olan ve kalp yetersizliği olan HD hastalarını çalışmaya dahil etmedik. Dolayısıyla bu korelasyonların kırılgnlık üzerine olan doğru etkileri gösterebileceğinden emin değiliz. Bu değişkenler aynı zamanda, KİK puanını değiştiren faktörlerin beta yüküne etki etmediğilerinden, son regresyon modeline dahil edilmedi. Hastaların eğitim gördükleri süre de kırılgnlık puanı ile negatif korelasyon gösterdi. Bu sonucun ise, kırılgnlık doğrudan puanına etki ettiğini gösterdiğimiz MoCA kognitif skoru ile eğitim durumu arasındaki birebir ilişkinin bir yansıması olduğunu kanaatindeyiz. Kırılgnlık puanı ile serum CRP düzeyi arasında korelasyon saptamadık. Buna rağmen daha büyük bir örneklem ile çalışıldığında farklı sonuçlar bulunabileceğini düşünüyoruz.

Kırılabilirliğin düzeltilmesinde HD hastalarına egzersizden özendirilmesi çok önemlidir. Egzersiz bu hastalarda sadece kas iskelet sistemi üzerine değil, immün sistem ve merkezi sinir sistemine faydalı etkiler de ortaya çıkarır (17, 29). Bununla beraber, yeterli protein alımının sağlanması ve D vitamini tedavisi unutulmamalıdır (1, 6). Diyaliz yeterliliğinin artırmanın ise gerek kırılabilirlik durumuna gerekse kognitif bozukluğa olumlu etkisi gösterilememiştir (9).

HD hastalarındaki kognitif değerlendirilmenin sağlıklı bireylerinkinden farklı özellikler içermesi ve genç erişkin sağlıklı popülasyonda kırılabilirlik durumunu değerlendirmenin anlamlı bir sonuç vermeyecek olması nedeniyle çalışmamıza kontrol grubu dahil etmedik. Çalışmamızın kısıtlayıcı noktaları olarak kesitsel çalışma tasarımı ve olgu sayısının azlığı sayılabilir. Yaşlı hastaları ve doğrudan kırılabilirlik veya kognitif bozukluğa yola açabilecek bazı durumları dışlamış olmamız olgu sayımızın istenilen seviyeye ulaşmasını zorlaştırdı.

SONUÇ

HD hastalarındaki kırılabilirlik sıklığının oldukça yüksek olması onlardaki biyolojik yaşlanmanın bir göstergesidir. Yaşlı HD hastalarında kırılabilirlik ve fiziksel inaktivite hem kognitif bozukluk hem de mortalite ile ilişkili bulunmuştur (7, 17). Buradan hareketle yaptığımız bu çalışmada, komorbidite oranları düşük olan genç HD hastalarında dahi kognitif bozukluğun ne denli sık olduğunu ve bu durumun fiziksel kırılabilirlikle ilişkili olabildiğini gösterdik.

Her yaşta HD hastasının uygun yöntemlerle kırılabilirlik ve kognitif bozukluk açısından değerlendirilmesi gerektiği kanısındayız. KKİ ile duyarlı ve/veya kırılabilir olarak değerlendirilenlerin multidisipliner bir yaklaşımla sarkopeni ve komorbidite ilişkili sorunlardan arındırılması faydalı olacaktır. Kognitif bozukluk haftalarında ise depresyon ve sessiz serebrovasküler hastalık dışlandıktan sonra, bu hastaların KVH, egzersiz ve beslenme konularında bilgilendirilmesi kötü prognoza sahip kırılabilir kişiler olmalarını önleyebilir.

Etik Komite Onayı: Etik komite onayı bu çalışma için, yerel etik komiteden alınmıştır.

Bilgilendirilmiş Onam: Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- E.E., N.U.; Veri Toplama- E.E., G.A., F.B.G.; Veri Analizi/Yorumlama- E.E., O.A., Ö.G., N.U.; Yazı Taslağı- E.E., G.A., F.B.G.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- E.E., O.A., Ö.G., N.U.; Son Onay ve Sorumluluk- E.E., G.A., F.B.G., N.U., O.A., Ö.G.; Süpervizyon- E.E.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the local ethics committee.

Informed Consent: Written consent was obtained from the participants.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study- E.E., N.U.; Data Acquisition- E.E., G.A., F.B.G.; Data Analysis/Interpretation- E.E., O.A., Ö.G., N.U.; Drafting Manuscript- E.E., G.A., F.B.G.; Critical Revision of Manuscript- E.E., O.A., Ö.G., N.U.; Final Approval and Accountability- E.E., G.A., F.B.G., N.U., O.A., Ö.G.; Supervision- E.E.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: Authors declared no financial support.

KAYNAKLAR

1. Seliger SL. Frailty and Cognitive Impairment in ESRD: Brain-Body Connections. Clin J Am Soc Nephrol 2015; 10(12):2104-2106. [CrossRef]
2. İlyasere O, Okai D, Brown E. Cognitive function and advanced kidney disease: longitudinal trends and impact on decision-making. Clin Kidney J 2017;10(1):89-94. [CrossRef]
3. Johansen KL, Delgado C, Bao Y, Kurella Tamura M. Frailty and dialysis initiation. Semin Dial 2013;26(6):690-6. [CrossRef]
4. Fried LP, Tangen CM, Walston J, Newman AB, Hirsch C, Gottdiener J, et al. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. Frailty in older adults: evidence for a phenotype. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2001;56(3):146-56. [CrossRef]
5. Morley JE, Vellas B, van Kan GA, Anker SD, Bauer JM, Bernabei R, et al. Frailty consensus: a call to action. J Am Med Dir Assoc 2013;14(6):392-7. [CrossRef]
6. Musso CG, Jauregui JR, Macías Nú- ez JF. Frailty phenotype and chronic kidney disease: a review of the literature. Int Urol Nephrol 2015;47(11):1801-7. [CrossRef]
7. Chowdhury R, Peel NM, Krosch M, Hubbard RE. Frailty and chronic kidney disease: A systematic review. Arch Gerontol Geriatr 2017;68:135-42. [CrossRef]
8. McAdams-DeMarco MA, Law A, Salter ML, Boyarsky B, Gimenez L, Jaar BG, Walston JD, Segev DL. Frailty as a novel predictor of mortality and hospitalization in individuals of all ages undergoing hemodialysis. J Am Geriatr Soc 2013;61(6):896-901. [CrossRef]
9. Kurella Tamura M, Larive B, Unruh ML, Stokes JB, Nissenson A, Mehta RL, Chertow GM; Frequent Hemodialysis Network Trial Group. Prevalence and correlates of cognitive impairment in hemodialysis patients: the Frequent Hemodialysis Network trials. Clin J Am Soc Nephrol. 2010; 5(8):1429-38. [CrossRef]
10. National Kidney Foundation Hemodialysis Adequacy 2015 Work Group. KDOQI Clinical Practice Guideline for Hemodialysis Adequacy: 2015 update. Am J Kidney Dis 2015;66(5):884-930.

11. Rockwood K, Song X, MacKnight C, Bergman H, Hogan DB, McDowell I, Mitnitski A. A global clinical measure of fitness and frailty in elderly people. *CMAJ* 2005;173(5):489-95. [\[CrossRef\]](#)
12. Nasreddine ZS, Phillips NA, Bédirian V, Charbonneau S, Whitehead V, Collin I, Cummings JL, Chertkow H. The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment. *J Am Geriatr Soc* 2005;53(4):695-9. [\[CrossRef\]](#)
13. Tholen S, Schmaderer C, Kusmenkov E, Chmielewski S, Förstl H, et al. Variability of cognitive performance during hemodialysis: standardization of cognitive assessment. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2014;38(1-2):31-8. [\[CrossRef\]](#)
14. Angermann S, Baumann M, Steubl D, Lorenz G, Hauser C, et al. Cognitive impairment in hemodialysis patients: Implementation of cut-off values for the Montreal Cognitive Assessment (MoCA) - test for feasible screening. *PLoS One* 2017;12(10):e0184589. [\[CrossRef\]](#)
15. Tiffin-Richards FE, Costa AS, Holschbach B, Frank RD, Vassiliadou A, Krüger T, et al. The Montreal Cognitive Assessment (MoCA) - a sensitive screening instrument for detecting cognitive impairment in chronic hemodialysis patients. *PLoS One* 2014;9(10):e106700. [\[CrossRef\]](#)
16. Erken E, Ozelsancak R, Sahin S, Yılmaz EE, Torun D, Leblebici B, Kuyucu YE, Sezer S. The effect of hemodialysis on balance measurements and risk of fall. *Int Urol Nephrol* 2016;48(10):1705-11. [\[CrossRef\]](#)
17. Shen Z, Ruan Q, Yu Z, Sun Z. Chronic kidney disease-related physical frailty and cognitive impairment: a systemic review. *Geriatr Gerontol Int* 2017;17(4):529-44. [\[CrossRef\]](#)
18. Roshanravan B, Khatri M, Robinson-Cohen C, Levin G, Patel KV, de Boer IH, et al. A prospective study of frailty in nephrology-referred patients with CKD. *Am J Kidney Dis* 2012;60(6):912-21. [\[CrossRef\]](#)
19. McAdams-DeMarco MA, Tan J, Salter ML, Gross A, Meoni LA, Jaar BG, Kao et al. Frailty and Cognitive Function in Incident Hemodialysis Patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2015;10(12):2181-9. [\[CrossRef\]](#)
20. Bao Y, Dalrymple L, Chertow GM, Kaysen GA, Johansen KL. Frailty, dialysis initiation, and mortality in end-stage renal disease. *Arch Intern Med* 2012;172(14):1071-7. [\[CrossRef\]](#)
21. Iyasere OU, Brown EA, Johansson L, Huson L, Smee J, Maxwell AP, Farrington K, Davenport A. Quality of Life and Physical Function in Older Patients on Dialysis: A Comparison of Assisted Peritoneal Dialysis with Hemodialysis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2016;11(3):423-30. [\[CrossRef\]](#)
22. Alfaadhel TA, Soroka SD, Kiberd BA, Landry D, Moorhouse P, Tennankore KK. Frailty and mortality in dialysis: evaluation of a clinical frailty scale. *Clin J Am Soc Nephrol* 2015;10(5):832-40. doi: 10.2215/CJN.07760814. [\[CrossRef\]](#)
23. Kallenberg MH, Kleinvelde HA, Dekker FW, van Munster BC, Rabelink TJ, van Buren M, Mooijaart SP. Functional and Cognitive Impairment, Frailty, and Adverse Health Outcomes in Older Patients Reaching ESRD-A Systematic Review. *Clin J Am Soc Nephrol* 2016;11(9):1624-39. [\[CrossRef\]](#)
24. Kutner NG, Zhang R, Huang Y, McClellan WM, Soltow QA, Lea J. Risk factors for frailty in a large prevalent cohort of hemodialysis patients. *Am J Med Sci* 2014;348(4):277-82. [\[CrossRef\]](#)
25. Nakatani T, Naganuma T, Uchida J, Masuda C, Wada S, Sugimura T, Sugimura K. Silent cerebral infarction in hemodialysis patients. *Am J Nephrol* 2003;23(2):86-90. [\[CrossRef\]](#)
26. Hirani V, Naganathan V, Blyth F, Le Couteur DG, Kelly P, Handelsman DJ, Waite LM, Cumming RG. Cross-Sectional and Longitudinal Associations Between Anemia and Frailty in Older Australian Men: The Concord Health and Aging in Men Project. *J Am Med Dir Assoc* 2015;16(7):614-20. [\[CrossRef\]](#)
27. Kurella Tamura M, Xie D, Yaffe K, Cohen DL, Teal V, Kasner SE, et al. Vascular risk factors and cognitive impairment in chronic kidney disease: the Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) study. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011;6(2):248-56. [\[CrossRef\]](#)
28. Tajar A, Lee DM, Pye SR, O'Connell MD, Ravindrajah R, Gielen E, et al. The association of frailty with serum 25-hydroxyvitamin D and parathyroid hormone levels in older European men. *Age Ageing* 2013;42(3):352-9. [\[CrossRef\]](#)
29. Bonanni A, Mannucci I, Verzola D, Sofia A, Saffioti S, Gianetta E, Garibotto G. Protein-energy wasting and mortality in chronic kidney disease. *Int J Environ Res Public Health* 2011;8(5):1631-54. [\[CrossRef\]](#)

İKİ FARKLI MEME KANSERİ HÜCRE HATTINDA FLORESAN İŞARETLİ MAACKIA AMURENSIS-LEKTİN-1 VE WHEAT GERM AGLUTİNİNİN HÜCRE YÜZEY GLİKAN PROFİLLERİNDEKİ FARKLI ETKİLERİ

EFFECTS OF FLUORESCENT MARKED MAACKIA AMURENSIS-LECTIN-1 AND WHEAT GERM AGLUTIN ON THE CELL SURFACE GLYCAN PROFILES IN TWO DIFFERENT BREAST CANCER CELL LINES

Günnur DEMİRCAN¹ , Yosun MATER² 

¹İstanbul Bilim Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²Gebze Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul, Türkiye

ORCID IDs of the authors: G.D. 0000-0001-7355-9065; Y.M. 0000-0002-7161-0637

Cite this article as: Demircan G, Mater Y. Effects of fluorescent marked maackia amurensis-lectin-1 and wheat germ agglutin on the cell surface glycan profiles in two different breast cancer cell lines. J Ist Faculty Med 2019;82(2):89-95. doi: 10.26650/IUITFD.429263

ÖZET

Amaç: Meme kanseri teşhisinde patolojik tetkikler gibi birçok yöntem kullanılmaktadır. Tüm bu tetkiklerin ve yöntemlerin yanı sıra, kanser araştırmalarında glikobiyolojinin de önemi oldukça artmıştır. ER (+) özellik gösteren MCF-7 ve ER (-) özellik gösteren MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarının zar yüzeylerinde görülen şeker rezidüleri miktar farklılıkları FITC-(*Maackia Amurensis-Lectin-1*) Ve FITC-(Wheat Germ Agglutin) ile spesifik olarak işaretlenmiş ve ışına yoğunluğu göreceli olarak irdelenmiştir. Bu yöntem ile meme kanseri hücre soylarının membranlarında bulunan sialik asit birimlerindeki farklılıkları iki saat gibi kısa bir zamanda, hassas olarak ayrılabilirliğinin açıkça ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soyları kullanılmıştır. Çalışmada kullanılması planlanan floresan işaretli lektinler [FITC-(*Maackia Amurensis-Lectin-1*) Ve FITC-(Wheat Germ Agglutin)] ilgili firmalardan satın alınmış ve kullanım protokolüne uygun olarak hazırlanıp işaretlemeler yapılmıştır.

Bulgular: MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarına FITC işaretli *Maackia amurensis* lektini-1 uygulanmıştır. Buna göre; MDA-MB-231 hücre hattı MCF-7'a göre göreceli olarak daha yoğun bir ışına göstermiştir. Aynı kanser hücre hatlarına FITC işaretli Wheat Germ Agglutinin uygulanmıştır. Bu işaretleme sonucunda da her iki kanser hattında da benzer yoğunlukta ışına tespit edilmiştir.

Sonuç: Çalışmada kullanılan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hat-

ABSTRACT

Objective: Many methods such as pathological examinations are used to diagnose breast cancer. In addition to all these tests and methods, the use of glycobiology has also increased significantly in cancer research. Differences in sugar residues observed on the membrane surfaces of breast cancer cell lines ER (+) -creating MCF-7 and ER (-) MDA-MB-231 were specifically marked with FITC-(*Maackia Amurensis-Lectin-1*) Ve FITC-(Wheat Germ Agglutin) The intensity of radiation is discussed relatively. The aim of using this method is to clearly reveal that the differences in the sialic acid units in the membranes of breast cancer cell lines can be precisely separated in as little as two hours.

Material and Method: MCF-7 and MDA-MB-231) cells were used in our study. [FITC-(*Maackia Amurensis-Lectin-1*) Ve FITC-(Wheat Germ Agglutin)] were purchased from the respective companies. Following this step, the FITC marked products were prepared and marked according to usage protocols.

Results: FITC-labeled *Maackia amurensis* Lectin-1 was applied to MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines. Subsequently, the MDA-MB-231 cell line showed a relatively more intense radiation than the MCF-7. The FITC marked Wheat germ agglutinin was applied to the same cancer cell lines. As a result of this marking, radiation of similar intensity was detected in both cancer lines.

Conclusion: These differences seen in the membranes of the

İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: gunnurbio@yahoo.com

Geliş tarihi/Received Date: 31.05.2018 • **Kabul tarihi/Accepted Date:** 21.03.2019

©Telif Hakkı 2019 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2019 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

larının membranların da görülen bu farklılıklar önemli bulunmuştur. Hücrelere uygulanan iki saatlik boyama yöntemi ile iki farklı meme kanseri hücre tipi hızlı bir şekilde ayrılmıştır. Aynı zamanda immünofloresan işaretli lektinler yardımıyla, glikokonjugatların, hızlı ve özgün ayırma kullanılabilirliği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, lektin, glikolizasyon

MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines used in the study are significant. Two different types of breast cancer cell types were rapidly separated using the two hour staining method applied to the cells. At the same time, with the help of immunofluorescent-labeled lectins, the availability of glycoconjugates was demonstrated for rapid and specific discrimination.

Keywords: Breast Cancer, lectin, glycolization

GİRİŞ

Kanser, hasarlı hücrelerin vücudun herhangi bir yerinde kontrol dışı çoğalıp, o bölgenin de dışına yayılmasından ileri gelen hastalıkların genel adıdır. İstatistiklere göre, yaşayan her beş kişiden bir tanesi yaşantısının bir döneminde kanser ile karşı karşıya gelmiştir. İlerleyen tıp ve uygulanan tüm yeni tedavi yaklaşımlarına karşın halen kanserden ölümler gelişmiş toplumlarda ikinci sırada yer almaktadır (6).

Dünyanın hemen her bölgesinde meme kanseri önemli bir sağlık sorunudur. Kadınlar arasında en sık görülen kanser türüdür. Akciğer kanserinden sonra kansere bağlı ölümlerde ikinci sırada yer almaktadır (23). Yaklaşık her 10 kadından birinin yaşam boyunca bu hastalığa yakalanma riskinin ve yakalananların üçte birinin de yaşamlarını bu hastalık nedeniyle kaybetme risklerinin olduğu bildirilmektedir (5). Bu son derece önemli sağlık sorununa çözüm bulmak birçok araştırmacı için ilk hedef olmuştur.

Meme kanserine yakalanma riski yaşın ilerlemesine bağlı olarak artmaktadır ancak bu artış menopoz sonrasında yavaşlamaktadır. Bu, meme kanserinin hormon bağımlı bir hastalık olduğunu ve post-menopoz evresindeki kadınlarda östrojen ve özellikle progesteron konsantrasyonlarında azalma olduğu ortaya çıkarmaktadır (11).

Meme kanseri oluşumunda birçok risk faktörü tanımlanmıştır. Risk faktörleri arasında genetik faktörler meme kanseri oluşumunda önemli bir yere sahiptir.

İnsan meme kanserlerinin yaklaşık olarak %40'ı p53 mutasyonlarından kaynaklanmaktadır. Bunun dışında en yaygın kalıtsal meme kanseri genleri BRCA1 ve BRCA2'dir. Bu genler DNA zincir kırıklarının tamirinde görev alırlar (11).

Ancak bu genlerde bozukluk veya mutasyonlar olursa meme kanseri riskinde artış meydana gelir. Anormal BRCA1 ve BRCA2 genleri tüm meme kanserlerinin yaklaşık %10'undan sorumludur (8).

Östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 (human epidermal growth factor receptor-2- [HER-2]) hem prognostik hem de prediktif değer taşır. Son yıllarda biyolojik ve moleküler faktörlerin, prognostik ve prediktif açıdan önemi artmaktadır (9).

ER hastalığının etiolojisinde en önemli rolü oynamaktadır.

Risk faktörlerinin pek çoğu doğrudan veya dolaylı olarak östrojen etkisine sahiptir. Meme kanserinde ER ve HER-2 uygun tedavinin seçilmesinde önemli rol oynar (15). ER parafin kesitlerde immünohistokimyasal olarak değerlendirilir (24).

Patolojik tetkikler, kanserin teşhisi için altın standarttır. Bu tetkiklerin, kanserin etiolojisinin patogenezinde, hastalığın klinik olarak korelasyon ve belirtilerinin belirlenmesinde önemli rolü vardır. En yeni moleküler teknolojiler, özellikle high-throughput teknolojiler, meme kanserinin morfolojik olarak benzer alt tiplerinin bile moleküler heterojenite gösterebildiğini tespit edebilmektedir. Örneğin, infiltre duktal karsinomanın en azından 4 moleküler alt tipe ayrıldığı tespit edilebilmiştir. Bu alt tipler; luminal (ER+, PR+, Her-2/neu-), Her-2 overexpressing (ER-, PR-, Her-2+), Bazal benzeri (ER+, PR-, Her-2-, CK5/6+, EGFR+), normal meme benzeri (ER-, PR-, Her-2-) olarak belirtilmiştir. Her bir tipin farklı klinik sonuçları bulunmaktadır. Bu alt tiplerde çoğalan (proliferatif) gen ekspresyonu çok pahalı moleküler testler olan Ki67, Her-2, PR ve ER'i içeren immünohistokimyasal markerlarla belirlenir (2).

Tüm bu tetkiklerin ve yöntemlerin yanı sıra, son yıllarda, kanser araştırmalarında glikobiyolojinin de önemi oldukça artmıştır. Glikolizasyon, çeşitli fizyopatolojik süreçleri kontrol edebilen bir anahtar düzenleyici mekanizma olarak hareket edebilir. İnsanlarda glikolizasyondaki bozukluklar hastalıklara yol açabilir. İnsanlarda bulunan glikom önemli miktarda biyolojik bilgi içermektedir (20).

Glikozilasyon en önemli ve yaygın post translasyonel modifikasyonlardan bir tanesidir. İnsan proteinlerinin %50'den fazlasının glikolize olduğu bilinmektedir. Glikolizasyon, protein stabilizasyonu, doku yapılarını koruma, hücre-hücre adezyonu ve hücre-matriks eki gibi birçok fizyolojik fonksiyon ve biyolojik yolakta yer alır (18).

N-bağlı veya O-bağlı glikolizasyon protein glikolizasyonunun tipleridir. İnflamatuvar deri hastalıkları, diabetes mellitus, kardiyovasküler hastalıklar, romatoid artrit, Alzheimer, prion hastalıkları ve kanser gibi birçok hastalıkta anormal glikozilasyon gözlemlenmiştir (13).

Lektinler, belirli bir tür glikana özgül afiniteye sahip olan glikoproteinlerdir. Lektin afinitesi zenginleşmesi, lektinlerin özel bir glikan kalıntısı veya bağlantı tipine özgüllüğünü kullanan başlıca tekniklerden biridir. Şu anda yaygın olarak kullanılan iki glikoprotein / glikopeptid zenginleş-

tirme tekniği olarak kabul edilmektedir. Örneğin, Wheat Germ Agglutinin (WGA), esas olarak bir glikan yapısında olan N-Asetil Glikozamin (GlcNAc) residüleri ile etkileşir.

Kanser hücre yüzeylerinde yer alan zengin glikan yapısının da onlara spesifik olarak bağlanabilen lektinler yardımıyla gösterilmesi mümkündür. Bununla birlikte, çok çeşitli glikanları yakalamak ve zenginleştirmek için bir multilektin karışımı kullanılmıştır. Akciğer, meme ve karaciğer de dahil olmak üzere farklı kanser tipleri ile ilişkili glikoproteomik değişiklikleri incelemek için etkili bir şekilde lektin zenginleştirme tekniği kullanılmıştır (25).

Yang ve ark. duktal karsinoma in situ (DCIS) ve invaziv meme kanseri (IBC) tanısı koyulan hastaların kan serumundaki glikoproteinlerdeki değişiklikleri değerlendirmek için lektin zenginleştirme tekniğini kullanmışlardır. Mannoz, Galaktoz ve GlcNAc / sialik asit residülerini yakalamak için concavalin A (ConA), Jacalin (AIL) ve WGA kullanılarak multilektin afinite zenginleştirme uygulamışlardır (30).

Whelan ve ark. hidrazid kimya temelli zenginleştirme kullanarak, üç meme kanseri hücre hattından N-bağlı membran glikoproteomikleri çalışmasını bildirmişlerdir. Kullanılan hücre soylarından MCF-7, ER ve PR (+) ve Her-2 (-), MDA-MB-453, ER ve PR (-) ve Her-2 (+) ve MDA-MB-468, ER ve PR ve Her-2 (-) (üçlü negatif) özellikleri taşımaktadır (29).

Yapılan çalışmada, ER (+) olan MCF-7 ve ER (-) olan MDA-MB-231 meme kanser hücre hatlarını oluşturan hücrelere, hücre zar yüzeylerinde yer alan bir tür galaktoz (Gal β 4GlcNAc) şekerine özgün olarak bağlanabilen floresan (FITC) işaretli *Maackia amurensis* lektin-1 (FITC-[MAL-I]) ve bazı sialik asit tiplerine (GlcNAc, Neu5Ac) ve özellikle β tipi N-Asetil Glikozamin (β -GlcNAc) sialik asit şekerine özgün olarak bağlanabilen floresan işaretli Wheat Germ Agglutinin (FITC-*Triticum vulgaris* [WGA]) uygulanmıştır.

Böylece ER (+) ve ER (-) özelliklere sahip adı geçen kanser hücre hatlarının zar yüzeylerinde görülen şeker residüleri

miktar farklılıkları FITC-[MAL-I] ve FITC-[WGA] ile spesifik olarak işaretlenmiş ve ışığa yoğunluğu göreceli olarak iridelenmiştir.

Bu amaçla çalışmamızda MCF-7 ve MDA-MB-231, ER (+) ve ER (-) kanser hücre hatlarına FITC-[MAL-I] uygulanarak, kanser hücre yüzeylerindeki Gal β 4GlcNAc tipi glikan birimlerine spesifik bağlanma özelliği sayesinde bu birimler görülür hale getirilmiştir. Aynı uygulama FITC-[WGA] kullanılarak, sialik asit (GlcNAc, Neu5Ac) birimleri ve özellikle β -GlcNAc tipi sialik asit içeren glikan birimlerine spesifik bağlanma özelliği sayesinde görülür hale getirilmiştir.

Bu yöntem ile meme kanseri hücre soylarının membranlarında bulunan sialik asit birimlerindeki farklılıkların iki saat gibi kısa bir zamanda, hassas olarak ayrılabilmesinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

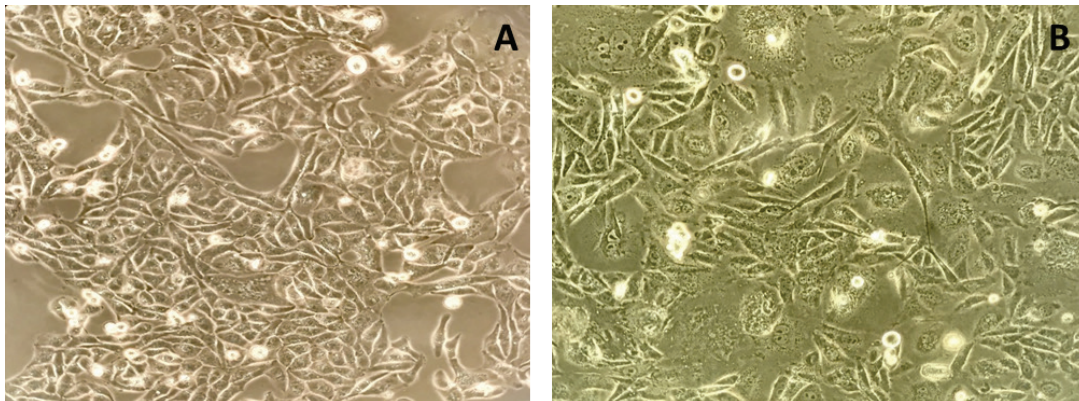
Deneyde Kullanılacak Hücrelerin Eldesi ve Hazırlanması

Çalışmamızda ATCC'den temin edilen MCF-7 (ATCC® HTB-22™) ve MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) hücre soyları kullanılmıştır.

Hücreler, içerisinde inaktive edilmiş %10 fetal sıçır serumu (FCS), 0,2 mM glutamin, 100 μ g/ml streptomisin 100 IU/ml penisilin içeren DMEM-F12 Ham medyumunda (Dulbecco'nun Modifiye edilmiş Eagle Medyumu, besleyici karışım F12 Ham medyumu) 37°C'de, %5 CO₂ ve 1 atmosfer basınç altında kültüre edilmiştir.

DMEM-F12 Ham medyumu ticari olarak kullanıma hazır şekilde satın alınmıştır. Hücreler rutin olarak haftada iki kez pasajlanmıştır. Hücreler, yoğunluk olarak flaskın yarı yüzeyini kapladıklarında deneylerde kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılması planlanan floresan (Fluorescein, FITC) işaretli *Maackia amurensis* lektini-1 (*Maackia amurensis* lectin-1 [MAL-I], FL-1311 Vector Laboratories, Bur-

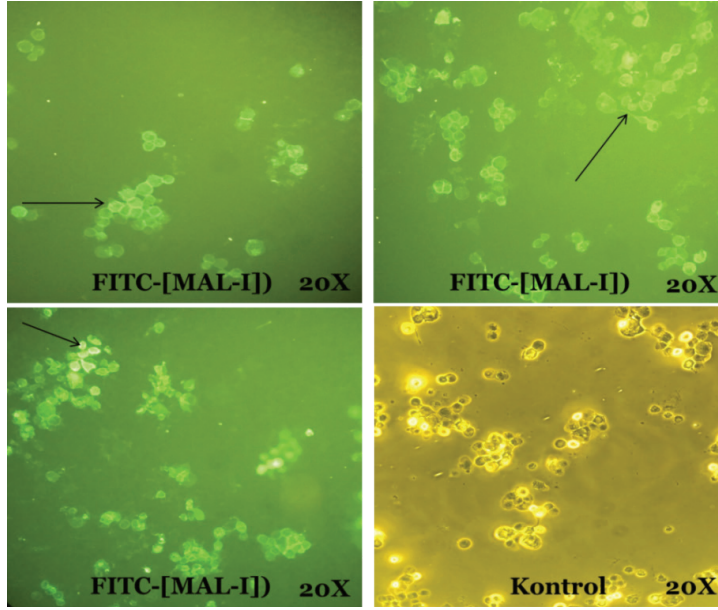


Şekil 1: Meme kanseri hücre hatları ışık mikroskobu görüntüleri (20X) A-MCF-7 hücre hattı B- MDA-MB-231 hücre hattı Floresan İşaretleme Prosedürü.

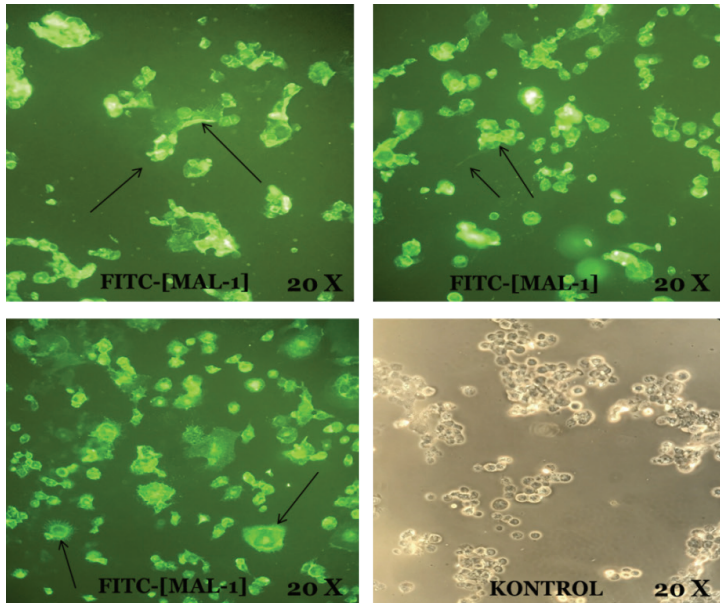
lingame, CA, USA) ve floresan işaretli Wheat Germ Aglutinin (*Triticum vulgare* [WGA] FL-1021 Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) ilgili firmalardan satın alınmıştır. Bu basamağı takiben FITC işaretli ürünler kullanım protokolüne uygun olarak hazırlanmış ve işaretlemeler yapılmıştır.

İşaretleme sürecinde medyumları üzerlerinden alınan hücreler PBS ile yıkanmıştır. Ardından, BSA içeren PBS ile yıkama yapılmıştır. Yıkama işlemlerinden sonra FITC işaretli lektinler ile uygun sürede inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda FITC içeren lektinler hücrelerin

üzerinden uzaklaştırılmış, Tween 20'li PBS ile yıkama gerçekleştirilmiştir. Sonraki adımda yıkama solüsyonu uzaklaştırılmış ve hücreler bir müddet kurumaya bırakılmıştır. Kurumayı takiben üzerlerine DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) içeren özel kapatıcı solüsyonu (Fluoroshield Mounting Medium with DAPI, ab 104139, Abcam) damlatılmıştır. Örnekler, Nikon Eclipse 80i Floresan Mikroskobu ile incelenmiş, DAPI ve FITC filtreleri kullanılarak fotoğraflanmıştır. Elde edilen mikrograflar aynı makinede yer alan, NIS Elements BR 3.0 programı ile görüntülenmiştir.



Şekil 2: MCF-7 hücre hattında FITC-MAL-I.



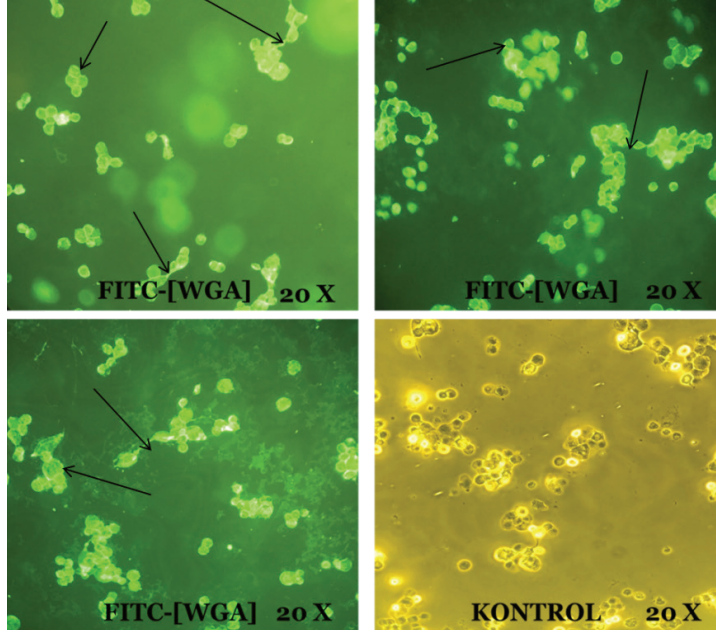
Şekil 3: MDA-MB-231 hücre hattında FITC-MAL-I.

BULGULAR

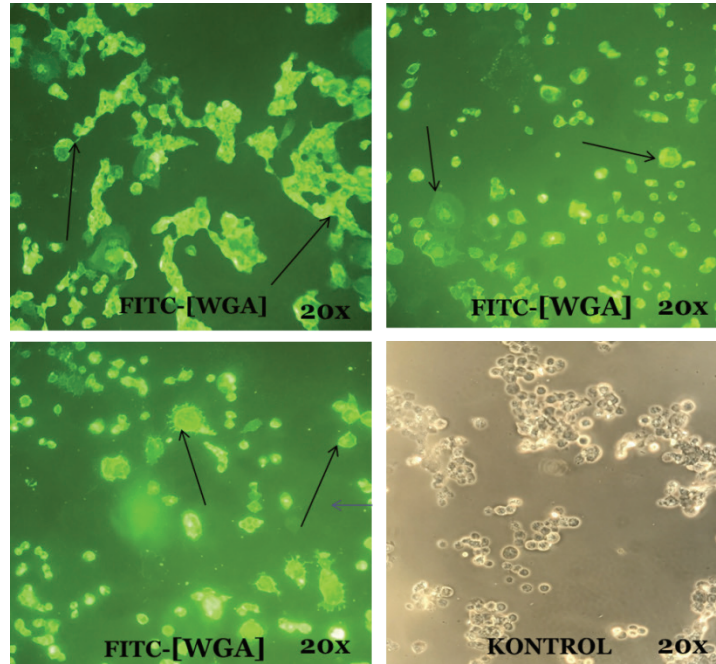
Çalışmada kullanılan MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları (Şekil 1) üzerine ilk olarak FITC-MAL-I uygulanmıştır. Bu lektin hücre zar yüzeylerinde yer alan galaktoz içeren bir tür sialik asit olan Gal β 4GlcNAc şekerini özgün işaretlemiştir. Buna göre; MDA-MB-231 kanser hücre hattı MCF-7'a göre

göreceli olarak daha yoğun bir ışıma göstermiştir (Şekil 2 ve 3).

Çalışmanın ikinci kısmında aynı tür kanser hücre hatları üzerine GlcNAc, Neu5Ac yapısında sialik asit tiplerini özgün olarak işaretleyen FITC-WGA uygulanmıştır. Bu işaretleme sonucunda da her iki kanser hattında yoğun ışıma tespit edilmiştir (Şekil 4 ve 5).



Şekil 4: MCF-7 hücre hattında FITC-WGA.



Şekil 5: MDA-MB-231 hücre hattında FITC-WGA.

TARTIŞMA

Dünya genelinde kadınlar arasında en yaygın kanser türü meme kanseri olarak bilinir (10). Meme kanseri dünyadaki kanser vakalarının yaklaşık %23'ünü oluşturur (12). Kanser oluşumunda çeşitli faktörler rol alır. Bu faktörler tümör oluşum tipine ve yerine bağlı olarak çeşitli semptomlara yol açabilir. Bu yüzden, kanser tedavisi, erken evrede tanı, etkin tedavi prosedürleri ve kanserin tekrar oluşmasını önlemek için tedavi sonrası bakım gerektirmektedir. Meme kanseri tanı teknikleri arasında mamografi, biyopsi, MRI, sonografi, moleküler meme görüntüleme, termografi vb. yer alır. Bunlar oldukça etkili yöntemlerdir ve kadınlarda meme kanserinin %80-90'ını tespit edebilmektedir (14).

Bunların dışında, enzim bağlantılı immünosorbent testi (ELISA), radioimmunoassay (RIA) ve immünohistokimya (IHC) gibi biyobelirteç temelli ekspresyon teknikleri de mevcut tanı gereksinimlerini karşılamaktadır. Tüm bu teknikler verimli olsa da, yine de bazı sınırlamaları vardır (16).

Tüm hücrelerde olduğu gibi kanser hücrelerinde de, yüzey reseptör proteinleri, mutasyona uğramış genler, mikroRNA'lar vb. gibi, tümör hücrelerinin yüzeyinde veya içinde değişken olarak eksprese edilen biyomoleküller bulunur. Bu moleküller kanser ilerlemesinin göstergesi olan belirteçler olarak kabul edilirler. Biyolojik olarak bu moleküller, biyobelirteçler olarak adlandırılır. Kanser hastalarına özgün biyobelirteçlerin tanıda kullanılabilmesi için noninvaziv bir prosedürle hastaların fizyolojik sıvılarından kolayca elde edilebilir olması ve sağlıklı kişilerde bulunmaması beklenmektedir. Bu nedenle potansiyel hedef belirteçler olarak biyosensörler yardımıyla kanser teşhisi büyük ölçüde araştırılmış ve ayrıntılı bir şekilde tartışılmıştır (4, 27, 28).

Bir tür biyobelirteç olarak glikoproteinler, Her-2, Mucin1 (MUC1), karsinoembriyonik antijen (CEA), epitelyal hücre adezyon molekülü (EpcAM), epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) gibi yüzey bağlı glikoprotein reseptörlerini oluştururlar. Reseptörler üzerindeki kontrol kaybolduğunda, MAPK ve PI3K / Akt yollarını değiştiren (21) ve metastazı indükleyen büyüme faktörlerinin üretilmesiyle kanser hücresi proliferasyonuna aracılık ederler (19). Çeşitli glikoproteinler arasında Her-2 ve MUC1, meme kanserinin saptanmasında en yaygın olarak kabul edilen tanı ve prognostik biyobelirteçlerdir. Her-2, bir proto-onkogen kodlayan trans-membran glikoproteindir (M. Wt-185 kDa). Meme kanseri tanısı için uygun bir biyobelirteç olan Her-2'nin %20-30 meme kanseri olgusunda aşırı ekspresyonu saptanmıştır (1).

Hastalık tanı ve teşhisinde hücre hatları laboratuvar çalışmalarının birçok alanında vazgeçilmezdir. Özellikle kanser araştırmalarında in vitro model olarak kullanılırlar (17). Meme kanseri araştırmalarında en yaygın olarak kullanılan meme kanseri hücre hatları, MCF-7 (26), ve MDA-MB-231'dir (3). Her ikisi de metastatik meme karsinomu

hastalarının plevral efüzyonlarından türetilmiştir. MCF-7 hücre hattı, meme hücrelerinin luminal epitelyal fenotipinin işaretleyicilerini ifade eder ve ER (+) tümörler için bir model olarak kullanılır (7). MDA-MB-231 hücre hattı, epitel işaretleyicileri ifade etmez fakat mezankimal fenotipin bir belirteci olan yüksek düzeyde vimentin içerir. MDA-MB-231 hücre hattı ER (-) ve Her-2 / neu-negatif meme kanseri için bir model olarak kullanılır (22).

Çalışmada ER (+) olan MCF-7 ve ER (-) olan MDA-MB-231 meme kanser hücre hatları kullanılmıştır. Bilinen konvansiyonel meme kanseri teşhis metodlarından daha ucuz ve 2 saat gibi kısa zamanda yanıt veren yöntemimizin temeli lektinlerin hücre yüzeyinde bulunan şeker rezidülerine özgün bağlanabilme özelliğine dayanmaktadır.

Bu çalışmada geliştirilen işaretleme yöntemi ile hücre yüzeyinde bulunan, yaygın sialik asit birimleri (GlcNAc, Neu-5Ac) ve daha nadir bulunan β bağlı galaktoz birimler içeren sialik asitler floresan işaretli WGA ve MAL lektinleri yardımı ile özgün olarak işaretlenmiş ve sonuçları irdelenmiştir.

Çalışmadan elde edilen bulgulara göre hem FITC-[MAL-I] hem de FITC-[WGA], ER (+) olan MCF-7 ve ER (-) olan MDA-MB 231 hücre hatlarının membranlarında görülen iki farklı sialik asit tipini özgün olarak işaretlemiştir. Ancak mikrograflarda görülen rezidülerin miktar farklılıkları bize FITC-[MAL-I]'ın ER (-) özellikteki MDA-MB-231 hücrelerinde β bağlı, galaktoz şekeri de içeren sialik asit tipini (Gal β 4GlcNAc), daha yoğun işaretlediğini göstermiştir. Bu sonuçlarda β bağlı, galaktoz şekeri de içeren sialik asit tipinin MDA-MB-231 hücre hattında daha yoğun bulunduğunu göstermektedir. Her iki hücre hattının membranlarında görülen bu farklılık iki saatlik bir boyama yöntemi ile iki hücre tipinin hızlı bir şekilde ayrılmasında kullanılabilir.

SONUÇ

Yapılan çalışmada, immüno floresan işaretli lektinler ve şeker rezidüleri yardımıyla, glikokonjugatların hızlı ve özgün ayırma kullanılabilişliği gösterilmiştir. Devam eden çalışmalarımızla bu yöntemin iyileştirilmesi ve daha da geliştirilerek, meme kanseri hücre hatlarında, hasta örneklerinde, hastalığın erken teşhisinde, patolojik bulgulara destek ve/veya alternatif bir yöntem olarak tercih edilebilirliğinin artırılmasına amaçlanmaktadır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

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

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından desteklenmiştir (Proje kodu: 35553).

Peer Review: Externally peer-reviewed.

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

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: This study was supported by Istanbul University Scientific Research Projects Unit (BAP) (Project code: 35553).

KAYNAKLAR

1. Al-Khafaji QAM, Harris M, Tombelli S, Laschi S, Turner A, Mascini M, et al. An electrochemical immunoassay for HER2 detection. *Electroanalysis* 2012;(24)4:735-42. [CrossRef]
2. Anthony S, Leong Y, Zhuang Z. The changing role of pathology in breast cancer diagnosis and treatment. *Pathobiology* 2011;78:99-114. [CrossRef]
3. Cailleau R, Young R, Olive M, Reeves WJ Jr. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst* 1974;53:661-74. [CrossRef]
4. Diaconu I, Cristea C, Harceago V, Marazza G, Berindan-Neagoe I, Sandulescu R. Electrochemical immunosensors in breast and ovarian cancer. *Clin Chim Acta* 2013;425:128-38. [CrossRef]
5. Gölbaşı Z, Çetin R, Kalkan S, Durmuş T. Üniversite öğrencisi kızların meme kanseri ve kendi kendine meme muayenesi ile ilgili bilgi ve davranışları. *Eur J Breast Health* 2010;6:69-73.
6. Gürel DK. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Erişkin Onkoloji, Hematoloji Kliniklerinde Kemoterapi Uygulanan Hastaların Yaşam Kalitesi Ve Bunu Etkileyen Faktörlerin İncelenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Hemşirelik Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. Adana: Çukurova Üniversitesi. 2007.
7. Horie K, Urano T, Ikeda K, Inoue S: Estrogen-Responsive RING Finger Protein Controls Breast Cancer Growth. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;85:101-4. [CrossRef]
8. Karakuş E. Östrojen-Bağımlı Meme Kanseri Ve Sodyum-Bağımlı Organik Anyon Taşıyıcı. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi 2010;5:155-66.
9. Koçer M. Meme Kanseri Evreleme, Prognostik ve Prediktif Faktörler. *Türkiye Klinikleri J Med Oncol-Special Topics* 2012;5(2):20-7.
10. Lee JH, Lee HJ, Sim DY, Jung JH, Kim KR, Kim SH. Apoptotic effect of lambertianic acid through AMPK/FOXO1 signaling in MDA-MB231 breast cancer cells. *Phytother Res* 2018;1-9. [CrossRef]
11. Libson S, Lippman M. A review of clinical aspects of breast cancer. *Int Rev Psychiatry* 2014;26(1):4-15. [CrossRef]
12. Mahfoud OK, Rakovich TY, Prina-Mello A, Movia D, Alves F, Volkov Y. Detection of ErbB2: Nanotechnological solutions for clinical diagnostics. *RSC Adv* 2014;4(7):3422-42. [CrossRef]
13. Mechref Y, Hu Y, Garcia A, Hussein A. Identifying cancer biomarkers by mass spectrometry-based glycomics. *Electrophoresis* 2012;33(12):1755-67. [CrossRef]
14. Michaelson J, Satija S, Moore R, Weber G, Halpern E, Garland A, et al. The pattern of breast cancer screening utilization and its consequences. *Cancer* 2002;94 (1):37-43. [CrossRef]
15. Mirtavoos-Mahyari H, Khosravi A, Esfahani-Monfared Z. Human epidermal growth factor receptor 2 and estrogen receptor status in respect to tumor characteristics in nonmetastatic breast cancer. *Tanaffos* 2014;13(1):26-34.
16. Mittal S, Gautam N, Mantha AK. Biosensors For Breast Cancer Diagnosis: A Review Of Bioreceptors, Biotransducers And Signal Amplification Strategies. *Biosens Bioelectron* 2017;15:88:217-31. [CrossRef]
17. Mladkova J, Sanda M, Matouskova E, Selicharova I. Phenotyping Breast Cancer Cell Lines EM-G3, HCC1937, MCF7 and MDA-MB-231 Using 2-D Electrophoresis And Affinity Chromatography For Glutathione-Binding Proteins. *BMC Cancer* 2010;10:449. [CrossRef]
18. Moremen KW, Tiemeyer M, Nairn AV. Vertebrate Protein Glycosylation: Diversity, Synthesis And Function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13(7):448-62. [CrossRef]
19. Nath S, Mukherjee P. MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends Mol Med* 2014;20:6:332-42. [CrossRef]
20. Pinho SS, Reis CA. Glycolysation in cancer: mechanism and clinical implications. *Nat Rev Cancer* 2015;15:540-55. [CrossRef]
21. Raina D, Kharbanda S, Kufe D. The MUC1 oncoprotein activates the anti-apoptotic phosphoinositide 3-kinase/Akt and Bcl-xL pathways in rat 3Y1 fibroblasts. *J Biol Chem* 2004;279:20:20607-12. [CrossRef]
22. Rochefort H, Glondou M, Sahla ME, Platet N, Garcia M. How to target estrogen receptor-negative breast cancer? *Endocr Relat Cancer* 2003;10:261-6. [CrossRef]
23. Saip P, Keskin S, Özkan M, Kaplan MA, Aydoğan F, Demirağ GG, et al. Türkiye'de meme kanserli hastaların tanı ve tedavi yöntemlerine ulaşım hızı; çok merkezli gözlemsel çalışma. *Eur J Breast Health* 2011;7:109-117.
24. Shah R, Rosso K, Nathanson SD. Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer. *World J Clin Oncol* 2014;5(3):283-98. [CrossRef]
25. Song E, Mechref Y. Defining glycoprotein cancer biomarkers by MS in conjunction with glycoprotein enrichment. *Biomark Med* 2015;9(9):835-44. [CrossRef]
26. Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan MA. Human Cell Line From A Pleural Effusion Derived From A Breast Carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1973;51:1409-16. [CrossRef]
27. Tohill EI. Biosensors For Cancer Markers Diagnosis. *Semin Cell Dev Biol* 2009;20:55-62. [CrossRef]
28. Vidi PA, Bissell MJ, Lelièvre SA. Three-dimensional culture of human breast epithelial cells: the how and the why. *Methods Mol Biol* 2013;945:193-219. [CrossRef]
29. Whelan SA, Lu M, He J. Mass spectrometry (LC-MS/MS) site-mapping of N-glycosylated membrane proteins for breast cancer biomarkers. *J Proteome Res* 2009;8(8):4151-60. [CrossRef]
30. Yang Z, Harris LE, Palmer-Toy DE, Hancock WS. Multielectin affinity chromatography for characterization of multiple glycoprotein biomarker candidates in serum from breast cancer patients. *Clin Chem* 2006;52(10):1897-905. [CrossRef]

İNSAN PERİFERİK KANINDAN ÇOK KÜÇÜK EMBRİYONİK (VSEL) KÖK HÜCRELERİN ELDE EDİLMESİ VE TANIMLANMASI

CHARACTERIZATION AND ISOLATION OF VERY SMALL EMBRYONIC-LIKE (VSEL) STEM CELLS OBTAINED FROM HUMAN PERIPHERAL BLOOD

Serap ERDEM KURUCA¹ , Dolay Damla ÇELİK¹ , Gülderen DEMİREL² , Dilşad ÖZERKAN³ 

¹İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İmmünoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

³Kastamonu Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Kastamonu, Türkiye

ORCID IDs of the authors: S.E.K. 0000-0002-5566-7844; D.D.Ç. 0000-0002-7523-8465; G.D. 0000-0001-5775-491X; D.Ö. 0000-0002-0556-3879

Cite this article as: Erdem-Kuruca S, Celik DD, Demirel G, Ozerkan D. Characterization and isolation of very small embryonic-like (VSEL) stem cells obtained from human peripheral blood. J Ist Faculty Med 2019;82(2):96-106. doi: 10.26650/IUITFD.2018.0001

ÖZET

Amaç: Kök hücre (KH) nakli malin kan hastalıkları, kemik iliği yetmezlikleri ve doğumsal kan hastalıklarının tedavisinde kullanılan yöntemdir. Bu amaçla, periferik kan projenitör hücreleri (PKPH) oldukça fazla kullanılmaktadır. Son yıllarda insan embriyonik kök hücrelerinin sahip olduğu pluripotent özelliği bulunan yeni KH türü tanımlanmıştır. Çok küçük embriyonik benzeri (VSEL) kök hücreler olarak adlandırılan bu hücrelerin, yetişkin bireyde periferik kanda (PK) bulunduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada VSEL kök hücrelerinin periferik kan kaynağı kullanarak elde edilmesi ve tanımlanması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Donörlerden alınan materyallerden lizis ve ficol gradient yöntemleri kullanılarak elde edilen mononükleer ve eritrosit katmanlarından, VSEL hücreleri izole edilmiştir. Flov sitometri ve immünfloresan boyama ile NANOG, OCT4, SSEA-4 ve CXCR-4 embriyonal kök hücre belirteçlerinin varlığı incelenmiştir. Western blot yöntemiyle ise, NANOG ve OCT4 proteinlerinin varlığı araştırılmıştır.

Bulgular: Flov sitometri sonuçlarına göre debris katmanında, VSEL belirteci taşıyan hücre sayısı CD45- popülasyonuna göre daha yüksek bulunmuştur. Elde edilen western ve immünfloresan sonuçlarına göre yüksek miktarda OCT4 ve NANOG ekspresyonu görülmüştür. Aynı zamanda bu proteinlerin hücre içinde hem sitoplazmada hem de çekirdekte bulunduğu gösterilmiştir.

Sonuç: Pluripotent kök hücre belirteci olarak bilinen bu proteinlerin yetişkin periferik kanında yüksek miktarda ekspresyonunun, farklılaşmış dokularda nasıl görev yaptığı sorusunu akllara getirmektedir. Bu bulgular; periferik kanda pluripotent belirteçler taşıyan yeni bir kök hücre popülasyonu bulunduğu tezini güçlendirmekte ve bu konuda yapılacak ileriye dönük klinik çalışmalar içinde temel oluşturmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Çok küçük embriyonik benzeri (VSEL) kök hücreler, Periferik kan, Pluripotent kök hücre markırları

ABSTRACT

Objective: Stem cell transplantation is considered to be one of the available treatments for malign or hereditary blood diseases and bone marrow failure. Peripheral blood progenitor cells (PBPC) are widely used for this technique. Recently a new type of stem cell with a pluripotent potential has been identified. These cells, called very small embryonic-like (VSEL) stem cells, are thought to be found in peripheral blood (PB) in adult individuals. The aim of this study was to obtain and identify VSEL stem cells using a peripheral blood source.

Material and Method: VSEL cells were isolated from mononuclear and erythrocyte layers obtained by using lysis and ficoll gradient methods from the materials taken from donors. The presence of NANOG, OCT4, SSEA-4 and CXCR-4 embryonal stem cell markers by flow cytometry and immunofluorescence staining was investigated. The presence of NANOG and OCT4 proteins was investigated using the Western blot method.

Results: According to the flow cytometry results, the number of cells carrying the VSEL marker was higher in the debris layer than in the CD45-population. Western and immunofluorescence results showed high levels of OCT4 and NANOG expression. It was also determined that these proteins are present in both the cytoplasm and the nucleus.

Conclusions: High expression of these proteins, known as pluripotent stem cell markers, in adult peripheral blood brings to mind the question of how they work in differentiated tissues. These findings strengthen the thesis of a new stem cell population that have pluripotent markers in peripheral blood and provide the basis for future clinical studies about this point.

Keywords: Very Small Embryonic-like (VSEL) stem cells, Peripheral blood, Pluripotent stem cell markers

İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: sererdem@yahoo.com

Geliş tarihi/Received Date: 25.07.2018 • **Kabul tarihi/Accepted Date:** 16.01.2019

©Telif Hakkı 2019 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2019 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

GİRİŞ

Günümüzde kök hücre nakli (KHN) rejeneratif tıpta önemli bir tedavi yöntemidir. KHN; lösemi, lenfoma gibi bazı malin kan hastalıkları ve kemik iliği yetmezlikleri ile doğumsal kan hastalıklarının tedavisinde sıklıkla başvuru hayat kurtarıcı yöntemlerden biridir. Kök hücreler çeşitli kaynaklardan elde edilir. Embriyonik kök hücreler yetişkin bireyin tüm hücre ve dokularını oluşturabilme kapasitesinden dolayı, geniş bir kullanım alanına sahipken, insan embriyonik kök hücrelerinin kullanımı dünyanın birçok ülkesinde çeşitli etik tartışmalar, allojenik kullanımındaki sorunlar ve teratoma riski nedeniyle sınırlandırılmıştır. Kök hücre nakillerinde bu yüzden kemik iliği, periferik kan progenitör hücreleri (PKPH) ve kordon kanı gibi hematopoetik kök hücre (HKH) kaynakları tercih edilmektedir (1). Bu kaynaklardan elde edilen kök hücrelerin hematopoetik rejenerasyonu sağlayabilmesi için ağırlıklı olarak pluripotent potansiyeli olan kök hücreler olması gerekmektedir (2).

Son yıllarda insan embriyonik kök hücrelerinin pluripotent karakterine sahip ve organizmada tüm yaşam boyunca var olan yeni bir kök hücre türü tanımlanmıştır (3). Çok küçük embriyonik benzeri kök hücreler (Very small embryonic-like stem cells - VSEL) olarak adlandırılan bu hücrelerin, yetişkin bireyde şimdilik kemik iliği, kordon kanı ve periferik kanda bulunduğu gösterilmiştir (4). Bu hücrelerin izolasyon işlemi esnasında mononükleer tabakanın dışında eritrosit katmanında bulunduğu için kaybedildiği iddia edilmektedir. PKPH gibi kök hücre kaynaklarının pluripotent kök hücre sayısını artırarak niteliğini iyileştirmek ve yetişkinlerde de kullanılabilme potansiyelini artırmak konusundaki çalışmaların, bu materyalin kullanım sınırlarını genişleteceği düşünülmektedir.

VSEL kök hücreler, ilk olarak 2006 yılında Zuba-Surma ve arkadaşları tarafından tanımlanan yeni bir kök hücre türüdür. Oldukça yeni keşfedilmiş olmaları nedeniyle, haklarında bilinenler son derece kısıtlıdır. Şimdiye kadar yapılan çalışmaların çoğunun fareler üzerinde yapılmış olması da, insandaki durumları hakkında bize yeterince bilgi verememektedir (5). Bu yüzden, bu çalışmada periferik kan kullanılarak VSEL kök hücrelerinin insandaki varlığının belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla periferik kan fikal ile santrifüj edildikten sonra hem mononükleer hem de eritrosit katmanındaki hücrelerin VSEL karakterizasyonu yapılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamıza katılan bireylere gönüllü onam formları imzalatılmıştır. Çalışmaya dahil edilen örnekler İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 20.06.2013 tarih'li 724 no'lu izni ile kullanılmıştır. Çalışmaya Sağlıklı 18 yaş ve üstü donörler dahil edilmiştir. Bunun aksine, kronik bir hastalığı olan, son 1 ay içerisinde enfeksiyon geçirmiş ve sigara kullanan donörler çalışmaya dahil etmemiştir. İzolasyon ve karakterizasyon yöntemleri canlı hücrelerde çalışmayı gerektirdiği için alınan kanlar bekletilmeden aynı gün içinde çalışılmıştır.

Hücre İzolasyonları

Fikal ile Hücre İzolasyonu

Fikal-gradient santrifüj yöntemi sıklıkla kullanılan ve kan hücrelerini çeşitli katmanlara ayırmaya yarayan bir yöntemdir (6). Kan fikal üzerine yayıldıktan sonra santrifüj edilir ve 4 katman halinde hücreler ayrılmış olur. İlk baştaki katmanda (1. katman) trombositler, sonraki katmanda (2. katman) ince bir çizgi halinde mononükleer hücreler (MNH), ardından 3. katmandaki fikalda bulunan nötrofiller ve en son olarak yoğunluklarından dolayı en altta bulunan eritrositler (4. Katman) olarak sıralanır. Bu izolasyon yönteminde, mononükleer hücreler fikal ile ayrılarak, hem MNH katmanında hemde eritrosit katmanında VSEL saflaştırılmıştır. Alınan materyal 1:1 oranında PBS (phosphate-buffered saline) ile dilüe edilmiştir. Sonrasında solüsyon 1:2 oranında Ficoll-Hypaque (BioWest Lymphosep 1.077 g/mL) solüsyonu üzerine eklenerek 2000 rpm'de 30 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda oluşan 4 katmanın 2.si (MNH) ve 4.sü (eritrosit) ayrı tüplere aktarılmıştır. 2. Katmana 1:3 oranında RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) eklenerek dilüe edildikten sonra 2000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant dökülerek kalan pellet RPMI ile yeniden süspansedilmiştir. Daha sonra eritrositlerin bol miktarda bulunduğu 4.katman aynı şekilde dilüe edilerek daha yüksek bir hızda (2690 rpm 15 dk) santrifüj edilmiştir. Bunun nedeni, VSEL kök hücrelerinin boyut olarak eritrositlere yakın olmasıdır. Ortalama eritrosit boyutu ~7-8 µm iken VSEL kök hücrelerinin boyutu yaklaşık 5-6 µm'dir. Böylece eritrositlerin dibe çökmesi sağlanarak süpernatant yeni bir tüpe aktarılmış ve 3000 rpm 10 dk santrifüj edilmiştir. Tekrar süpernatant atıldıktan sonra dipteki pellet RPMI ile süspansedilmiştir. Bu süspansiyon VSEL hücrelerinin bulunduğu bilinen katmandır (5. katman) (7). Elde edilen her katmandan yayma preparat hazırlanmıştır. Kullanılmayan pelletler protein izolasyonu için -20'de saklanmıştır.

Eritrosit Lizisi ile İzolasyon

VSEL izolasyonu için kullanılan diğer yöntem, eritrosit lizisidir. Fikal yöntemi ile çok fazla hücre kaybı oluşurken, bu yöntemde hücre kaybının daha az olduğu düşünülmektedir (8). Bu nedenle çalışmada 2 yöntem birlikte kullanılmıştır. Tüm materyal eritrositleri parçalayan (amonyum klorür) tamponlu çözelti ile 1:5 oranında karıştırılarak 15 dk oda ısısında bekletildikten sonra 2000 rpm'de 10'dk santrifüj edilerek üst katman toplanmıştır. Eritrositler tamamen uzaklaşınca kadar bu işlem tekrarlanmıştır. Daha sonra PBS ile 2000 rpmde 10 dk yıkama yapılarak, süpernatant atılmış ve dipteki pellet RPMI ile süspansedilmiştir. Yayma preparat yapıldıktan sonra kullanılmayan pellet -20'de saklanmıştır.

Flow Sitometri Ölçümleri

Floresan ışıkların birbirine karışmaması için 4 ayrı tüpte, 4 farklı antikora bakılmıştır. Kullanılan antikolar SSEA-4 (evre-spesifik embriyonik antijen 4) (Santa Cruz), PE anti-human CD45 (BioLegend), FITC anti-human CD34 (BioLegend), NANOG (Nanog homeobox) (Santa Cruz), CXCR-4 (C-X-C motif kemokin reseptör 4) (Santa Cruz), OCT 3/4 (major octamer-bağlayıcı protein) (Santa Cruz); sekonder antikolar ise, Goat anti-mouse IgG-TR* (Santa Cruz), Donkey anti-goat IgG-FITC* (Santa Cruz) dir.

Flov sitometrik ölçümler sadece eritrosit lizisi yapılmış hücre grubuna uygulanmıştır. Lizis yapılmış hücreler 1×10^6 /ml hücre olacak şekilde PBS ile sulandırılmıştır. Her bir flov tüpüne 100 µl hücre süspansiyonu konulmuştur. Tüpte 1 µg olacak şekilde primer antikolar eklenerek, 30 dakika karanlıkta bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda tüplere 500 µl PBS eklenip, 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılarak 100'er µl PBS eklenmiştir. Primer antikolar ile uyumlu olan sekonder antikolar her tüpte 0,5 – 1 µg arasında olacak şekilde eklenmiş ve karanlıkta 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. PBS ile yıkanarak, süpernatant atılmıştır. Her tüpe yaklaşık 500 µl flov solüsyonu konarak ölçüm yapılmıştır.

VSEL hücrelerinde literatüre göre CD45 belirteçinin negatif olduğunu, CD34'ün ise pozitif olduğu gösterilmiştir (9). Bu bilgi doğrultusunda; 1. tüpte CD45-/CD34+/SSEA-4+ hücreleri, 2. tüpte CD45-/NANOG+, 3. tüpte CD45-/CXCR-4+ ve 4. tüpte CD45-/OCT-3/4+ olan hücreler kapılanarak incelenmiştir. Aynı zamanda, VSEL hücrelerinin mononükleer hücrelere göre daha küçük olduğu için debris kısmında da bulunabileceği belirtildiğinden dolayı, debrisden de kapı alınarak aynı ölçümler gerçekleştirilmiştir.

İmmünfloresan Boyama

Hazırlanan yayma preparatlar %96'lık etanolde fikse edilmiştir. PBS ile 3 kere yıkama yapılmıştır. Hücre permeabilizasyonu için, %0,1'lik triton X-100 2 ml PBS içinde hazırlanarak 15 dk buzda inkübe edilmiş ve 3 kere PBS ile yıkanarak, her yıkamada 3'er dakika bekletilmiştir. Bloking tamponunda (%2'lik BSA (bovine serum albumin) ve %0,3'luk triton X-100) 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. 3x3 dk PBS ile yıkama yapılmıştır. Primer antikor 1:1000 oranında bloking solüsyonunda dilue edilerek hazırlanmıştır. +4°C'de tüm gece inkübasyona bırakılmış ve ertesi gün PBS ile 5x5 dk yıkama yapılmıştır. 1:1000 oranında dilue edilen sekonder antikor ile 1 saat karanlıkta bekletilmiş ve tekrar PBS ile 5x5dk yıkama yapılmıştır. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Santa Cruz Biotechnology sc-3598) ile boyama yapılmış ve floresan mikroskopunda incelenmiştir. Floresan mikroskopu için kullanılan antikolar, flov sitometride kullanılanlar ile aynı antikordardır. Liste Tablo 1'de gösterilmektedir.

Western Blot Yöntemi ile Spesifik Proteinlerin Karakterizasyonu

Çalışılan proteinler NANOG ve OCT4'dür. Kontrol olarak β-aktin kullanılmıştır. Örnekler 2000 rpm'de 10 dk santrifüj yapılarak, süpernatantları atılmıştır. Hücre Lizis Tamponu (1:10 EDTA/Tris-HCl, %0,5 Triton X-100) hazırlanmış ve 10 ml stok hücre lizis tamponunu içine, PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride proteaz inhibitörü) stoktan 10 µl eklenmiştir. Hücre pelletlerinin üzerine 100 µl lizis tamponu eklenerek, 30-60 dk buzda inkübe edilmiş ve 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.

Protein Tayini (Bradford Testi)

BSA'dan (1,46mg/ml dsu) seri dilüsyonlar yapılarak 5 tane standart elde edilmiştir. Hücre lizis örnekleri kullanılmıştır.

Tablo 1: İmmünfloresan preparatlar ve antikolar

Kaynak Adı	Hücre Grubu	Antikolar		
		1.Preperat	2.Preperat	3.Preperat
Periferik Kan	MNH Katman Preperatı	SSEA-4-TR CXCR4- FITC CD45-PE DAPI	NANOG-FITC CD45-PE DAPI	OCT4-FITC CD45-PE DAPI
	5. Katman Preperatı	SSEA-4-TR CXCR4- FITC CD45-PE DAPI	NANOG-FITC CD45-PE DAPI	OCT4-FITC CD45-PE DAPI
	Lizis Preperatı	SSEA-4-TR CXCR4- FITC CD45-PE DAPI	NANOG-FITC CD45-PE DAPI	OCT4-FITC CD45-PE DAPI

96'lık mikrotiplere 10 µl örnek 200 µl Bradford belirteci 3 tekrarlı şekilde eklenmiştir. 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. Spektrofotometrede 560-590 nm arasında okunmuştur. Standartların ölçülen absorbansları kullanılarak standart grafiği oluşturulmuş, örneklerin absorbansları bu grafikte yerine konularak protein miktarları saptanmıştır.

Çalışmada %12'lik akrilamid içeren ayırma jeli ve %5'lik yükleme jeli kullanılmıştır. 2x Laemlli Örnek Tamponu (Laemli Sample Buffer) ile örnekler 1:1 oranında karıştırılmış ve içine %5 oranında β-merkaptoetanol eklenmiştir. Protein denatürasyonu için 80°C'de 15 dk inkübe edilerek, hemen buza alınmış, örnekler 20 µl olacak şekilde jele yüklenmiş ve 130 V'da 45 dk yürütülmüştür. PVDF membran kullanılarak, membran filtre kağıdı ve jel sistemi hazırlanmış ve 350 mA'de 60 dk blotlama yapılmıştır.

Membranda Spesifik Proteinin İşaretlenmesi

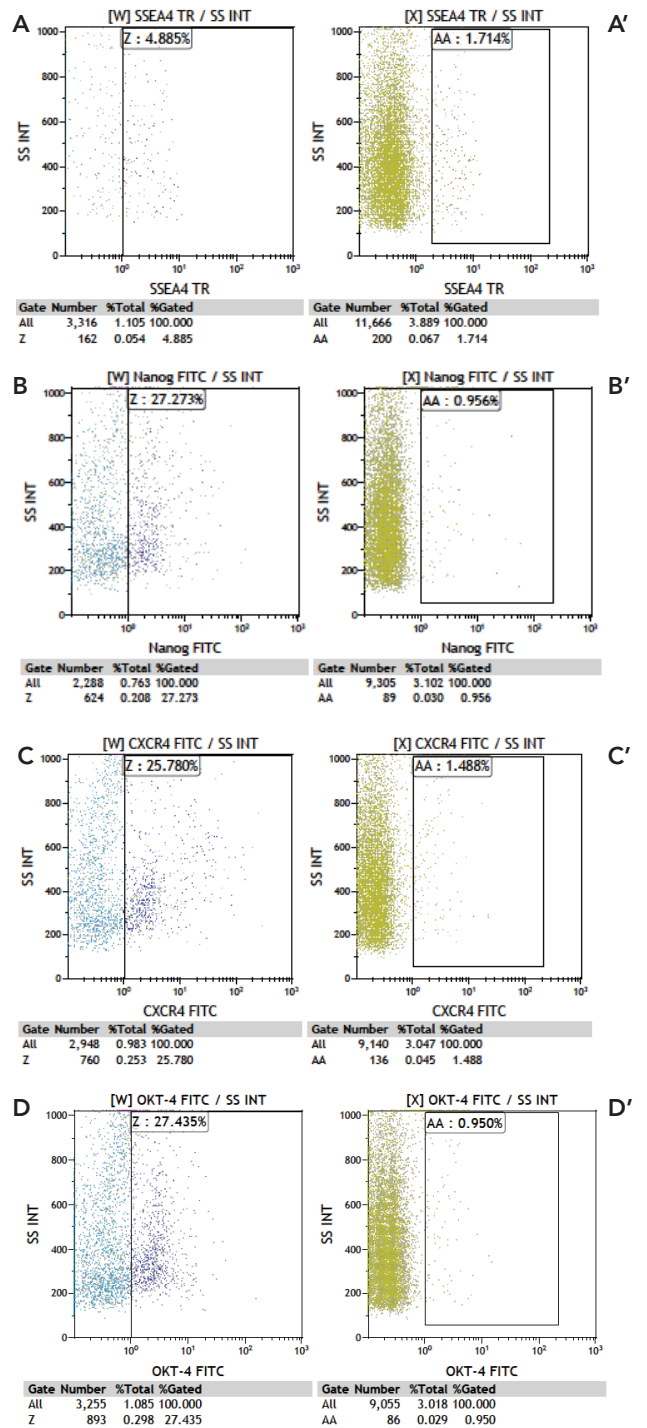
TBST (50 mM Tris-Cl, pH 8,0, 150 mM NaCl, %0,1 Tween-20) içinde %5'lik süt tozu bloking solüsyonu olarak kullanılmış ve membran bu solüsyonda 1 saat boyunca, çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır. Bloking bitince yıkama solüsyonu olan TBST'de 3 kere 5'er dakikalık çalkalayıcıda yıkama yapılmıştır. Primer antikor bloking solüsyonunda istenen oranda sulandırılarak hazırlanarak, gece boyu +4°C'de çalkalayıcıda bırakılmıştır. İnkübasyon bitince 3'er kez 5'er dakikalık TBST ile yıkama yapılmıştır. Sekonder antikor, alkalın fosfataz (AP) konjuge olarak seçilmiştir. Sekonder antikorda istenilen oranda %5'lik süt tozu solüsyonunda dilue edilerek, 1 saat çalkalayıcıda, oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Kullanılan antikor ve dilüsyonları sırasıyla NANOG (1:1000), OCT-4(1:1000), β-actin (1:1000), Donkey anti-goat IgG-AP (1:10000) şeklindedir.

Görüntüleme

Sekonder antikor AP ile konjuge olarak seçildiğinden AP substratı olan Novex AP Chromogenic Substrat ile görüntüleme yapılmıştır. Sekonder antikordan sonra 3'er kez 5'er dakikalık TBST ile yıkama yapılmış ve distile su ile 2 dk daha membran çalkalayıcıda çalkalandıktan sonra Novex Substrat konulmuştur. İstenen görüntü elde edilince distile su ile reaksiyon durdurulmuştur. Membran kurutulurken, bilgisayarda taranmıştır.

İstatistiksel Analiz

Çalışmada Graphpad Prism5 (La Jolla, Amerika) programı kullanılmıştır. Flov sonuçlarında kapılardaki antikorların kendi içlerinde anlamlılığı 'one-way ANOVA' testi ile, kapılar arasındaki antikorların anlamlılıkları ise "two-way ANOVA" testi ile yapılmıştır. Western sonuçlarında antikorların her birinin katmanlardaki değerleri "one-way ANOVA" testi ile bakılmıştır. İki antikorun katmanlar arasındaki anlamlılıkları ise "two-way ANOVA" testi ile incelenmiştir. Anlamlılık değeri p<0,05 olan sonuçlar anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 1: Periferik kanda VSEL belirteçlerinin flow sitometri ile gösterilmesi. A) Debris popülasyonunda, SSEA-4 pozitif hücreler A') CD45- popülasyonunda, SSEA-4 pozitif hücreler B) Debris popülasyonunda, NANOG pozitif hücreler B') CD45- popülasyonunda, SSEA-4 pozitif hücreler C) Debris popülasyonunda, CXCR4 pozitif hücreler C') CD45- popülasyonunda, CXCR4 pozitif hücreler D) Debris popülasyonunda, OCT3/4 pozitif hücreler D') CD45- popülasyonunda, OCT3/4 pozitif hücreler görülmektedir.

BULGULAR

Flow Sitometri ile Kapılama ve Hücre Sayımı

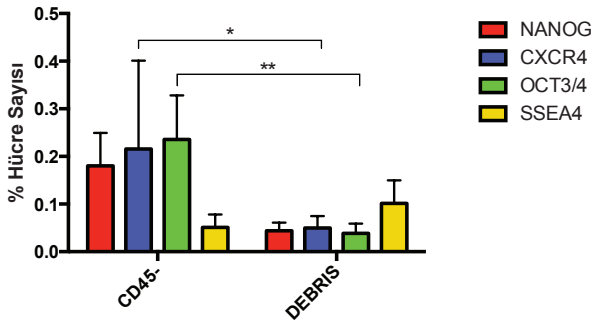
Flow sitometride iki farklı kapılama yapılarak, hücreler üzerindeki VSEL belirteçlerinin varlığına ve sayısına bakılmıştır. İlk kapılama CD45- hücreler (CD45 soluk hücreler de dahil) üzerinden yapılmıştır. Bu grubun içindeki NANOG, CXCR4, OCT3/4 ve SSEA-4 pozitif hücre sayısı belirlenmiştir. İkinci kapılama debris kısmı üzerinden yapılmıştır. Bu kısımda da aynı belirteçler incelenmiştir.

Şekil 1’de alınan bir periferik kan örneğinin flow sonuçları verilmektedir.

Elde edilen sayıların yüzde olarak ortalamaları Tablo 2’de gösterilmektedir. Her iki kapılamadaki antikorların kendi aralarındaki korelansı anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Debris ve CD45- popülasyonunda CXCR4 ve OCT3/4 antikorlarının farklılığının anlamlı olduğu gösterilmiştir ($p < 0,05$). İki grubun ortalamalarının karşılaştırılması Şekil 2’de gösterilmektedir.

Tablo 2. Flow sitometri ile sayılan hücrelerin (%) ortalamaları.

	%NANOG	%CXCR4	%OCT3/4	%SSEA-4	P Değeri
CD45-	0,180	0,215	0,235	0,05	0,0172
DEBRİS	0,044	0,049	0,038	0,101	0,0076

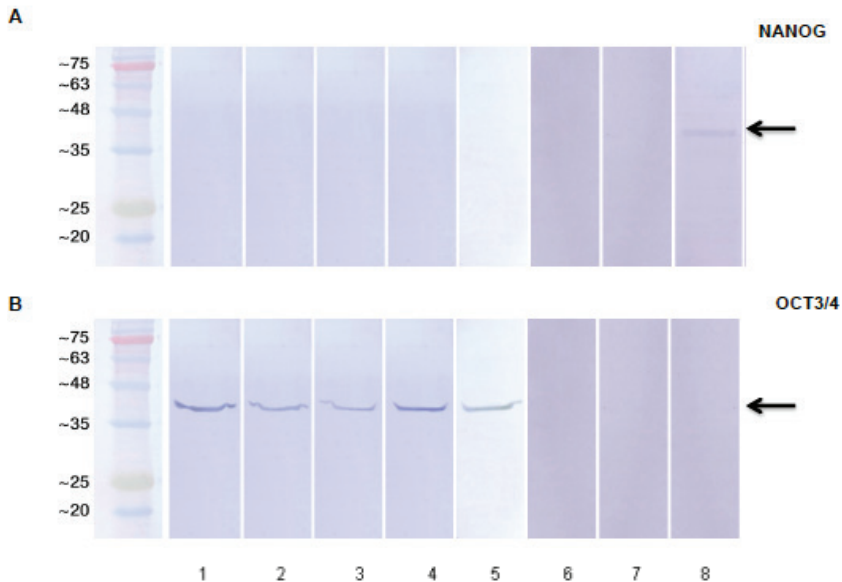


Şekil 2: Periferik kandan eritrosit lizisi ile elde edilen hücrelerde flow sitometride CD45- popülasyonunda ve debris-de VSEL belirteçleri (NANOG, CXCR4, OCT3/4, SSEA-4). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Western Blot Yöntemi ile VSEL Proteinlerinin Tayini

Alınan 8 periferik kanın incelenen katmanlarında (lizis, MNC ve 5. katman) western blot yöntemi ile OCT3/4 ve NANOG proteinlerinin varlığı araştırılmıştır. Şekil 3’de lizis katmanında, NANOG 40 kDa ağırlığında sadece 1 örnekte pozitif iken diğerlerinde tespit edilemedi. OCT3/4 proteini ise 33 kDa düzeyinde 5 örnekte pozitif bulundu.

Şekil 4’de MNC katmanında NANOG 40 kDa düzeyinde sadece 3 örnekte pozitif iken diğerlerinde tespit edilemedi. Aynı örneklerde 25 kDa düzeyinde ekstra ladder şeklinde bantlar görülmüştür. OCT3/4 proteini ise 33 kDa düzeyinde 5 örnekte pozitif bulunmuştur.

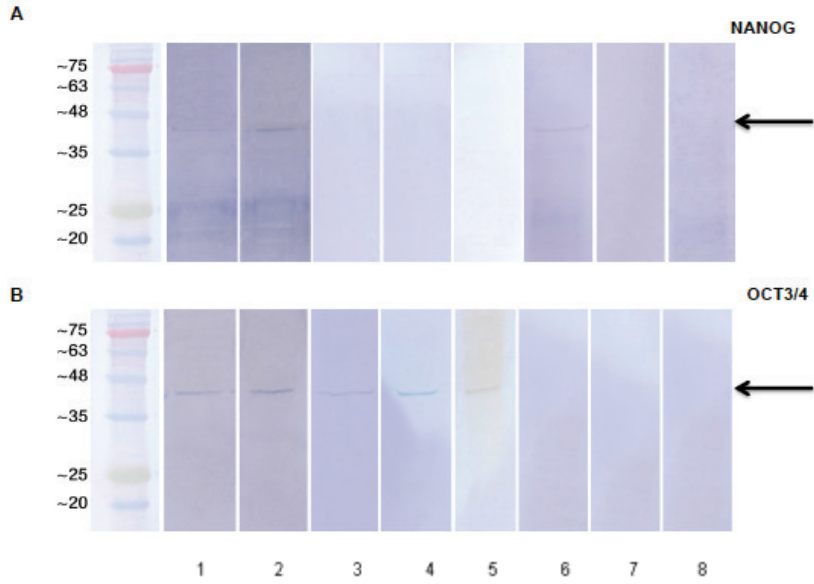


Şekil 3: Periferik kan lizis katmanında, VSEL belirteçlerinin protein düzeylerinin western blot ile gösterilmesi A) NANOG proteinin varlığı B) OCT3/4 proteinin varlığı

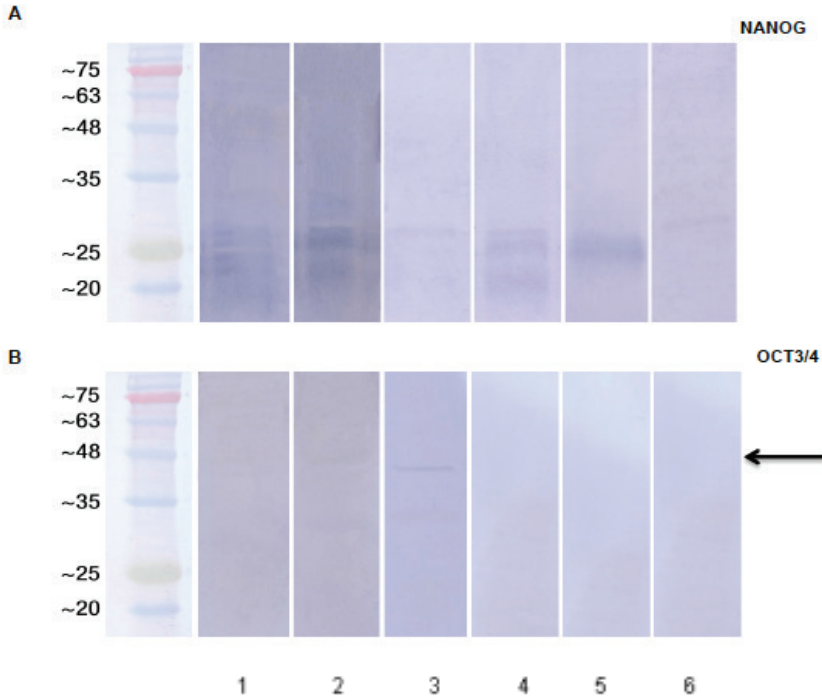
Şekil 5'de 5. katman hücrelerinde bulunan bantlar gösterilmektedir. NANOG 25 kDa düzeyinde tüm örneklerde ladder şeklinde bantlar tespit edilmiştir. OCT3/4 proteini 33 kDa düzeyinde 1 örnekte pozitif bulunmuştur.

VSEL Belirteçlerinin İmmüno Floresan Boyamalar ile Gösterilmesi

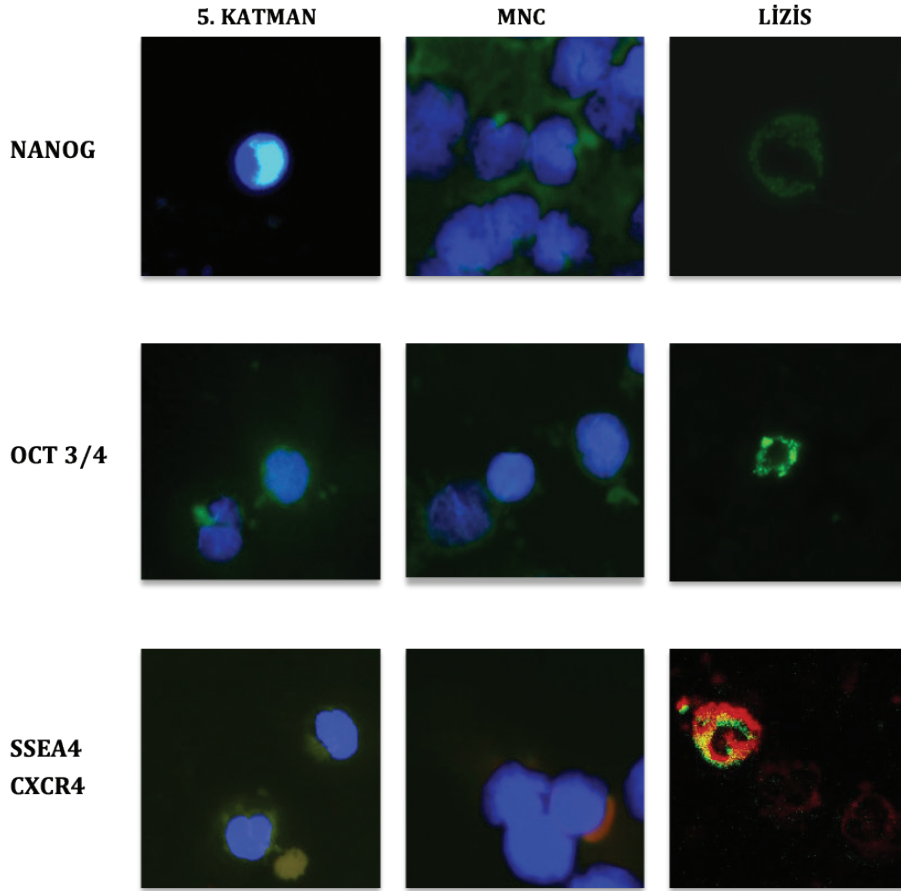
Şekil 6'da, 3 hücre katmanında da yapılan immüno floresan boyamalar gösterilmektedir.



Şekil 4: Periferik kan MNC katmanında, VSEL belirteçlerinin protein düzeylerinin western blot ile gösterilmesi A) NANOG proteinin varlığı B) OCT3/4 proteinin varlığı



Şekil 5: Periferik kan 5. Katman hücrelerinde, VSEL belirteçlerinin protein düzeylerinin western blot ile gösterilmesi A) NANOG proteinin varlığı B) OCT3/4 proteinin varlığı



Şekil 6: Periferik kandan izole edilen üç farklı hücre katmanında VSEL belirteçlerinin (NANOG, OCT3/4, SSEA-4, CXCR4) immünofloresan ile gösterilmesi. Satırlarda kullanılan antikorlar, sütunlarda ise hücre katmanları göstermektedir. DAPI nükleusu boyayarak mavi floresan vermektedir. VSEL belirteçlerinin pozitifliği ise, NANOG, OCT3/4 ve CXCR4 için yeşil floresan ile, SSEA-4 için ise kırmızı floresan ile gösterilmiştir.

TARTIŞMA

HKH'lerin transplantasyonda kullanım oranının yüksek olması, rejenerasyonu sağlamada daha başarılı olmalarından kaynaklanmaktadır. Bu özellikten plastitenin sorumlu olduğu düşünülmekteydi (10). Bunun nedeninin kemik iliğinde bulunan, henüz tanımlanmamış, hematopoetik olmayan, primitif bir hücre grubu olabileceği ileri sürülmüştür (11, 12). VSEL kavramı da bu hipotez doğrultusunda ortaya çıkmıştır. Yüksek nükleus/sitoplazma oranına sahip, boyutları 4-6 µm olan, EKH belirteçlerini sentezleyen ve dormansi halde bir grup kök hücrenin kemik iliğinde varlığı gösterilmiştir. Bu hücrelerin boyutlarının küçük olması nedeniyle 'Çok Küçük Embriyonik Benzeri Kök Hücreler (VSELsc)' olarak tanımlanmıştır (3). Günümüzde halen bu hücrelerin varlığı, pluripotent kapasiteleri ve kendilerini yenileyebilir oluşları, *in vitro/vivo* çoğalması bir tartışma konusu halindedir (13-15).

Şimdiye kadar yapılan çalışmalar, bu hücreleri tanımlamak ve fonksiyonlarını anlayabilmek amaçlı yapılmış olmakla beraber

genellikle fare çalışmalarıdır. Son yıllarda insan materyalinde VSEL çalışmaları artırılarak, farelerdeki VSEL kök hücreleriyle benzerlikleri ve farklılıkları araştırılmaktadır (16, 17).

Kucia ve arkadaşlarının (2006) yaptıkları çalışma VSEL kavramı için öncü niteliği taşımaktadır. Flov sitometri ile buldukları sonuçlara göre; fare PK'sında Sca-1⁺/Lin⁻/CD45⁻ olan hücre miktarı 160 hücre/ml (yani total beyaz kan hücrelerinin %0,0016) iken mobilize olmuş PK'da 800 hücre/ml'dir (yani total beyaz kan hücrelerinin %0,0035'i). Aynı zamanda Oct4, NANOG gibi transkripsiyon faktörlerinin mobilize kanda ekspresyonunun arttığını, mRNA düzeylerine göre hesaplamışlardır. İmmünofloresan boyama ile, nükleusta Oct4 ve NANOG ekspresyonunu göstermişlerdir. Bu hücrelerin sadece PKH belirteçlerini ifade etmediklerini aynı zamanda 3 germ tabakasına da farklılaştığını göstermek için hücreleri kültür yaptıklarında farklılaştıklarını gözlemlemişlerdir. İzole edilen VSEL hücreleri kardiyomyosit, nöral hücreler ve pankreatik hücrelere benzer kümeler oluşturmuşlardır (3, 5). Başka bir ça-

İşlemede ise, insan kordon kanından 3 grup olmak üzere lin⁻/CD45/CXCR4⁺, lin⁻/CD45/CD34⁺, lin⁻/CD45/CD133⁺ hücreleri izole etmişlerdir. Bu hücre gruplarının total kordon kanı hücrelerinde sırasıyla %0,037, %0,118 ve %0,018 oranında olduğunu göstermişlerdir. Aynı zamanda bu grupları FACS ile izole ederek, yüksek miktarda Oct4 ve NANOG mRNA düzeyleri elde etmişler ve immüno floresan ile de hücre yüzeyinde SSEA-4, nükleusda Oct4 ve NANOG varlığını belirlemişlerdir (18). Bu makalelerin ışığında, bu çalışmada insan periferik kanında flov sitometri ile VSEL varlığı araştırılmıştır. PK hücrelerinde CD45-gruptan sırasıyla %0,18 NANOG, %0,215 CXCR4, %0,235 Oct4 ve %0,05 SSEA-4 pozitif bulunmuştur. CD45-/Debris grubundan %0,044 NANOG, %0,049 CXCR4, %0,038 Oct4 ve %0,101 SSEA-4 pozitifliği gösterilmiştir (n=8).

Bhartiya ve arkadaşları (2012), VSEL hücrelerinin boyutlarını göz önüne alarak VSEL izolasyonu için bu çalışmada kullanılan yöntemi belirtmişlerdir. 5. Katmandaki hücrelerin Oct4 ve NANOG ifade ettiğini hatta MNH katmanındaki hücrelere oranla bu transkripsiyon faktörlerinin daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Oct4'un HKH'lerde sitoplazmada, VSEL'lerde ise çekirdekte olduğunu, SSEA4 unda hücre yüzeyinde VSEL'lerde pozitif olduğunu göstermişlerdir. Bu sonuçların ışığında VSEL hücrelerinin MNH katmanı dışındaki eritrosit katmanında daha fazla bulunduğunu ve bundan dolayı kordon kanı saklanırken, sadece MNH hücrelerinin dondurulduğu ve bu alt katman olan kısmın dahil edilmediği için VSEL hücrelerinin atılmış olduğunu ileri sürmüşlerdir (7). Bu araştırmaya benzer şekilde, bu çalışmada 5. ve MNH katmanları izole edilerek, bu katmanlardaki VSEL kıyaslaması için western blot yöntemi kullanılmıştır. Western blot yöntemi VSEL çalışmalarında bu güne kadar hiç kullanılmamış bir yöntemdir. Genellikle çalışmalar mRNA miktarını gösteren RT-PCR üzerinden yapılmıştır. Fakat RT-PCR genellikle western ile de doğrulama gerektiren bir yöntemdir. Çünkü RT-PCR ile bakılan mRNA düzeyi, her ne kadar bir proteinin bilgisini transkripsiyonal düzeyde verse de, proteine dönüşen miktar hakkında bir şey söylememektedir. mRNA'dan protein sentezi sırasında yanlış, eksik veya sentezlenmeyen proteinler olabilmektedir. Bu yüzden sonuçlara göre, lizis ve MNC katmanında Oct4 varlığı gösterilirken; 5. Katmanda varlığı gösterilememiştir. 5. Katman çok az miktarda hücreden oluşmaktadır ve bu da western blot için gerekli olan total protein miktarını genel olarak sağlayamamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Özellikle PKH belirteci olan bir transkripsiyon faktörü Oct4'nin varlığı gösterilmiştir. Bu çalışmada bulunan sonuçlara benzer şekilde, PK MNH'lerinde Oct4 varlığını PCR, Western blot ve immüno floresan yöntemlerle gösterilmiş ve Oct4'un saf bir pluripotent kök hücre belirteci olup olmadığının tartışmalı bir konu olabileceğine değinilmiştir (19). Fakat başka bir çalışmada, Oct4 izoformları incelenerek Oct4'un yapısını anlayama yönelik önemli bilgiler elde edilmiştir (20). Oct4 varlığı hücrenin farklılaşmasını engellemektedir. Oct4 baskılanınca hücre

farklılaşmaya başlar. Ayrıca, Oct4 POU domain ailesinin bir üyesidir ve insanda Oct4A ve Oct4B izoformları olmak üzere 2 formu bulunmaktadır (21). Oct4 mRNA'sı 3 bölümden oluşmaktadır. N-terminal kısmı, POU DNA bağlanma bölgesi ve C-terminal kısmı. Oct4A ve Oct4B mRNA'larının POU ve C-terminal kısmı aynı olmasına rağmen N-terminal kısımları farklıdır. Oct4B N-terminal kısmında yaklaşık 95 amino asitlik bir eksik bulunmaktadır. Bu eksiklik Oct4B izoformunun DNA ya bağlanma yeteneğini inhibe etmektedir. Bunun aksine Oct4A DNA'ya bağlanabilmekte ve pluripotensiyi koruyabilmektedir. Aynı zamanda embriyonik hücre hatlarında iki izoformda bulunmasına rağmen Oct4A miktarı, Oct4B miktarına oranla oldukça yüksek olarak gösterilmiştir. Ayrıca, Oct4A çekirdekte, Oct4B ise sitoplazmada lokalize olmaktadır (20). Liedtke ve arkadaşları (2007), Oct4 varlığını PK ve kordon kanı MNH'lerinde RT-PCR ile gösterirken primer seçiminin çok önemli olduğunu, yanlış primer seçimi ile Oct4A ile Oct4B izoformlarının birbirine karıştırılabileceğini (22); Zangrossi ve ark. (2007) ise bulduklarının aslında Oct4B izoformu olduğunu bildirmişlerdir (19). Daha sonraki çalışmalarda bazı kanserli hücre hatlarında ve HKH'lerde Oct4B izoformunun varlığı gösterilmiştir (23-26). Bu çalışmada, Oct4 varlığının Oct4B izoformu olduğu düşünülmektedir. İmmüno floresan görüntülerde bu kanıyı desteklemektedir. Ayrıca yapılan immüno floresan boyamalarda Oct3/4'un sitoplazmik lokasyona sahip olduğu görülmektedir. Western blot sonuçlarıyla beraber ele alınınca PK'da Oct4B izoformunun yüksek miktarda ifade edildiğini söylemenin yanlış olmayacağı düşünülmektedir. Fakat yapılan izolasyon işlemleriyle miktarının azaldığı gözlenmiştir. Fikol ile ayrılan katmanlarda Oct4 ifadesinin azaldığı veya yok olduğu görülmüştür. Bu da fikolün hücre kaybına neden olduğunu doğrulamaktadır. Veya MNC katmanı dışında kalan bir hücre gurubunun daha Oct4B ifade ettiğini göstermektedir. Oct4B izoformunun tam olarak görevi, hangi hücrelerde bulunduğu, Oct4A ile olan etkileşimlerinin ne olduğu bilinmemektedir. Bu henüz aydınlatılmamış bir konu olarak durmakta ve daha kapsamlı araştırmalar gerektirmektedir.

NANOG; Oct4 ve Sox2 genleriyle iş birliği halinde hücrenin pluripotent özelliğinin sürdürülmesini sağlar, miktarı azaldığında pluripotansiyel özellik azalır. Bu çalışmada, NANOG ekspresyonu gösterilmiştir. Fakat NANOG antikorumun birden fazla bant verdiği ve tahmin edilen kDa'dan farklı noktalarda da bantlar oluşturduğu da görülmüştür. Bu NANOG'un çabuk degrade olduğunu, post translasyonel modifikasyonlara uğrayarak bu şekilde bir bant dizisi verdiğini düşündürmektedir (27). PK'da varlığının tartışmalı olması, NANOG'un saf bir kök hücre belirteci olup olmadığını düşündürmektedir. NANOG proteinin 11 tane psödogeni olduğunu gösterilmiştir. NANOGP1 ve NANOGP8 dışında geri kalan NANOGP2, NANOGP3, NANOGP4, NANOGP5, NANOGP6, NANOGP7, NANOGP9, NANOGP10 ve NANOGP11 psödogenler eksik intronları, okuma çerçevesi içinde stop kodunu bulundurması veya

okuma çerçevelerinin kayması gibi nedenlerle protein üretemektedirler. NANOGP1 ise duplike psödodendir. NANOG ile çok benzer ekson-intron organizasyonuna sahiptir ve fiziksel olarak da birbirlerine bağlıdır. Sekans dizimi %97 NANOG ile aynıdır. Fakat NANOGP1 dizisindeki bir nükleotidin değişimi ile dizinin başlarında stop kodonu oluşmaktadır. Dolayısıyla mRNA'sı düzgün bir protein kodlayamamaktadır. NANOGP8 okuma çerçevesine sahip olan ve fonksiyonel olabileceği düşünülen psödodendir (28). Farelerde yapılan bir çalışmada, NANOG proteini western blot ile incelendiğinde, antikorun kolaylıkta fragmente olup bir merdiven (ladder) şeklinde bant görüntüsü verdiği; bununda proteinin sürekli turnover geçirmesi nedeniyle olabileceği savunulmuştur. Ayrıca NANOG'un çekirdekte lokalize olduğu gösterilmiştir (29). İnsan embriyonik kök hücreleri, neonatal fibroblastlar, HeLa hücreleri (servikal kanser hücreleri), SH-SY5Y (nöroblastoma hücreleri), ve insan mezenşimal kök hücreleri embriyonik NANOG ifade ederken; erişkin fibroblastlar, HUVEC hücreleri (endotel hücreleri), total kalp dokusu ve insan düz kas hücrelerinin sadece NANOGP8 ifade ettiği gösterilmiştir. Aynı zamanda farklı hücre tiplerinde NANOG proteininin farklı hücrel lokalizasyonuna sahip olduğu belirlenmiştir. NANOG yada NANOGP8 ifade etmelerinin lokalizasyon açısından anlamlı bir farkı olmadığı, iki formunda farklı hücrelerde sitoplazmik yada nükleik olabileceği ve lokalizasyonun hücre tipine göre değiştiği gözlemlenmiştir. NANOG proteininin birden fazla bant vermesinin post translasyonel modifikasyonlardan kaynaklanabileceği de savunulmuştur (27). Farelerde NANOG proteininin 3 adet varyantı olduğu saptanmıştır. Alternatif bölünme ile 3 farklı NANOG proteininin oluştuğu ve 3 varyantında kendini yenileyemeyi koruyabildiği gösterilmiştir. Aynı zamanda bu farklı varyantların farklı kDa'a sahip olduğundan, ladder formuna b varyantların sebep olabileceği belirtilmiştir. Ayrıca, NANOG isoformlarının sitoplazmada bulunduğu gösterilmiştir (30). İnsan servikal kanser hücrelerinde (SCC) de, NANOG varlığı sitoplazmik olarak gösterilmiş; NANOG hücrel lokalizasyonun hücre tipine ve kanserin safhasına göre değiştiği bildirilmiştir (31). Tüm bu çalışmaların ışığında, bu çalışmanın sonuçları karşılaştırıldığında, NANOG proteininin periferik kanda bulunduğu söylenebilir. NANOG proteininin bir ladder oluşturduğu gözlemlendiğinde, western blot için optimize etmesi zor bir antikor olduğunu düşünülmüştür. Ayrıca, belirli katmanlarda farklı ağırlıkta bantlar görülmekte; bu da NANOG proteininin farklı hücre gruplarında farklı post translasyonel modifikasyonlara uğrayabileceğini göstermektedir. Aynı zamanda farklı NANOG varyantlarında, farklı hücre gruplarında bulunabileceğini ortaya çıkartmaktadır. Bunlar hakkında kesin kaniye varabilmek için ayrıca gen düzeyinde PCR gibi ilave testlerle de gösterilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada, lizis katmanında bir ekspresyon görülmezken, MNC katmanında NANOG ifade edilmektedir. 5. Katmanda ise 27 kDa yakınlarında bir bant grubu gözlemlenmiştir. Normal NANOG bantından çok aşağılarda böyle bir ban-

tın olması, belki NANOG proteinin fragmente olarak böyle bantlar vermiş olabileceğini düşündürmektedir. Genel olarak 5. Katmanda protein miktarının çok az olması hücre grubu hakkında yorum yapmayı kısıtlı bir alana itmektedir.

Yapılan immünfloresan boyama ile özellikle sitoplazmada tüm katmanlarda NANOG saptanmıştır. Şimdiye kadar NANOG varlığı embriyonik kök hücrelerde, primordiyal germ hücrelerinde, insan germ hücre tümörlerinde, mezenşimal kök hücrelerde, testis kanserinde, meme kansinomalarda, fetal testisde, malin servikal epital hücrelerinde ve erişkin insan fibroblastlarında gösterilmiştir (31-35). NANOG proteininin başka hangi hücrelerde olduğu veya psödogeni olan NANOGP8'in nasıl bir etki yarattığını bilinmemektedir. Sitoplazmik yada nükleik olmasının nasıl bir değişikliğe veya fonksiyona neden olduğunu, hangi mekanizmalarla sitoplazmik NANOG oluştuğuna dair bir bilgi de bulunmamaktadır. Bu konuda daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak, 5. Katmanda Bhartiya ve ekibinin gösterdiği derecede yüksek pluripotent özellikte, rejenerasyon kapasitesi yüksek yeterli miktarda hücre grubuna rastlanmamıştır. 5. Katmanda pluripotent özellik gösteren hücreler var olsa da, yeterli miktarda ve sayıda bulunmadıkları ve transplantasyon başarısını arttıracabilecek düzeyde olamayacakları düşünülmektedir. Lizis ve MNC katmanları ele alınırsa, fikal kullanımının hücre miktarını azalttığı ve hücre kaybına neden olduğu da gösterilmiştir. VSEL hücrelerini ve hematopoetik kök hücrelerinin korunması ve materyaldeki bütün değerlendirilmek isteniyorsa fikal kullanımı sınırlandırılmalıdır.

VSEL hücrelerinin varlığı ve miktarı hakkında western blot ile kesin olarak bir yargıya varmak pek mümkün görünmemektedir. Bunun nedeni, kullanılan pluripotent belirteçlerin çeşitli izoformlarının olması ve bu izoformların western blot ile birbirinden ayırt edilememesidir. Flov sonuçlarına göre bakıldığında pluripotent belirteçleri taşıyan hücre miktarı Zuba-Surma ve arkadaşlarının gösterdiği gibi debrıs kısmında daha fazla görünmektedir. Bu hücrelerin küçük olmaları debrısları karışmalarına ve bu yüzden gözden kaçmalarına neden olmaktadır. VSEL hücrelerinin karakterlerinin tam olarak anlaşılabilmesi için daha fazla araştırma yapılmalıdır. Bu hücrelerin kendini yenileyebilme kapasitesi, buldukları dokular ve işlevlerinin anlaşılması sonunda klinik kullanım potansiyellerinin de yolu açılacaktır.

Teşekkür: Periferik kan materyalinin sağlanmasında yardımcı olan İstanbul Üniversitesi Kan merkezi yönetimine ve çalışanlarına teşekkür ederiz.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı, İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan (20.06.2013 tarih ve 724 no) alınmıştır.

Bilgilendirilmiş Onam: Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

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

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından desteklenmiştir (Proje kodu: 35553).

Acknowledgement: Thanks to Istanbul University Blood Center managers and workers for their help with the peripheral blood materials.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the ethics committee of Istanbul Faculty of Medicine.

Informed Consent: Written consent was obtained from the participants.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

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

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: This study was supported by Istanbul University Scientific Research Projects Unit (BAP) (Project code: 35553).

KAYNAKLAR

1. Kucia M, Reza R, Campbell FR, Zuba-Surma E, Majka M, Ratajczak J. et al, A population of very embryonic-like (VSEL) CXCR4+ SSEA-1+ Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia* 2006;20:857-69. [\[CrossRef\]](#)
2. Zuba-Surma EK, Kucia M, Ratajczak J, Ratajczak MZ. "Small stem cells" in adult tissues: Very small embryonic-like stem cells (VSELs) Stand up. *Cytometry* 2009;75(1):4-13. [\[CrossRef\]](#)
3. Kucia M, Wysoczynski M, Wu W, Zuba-Surma EK, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Evidence that very small embryonic-like stem cells are mobilized into peripheral blood. *Stem Cells* 2008;26:2083-92. [\[CrossRef\]](#)
4. Loos H, Blok-Schut B, Van Doorn R, Hoksbergen R, Riviere AB, Meerhof L. A method for the recognition and separation of human blood monocytes on density gradient. *Blood* 1976;48:731-42.
5. Bhartiya D, Shaikh A, Nagvenkar P, Kasiviswanathan S, Pethe Prasad, Pawani H, et al. Very small embryonic-like stem cells with maximum regenerative potential get discarded during cord blood banking and bone marrow processing for autologous stem cell therapy. *Stem Cells Dev* 2012;21(1):1-6. [\[CrossRef\]](#)
6. Chang Y, Tien K, Wen C, Hsieh T, Hwang S. Recovery of CD45(-)/Lin(-)/SSEA-4(+) very small embryonic-like stem cells by cord blood bank standard operating procedures. *Cytotherapy* 2014;16(4):560-5. [\[CrossRef\]](#)
7. Sovalat H, Scrofani M, Eidsenchen A, Pasquet S, Rimelen V, Henon P. Identification and isolation from either adult human bone marrow or G-CSF-mobilized peripheral blood of CD34+/CD133+/CXCR4+/ Lin-CD45- cells, featuring morphological, molecular, and phenotypic characteristics of very small embryonic-like (VSEL) stem cells. *Exp Hematol* 2011;39:495-505. [\[CrossRef\]](#)
8. Ratajczak MZ, Zuba-Surma E, Wojakowski W, Kucia M, Ratajczak J. Bone marrow – Home of versatile stem cells. *Transfus Med Hemother* 2008;35:248-59. [\[CrossRef\]](#)
9. Kucia M, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Are bone marrow stem cells plastic or heterogenous – That is the question. *Exp Hematol* 2005;33:613-23. [\[CrossRef\]](#)
10. Ratajczak MZ, Zuba-Surma E, Wojakowski W, Suszynska M, Liu R, Ratajczak J, et al. Very small embryonic-like stem cells (VSELs) represent a real challenge in stem cell biology: recent pros and cons in the midst of a lively debate. *Leukemia* 2014;28:473-84. [\[CrossRef\]](#)
11. Parker GC. Very small embryonic-like stem cells: A scientific debate? *Stem Cells Dev* 2014;23(7):687-8. [\[CrossRef\]](#)
12. Kassmer SH, Krause DS. Very small embryonic-like stem cells: Biology and function of these potential endogenous pluripotent stem cells in adult tissues. *Mol Reprod Dev* 2013;80:677-90. [\[CrossRef\]](#)
13. Heider A, Danova-Alt R, Egger D, Cross M, Alt R. Murine and human very small embryonic-like cells: A perspective. *Cytometry* 2012;83A:72-5. [\[CrossRef\]](#)
14. Kucia M, Halasa M, Wysoczynski M, Baskiewicz-Masiuk M, Moldenhawer S, Zuba-Surma E. et al. Morphological and molecular characterization of novel population of CXCR4+/SSEA-4+/Oct-4+ very small embryonic-like cells purified from human cord blood – preliminary report. *Leukemia* 2007;21:297-303. [\[CrossRef\]](#)
15. Zangrossi S, Marabese M, Brogginini M, Giordano R, D'Erasmus M, Montelatici E. et al. Oct-4 expression in adult human differentiated cells challenges its role as a pure stem cell marker. *Stem Cells* 2007;25:1675-80. [\[CrossRef\]](#)
16. Lee J, Kim HK, Rho J, Han Y, Kim J. Human Oct4 isoforms differ in their ability to confer self-renewal. *J Biol Chem* 2006;281:33554-65. [\[CrossRef\]](#)
17. Kaufmann G, Liebaers I, Steirteghem AV, Velde HVD. POU5F1 isoforms show different expression patterns in human embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Stem Cells* 2006;24:2685-91. [\[CrossRef\]](#)
18. Liedtke S, Enczmann J, Walclawczyk S, Wernet P, Kögler G. Oct4 and its pseudogenes confuse stem cell research. *Cell Stem Cell* 2007;1:364-6. [\[CrossRef\]](#)
19. Tai M, Chang C, Olson LK, Trosko JE. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2005;26(2):495-502. [\[CrossRef\]](#)

20. Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SAM, Gokhale PJ, Andrews PW. OCT4 spliced variants are differentially expressed in human pluripotent and nonpluripotent cells. *Stem Cells* 2008; 26:3068-74. [\[CrossRef\]](#)
21. Redshaw Z, Strain A. Human hemotopoietic stem cells express Oct4 pseudogenes and lack the ability to initiate Oct4 promoter-driven gene expression. *J Negat Results Biomed* 2010;9(1):2. [\[CrossRef\]](#)
22. Ambady S, Malcuit C, Kashpur O, Kole D, Holmes WF, Hedblom E. et al. *Int Dev Biol* 2010;54:1743-54. [\[CrossRef\]](#)
23. Booth HAF, Holland PWH. Eleven daughters of NANOG. *Genomics* 2004;84:229-38. [\[CrossRef\]](#)
24. Hatano S, Tada M, Kimura H, Yamaguchi S, Kono T, Nakano T. et al. Pluripotential competence of cells associated with Nanog activity. *Mec Develop* 2005;22:67-79. [\[CrossRef\]](#)
25. Levasseur DN, Das S, Jena S. Alternative splicing produces nanog protein variants with different capacities for self-renewal and pluripotency in embryonic stem cells. *J Biol Chem* 2011;286:42690-703. [\[CrossRef\]](#)
26. Gu T, Liu S, Zheng P. Cytoplasmic NANOG- positive stromal cells promote human cervical cancer progression. *Am J Pathol* 2012;181(2):652-60. [\[CrossRef\]](#)
27. Ezeh UI, Turek PJ, Reijo RA, Clark AT. Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma. *Cancer* 2005;104:2255-65. [\[CrossRef\]](#)
28. Page R, Ambady S, Holmes WF, Vilner L, Kole D, Kashpur O, et al. Induction of stem cell gene expression in adult human fibroblasts without transgenes. *Cloning stem cells* 2009;11(3):417-25. [\[CrossRef\]](#)
29. Alvarez A, Hossain M, Dantuma E, Merchant S, Sugaya K. NANOG overexpression allows human mesenchymal stem cells to differentiate into neural cells. *Neurosci Med* 2010;1:1-13. [\[CrossRef\]](#)
30. Eberle I, Pless B, Braun M, Dingermann T, Marschalek R. Transcriptional properties of human NANOG1 and NANOG2 in acute leukemic cells. *Nucleic Acids Res* 2010; 38(16):5384-95. [\[CrossRef\]](#)

SIÇANLARDA PTZ-KAYNAKLI NÖBETLERDE ERİTROPOİETİNİN HİPOKAMPUS VE FRONTAL KORTEKSTE NİTRİK OKSİT SENTAZ TÜRLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

EFFECTS OF ERYTHROPOIETIN ON NITRIC OXIDE SYNTHASE TYPES IN THE HIPPOCAMPUS AND FRONTAL CORTEX IN PTZ-INDUCED SEIZURES IN RATS

Ayşegül KAPUCU¹ 

¹İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, İstanbul, Türkiye

ORCID IDs of the author: A.K. 0000-0002-0946-1407

Cite this article as: Kapucu A. Effects of erythropoietin on nitric oxide synthase types in the hippocampus and frontal cortex in PTZ-induced seizures in rats. J Ist Faculty Med 2019;82(2):107-15. doi: 10.26650/IUITFD.416053

ÖZET

Amaç: Öğrenme-hafıza bozukluklarında ve epileptogenezde önemli bir medyatör olan nitrik oksit, hipokampus başta olmak üzere beyin birçok bölgesinde nöronal hücrelerde nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından oluşturulur. Eritropoietin (EPO)'nun nöroprotektif ve antiepileptik etkileri olduğu gösterilmiştir. EPO ön-uygulamasının, pentilentetrazol (PTZ) ile indüklenen jeneralize nöbet modelinde konvulsiyonlar ve hipokampus ve frontal kortekste NOS türleri üzerine etkilerini araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem: *Wistar albino* 40 erkek sıçan 4 gruba ayrıldı: kontrol, PTZ-tek doz 60 mg/kg; EPO-3000 IU/kg; EPO+PTZ grubu-PTZ uygulanmasından 24 saat önce EPO ön-uygulaması yapılan grup. PTZ uygulamasından sonra, nöbet şiddeti gözlemlendi ve skorlandı. Sıçanların plazma, hipokampus ve frontal korteks örneklerinde nöronal NOS (nNOS), endotelial NOS (eNOS), indüklenbilir NOS (iNOS) düzeyleri ve hipokampusde NOS türlerinin anlatımları değerlendirildi.

Bulgular: EPO ön-uygulaması nöbet şiddetini azalttı. Tek başına EPO uygulaması nNOS düzeyini plazma ($p<0,001$), frontal korteks ($p<0,05$) ve hipokampus ($p<0,001$) örneklerinde azalttı. Hipokampus nNOS düzeyi ve anlatımı, EPO+PTZ grubunda, PTZ grubuna göre arttı ($p<0,001$). PTZ uygulamasıyla hipokampusde eNOS ($p<0,01$) ve iNOS ($p<0,05$) azalırken; EPO ön-uygulamasıyla kontrole yakın olduğu gözlemlendi.

Sonuç: EPO ön-uygulaması antikonvulsif etkilerini, eNOS ve nNOS düzeylerini artırarak gösterdi. EPO ön-uygulaması, eNOS aracılığıyla hipokampusde kan akımını artırarak, nöronların hiperexcitabilitesini azaltabilir. Ayrıca EPO, antioksidan görevi göerek eNOS ve nNOS'un azalmasını engelleyerek antikonvulsif etkilerine katkıda bulunabilir.

Anahtar Kelimeler: Eritropoietin, nitrik oksit sentaz, hipokampus, nöbet

ABSTRACT

Objective: Nitric oxide, an important mediator in the dysfunctions of learning-memory and epileptogenesis, is formed by nitric oxide synthase (NOS) in neuronal cells in many areas of the brain, primarily the hippocampus. It has been shown that erythropoietin (EPO) has neuroprotective and antiepileptic effects. The aims of this study was to investigate the effects of EPO pre-treatment on convulsions and NOS species in the hippocampus and frontal cortex in pentylene tetrazole (PTZ)-induced generalized seizure model.

Material and Method: Forty adult male *Wistar albino* rats were divided into four groups: Control-saline; PTZ-single dose 60 mg/kg; EPO-3000 IU/kg; and EPO+PTZ- EPO pretreatment 24 hours before PTZ administration. After the administration of PTZ, the seizure severity (stage) was observed and scored. The levels of neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS), inducible NOS (iNOS) levels in the plasma, hippocampus and frontal cortex specimens of animals and expressions of NOS species in the hippocampus tissues were examined.

Results: EPO pretreatment decreased seizure stage ($p<0.01$). EPO administration alone reduced nNOS levels in plasma ($p<0.001$), frontal cortex ($p<0.05$), hippocampus ($p<0.001$). Hippocampus nNOS level and expression increased in the EPO+PTZ group compared to the PTZ group ($p<0.001$). eNOS ($p<0.01$) and iNOS ($p<0.05$) levels of hippocampus decreased in the PTZ group; EPO pretreatment before PTZ application improved nNOS level.

Conclusion: The EPO pre-treatment demonstrated anticonvulsive effects by increasing eNOS and nNOS levels. EPO pre-treatment can reduce the hyperexcitability of neurons by increasing blood flow in the hippocampus via eNOS. In addition, EPO may contribute to its anticonvulsive effects by inhibiting the decrease of eNOS and nNOS by acting as antioxidant.

Keywords: Erythropoietin, nitric oxide synthase, hippocampus, seizure

İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: akapucu@istanbul.edu.tr

Geliş tarihi/Received Date: 17.04.2018 • Kabul tarihi/Accepted Date: 31.10.2018

©Telif Hakkı 2019 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2019 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

GİRİŞ

Epilepsi dünyada sık görülen dördüncü nörolojik bir hastalıktır ve beyindeki sinir hücrelerinin artmış uyarılabilirliğinden (nöronal hiperekstabilite) kaynaklanır (1). Epileptik nöbetlerin antiepileptik ilaçlarla engellenebileceği, yüzyıl kadar önce sodyum pentotalin bulunuşu ve kullanılmasıyla ortaya konmuştur (2). Pentilenterazol (PTZ) ve maksimal elektroşok deneysel nöbet modelleri, yaygın olarak antiepileptik ilaçların değerlendirilmesinde kullanılan deneysel modellerdir. PTZ, γ -aminobütirik asit-A (GABA-A) reseptörün antagonisti olarak davranır ve glutamerjik nöronal aktivitenin artmasıyla PTZ-indüklü konvülsif nöbetler gerçekleşir (3).

Öğrenme-hafıza bozuklukları ve epilepsi patogeneğinde önemli bir medyatör olan nitrik oksit (NO) hipokampus başta olmak üzere beyinin birçok bölgesinde nöronal hücrelerde nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından L-argininin L-sitrüline dönüştürülmesi sırasında oluşur ve üç tip NOS vardır, endotelial NOS (eNOS), nöronal NOS (nNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS) (4). nNOS ve eNOS, nöronlarda ve endotelial hücrelerde eksprese edilirken; iNOS reaktif astrositlerde eksprese edilir ve immün fonksiyona aracılık eder (5). eNOS'dan kökenli NO, beyindeki mikro sirkülasyonun korunması ve sürdürülmesinde rol oynamaktadır (6). Ayrıca nörotoksititeye karşı koruyucudur ve nöronal sağ kalım için önemlidir. nNOS'dan türetilen NO, nöronal plastisite, bellek oluşumu, merkezi sinir sistemi kan akışının düzenlenmesi, ağrı sinyalleri iletimi ve nörotransmitter salınımı ile ilişkili önemli bir nörotransmitter olarak görev yapar (7). Aşırı miktarda nöronal NO üretildiğinde fizyolojik bir nöromodülatörden nörotoksik bir faktöre dönüşebilir. Bu nedenle nNOS, geniş bir yelpazede hem fizyolojik ve hem de patolojik koşullarda önemlidir. iNOS, pro-inflamatuvar sitokinlere veya endotoksine yanıt olarak makrofajlar, glial hücreler ve tümör hücrelerinde eksprese edilir. Reaktif astrositlerde iNOS ekspresyonunun artması, glutamaterjik yolu uyarır ve hiperekstabiliteye neden olur (5). iNOS aracılı NO, status epileptikus (SE) sonrası dönemde, yani epileptojenез döneminde nöronları uyarıma devam eder (8) ve bu faktörler, nöronları nöbet eşişğini daha da düşürmek için ısrarla duyarlı hale getirir (9).

Klinik ve deneysel çalışmalar, uzun süreli epileptik nöbetlerin çoğunlukla hipokampusta nöronal hasar oluşturarak bilişsel fonksiyonlarda bozulmaya neden olduğunu göstermiştir (10). Öğrenme ve hafızadan sorumlu olan hipokampus, cornu ammonis (CA) ve dentat girus olmak üzere iki kısımdan oluşur. Hipokampusun CA bölgesi CA1, CA2, CA3 ve CA4 olmak üzere dört zondan oluştuğu kabul edilir. CA1 ve CA2 zonları küçük piramidal hücrelerden, CA3 ve CA4 zonları geniş piramidal hücrelerden oluşur. Dentat girus bir kavite şeklindedir ve küçük granül hücrelerden oluşmaktadır. Deneysel oluşturulmuş status epileptikus

modellerinde CA1 bölgesindeki piramidal nöronlar serebral iskemiyeye karşı daha hassas oldukları (11, 12), hipokampus CA1, CA3 piramidal nöronlar ve dentat hilus bölgesi granüler nöronlarda histolojik değişiklikler saptanmıştır (13). Ayrıca temporal lob epilepsisinde CA1'in en fazla etkilenen hipokampus alt bölgesi olduğu rapor edilmiştir (14). İlâveten hipokampus alt bölgeleri (DG, CA3, CA1) arasındaki intrahipokampal bağlantılar, epileptik durum oluşturabilen eksitator geri besleme halkaları içeren devrelere sahiptir. CA1 bölgesi nöronları spasyal (uzaysal) öğrenme ve bellek için gereklidir. CA1 bölgesi bir hata dedektörü gibi çalışır ve kortikal bilgiler ile CA3 ve entorniyal korteksten gelen bilgiler arasında uyumsuzluk olup olmadığını kontrol eder. CA1 ve CA3'deki hücre sayıları adölesan dönemden önce daha az iken bu dönemden sonra giderek artmaktadır (15). Epileptik nöbetler ve bilişsel bozukluk ilişkisi iyi bilinmektedir. Uzun süreli anıların oluşumu ve depolanmasındaki zorluklar nöbetlerde hipokampus dışında diğer beyin bölgelerinin de etkilendiğini düşündürmektedir (16, 17). Frontal korteks hipokampusda kodlanan bilgilerin uzun süreli hafızada depolanmasından sorumlu olduğu bilinen en önemli beyin bölgesidir (18). Dolayısıyla çalışmamızda PTZ ile indüklediğimiz nöbetlerin frontal kortekste NOS türlerinin ekspresyonuna eritropoietinin etkisini de araştırdık.

Eritropoietin (EPO) esasen eritropoezde rol oynar. EPO'nun geniş yelpazede nörodejeneratif hastalık modellerinde pleitropik etkileri ortaya konmuştur. EPO öntedavisinin serebral iskemiyeye, travma modellerinde nöron koruyucu ve antiinflamatuvar etkileri, deneysel indüklenmiş epileptik nöbet modellerinde antiepileptik etkisi gösterilmiştir (19-21). EPO'nun vazodilatasyonla sonuçlanan nörovasküler yanıtında kan akışını artırma yoluyla NO üretimini artırarak nöroprotektif etkileri rapor edilmiştir (22). NO'nun, nöronal hücre kültürlerinde EPO reseptörü (EpoR) ekspresyonunu indükleyebildiği (23), vazodilatasyon yoluyla oksijen teminini artırabileceği ve dolayısıyla doku koruyucu etkileri sağlayabileceği ancak NO'nun aşırı üretilmesinin nörotoksik olduğuda bilinmektedir (24). Basal gangliyon hücre kültürlerinde, NO uygulamasının, glial hücrelerde EPO'nun hipoksi indükleyici faktör (HIF) aracılı transkripsiyonuna bağlı olarak aksonal dejenerasyona karşı koruma sağladığı gösterilmiştir (25).

Bu çalışmada, PTZ ile indüklediğimiz tonik klonik nöbetlerden 24 saat önce EPO uygulamasının nöbet davranışı ile (proflaktik olarak) plazma, frontal korteks ve hipokampus CA1, CA3 ve DG bölgelerinde NOS türlerinin düzeyleri üzerine etkileri araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney düzeneği ve gruplar

Bu çalışmada kırk adet ağırlıkları 300-350 g arasında değişen 3 aylık erkek *Wistar albino* sıçan kullanıldı ve sıçanlar standart laboratuvar koşullarında (12 saat aydınlık-12 saat

karanlık, $21 \pm 1^\circ\text{C}$ oda sıcaklığı, ad-libitum su ve besin) barındırıldı. Tüm deneyler ulusal sağlık enstitüleri tarafından kabul edilen deney hayvanları bakımı ve kullanımı ilgili kurallar çerçevesinde Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nde (Etik Kurul Onayı 2016/128 sayılı, 22.04.2016 tarihli olarak Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 'ndan alındı) gerçekleştirildi. Hayvanlar rastgele olarak : (i) tek başına serum fizyolojik (SF) uygulanan (kontrol, n=10); (ii) tek başına pentilentetrazol (PTZ, n=10) uygulanan (24 saat önce SF uygulandı), (iii) tek başına EPO uygulanan (SF uygulamasından 24 saat önce EPO, n=10) ve (iv) PTZ enjeksiyonundan 24 saat önce EPO uygulanan (EPO + PTZ, n=10) olmak üzere dört gruba ayrılmıştır.

Uygulanan maddeler ve dozları

Rekombinant insan eritropoietini, (r-HuEPO, Eprex; Epoetin alfa, 3000 IU/ml, Santa Farma, Turkey) intraperitoneal (i.p) 3000 IU/kg olacak şekilde SF içerisinde seyreltilerek kullanıldı. Bu doz daha önce kullanılmış olup herhangi bir yan etkisi görülmemesi (17) sebebiyle tercih edilmiştir. EPO veya SF uygulamalarından 24 saat sonra sıçanlara SF içinde çözündürülen 60 mg/kg i.p. PTZ (Sigma) uygulanmıştır. Kontrol ve EPO kontrol gruplarındaki sıçanlara serum fizyolojik uygulandı.

Epileptik nöbetler geçirildikten 48 saat sonra (kısa ve uzun süreli hafıza testi yapılmıştır, ancak sonuçları burada değerlendirilmemiştir) biyokimyasal analizler için 6 hayvandan kardiyak kan alındı, dekapite edilen hayvanların hipokampus ve korteksleri ayrılarak sıvı azotla donduruldu ve -80°C saklandı. Alınan kanlar 3000 xg'de santrifüjlenerek çalışılmak üzere saklandı. İmmunohistokimyasal çalışmalar için ise perfüzyon yöntemi uygulandı.

PTZ indüklü nöbet şiddetlerinin değerlendirilmesi

Nöbet şiddeti; PTZ verildikten sonra iki saat süre ile sıçanlar gözlenerek nöbetler Racine skalasına göre skorlandı (26). 0 nöbet yok; 1 jeneralize myoklonikjerk (bir kasın geçici olarak kasılıp sarsılması); 2 doğrulma kaybının eşlik etmediği jeneralize klonik nöbet; 3 doğrulma kaybının eşlik ettiği jeneralize klonik nöbet; 4 ön ekstremitte tonusu ile doğrulma kaybı; 5 arka ekstremitte tonusu ile doğrulma refleksinin kaybı olarak kabul edilerek nöbet şiddeti belirlendi.

Hipokampus ve frontal korteks dokularında ve plazma örneklerinde biyokimyasal belirteçlerin çalışılması

Dondurularak saklanan hipokampus ve frontal korteks dokuları 137 mM NaCl, 10 mM fosfat ve 2,7 mM KCl içeren ve pH'sı 7,4 olan fosfat tamponunda (PBS) homojenize edildikten sonra $+4^\circ\text{C}$ 'de 10000g'de 15 dakika santrifüj edildi. Plazma ve doku (hipokampus ve korteks) örneklerinde nNOS (SunLong, SL1253Ra, China), iNOS (SunLong, SL1250Ra, China), eNOS (SunLong, SL1251Ra, China) belirteçleri çalışıldı.

İmmunohistokimyasal metod

Deney sırasında 4 sıçanın perfüzyon yöntemiyle kısmen fikse edilen beyinleri, sağ ve sol hemisferler olarak ayrıldı. %10 nötral formalinde fikse edildi. Dokular daha sonra parafin bloklar haline getirilerek 5 μm kalınlığında alınan kesitler immunohistokimyasal çalışmalar için kullanıldı.

Lamlara alınan kesitler deparafinizasyon ve dehidratasyon işlemlerinden sonra saf suda yıkandı. Lamlar mikrodalga fırında sitrat tamponu (pH:6,0) içerisinde 600 Watt'ta 10 dakika kaynatıldıktan sonra oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Sitrat tamponunun ardından saf suda yıkanan kesitler 10-15 dakika boyunca PBS (pH:7,2)'de bekletildi. Tüm kesitler, endojen peroksidaz aktivitesinin engellenmesi için, oda sıcaklığında ve nemli ortamda %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) (Merck, 1,08597) içinde 10 dakika tutulduktan sonra PBS'e alındı. Daha sonra, kesitlere oda sıcaklığında 10 dakika Ultra V blok (Thermo Scientific, TA-125-UB) uygulandı. Kesitler nNOS (1:150 dilüsyonunda, Invitrogen 617000) ve eNOS (1:100 dilüsyonunda Labvision RB9279) antikoları $+4^\circ\text{C}$ 'de bir gece (18 saat), iNOS antikoru (1:100 dilüsyonunda, Lab Vision RB1605) ile oda ısısında 1 saat tutuldu. Tüm antikolar, UltrAb Diluent (Lab Vision, TA-125-UD)'de sulandırıldı. Lamlar, PBS' de 3 kez 5'er dakika yıkandıktan sonra, 30 dakika oda sıcaklığında, keçiden elde edilmiş biyotinlenmiş anti-tavşan sekonder antikoru (Thermo Scientific, TP-125-BN) ile inkübe edildi. Kesitler PBS' de yıkandıktan sonra, peroksidaz ile işaretli streptavidin (Thermo Scientific, TS-125-HR)'de oda sıcaklığında 30 dakika tutuldu. Renkli reaksiyon ürününün oluşması için, maksimum 10 dakika AEC (3-amino-9-etilkarbazol) (Thermo Scientific, TA-004-HAC) ile inkübe edildikten sonra distile su ile yıkandı. 45 saniye boyunca Mayer hematoksilende (Lab Vision, TA-125-MH) tutularak zıt boyama yapılan kesitler, 5 dakika musluk suyunda yıkandıktan sonra gliserol jelatin (Lab Vision, TA-125-UG) ile kapatıldı. Leica ışık mikroskobu ile incelenerek hipokampusun CA3, CA1 ve DG alanlarındaki eNOS, iNOS ve nNOS pozitif reaksiyonlu hücrelerin dağılımı H-skor ile değerlendirildi. [H-skor=S Pi (i + 1), "i" reaksiyon şiddeti ve "P" reaksiyon gösteren hücre yüzdesi] (21). DG, CA3 ve CA1 bölgelelerinin H-skorları birlikte değerlendirilerek ortak bir H-skor değeri elde edildi ve gruplar karşılaştırıldı.

İstatistiksel Analiz

Elde edilen tüm veriler Instat istatistik yazılımı (Instat Graphpad Yazılımı, San Diego, CA, ABD) kullanılarak analiz edilmiştir. Normal dağılım için grupların uyumluluğunun test edilmesinin ardından, doku homojeniteleri ve plazma örnekleri, tek yönlü varyans analizi uygulanarak Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılarak değerlendirildi. Nöbet şiddeti ise student-t testi (Mann Whitney post test) ile değerlendirildi. Değerler \pm standart sapma olarak ifade edildi. $P < 0,05$ değeri tüm analizlerde istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

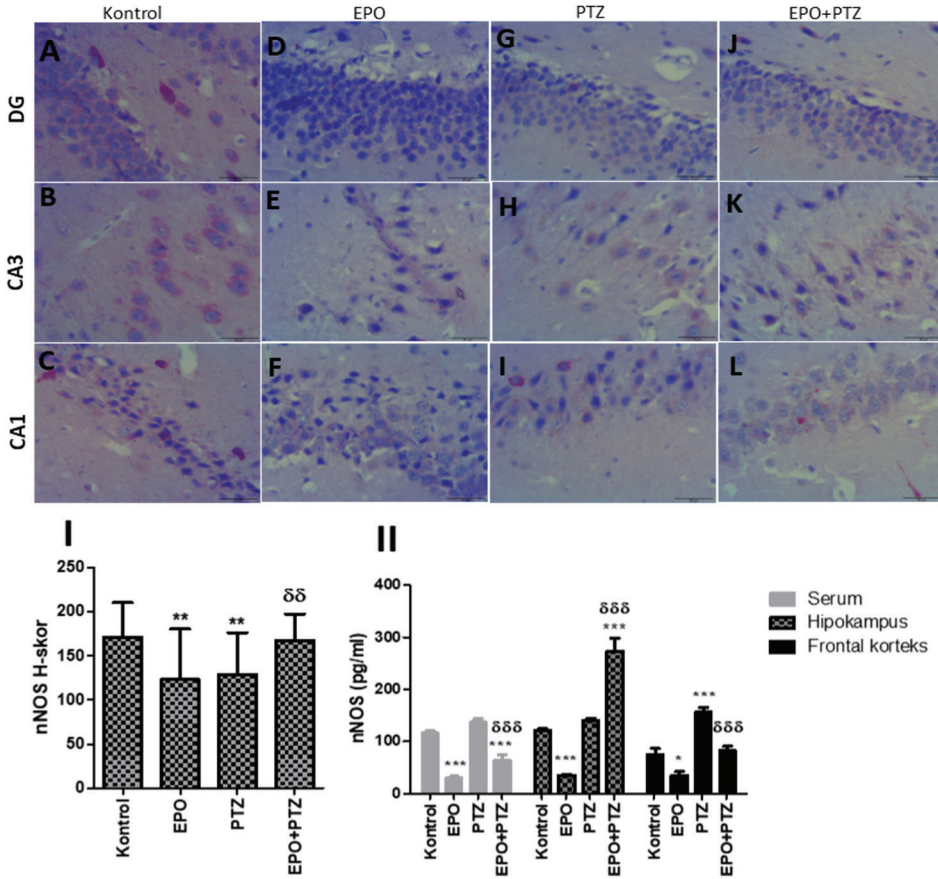
EPO ön-uygulamasının nöbet şiddeti üzerine etkileri

PTZ uygulanması sonucunda nöbet şiddeti $4,8 \pm 0,4$ olarak skorlanırken, EPO ön-uygulamasıyla nöbet şiddetlerinin $3,4 \pm 0,5$ olduğu ve EPO ön uygulamasının nöbet şiddetini anlamlı olarak azalttığı ($p < 0,01$) tespit edildi. Son PTZ uygulamasından sonra olacak şekilde hafıza testi (kısa ve uzun süreli hafıza) yapılmıştır ancak sonuçlar verilmemiştir.

EPO ön-uygulamasının plazma, hipokampus ve frontal korteks örneklerinde nNOS düzeyi ve hipokampusteki ekspresyonu üzerine etkisi

Plazma nNOS düzeyleri kontrol grubunda $116,8 \pm 9,5$; EPO grubunda $29,9 \pm 9$; PTZ grubunda $133,9 \pm 16,6$; EPO+PTZ grubunda $64,1 \pm 25$ pg/ml'dir. Kontrol grubuna göre EPO

grubu nNOS düzeyinin anlamlı olarak azaldığı ($p < 0,001$) görülürken, PTZ grubunda ise anlamlı bir değişiklik görülmedi. EPO+PTZ grubunun plazma nNOS düzeyi PTZ grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldı ($p < 0,001$). Hipokampus nNOS düzeyleri değerlendirildiğinde ise, EPO uygulanan grupta ($35,6 \pm 1,8$) kontrol grubuna ($121,3 \pm 7,4$) göre anlamlı olarak azalış ($p < 0,001$) görülürken; PTZ uygulanan grupta ($140,9 \pm 9,5$) ise kontrole göre farklılık tespit edilmedi. EPO+PTZ grubu nNOS düzeyi ($273,6 \pm 59$) ise PTZ grubuna göre anlamlı olarak arttı ($p < 0,001$) (Şekil 1). Frontal korteks nNOS düzeyleri kontrol grubuna ($74,6 \pm 30,1$) göre; EPO uygulanan grupta ($35,1 \pm 18,5$) azaldığı ($p < 0,05$); PTZ uygulanan grupta ($156,3 \pm 22$) ise anlamlı olarak arttığı ($p < 0,001$) görüldü. Frontal korteks nNOS düzeyi EPO+PTZ grubunda ($82,8 \pm 20,2$) ise, PTZ grubuna göre azaldı ($p < 0,001$) (Şekil 1).



Şekil 1: Hipokampusde nNOS anlatımı ile plazma, hipokampus ve frontal korteks doku örneklerinde nNOS düzeyleri. A: Kontrol grubu DG, B: Kontrol grubu CA3, C: Kontrol grubu CA1, D: EPO grubu DG, E: EPO grubu CA3, F: EPO grubu CA1, G: PTZ grubu DG, H: PTZ grubu CA3, I: PTZ grubu CA1, J: EPO+PTZ grubu DG, K: EPO+PTZ grubu CA3 ve L: EPO+PTZ grubu CA1 bölgelerinde nNOS anlatımı gösterilmektedir. I: Hipokampusteki nNOS anlatımının H-skor olarak gösterilmesi (n=4). II: Plazma, hipokampus ve frontal korteks örneklerinde nNOS düzeyleri (n=6).*, kontrol grubuna; δ, PTZ grubuna göre karşılaştırmayı ifade etmektedir. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; δδ $p < 0,01$; δδδ $p < 0,001$. Veriler ortalama±standart sapma olarak değerlendirilmiştir.

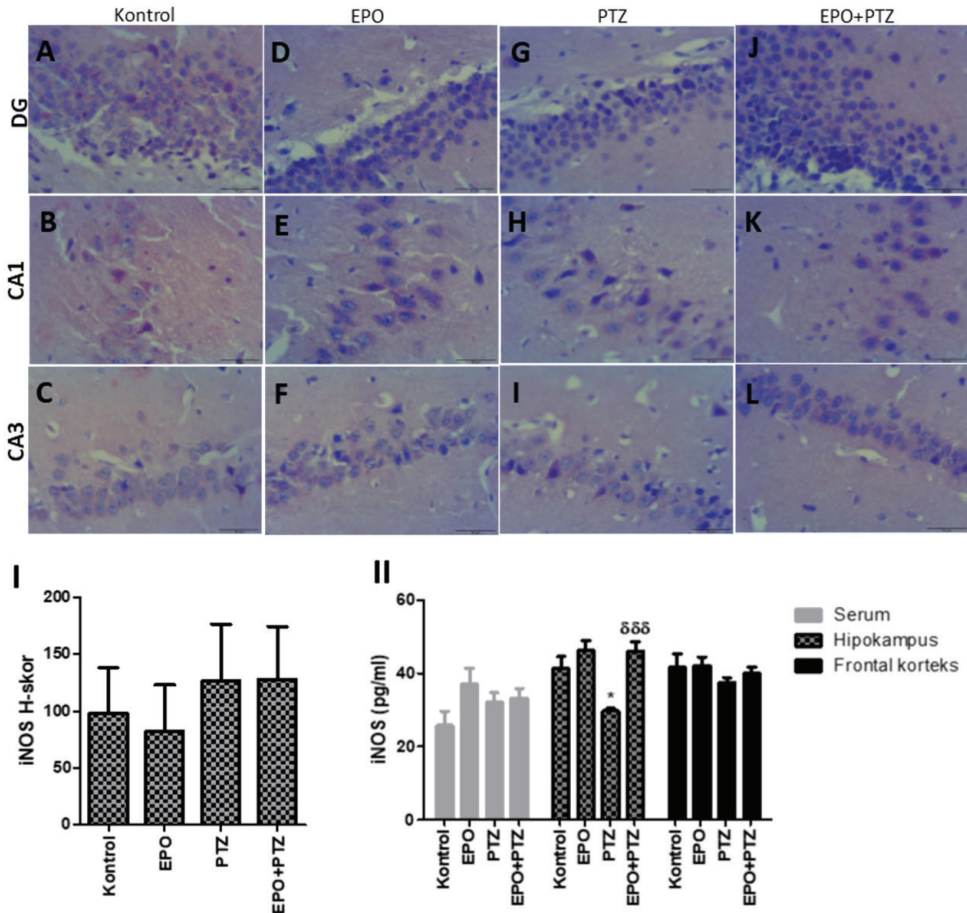
Hipokampusun CA3, CA1 ve DG alanlarında immunohistokimyasal olarak nNOS pozitif reaksiyonunun şiddeti incelendiğinde EPO grubunda ve PTZ grubunda nNOS reaksiyonunun kontrol grubuna göre azaldığı ($p<0,01$) gözlemlendi. EPO ön-uygulamasından 24 saat sonra PTZ verilen gruptan nNOS anlatımının, PTZ grubuna göre anlamlı olarak bir artışı görüldü ($p<0,01$) (Şekil 1).

EPO ön-uygulamasının plazma, hipokampus ve frontal korteks örneklerinde iNOS düzeyi ve hipokampusteki ekspresyonu üzerine etkisi

Plazma iNOS düzeyleri kontrol grubunda $25,9\pm9,5$; EPO grubunda $37,0\pm10,7$; PTZ grubunda $32,1\pm6,4$ ve EPO+PTZ grubunda $33,2\pm6,7$ pg/ml'dir ve gruplar arasında anlamlı bir farklılık yoktu. Hipokampus iNOS düzeyinde, EPO uygulanan grup ($46,3\pm6,3$) ile kontrol grubu

($41,4\pm8,0$) arasında anlamlı bir farklılık gözlenmezken; PTZ uygulanan grupta ($29,8\pm1,5$) iNOS düzeyinin kontrol grubuna göre ($p<0,05$) azaldığı görüldü. EPO+PTZ grubu iNOS düzeyi ($46,1\pm6,2$), PTZ grubuna göre arttı ($p<0,001$) (Şekil 2). Frontal korteks iNOS düzeyleri ise kontrol grubunda $41,8\pm8,6$; EPO grubunda $42,2\pm5,6$; PTZ grubunda $37,6\pm3,0$ ve EPO+PTZ grubunda $40,0\pm4,3$ pg/ml'dir ve gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı.

İmmunohistokimyasal olarak hipokampusun CA3, CA1 ve DG alanları incelendiğinde EPO grubundave PTZ grubunda iNOS pozitif reaksiyonu, kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık göstermedi. EPO ön-uygulamasından 24 saat sonra PTZ verilen grup ile PTZ grubu arasında da belirgin farklılık gözlemlenmedi (Şekil 2).

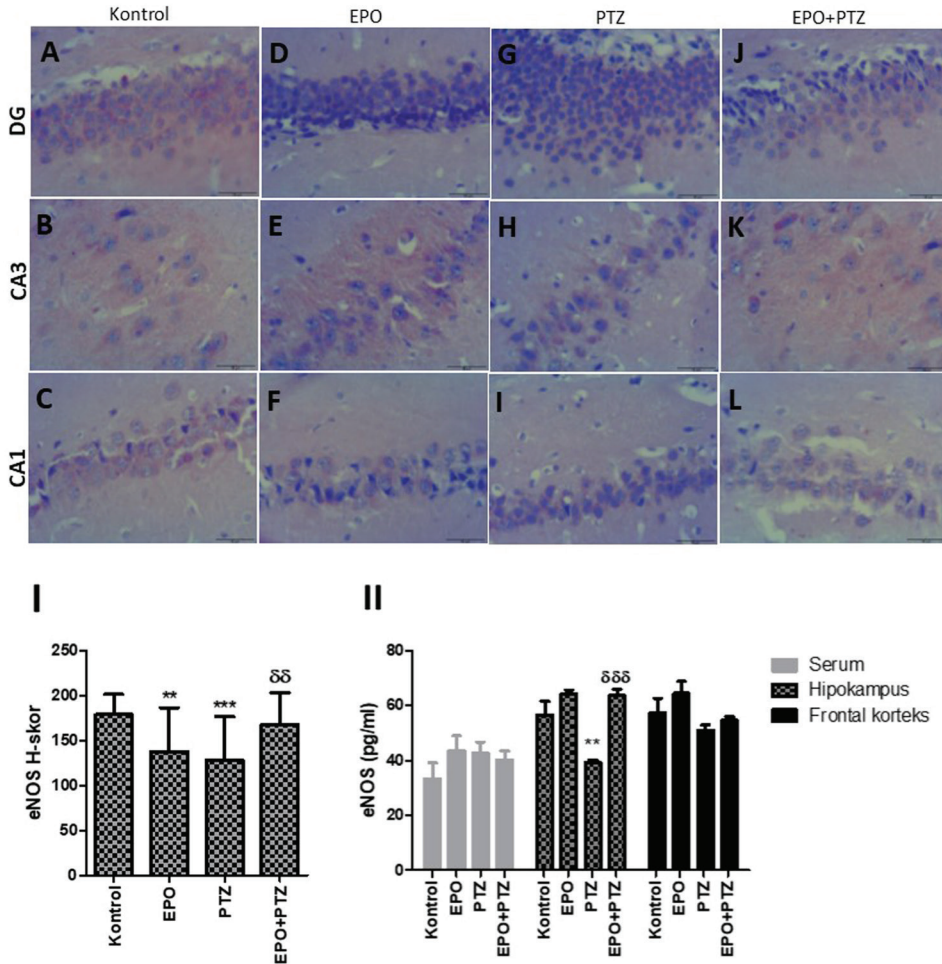


Şekil 2: Hipokampusde iNOS anlatımı ile plazma, hipokampus ve frontal korteks doku örneklerinde iNOS düzeyleri. A: Kontrol grubu DG, B: Kontrol grubu CA3, C: Kontrol grubu CA1, D: EPO grubu DG, E: EPO grubu CA3, F: EPO grubu CA1, G: PTZ grubu DG, H: PTZ grubu CA3, I: PTZ grubu CA1, J: EPO+PTZ grubu DG, K: EPO+PTZ grubu CA3 ve L: EPO+PTZ grubu CA1 bölgelerinde iNOS anlatımları gösterilmektedir. I: Hipokampusteki iNOS anlatımının H-skor olarak gösterilmesi (n=4). II: Plazma, hipokampus ve frontal korteks örneklerinde iNOS düzeyleri (n=6). *, kontrol grubuna; δ, PTZ grubuna göre karşılaştırmayı ifade etmektedir. * $p<0,05$; ** $p<0,001$; ^{δδδ} $p<0,001$. Veriler ortalama±standart sapma olarak değerlendirilmiştir.

EPO ön-uygulamasının plazma, hipokampus ve frontal korteks örneklerinde eNOS düzeyi ve hipokampusteki ekspresyonu üzerine etkisi

Plazma eNOS düzeyleri kontrol grubunda $33,3 \pm 14,2$; EPO grubunda $43,5 \pm 13,3$; PTZ grubunda $42,7 \pm 9,5$; EPO+PTZ grubunda $40,1 \pm 8,1$ pg/ml'dir ve gruplar arasında anlamlı bir farklılık yoktur. Hipokampus eNOS düzeyleri kontrol grubunda $56,8 \pm 12$; PTZ uygulanan grupta $39,2 \pm 2,2$; EPO grubuna $64,1 \pm 3,6$ ve EPO+PTZ grubunda $63,7 \pm 5,3$ pg/ml'dir. PTZ grubu hipokampal eNOS düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalırken ($p < 0,01$); EPO grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık görülmedi. EPO+PTZ grubunda ise PTZ grubuna göre eNOS düzeyinin arttığı ($p < 0,001$) ve kontrol ile EPO gruplarına yaklaştığı görüldü (Şekil 3). Frontal korteks eNOS düzeyleri ise kontrol grubunda $57,3 \pm 13$; EPO grubunda $64,4 \pm 10,7$; PTZ grubunda $51,0 \pm 4,5$ ve EPO+PTZ grubunda $54,5 \pm 3,3$ pg/ml'dir ve gruplar arasında anlamlı bir farklılık yoktur (Şekil 3).

İmmünohistokimyasal olarak hipokampusun CA3, CA1 ve DG alanlarındaki eNOS pozitif reaksiyonu EPO grubunda ($p < 0,01$) ve PTZ grubunda ($p < 0,001$) kontrol grubuna göre azaldı. EPO ön-uygulamasından 24 saat sonra PTZ verilen grupta eNOS anlatımının PTZ grubuna göre ($p < 0,01$) anlamlı olarak arttığı görüldü (Şekil 3).



Şekil 3: Hipokampusteki eNOS anlatımı ile plazma, hipokampus ve frontal korteks doku örneklerinde eNOS düzeyleri. A: Kontrol grubu DG, B: Kontrol grubu CA3, C: Kontrol grubu CA1, D: EPO grubu DG, E: EPO grubu CA3, F: EPO grubu CA1, G: PTZ grubu DG, H: PTZ grubu CA3, I: PTZ grubu CA1, J: EPO+PTZ grubu DG, K: EPO+PTZ grubu CA3 ve L: EPO+PTZ grubu CA1 bölgelerinde eNOS anlatımları gösterilmektedir. I: Hipokampusteki eNOS anlatımının H-skoru olarak gösterilmesi (n=4). II: Plazma, hipokampus ve frontal korteks örneklerinde eNOS düzeyleri (n=6). *kontrol grubuna; δ , PTZ grubuna göre karşılaştırmayı ifade etmektedir. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $\delta\delta$ $p < 0,01$; $\delta\delta\delta$ $p < 0,001$. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak değerlendirilmiştir.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Eritropoietin, antikonvulsan etkileriyle beraber, üç NOS izoformu üzerinden hipokampus veya frontal korteksde farklı etkiler göstermektedir. PTZ uygulamasından 24 saat önce EPO uygulanması, hipokampusda ağırlıklı olarak nNOS olmak üzere kısmen eNOS ve iNOS üzerinden hipokampus ve frontal korteksde etkileri olmaktadır.

Deneyssel olarak indüklenen nöbetlerde, EPO ön-tedavisinin serebral iskemi, travma modellerinde nöron koruyucu ve antiinflamatuvar etkileri gösterilmiştir (20, 21). Bizim de çalışmamızda EPO ön-uygulanmasıyla nöbet şiddetlerinin azaldığını gösterdik ve literatürle uyumludur. NMDA reseptörlerinin aktivasyonu L-argininden NO üreten enzimleri tetikler (27). EPO'nun nöroprotektif etkisinde NO'nun sorumluluğu, genellikle NO'nun vazodilatatör etkisi yani kan akımını artırması ile açıklanmaktadır (22). NO'nun, nöronal hücre kültürlerinde EpoR ekspresyonunu indükleyebildiği (23), vazodilatasyon yoluyla oksijen teminini artırabileceği ve dolayısıyla doku koruyucu etkileri sağlayabileceği ancak NO'nun aşırı üretilmesinin nörotoksik olduğu da bilinmektedir (24). Bazal gangliyon hücre kültürlerinde, NO uygulamasının, glial hücrelerde EPO'nun HIF aracılıklı transkripsiyonuna bağlı olarak aksonal dejenerasyona karşı koruma sağladığı gösterilmiştir (25).

Farelerde, normal koşullarda NO içeriği serebral korteksin temporal bölgesinde (amigdala dahil); hipokampus, serebellum ve serebral korteksin diğer bölgelerinden daha fazla olduğu bildirilmiştir (28). PTZ indüklü konvulsif nöbetlerden sonra tüm beyin bölgelerinde NO miktarının %50'den fazla arttığı gösterilmiştir (3). nNOS (-/-) olan farelerde, PTZ ile nöbet oluşması daha yüksektir (29). PTZ, dozuna da bağlı olarak beyin farklı bölgelerinde farklı hücrelerde farklı etkiler gösterir. NO, NOS bağımlı hücreye özgü sinyal kompleksleri aracılığıyla bu etkilerini seğileyebilir (30). NO'nun prokonvulsan etkisini rapor eden çalışmalar (31, 32), yanında antikonvulsan etkisini gösteren çalışmalarda mevcuttur (29). PTZ ile indüklenen kindling nöbetlerde NO'nun elektriksel deşarjları azaltarak antikonvulsan etkisi gösterilmiştir (32). nNOS tarafından NO üretimi, hipoksi süresince veya sonrasında artar (33). Bizim çalışmamızda da PTZ ile oluşturulan tonik klonik nöbetler sonrasında frontal korteksde nNOS düzeyi artış göstermiştir. Ancak PTZ grubunda, serum düzeyinin aksine hipokampus alt bölgelerinde nNOS ekspresyonunun düşmesinin bir nedeni epileptik nöbetlerin indüklediği oksidatif stres olabilir. NMDA reseptörü içeren nöronların yüksek oranda nNOS içerdikleri rapor edilmiştir (34). Epileptik nöbetlere özellikle hipokampal nöronların hassasiyeti ve nöbetlerin oluşumunda hipokampal nöronlardaki aşırı elektriksel aktivitenin sorumluluğu bilinmektedir. Dolayısıyla frontal korteksten farklı olarak hipokampusda NMDA reseptörlerinin aşırı aktivasyonu, hücre içine aşırı kalsiyum girişi reaktif oksijen ürünlerinin oluşumuna ne-

den olur. Bu oksidatif ürünlerin hipokampusda nNOS ile reaksiyona girip oksidatif peroksit ürünlerinin oluşumuna (35) böylece hipokampusda nNOS'da azalmaya neden olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca deneyin hafıza testinden sonra sonlandırılması, iyileşme süreçlerinin devreye girmiş olmasını da etkin kılmış olabilir. İlginç olarak tek başına EPO uygulamasından sonra hem plazma, hipokampus ve frontal korteksdeki düzeyleri ve hem de hipokampusdeki nNOS anlatımının (kontrol grubuna kıyasla) çok belirgin olarak düşmüş olması, tek başına EPO uygulamasının nNOS üzerine baskılayıcı olabileceğini düşündürmektedir. Bu düşüncemiz Kılıc ve ark. (2005) tarafından yapılan murin beyinde rhEPO'sunun transgenik ekspresyonu, striatal nöronlarda nNOS ekspresyonunu baskıladığını bildiren çalışmayla da örtüşmektedir (36).

NO'in, kortikal nöronlarda eksitotoksositeye karşı koruyucu fakat hipokampusdaki nöronlarda uyarılabilirliğe karşı hücre tiplerine özgü etki gösterdiği düşünülmektedir (30). Glial (Shwann) hücre kültüründe, NO-indüklü aksonal korumanın hipoksi indükleyici faktör (HIF)-1 aracılı olarak EPO transkripsiyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir (25). Çalışmamızda da EPO uygulamasından sonra PTZ verilen hayvanların hipokampuslarında nNOS ekspresyonunun kontrol seviyesinde korunması, EPO'nun antioksidan etkisine bağlı olduğunu düşündürmektedir. EPO hipokampusda oksidatif stresi azaltarak mevcut nNOS ekspresyonunun korunmasını sağlayabilir. Nitekim EPO ön tedavisinin, PTZ indüklü epileptik nöbetlerin hipokampusda indüklediği lipid peroksidasyon ürünü olan MDA seviyesini düşürdüğü gösterilmiştir (21).

PTZ verilerek akut nöbet oluştuktan 1 saat sonra izole edilen sıçan hipokampuslarında iNOS düzeyi artarken eNOS düzeyinin azaldığı bildirilmektedir (21). Buna karşın 60 mg/kg PTZ ile indüklenen akut nöbetlerde hipokampusda iNOS ekspresyonunun değişmediğini rapor eden çalışma da mevcuttur (37). Bizim çalışmamızda PTZ verilen grupta hipokampus eNOS düzeyi literatürle uyumlu şekilde düşmüştü, ancak ilginç olarak iNOS düzeyleri de düşüktü. Bu durum literatürle çelişmektedir. Bunun nedeni nöbetlerden sonra örneklerin alınma süreleri arasındaki farklılık olabilir. Ayrıca nöbetlerin neden olduğu oksidatif stres tüm NOS türleri ile üretilmiş NO ile birleşerek reaktif nitrojen ürünleri oluşturabilir, bu nedenle diğer NOS türlerinde olduğu gibi iNOS da düşük bulunmuş olabilir. Nitekim reaktif oksijen ürünlerinin iNOS ile reaksiyonu yüksek oranda gerçekleşmektedir. EPO'nun, inflamatuvar uyarılara maruz kalmış oligodendrositlerdeki proinflamatuvar medyatör olan iNOS ekspresyonunu hafiflettiği, buna karşın EPO'nun orta düzeyde eNOS'u aktive edebileceği bildirilmektedir (37). Bahçekapılı ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada EPO ön uygulaması ile hipokampusda eNOS düzeyinin arttığı, iNOS seviyesinin de azaldığı rapor edilmiştir (21). Çalışmamızda PTZ uygulamasından önce EPO ön-uygulanması ile hipokampusde-

ki iNOS ve eNOS düzeyleri ve anlatımları kontrol grubu değerlerine yaklaştı. eNOS ve iNOS normal değerlere yaklaşıırken, nNOS düzeyinin yaklaşık 2 kat kadar hipokampusde belirgin olarak artmış olması, EPO ön-uygulamasının tonik klonik nöbetlerde hipokampusde nNOS'u artırarak koruyucu özelliklerini sergileyebileceğini düşündürmektedir. Bu düşünce de, nNOS'un beynin farklı bölgelerinde ve farklı durumlarda prokonvulsan veya antikonvulsan davranış sergilediği şeklinde yorumlanabilir. Bazı çalışmalarda nNOS'un antikonvulsan özelliklerinin de ortaya konmasıyla epilepsi tedavilerinde NO aracılı tedavi yöntemlerini ve olasılıklarını geliştirme gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, EPO ön uygulaması yapılan kontrol grubu hayvanların serum, hipokampus ve frontal korteks örneklerinde nNOS düzeyinin düşük olması ilginç bir bulgu olarak karşımıza çıkmaktadır ve bu bulgu bize EPO'nun ağırlıklı olarak nNOS'u da etkileyebileceğini gösterir.

Çalışmamızda hipokampusdeki NOS türleri anlatımlarının zaman zaman biyokimyasal ölçümlerden farklı olması, biyokimyasal incelemeler için total hipokampus dokusu kullanılması ve anlatımlarının incelemesi hipokampusdeki belli zonlardaki hücrelerin sayımı ile ince bir kesit üzerinde yapılmış olmasından kaynaklanmış olabilir.

Sonuç olarak, EPO ön-uygulamasının nöbet şiddetini azalttığı ve PTZ indüklü nöbetlerden 48 saat sonra deneyin sonlandırılmasıyla EPO uygulaması, hipokampus alt bölgelerinde eNOS ve daha belirgin olarak nNOS düzeyini artırmıştır. EPO'nun antiepileptik etkisini NOS'lar bağlamında değerlendirecek olursak; EPO ön tedavisi; 1) eNOS aracılığıyla nöbete hassas bölge olan hipokampusda kan akımını artırarak nöbetlerin neden olduğu iskeminin engellenmesi ve dolayısıyla kanlanmanın azalmasına bağlı nöronlardaki hipereksitabilitenin engellenmesi ile, 2) muhtemelen antioksidan etki ile nöbetlerin neden olduğu oksidatif etkiyi azaltıp antioksidan etki ile hem eNOS hem de nNOS'un azalmasını engellemiştir. Böylelikle EPO ön tedavisi eNOS ve nNOS aracılığı ile antikonvulzif etki gösterebilir. Bu preliminere ancak özgün bulgularımız EPO'nun antiepileptik ve antiamezik etkisinde NO'nun sorumluluğunun spesifik NO inhibitörleri ile daha ileri araştırılması gerekliliğini düşündürdü.

Teşekkür: Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje No: 21796). Ayrıca Prof. Dr. Kadriye Akgün Dar ve Prof. Dr. Gülay Üzüm'e desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Etik Komite Onayı: Etik komite onayı bu çalışma için, yerel etik komiteden alınmıştır.

Bilgilendirilmiş Onam: Gerekli değil.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

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

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu araştırmanın finansal desteği, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Koordinasyon Birimi tarafından sağlanmıştır.

Acknowledgments: This work was supported by Scientific Research Project Coordination Unit of Istanbul University. Project number: 21796. Also, I would like to thank Prof. Dr. Kadriye Akgün Dar and Prof. Dr. Gülay Üzüm for their supports.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the local ethics committee.

Informed Consent: Not required.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

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

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: Financial and/or material support for this research has been provided from an institution named Scientific Research Project Coordination Unit of Istanbul University.

KAYNAKLAR

1. Palabıyık M. Kronik levetirasetam uygulanan normal ve temporal lob epilepsi modeli oluşturulmuş sıçanlarda aromataz ekspresyonu değişiklikleri. 2015 Ankara Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi.
2. Shorvon SD. Drug treatment of epilepsy in the century of the ILAE: the second 50 years, 1959–2009. *Epilepsia* 2009;50(s3):93-130. [CrossRef]
3. Watanabe M, Miyai A, Danjo S, Nakamura Y, Itoh K. The threshold of pentylene-tetrazole-induced convulsive seizures, but not that of nonconvulsive seizures, is controlled by the nitric oxide levels in murine brains. *Exp Neurol* 2013;247:645-52. [CrossRef]
4. Brown GC. Nitric oxide and neuronal death. *Nitric oxide* 2010; 23(3):153-65. [CrossRef]
5. Samland H, Huitron-Resendiz S, Masliah E, Criado J, Henriksen SJ, Campbell IL. Profound increase in sensitivity to glutamatergic-but not cholinergic agonist-induced seizures in transgenic mice with astrocyte production of IL-6. *J Neurosci Res* 2003;73(2):176-87. [CrossRef]
6. Toda N, Ayajiki K, Okamura T. Cerebral blood flow regulation by nitric oxide: recent advances. *Pharmacol Rev* 2009;61(1):62-97. [CrossRef]

7. Toda N, Okamura T. The pharmacology of nitric oxide in the peripheral nervous system of blood vessels. *Pharmacol Rev* 2003;55(2);271-324. [\[CrossRef\]](#)
8. Kim SY, Buckwalter M, Soreq H, Vezzani A, Kaufer D. Blood-brain barrier dysfunction-induced inflammatory signaling in brain pathology and epileptogenesis. *Epilepsia* 2012;53(6);37-44. [\[CrossRef\]](#)
9. Vezzani A, Balosso S, Ravizza T. Inflammation and epilepsy. *Handb Clin Neurol*. 2012;107;163-75. [\[CrossRef\]](#)
10. Vezzani A, Auvin S, Ravizza T, Aronica E. Glia-neuronal interactions in ictogenesis and epileptogenesis: role of inflammatory mediators. In: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, et al, editors. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* [Internet]. 4th edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012. [\[CrossRef\]](#)
11. İzci Y, Erbaş YC. Hippocampus: Its Structure and Functions, *Türk Nöroşir Derg*, 2015;25:3;287-95.
12. Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto SI, Hatano O, Kawahara N, Nakafuku M. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 2002;110(4);429-41. [\[CrossRef\]](#)
13. Nadler JV, Perry BW, Cotman CW. Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells. *Nature* 1978;271(5646);676. [\[CrossRef\]](#)
14. Lehmann TN, Gabriel S, Kovacs R, Eilers A, Kivi A, Schulze K et al. Alterations of neuronal connectivity in area CA1 of hippocampal slices from temporal lobe epilepsy patients and from pilocarpine-treated epileptic rats. *Epilepsia* 2000;41(6);S190-4. [\[CrossRef\]](#)
15. Suzuki M, Hagino H, Nohara S, Zhou SY, Kawasaki Y, Takahashi T, Kurachi M. Male-specific volume expansion of the human hippocampus during adolescence. *Cereb Cortex* 2004;15(2);187-93. [\[CrossRef\]](#)
16. Stretton J, Thompson PJ. Frontal lobe function in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 2012;98(1);1-13. [\[CrossRef\]](#)
17. Cave CB, Squire LR. Intact verbal and nonverbal short-term memory following damage to the human hippocampus. *Hippocampus* 1992;2(2);151-63. [\[CrossRef\]](#)
18. Chapados C, Petrides M. Ventrolateral and dorsomedial frontal cortex lesions impair mnemonic context retrieval. *Proc Biol Sci* 2015;282(1801);20142555.
19. Erbaş O, Çınar BP, Solmaz V, Çavuşoğlu T, Ateş U. The neuroprotective effect of erythropoietin on experimental Parkinson model in rats. *Neuropeptides* 2015;49;1-5. [\[CrossRef\]](#)
20. Gu L, Xu H, Wang F, Xu G, Sinha D, Wang J, Lu L. Erythropoietin exerts a neuroprotective function against glutamate neurotoxicity in experimental diabetic retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55(12);8208-22. [\[CrossRef\]](#)
21. Bahçekapılı N, Akgün-Dar K, Albeniz I, Kapucu A., Kandil A., Yağız O, Üzüm G. Erythropoietin pretreatment suppresses seizures and prevents the increase in inflammatory mediators during pentylenetetrazole-induced generalized seizures. *Int J Neurosci* 2014;124(10);762-70. [\[CrossRef\]](#)
22. Genc S, Kuralay F, Genc K, Akhisaroglu M, Fadiloglu S, Yorukoglu K, Gure A. Erythropoietin exerts neuroprotection in 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-treated C57/BL mice via increasing nitric oxide production. *Neurosci Lett* 2001;298(2);139-41. [\[CrossRef\]](#)
23. Chen ZY, Wang L, Asavaritkrai P, Noguchi CT. Up-regulation of erythropoietin receptor by nitric oxide mediates hypoxia preconditioning. *J Neurosci Res* 2010;88(14);3180-8. [\[CrossRef\]](#)
24. Tian J, Kim SF, Hester L, Snyder SH. S-nitrosylation/activation of COX-2 mediates NMDA neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci* 2008;105(30);10537-40. [\[CrossRef\]](#)
25. Keswani SC, Bosch-Marcé M, Reed N, Fischer A, Semenza GL, Höke A. Nitric oxide prevents axonal degeneration by inducing HIF-1-dependent expression of erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci* 2011;108(12);4986-90. [\[CrossRef\]](#)
26. Homayoun H, Khavandgar S, Dehpour AR. Anticonvulsant effects of cyclosporin A on pentylenetetrazol-induced seizure and kindling: modulation by nitric oxide system. *Brain Res* 2002;939:1-10. [\[CrossRef\]](#)
27. Lüscher C, Malenka RC. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;4(6);a005710. [\[CrossRef\]](#)
28. Itoh K, Watanabe M. Paradoxical facilitation of pentylenetetrazole-induced convulsion susceptibility in mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Neuroscience* 2009;159;735-43. [\[CrossRef\]](#)
29. Gotti S, Sica M, Viglietti-Panzica C, Panzica G. Distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the mouse brain. *Microsc Res Tech* 2005;68(1);13-35. [\[CrossRef\]](#)
30. Sandoval R, Gonzalez A, Caviades A, Pancetti F, Smalla KH, Kaehne T, Michea L, Gundelfinger ED, Wyneken U. Homeostatic NMDA receptor down-regulation via brain derived neurotrophic factor and nitric oxide-dependent signalling in cortical but not in hippocampal neurons. *J Neurochem* 2011;118;760-72. [\[CrossRef\]](#)
31. Chuang YC, Chen SD, Lin TK, Liou CW, Chang WN, Chan SH, Chang AY. Upregulation of nitric oxide synthase II contributes to apoptotic cell death in the hippocampal CA3 subfield via a cytochrome c/caspase-3 signaling cascade following induction of experimental temporal lobe status epilepticus in the rat. *Neuropharmacology* 2007;52;1263-73. [\[CrossRef\]](#)
32. Kovacs R, Rabanus A, Otahal J, Patzak A, Kardos J, Albus K, Heinemann U, Kann O. Endogenous nitric oxide is a key promoting factor for initiation of seizure-like events in hippocampal and entorhinal cortex slices. *J Neurosci* 2009;29;8565-77. [\[CrossRef\]](#)
33. Garry PS, Ezra M, Rowland MJ, Westbrook J, Pattinson KTS. The role of the nitric oxide pathway in brain injury and its treatment—from bench to bedside. *Exp Neurol* 2015;263;235-43. [\[CrossRef\]](#)
34. Standaert DG. NMDA receptors and nitric oxide synthase. *Nature* 1999;4;13-14.
35. Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide, mitochondria, and cell death. *IUBMB life* 2001;52(3-5);189-95. [\[CrossRef\]](#)
36. Kilic U, Kilic E, Soliz J, Bassetti CI, Gassmann M, Hermann DM. Erythropoietin protects from axotomy-induced degeneration of retinal ganglion cells by activating ERK-1/2. *FASEB J* 2005;19(2);249-51. [\[CrossRef\]](#)
37. Abdallah DM. Genetics- Anticonvulsant potential of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist pioglitazone in pentylenetetrazole-induced acute seizures and kindling in mice. In: Acton QA, editor. *Epilepsy: New Insights for the Healthcare Professional*. Atlanta; 2011. p.72.
38. Nguyen AQ, Cherry BH, Scott GF, Ryou MG, Mallet RT. Erythropoietin: powerful protection of ischemic and post-ischemic brain. *Exp Biol Med* 2014;239(11);1461-75. [\[CrossRef\]](#)

SENDROMİK VE NON-SENDROMİK KRANIYOSİNOSTOZ OLGULARINDA *FGFR1-3*, *TWIST1*, *MSX2*, *POR*, *FREM1* VE *RAB23* GENLERİNİN MOLEKÜLER ANALİZİ

MOLECULAR ANALYSIS OF *FGFR1-3*, *TWIST1*, *MSX2*, *POR*, *FREM1* AND *RAB23* GENES IN SYNDROMIC AND NON-SYNDROMIC CRANIOSYNOSTOSIS CASES

Volkan KARAMAN¹ , Güven TOKSOY¹ , Birsen KARAMAN¹ , Hülya KAYSERİLİ KARABEY¹ , Seher BAŞARAN¹ , Umur ALTUNOĞLU¹ , Şahin AVCI¹ , Zehra Oya UYGUNER¹ 

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

ORCID IDs of the authors: V.K. 0000-0001-8777-3548; G.T. 0000-0002-8103-9980; B.K. 0000-0001-8640-0176, H.K. 0000-0003-0376-499X; S.B. 0000-0001-8668-4746; U.A. 0000-0002-3172-5368; Ş.A. 0000-0001-9545-6657; Z.O.U. 0000-0002-2035-4338

Cite this article as: Karaman V, Toksoy G, Karaman B, Kayserili Karabey H, Basaran S, Altunoglu U, et al. Molecular analysis of *FGFR1-3*, *TWIST1*, *MSX2*, *POR*, *FREM1* and *RAB23* genes in syndromic and non-syndromic craniosynostosis cases. J Ist Faculty Med 2019;82(2):116-22. doi: 10.26650/IUITFD.422258

ÖZET

Amaç: Sendromik (SCS) ve non-sendromik kraniyosinostozlu (NSCS) olgularda, kraniyosinostoz tipleriyle ilişkilendirilmiş genlerde (*FGFR1-3*, *TWIST1*, *MSX2*, *POR*, *FREM1* ve *RAB23*) mutasyonların araştırılması ve moleküler genetik tanı için akılcı bir akış şeması oluşturulması.

Gereç ve Yöntem: İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD'da kromozom anomalisi dışlanmış, altısı prenatal ve 34'ü postnatal tanı alan, dokuzu NSCS ve 31'i SCS toplam 40 olgu ile 34 sağlıklı ebeveyn çalışmamıza dahil edildi. SCS'li olguların dokuzu Pfeiffer (PS), altısı Crouzon (CRS), beşi Apert (AS), yedisi Saethre-Chatzen (SaCS) ve dördü Muenke (MUS)/Saethre Chatzen (SaCS) idi. Kraniyosinostoz tipine göre mutasyonların en sık görüldüğü gen/ekzon bölgelerinden başlanarak, tüm gen ve ilişkili diğer genler aşamalı olarak Sanger dizileme yöntemi ile incelendi. Mutasyon saptanmayan olgularda incelenen genlerdeki büyük delesyon ve duplikasyonlar *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) yöntemi ile araştırıldı.

Bulgular: Olgularımızın %50'sinde dizi analizi ile ve %2,5'unda MLPA yöntemi ile klinik bulguları destekleyen moleküler genetik sonuçlara ulaşıldı. Moleküler tanı oranı SCS grubunda %64,5, NSCS grubunda %11,1 oldu.

Sonuç: Sendromik olgularda moleküler tanı oranı seri ortalamasının üzerinde idi. Birinci basamakta *FGFR2* geni ekzon 7-8'de olası mutasyonlar dışlandıktan sonra, ikinci basamaktaki hedef ekzonlara (3, 5, 11, 14-17) ekzon 12 ve 13'ün ilavesi PS'de mutasyon saptama oranını %33 arttırdı. Çalışmamız, moleküler tanı alan ailelere özgün genetik danışma olanağı sağladı. CS olgularında izlenen akış şemasında Sanger dizileme ile 1. ve 2. basamak testlerden sonra mutasyon saptanmayan olguların yeni nesil dizileme tekniği ile klinik ekzom ve yüksek çözünürlüklü mikroarray çalışmasına alınmasının uygun olacağına karar verildi.

Anahtar Kelimeler: Kraniyosinostoz, *FGFR*, *TWIST1*

ABSTRACT

Objective: Craniosynostosis (CS) associated genes (*FGFR1-3*, *TWIST1*, *MSX2*, *POR*, *FREM1* and *RAB23*) were investigated in order to determine the mutation rates and establish an effective flow chart for molecular genetic diagnosis for syndromic (SCS) and non-syndromic craniosynostosis (NSCS).

Material and Method: A total of 40 cases, including six prenatal cases, with normal karyotypes, and 34 parents were investigated in the Medical Genetics Department of Istanbul Medical Faculty. The clinical diagnosis was NSCS in 9, Pfeiffer in 9 (PS), Crouzon in 6 (CRS), Apert in 5 (AS), Saethre-Chatzen in 7 (SaCS) and Muenke/Saethre Chatzen in 4 (MUS/SaCS) of the cases. According to the clinical diagnosis, the hot spot mutation sites of genes/exons were screened initially and the whole gene and other genes were progressively examined by Sanger sequencing. The Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) technique was applied to detect deletions/duplications.

Results: Molecular results were achieved in 50% of cases by sequencing and in 2.5% by MLPA. Molecular diagnosis rate was 64.5% in SCSs and 11.1% in NSCSs.

Conclusion: Molecular diagnosis rate was higher in the SCS than in the NSCS group. Including exons 12 and 13 to target exons (3, 5, 11, 14-17) of *FGFR2* gene increases the mutation rate by 33% in the second step of the molecular investigation in PS cases. Genetic counseling with the families following molecular diagnosis is important. Our results supported the fact that CS cases with un-identified pathogenic variants in the first and second steps of the algorithmic chart, should be followed by clinical exome and high resolution microarray techniques.

Keywords: Craniosynostosis, *FGFR*, *TWIST1*

İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: volkan.karaman@istanbul.edu.tr

Geliş tarihi/Received Date: 09.05.2018 • **Kabul tarihi/Accepted Date:** 08.10.2018

©Telif Hakkı 2019 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2019 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

GİRİŞ

Kafatası kemiklerini birleştiren kraniyal sütürler, fibröz dokular olup doğum sırasında kafanın kanaldan rahat geçmesine ve ilerleyen süreçte beynin büyümesine olanak sağlar (1, 2). Beyin kubbesinde sagittal, koronal, metopik ve lambdoid olmak üzere sekiz adet kraniyal sütür bulunur. Sütürlerin erken füzyonu sinostoz, sütürlerden bir veya birkaçının erken kapanması ile ortaya çıkan malformasyon da kraniyosinostoz (CS) olarak tanımlanır. 1/2100-1/2500 canlı doğumda bir gözlenen (3, 4) bu malformasyonun varlığında beyin, kranyumun açık olan sütürleri yönünde büyümeye devam eder ve kapanan sütüre özgün (trigonocefali, skafosefali, akrosefali, plagiosefali, ve brakisefali vb.) deformasyonlar ortaya çıkar. CS'ların önemli bir kısmı izole formda non-sendromik (NSCS), pek azı ek bulguların eşlik ettiği sendromik formda (SCS) gözlenir. İzole formlar; sagittal, lambdoid, koronal (tek veya çift taraflı sütürün etkilenmesiyle), metopik ya da çoklu sütür sinostozlarıdır (4, 5). Prevelansı 3-5/10.000 olarak verilen CS'ların %70-85'inini oluşturan NSCS'ların %92'si sporadiktir ve patogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır (6-8).

CS'lu olguların %15-40'ını oluşturan SCS'lar, bugüne kadar 180'den fazla sendromla ilişkilendirilmiştir (8, 9). SCS'lar, otozomal dominant (OD), otozomal resesif (OR) ve X-e bağlı kalıtım göstermektedir (8, 10, 11). SCS'lar içinde en iyi bilinenler; Apert (AS), Pfeiffer (PS), Crouzon (CRS) ve Saethre-Chotzen (SaCS) sendromudur. AS, el ve ayaklarda bilateral simetrik kompleks sindaktili ve bikoronal sinostoz ile (4, 12), geniş bir klinik spektrumu olan PS genellikle geniş radyale dönük başparmak ve/veya büyük ayak baş parmak, nadiren kutanöz sindaktili ile, CRS, el ve ayaklarda herhangi bir bulgu olmaksızın *kruzonooid* yüz görünümü ile (4, 13) SaCS uni/veya bilateral koronal sinostoz, fasyal asimetri, pitoz, anormal kulak görünümü ile karakterizedir (4, 8, 14).

CS ile ilişkili ilk tek gen mutasyonu, *MSX2* geninde Jabs ve ark.'ları (1993) tarafından tanımlanmıştır (15), ancak günümüze kadar başka hiçbir olguda gösterilememiştir (4, 8). Son yıllarda yeni nesil dizileme teknolojilerinin kullanılmasıyla CS ilişkili genlerin ve yolların belirlenmesine yönelik çalışmaların sayısı artmıştır. Günümüzde, İnsan Genomu Mutasyon Veri Bankasında (HGMD) CS'la ilişkilendirilmiş 73 gen bildirilmektedir. CS ilişkili gen sayısı artmasına rağmen, BCS ile ilişkili genler arasında *FGFR2* %32 ile ilk sırada yer alırken, bunu %25 ile *FGFR3* ve %19 ile *TWIST1* genleri izlemektedir (4, 16). *FGFR* (*Fibroblast Growth Factor Receptor*) grubundan CS ilişkisi tanımlanmış diğer bir gen ise, *FGFR1*'dir.

FGFR genlerinin kodladığı fibroblast büyüme faktörü reseptörlerin, fibroblast büyüme faktörlerine bağlanan, membran dışına uzanan ligand domaininde üç adet immunoglobulin benzeri domain (I, II ve III), heliks yapısında olan tek bir transmembran domaini ve hücre içine

uzanan tirozin kinaz aktivitesi gösteren intrasellüler domaini bulunmaktadır (4, 8). *FGFR2* ve *FGFR3*'de saptanan mutasyonların büyük çoğunluğu genin IgII (D2) ve IgIII (D3), *TWIST1*'de ise "helix-loop-helix" domaini kodlayan bölgelerinde saptanmaktadır (4). CS ilişkisi iyi tanımlanmış ancak nadir sayıda olguda gözlenen genler ise *POR*, *FREM1* ve *RAB23*'dür (4, 8, 17, 18).

FGFR2'deki mutasyonlar, AS ve CRS'lu olguların %100'ünden, PS'nun ise >%95'inden sorumlu tutulmaktadır (8). Bu gendeki farklı tip mutasyonların, AS, CRS ve PS'na yol açması ekspresivite değişkenliğini göstermektedir (4, 19). PS'da olguların %5'inde *FGFR1* geni mutasyonları tanımlanmıştır. *TWIST1* ve *FGFR2* genlerindeki heterozigot mutasyonlar, SaCS'na yol açmaktadır (4, 8, 20).

CS olgularındaki genetik çalışmalar, *FGFR* mutasyonlarının çoğunun reseptör dimerizasyonunu, ligand bağlanma aktivitesini ve reseptörün kinaz aktivasyonunu arttıran mutasyonlarla ilişkili olduğunu göstermiştir (21, 22). Fibroblast Büyüme Faktör (FGF)'leri, *FGFR* gen ailesinin ligantlarıdır. Günümüze kadar FGF ailesinden 23 üye (FGF1-FGF23) tanımlanmıştır (21, 23-25). Gebeliğin oluşumuyla FGF ve *FGFR*'ler, kraniyal sütürlerde ifade edilir. Ekstraselüler matrikste ve hücre yüzeyinde bulunan heparan sülfat proteoglikan (HSPG) molekülleri, FGF moleküllerinin uzaysal ve zamansal aktivitesini belirleyici özelliğe sahiptir. Hücre yüzeyinde HSPG'lerin, FGF/FGFR etkileşiminde FGF'leri ısı, pH ya da proteazlara bağlı yıkımdan koruyarak stabilize ettikleri bildirilmiştir (24, 26, 27). Aktive olan FGF/FGFR sinyal yolları kafatası ve kraniyal sütür gelişiminde önemli bir yer tuttuğundan bu yolaktaki proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar normal gelişimin bozulmasına ve *FGFR* ilişkili kraniyosinostozlara neden olmaktadır (7, 28).

Bu çalışma ile CS ilişkili fenotiplerde, sekiz gende (*FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *TWIST1*, *MSX2*, *POR*, *FREM1* ve *RAB23*) olguların klinik tanıları dikkate alınarak, moleküler genetik test akış şeması ile incelenmesi, SCS ile NSCS olgularında moleküler tanı saptama oranlarının belirlenmesi ve elde edilen veriler ile etkin bir akış şeması oluşturulması hedeflendi.

GEREÇ VE YÖNTEM

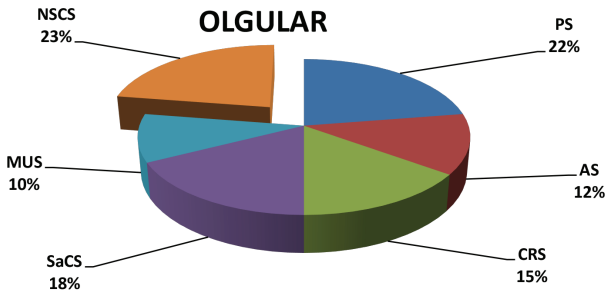
1990-2014 yılları arasında İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD polikliniğinde kraniyosinostoz tanısı alan ve izlenen, kromozom anomalisi dışlanan ve projeye katılmaya onam veren, altısı prenatal ve 34'ü postnatal olan toplam 40 olgu ve 34 aile bireyi çalışmaya alındı. Olguların 31'i (AS n:5, PS n:9, CRS n:6, MUS n:4, SaCS n:7) SCS ve dokuzu NSCS grubunda değerlendirildi. Postnatal olgularda periferik kan (n=68), prenatal olgularda kordon kanı (n=2), fetal deri (n=2), amniyotik sıvı hücre kültürü (n=1) ve kardiyosentez (n=1) örnekleri DNA izolasyonu için kullanıldı, test için -20°C'de saklandı.

Aday genlerin transkriptleri HGMD ile uyumlu olarak seçildi. Primerlerin tasarımında Ensembl'dan yararlanıldı, özgünlük UCSC'de test edildi. Sanger dizileme yöntemi ilk 21 olguda hizmet alımı (Macrogen), 19 olguda ve ailelerinde laboratuvarımızda (ABI3500) gerçekleştirildi. Varyant değerlendirilmesinde *in silico* veri taban analizleri uygulandı, ClinVar, HGMD ve çeşitli literatürlere başvuruldu.

Delesyon/duplikasyon analizleri için SALSA-MLPA-Kraniofasial (P080-B1 Lot.0710) kiti firma protokollerine uygun olarak çalışıldı. İncelenen bölgeler; ALX1/ekzon/1-4; ALX3/ekzon/1-4; ALX4/ekzon/2-4; EFN1/ekzon/1-5; RUNX2/ekzon/2,3a,4-9; TWIST1/ekzon/1-2; TWISTNB/ekzon/4; FGFR1/ekzon/4-8; FGFR2/ekzon/8,11b; FGFR3/ekzon/7; MSX2/ekzon 1-2 idi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan olguların (n=40), 31'i SCS (%77,5) ve 9'u NSCS (%22,5) idi. Olguların klinik tanı dağılımı Şekil 1'de, bulguları Tablo 1'de sunulmaktadır.



Şekil 1: CS olgularının klinik tanıya göre dağılımı

Genel seride mutasyon saptanma oranı %52,5 (21/40) olup OD kalıtım gösteren üç gende (*FGFR2*, *FGFR3* ve *TWIST1*) 13 farklı mutasyon saptandı. Bu mutasyonlardan 12'si dizi analizi ile gösterilen değişimlerdi: sekiz yanlış anlamlı, iki anlamsız, biri daha önce tanımlanmamış sessiz ve biri 21 bç'lik duplikasyon; 1'i ise MLPA analizinde saptanan tüm gen delesyonu idi (Tablo 2). Ebeveyn çalışmasında mutasyonların dört olgunun ikisinde maternal, ikisinde paternal kaynaklı olduğu gösterildi. Maternal kalıtılan iki olgu SaCS, paternal kalıtılan iki olgunun biri PS tanılı, diğeri NSCS grubunda idi. Diğer 13 olgunun ebeveynleri mutasyon taşımadığından, gonadal mozaizm dışlanamamakla birlikte, mutasyonun *de novo* oluştuğu öngörüldü.

TARTIŞMA

AS'lu olguların %95-98'inde *FGFR2* geninde özellikle ekzon 7'deki yanlış anlamlı c.755C>G (p.Ser252Trp) ve c.758C>G (p.Pro253Arg) mutasyonları sendromla ilişkilendirilmişti (4, 29). Uyguladığımız test akış şemasında 1.basamakta yer alan *FGFR2* geni ekzon 7'nin dizilenmesi, AS'li olguların tamamına tanı olanağı sağladı. Bu sonuç literatür ile uyumlu bulundu (4).

PS'lu olgularda, 1. basamakta *FGFR2* ekzon 8 dizilemesi ile, üçte birine tanı konuldu. Literatürde 2. basamak testi olan ekzon 3, 5, 11, 14-17'nin dizilenmesi, ekzon 12 ve 13'ün ise 3. basamakta dizilenmesi önerilmektedir (4). Çalışmada ekzon 12-13, 2. basamakta dizilenmiş ve iki olguda saptanan mutasyonlarla tanı oranı PS'unda %66,6'ya yükselmiştir. Literatürde önerildiği gibi 1. basamakta *FGFR2* ekzon 7-8 dizilemesi ile CRS'lu altı olgunun üçüne tanı konulabilmiş (%50), mutasyon saptanmayan olgularda diğer ekzon ve genlerde dizileme ve MLPA tekniğiyle herhangi bir mutasyon saptanmamıştır. Ayırıcı tanıda bilişsel geriliğin önemli olduğu MUS ile fenotipi sıklıkla örtüşen SaCS olgularında 1. basamak testi olarak *FGFR3* ekzon 7 ve *TWIST1* ekzon 1'in dizilenmesi önerilmekte ve mutasyon saptanan gene göre adlandırılmaktadır. Serimizdeki MUS klinik tanılı dört olgunun ikisinde (%50), birinci basamakta çalışılan *FGFR3* ekzon 7'de c.749C>G (p.Pro250Arg) mutasyonu saptanmıştır. SaCS olgularında en sık *TWIST1* geninde mutasyon gözlenmektedir. Literatürde sadece bir SaCS olgusunda *FGFR2* geninde mutasyon bildirilmiştir (30). Çalışmamızda SaCS olgularında, 1. basamakta *TWIST1* ekzon 1 incelenmiş (Tablo 3) ve yedi olgunun üçünde mutasyon saptanmıştır (%42,8). 2. basamakta uygulanan delesyon/duplikasyon testi ile bir olguda tüm gen delesyonu saptanmış ve SaCS olgularında mutasyon saptama oranımız %57'ye yükselmiştir. MLPA çalışması ile bir olguda mutasyon saptanmış olduğu için, SaCS olgularında 2. basamak testi olarak MLPA önerilmektedir.

Çalışma grubumuzda yer alan genlerde ekzon dizileme ve MLPA tekniği ile taranmasına rağmen (Tablo 3) mutasyon saptanmayan, PS (n=3), CRS (n=3) ve bir MUS (n:2) olgusunda akraba evliliği varlığı, çalışmamızda yer almayan OR kalıtlı CS ilişkili genlerin sorumlu olabileceğini düşündürdü.

SCS olgularında *MSX2*, *POR*, *FREM1*, *RAB23* genlerinin, kraniyosinostozların etiopatogenezinde çok nadir yer aldığı bildirilmektedir (4). Çalışmamızda son basamakta yer alan bu dört gende dizileme ile mutasyon saptanmamıştır.

NSCS ön tanılı dokuz olguda eş zamanlı olarak *FGFR3* ekzon 7-9, *FGFR2* ekzon 7 (IIIa) ve 8 (IIIc) ve *TWIST1* dizi analizi gerçekleştirildi (4). Sadece 1 olguda *FGFR2* geninde literatürde daha önce tanımlanmamış c.234C>T (p.His78=) sessiz değişim saptandı. Bu değişim için *in silico* programlarda "patojenik varyant" öngörüsü yapılması ve ailedeki segregasyon çalışmasında sadece etkilenmiş bireylerde gösterilmesi, etkilenmemişlerde gösterilememesi bulgularla ilişkili olduğu yönünde değerlendirildi, ancak 1,5° kuzen evliliği ürünü olan bu olgudaki sonucun rastgele birliklilik olabileceği de göz ardı edilmemelidir. İleride bu değişimi taşıyan farklı etkilenmiş bireylerin varlığı fenotip-genotip ilişkisini destekleyecektir. Mutasyon saptanmayan olgularda delesyon ve duplikasyon tanısı için MLPA analizi ve eş zamanlı olarak *FGFR2* ve *FGFR3* genlerinin diğer

Tablo 1: CS olgularının demografik ve klinik bulguları

Olgu	C.	Akraba Evliliği	Tanı yaşı	Mat/pat yaş	Ailede Taşıcılık	Etkilenmiş sütür	Sd.	Kd.	Geniş el/ayak baş parmağı	Proptozis	Mutasyon +/-
AS1	E	-	25 GH	36/38	-	Koronal	+	-	+	+	+
AS2	E	-	2 ay	32/38	-	Koronal	+	-	+	+	+
AS3	E	-	1 ay	28/36	-	Koronal	+	-	-	+	+
AS4	E	-	1,5 yaş	34/36	-	Koronal	+	-	-	+	+
AS5	D	-	27 GH	26/30	-	Koronal	+	-	+	+	+
PS1	D	-	23 GH	32/35	-	Koronal, sagittal ve lambdoid	-	-	+	+	+
PS2	D	-	2,5 yaş	32/36	-	Koronal, sagittal	+	-	+	+	+
PS3	D	-	3,5 ay	27/34	-	Koronal, sagittal	-	-	+	+	+
PS4	D	-	1,5 ay	39/38	-	Sagittal	+	+	+	+	+
PS5	E	1° kuzen	6 ay	30/33	-	Koronal, sagittal	+	+	-	-	-
PS6	E	-	9 yaş	28/32	pat.	Koronal	+	+	+	+	+
PS7	E	1° kuzen	5 yaş	26/32	-	Koronal, sagittal	+	+	+	-	-
PS8	E	1° kuzen	2 ay	21/24	-	Koronal	-	-	-	+	-
PS9	D	-	22 GH	22/25	-	Koronal, sagittal ve lambdoid	-	-	+	+	+
CRS1	E	1° kuzen	6 yaş	28/34	-	Koronal, sagittal	-	+	-	+	-
CRS2	E	-	14 yaş	24/30	-	Bikoronal	-	-	-	+	+
CRS3	D	1,5° kuzen	14 yaş	27/31	-	Bikoronal	-	-	-	+	-
CRS4	D	-	2 yaş	30/37	-	Bikoronal	-	-	-	+	+
CRS5	E	1° kuzen	4,5 yaş	27/31	-	Koronal, sagittal	-	-	-	+	-
CRS6	D	-	2 ay	25/28	-	Bikoronal	-	-	-	+	+
SaCS1	E	-	3,5 yaş	37/41	-	Bikoronal	-	-	-	+	-
SaCS2	D	-	7 ay	37/49	-	Bikoronal	-	-	-	+	-
SaCS3	E	-	1,5 ay	28/36	-	Bikoronal	-	-	+	+	+
SaCS4	D	1° kuzen	3 ay	28/26	mat.	Bikoronal	+	-	-	+	+
SaCS5	D	-	2 ay	35/37	-	Bikoronal	-	-	-	+	+
SaCS6	D	-	11 ay	33/38	mat.	Bikoronal	-	-	+	+	+
SaCS7	D	-	2,5 ay	30/37	-	Bikoronal	-	-	-	+	-
MUS1	E	1° kuzen	1 yaş	35/34	-	Koronal	+	-	-	-	-
MUS2	D	-	3,5 ay	29/34	-	Bikoronal	-	-	-	+	-
MUS3	D	-	2 ay	28/29	-	Bikoronal	-	+	-	+	+
MUS4	D	-	2,5 ay	28/30	-	Koronal	-	-	-	+	+
NCS1	D	1,5° kuzen	10 gün	26/30	pat.	Sagittal	-	-	-	+	+
NCS2	E	-	2,5 yaş	28/36	-	Sagittal	-	-	-	-	-
NCS3	E	-	25 GH	20/20	-	Koronal	-	-	+	-	-
NCS4	E	1,5° kuzen	2 yaş	27/26	-	Bikoronal	-	-	-	+	-
NCS5	D	1° kuzen	36 GH	21/25	-	Koronal	-	-	+	+	-
NCS6	D	1,5° kuzen	1 yaş	29/30	-	Sagittal	+	-	-	+	-
NCS7	E	1° kuzen	8 gün	26/38	-	Sagittal	-	-	-	+	-
NCS8	E	-	2 yaş	33/35	-	Sagittal	-	-	-	-	-
NCS9	E	1° kuzen	5 ay	30/30	-	Bikoronal	-	-	-	-	-

GH: gebelik haftası, C.Cinsiyet, *İlk değerlendirme, Sd:Sindaktili, Kd:Klinodaktili,mat.:maternal,pat.:paternal

Tablo 2: FGFR2, FGFR3, TWIST1 genlerinde mutasyon saptanan olgularda, fenotip, ilişkili gen mutasyonları ve aminoasit değişimleri (n:21)

Fenotip	Gen ve NM numarası	Ekzon	Nükleotid	Aminoasit Değişimi
Apert sendromu n:5		7	c.755C>G	p.Ser252Trp
Pfeiffer sendromu n:3		8	C.1019A>G	p.Tyr340Cys
Pfeiffer sendromu n:1		5	c.514_515delGCinsTT	p.Ala172Phe
Pfeiffer sendromu n:1	FGFR2 NM_000141.4	12	c.1646A>C	p.Asn549Thr
Pfeiffer sendromu n:1		13	c.1694A>C	p.Glu565Ala
Crouzon sendromu n:2		7	c.833G>T	p.Cys278Phe
Crouzon sendromu n:1		8	c.1025G>A	p.Cys342Tyr
Muenke sendromu n:2	FGFR3 NM_000142.4	7	749C>G	p.Pro250Arg
Saethre-Chotzen sendromu n:1		1	355C>T	p.Gln119*
Saethre-Chotzen sendromu n:1		1	c.376G>T	p.Glu126*
Saethre-Chotzen sendromu n:1	TWIST1 NM_000474.3	1	c.396_416, 21bp dup	-
Saethre-Chotzen sendromu n:1		tüm gen	MLPA TWIST1 heterozigot tüm gen delesyonu	-
Non-sendromik kraniyosinostoz n:1	FGFR2 NM_000141.4	3	c.234C>T	p.His78=

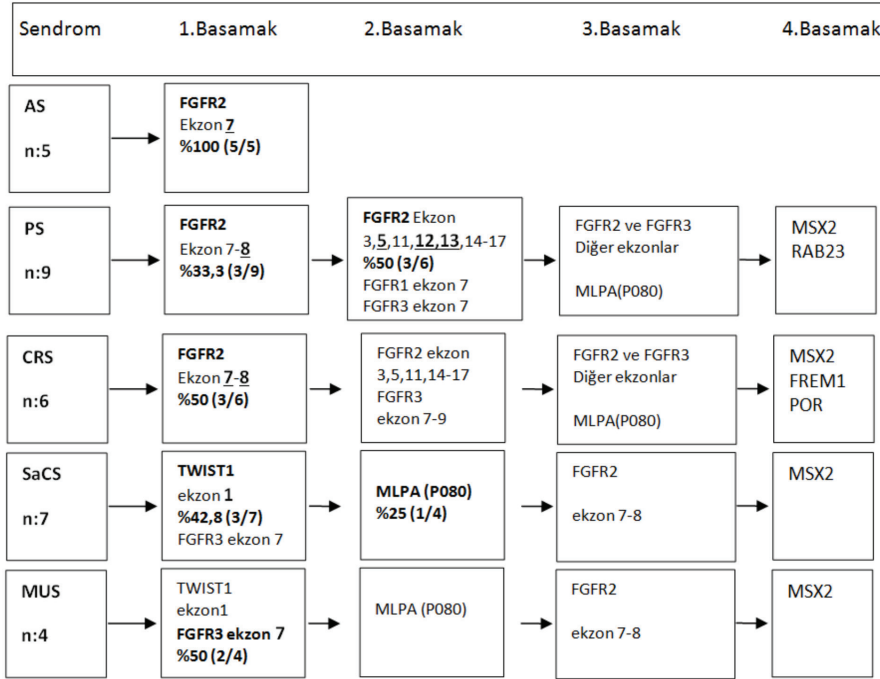
ekzonları dizilendi ve herhangi bir mutasyon saptanmadı. NSCS olgularının altısının ebeveyninde 1° ya da 1,5° kuzen evliliği varlığı (%66,6), OR kalıtım modeline uygun, henüz tanımlanmamış yeni genlerin varlığını düşündürmektedir.

Çalışmamızın başladığı 2011 yılından sonra, özellikle yeni nesil dizileme teknolojisinin kullanımı ile geniş seri çalışmaları yayınlanmaya, yeni genler ve yolaklar belirlenmeye başlamıştır. 2012 yılında Justice ve ark.'ları 172 NSCS olgusu ve 548 kontrolden oluşan serilerinde genom boyu ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) ile BMP2 ve BBS9 genlerinin de CS ile ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir (31). Twigg ve ark.'ları 2013 yılında tüm ekzom dizileme (TED) ile bir olguda ERF geninde mutasyon saptamışlar, aile çalışmasını takiben SCS ve NSCS olgularından oluşan 412 olguluk serilerinde bu gende 12 olguda daha ERF geninde farklı mutasyonların varlığını göstermişlerdir (32). Sharma ve ark.'ları 2013 yılında SCS ve NSCS olgularında önce FGFR2-3 ve TWIST1'de mutasyon oranlarının

yüksek olduğu gen bölgelerini dizilemişler ve mutasyon saptamadıkları bilateral koronal sinostozu olan yedi olguda WES uygulamışlardır. Bu olgularda TCF12 geninde patojenik özellikte farklı varyantlar saptamaları üzerine bu genin CS ile ilişkili olabileceği öngörüsü ile aynı geni 347 olguluk serilerinde çalışmışlar ve 38 olguda daha mutasyon saptadıklarını bildirmişlerdir (33). Lee ve ark.'nın 2017 yılındaki çalışmasında FGFR1-3 genlerinin hastalık ilişkili hedef bölgeleri ve TWIST1 geni mutasyonlar açısından dışlanmış 233'ü retrospektif ve 86'sı ise prospektif olan kohortlarında, CS ilişkileri daha önce bildirilen 20 genden oluşan panel çalışmasında retrospektif gruptaki olguların %14'ünde ve prospektif gruptaki olguların ise %15'inde mutasyon saptamışlardır. Toplamda 33 olgunun 22'sinde TCF12 (55%), altısında EFNB1 (18%), ikisinde ALX4, ikisinde POR, ikisinde FGF10 ve birer olguda EFNA4, IL11RA ve ER'de mutasyon saptadıklarını bildirmişlerdir (34).

Sonuçlarımız, özgün klinik tanının varlığında, CS'un mo-

Tablo 3: SCS olgularında uygulanan moleküler analiz akış şeması (mutasyon saptanan gen/ekzonlar koyu gösterilmiştir)



leküler analiz akış şeması uygulanarak (1. ve 2. basamak testler) hızlı ve hedefe yönelik olarak planlanabileceğini, mutasyon saptanmayan olgularda ise YND temelli klinik ekzom ya da panel-gen testlerinin daha ekonomik, hızlı ve etkin moleküler tanıya yardımcı olabileceğini göstermektedir. Her TED'de olduğu gibi test öncesi yüksek çözünürlüklü mikroarray/aCGH analizleri ile mikrodelyasyon ve duplikasyonların dışlanması mutlaka önerilmelidir.

24379) ve CRANIRARE-2 konsorsiyum (ERA-NET) TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (Proje No: 112S398).

Ethics Committee Approval: This study was approved by the Ethics Committee of Istanbul University Istanbul Faculty of Medicine (No: 2012-1305-1177).

Informed Consent: Informed consent was obtained from all participants.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

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

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: This study was funded by Istanbul University Scientific Research Projects Unit (project numbers: 24379) and CRANIRARE-2 konsorsiyum (ERA-NET) TÜBİTAK (project numbers: 112S398).

Etik Komite Onayı: Bu çalışmada İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun onayı alınmıştır (Dosya No: 2012-1305-1177).

Bilgilendirilmiş Onam: Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

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

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından (Proje No:










KAYNAKLAR

1. Tunçbilek G. Kraniyofasiyal cerrahinin temel prensipleri. Hacettepe Tıp Dergisi 2009;40(1):33-44.

2. Slater BJ, Lenton KA, Kwan MD, Gupta DM, Wan DC, Longaker MT. Cranial sutures: A brief review. *Plast Reconstr Surg* 2008;121(4):170e-8e. [\[CrossRef\]](#)
3. Boulet SL, Rasmussen SA, Honein MA. A population-based study of craniosynostosis in metropolitan Atlanta, 1989-2003. *Am J Med Genet A* 2008;146A(8):984-91. [\[CrossRef\]](#)
4. Johnson D, Wilkie AO. Craniosynostosis. *Eur J Hum Genet* 2011;19(4):369-76. [\[CrossRef\]](#)
5. Önal Ç. Çocukta Baş Muayenesi. *TND Pediatrik Nöroflürüji Öğretim ve Eğitim Grubu Bülteni* 2008;(3):15-8.
6. Boyadjiev SA, Consortium IC. Genetic analysis of non-syndromic craniosynostosis. *Orthod Craniofac Res* 2007;10(3):129-37. [\[CrossRef\]](#)
7. Cohen MM, MacLean RE. Craniosynostosis : Diagnosis, evaluation, and management. 2nd ed. New York: Oxford University Press; 2000; 454.
8. Kimonis V, Gold JA, Hoffman TL, Panchal J, Boyadjiev SA. Genetics of craniosynostosis. *Semin Pediatr Neurol* 2007;14(3):150-61. [\[CrossRef\]](#)
9. Çeltikçi E, Börcek AÖ, Baykaner MK. Kraniyosinostozlar. *Türk Nöroşirürji Dergisi* 2013;23(2):132-7.
10. Twigg SR, Wilkie AO. A Genetic-Pathophysiological Framework for Craniosynostosis. *Am J Hum Genet* 2015;97(3):359-77. [\[CrossRef\]](#)
11. Levi B, Wan DC, Wong VW, Nelson E, Hyun J, Longaker MT. Cranial Suture Biology: From Pathways to Patient Care. *J J Craniofac Surg* 2012;23(1):13-9. [\[CrossRef\]](#)
12. Slaney SF, Oldridge M, Hurst JA, Moriss-Kay GM, Hall CM, Poole MD, et al. Differential effects of FGFR2 mutations on syndactyly and cleft palate in Apert syndrome. *Am J Hum Genet* 1996;58(5):923-32.
13. Hoefkens MF, Vermeij-Keers C, Vaandrager JM. Crouzon syndrome: Phenotypic signs and symptoms of the postnatally expressed subtype. *J Craniofac Surg* 2004;15(2):233-40;41-2.
14. Kress W, Schropp C, Lieb G, Petersen B, Busse-Ratzka M, Kunz J, et al. Saethre-Chatzen syndrome caused by TWIST 1 gene mutations: Functional differentiation from Muenke coronal synostosis syndrome. *Eur J Hum Genet* 2006;14(1):39-48. [\[CrossRef\]](#)
15. Jabs EW, Muller U, Li X, Ma L, Luo W, Haworth IS, et al. A mutation in the homeodomain of the human MSX2 gene in a family affected with autosomal dominant craniosynostosis. *Cell* 1993;75(3):443-50. [\[CrossRef\]](#)
16. Azoury SC, Reddy S, Shukla V, Deng CX. Fibroblast Growth Factor Receptor 2 (FGFR2) Mutation Related Syndromic Craniosynostosis. *Int J Biol Sci* 2017;13(12):1479-88. [\[CrossRef\]](#)
17. Huang N, Pandey AV, Agrawal V, Reardon W, Lapunzina PD, Mowat D, et al. Diversity and function of mutations in p450 oxidoreductase in patients with Antley-Bixler syndrome and disordered steroidogenesis. *Am J Hum Genet* 2005;76(5):729-49. [\[CrossRef\]](#)
18. Vissers LE, Cox TC, Maga AM, Short KM, Wiradajaja F, Janssen IM, et al. Heterozygous mutations of FREM1 are associated with an increased risk of isolated metopic craniosynostosis in humans and mice. *PLoS Genet* 2011;7(9):e1002278. [\[CrossRef\]](#)
19. Wilkie AO, Byren JC, Hurst JA, Jayamohan J, Johnson D, Knight SJ, et al. Prevalence and complications of single-gene and chromosomal disorders in craniosynostosis. *Pediatrics* 2010;126(2):e391-400. [\[CrossRef\]](#)
20. Freitas EC, Nascimento SR, de Mello MP, Gil-da-Silva-Lopes VL. Q289P mutation in FGFR2 gene causes Saethre-Chatzen syndrome: some considerations about familial heterogeneity. *Cleft Palate Craniofac J* 2006;43(2):142-7. [\[CrossRef\]](#)
21. Park J, Park OJ, Yoon WJ, Kim HJ, Choi KY, Cho TJ, et al. Functional characterization of a novel FGFR2 mutation, E731K, in craniosynostosis. *J Cell Biochem* 2012;113(2):457-64. [\[CrossRef\]](#)
22. Kelleher FC, O'Sullivan H, Smyth E, McDermott R, Viterbo A. Fibroblast growth factor receptors, developmental corruption and malignant disease. *Carcinogenesis* 2013;34(10):2198-205. [\[CrossRef\]](#)
23. Guillemot F, Zimmer C. From cradle to grave: the multiple roles of fibroblast growth factors in neural development. *Neuron* 2011;71(4):574-88. [\[CrossRef\]](#)
24. Dienstmann R, Rodon J, Prat A, Perez-Garcia J, Adamo B, Felip E, et al. Genomic aberrations in the FGFR pathway: Opportunities for targeted therapies in solid tumors. *Ann Oncol* 2014;25(3):552-63. [\[CrossRef\]](#)
25. Zhang X, Ibrahim OA, Olsen SK, Umemori H, Mohammadi M, Ornitz DM. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *J Biol Chem* 2006;281(23):15694-700. [\[CrossRef\]](#)
26. Coutu DL, Galipeau J. Roles of FGF signaling in stem cell self-renewal, senescence and aging. *Aging (Albany NY)* 2011;3(10):920-33. [\[CrossRef\]](#)
27. Mohammadi M, Olsen SK, Ibrahim OA. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16(2):107-37. [\[CrossRef\]](#)
28. Martinez-Abadías N, Heuze Y, Wang Y, Jabs EW, Aldridge K, Richtsmeier JT. FGF/FGFR signaling coordinates skull development by modulating magnitude of morphological integration: evidence from Apert syndrome mouse models. *PLoS One* 2011;6(10):e26425. [\[CrossRef\]](#)
29. Sarah F. Slaney MO, Jane A. Hurst, Gillian M. Morriss-Kay, Christine M. Hall, Michael D. Poole, Andrew O. M. Wilkie. 1996 Slaney, Differential Effects of FGFR2 Mutations on Syndactyly and Cleft Palate in Apert Syndrome. *Am J Hum Genet* 58:923-932, 1996.
30. Paznekas WA, Cunningham ML, Howard TD, Korf BR, Lipson MH, Grix AW, et al. Genetic heterogeneity of Saethre-Chatzen syndrome, due to TWIST and FGFR mutations. *Am J Hum Genet* 1998;62(6):1370-80. [\[CrossRef\]](#)
31. Justice CM, Yagnik G, Kim Y, Peter I, Jabs EW, Erazo M, et al. A genome-wide association study identifies susceptibility loci for nonsyndromic sagittal craniosynostosis near BMP2 and within BBS9. *Nat Genet* 2012;44(12):1360-4. [\[CrossRef\]](#)
32. Twigg SR, Vorgia E, McGowan SJ, Peraki I, Fenwick AL, Sharma VP, et al. Reduced dosage of ERF causes complex craniosynostosis in humans and mice and links ERK1/2 signaling to regulation of osteogenesis. *Nat Genet* 2013;45(3):308-13. [\[CrossRef\]](#)
33. Sharma VP, Fenwick AL, Brockop MS, McGowan SJ, Goos JA, Hoogeboom AJ, et al. Mutations in TCF12, encoding a basic helix-loop-helix partner of TWIST1, are a frequent cause of coronal craniosynostosis. *Nat Genet* 2013;45(3):304-7. [\[CrossRef\]](#)
34. Lee E, Le T, Zhu Y, Elakis G, Turner A, Lo W, et al. A craniosynostosis massively parallel sequencing panel study in 309 Australian and New Zealand patients: Findings and recommendations. *Genetics In Medicine*, 2017.

FETAL BRAIN SHRINKAGE: A RARE, MYSTIFYING ANOMALY

FETAL BEYİN BÜZÜŞMESİ: NADİR, İLGİ ÇEKİCİ BİR ANOMALİ

Gürcan TÜRKYILMAZ¹ , Şahin AVCI² , Umut ALTUNOĞLU² , Emircan ERTÜRK¹ , Melis CANTÜRK¹ ,
Tuğba SİVRİKOZ¹ , İbrahim KALELİOĞLU¹ , Recep HAS¹ , Atıl YÜKSEL¹ 

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, ¹Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, ²Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ORCID IDs of the authors: G.T. 0000-0002-5514-0233; Ş.A. 0000-0001-9545-6657; U.A. 0000-0002-3172-5368; E.E. 0000-0003-0169-6903; M.C. 0000-0003-1114-4678; T.S. 0000-0001-5482-9429; İ.K. 0000-0002-5504-2166; R.H. 0000-0002-1372-8506; A.Y. 0000-0002-6487-0860

Cite this article as: Turkyilmaz G, Avcı S, Altunoglu U, Erturk E, Canturk M, Sivrikoz T, et al. Fetal brain shrinkage: a rare, mystifying anomaly. J Ist Faculty Med 2019;82(2):123-6. doi: 10.26650/IUITFD.2018.0008

ABSTRACT

Objective: Brain shrinkage in fetal life is a dismal, misunderstood anomaly. In this report, we described a rare case of severe brain shrinkage diagnosed in the 25th weeks of gestation complicated with fetal anemia and ascites.

Case Report: We detected polyhydramnios, ascites and severe brain anomaly in the fetus. Although the head circumference was normal; the brain tissue was atrophic and positioned in the center of the skull. The two cerebral hemispheres were adequately developed. Subarachnoid space was much extended, and the surface of the brain was smooth. Also, we detected severe fetal anemia. Perinatal infectious diseases were excluded. Fetal cranial MRI confirmed the brain shrinkage and TOP were performed.

Conclusion: We showed a unique fetal brain malformation which comprises intracranial shrinkage and extreme subarachnoid space wideness without microcephaly. It is not well recognized in the literature, and the etiology is unclear.

Keywords: Brain, fetus, MRI, prenatal diagnosis, ultrasonography

ÖZET

Amaç: Fetal hayatta gerçekleşen beyin büzüşmesi iyi anlaşılama-mış, kötü bir anomalidir. Bu vaka sunumunda fetal anemi ve asitle komplike olmuş ve 25. haftada tanı almış ciddi bir beyin büzüş-mesi anomalisini tanımladık.

Vaka Sunumu: Fetüste polihidramniyos, asit ve ağır bir beyin anomalisi saptadık. Kafa çevresi normal sınırlarda olmasına rağmen; beyin dokusu atrofikti ve kafatasının ortasında yerleşmişti. Her iki hemisfer yeterli ölçüde gelişmişti. Subaraknoid mesafe oldukça genişti ve beyin yüzeyi düzleşmişti. Ayrıca fetüste ağır anemi saptadık. Perinatal enfeksiyonlar dışlandı. Fetal MRI beyin büzüşmesini doğruladı ve aileye gebeliğin terminasyon seçeneği sunuldu.

Sonuç: Mikrosefali eşlik etmeksizin beyin büzüşmesi ve aşırı genişlemiş subaraknoid mesafe ile tanımlanan nadir bir beyin malformasyonunu gösterdik. Bu anomali literatürde yeteri kadar tanımlanmamıştır ve etiyolojisi henüz aydınlatılamamıştır.

Anahtar Kelimeler: Beyin, fetüs, MRI, prenatal tanı, ultrasonog-rafi

INTRODUCTION

Fetal brain shrinkage or atrophy is a rare anomaly which describes reducing the brain volume without small skull size. It is characterized by the positioning of well-developed cerebral hemispheres in the central of the skull and most of the space of cranium fulfill with cerebrospinal fluid. The cause of the pathology is unknown in the majority of cases; however, determined risk factors are maternal alcohol consumption, intrauterine infections, particularly

cytomegalovirus (CMV) and vascular insults (1). It is different from microcephaly or micrencephaly which is defined as low brain weight accompany decreased skull circumference. The other differential diagnoses are perinatal Zika virus (ZIKV) and cytomegalovirus (CMV) infections, hydranencephaly and fetal brain disruption sequence. This report shows a rare case of severe brain shrinkage diagnosed in the 25th weeks of gestation complicated with fetal anemia and ascites and review of the literature.

Corresponding author/İletişim kurulacak yazar: gurcanturkyilmaz@gmail.com

Received Date/Geliş tarihi: 14.09.2018 • **Accepted Date/Kabul tarihi:** 08.03.2019

©Telif Hakkı 2019 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2019 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

CASE REPORT

A 22-year-old woman, gravida five paras 2, 25th-week gestation referred to our center for hydrocephaly, ascites, and polyhydramnios. She was healthy, and there was no familial disease. There was no history of medication or drug abuse. She had two healthy children and first-trimester aneuploidy screening test was negative. Ultrasonographic examination revealed polyhydramnios (amniotic fluid index: 24 cm) and ascites. There was no pleural or pericardial effusion, ascites or skin edema. The biparietal diameter and head circumferences were 36 and 58 percentiles respectively, and the cranial sutures were visualized. The brain appeared highly abnormal. Entire brain tissue was atrophic. In the axial plan, the cerebral hemispheres were positioned in the center of the skull and most of the space of cranium occupied by anechoic cerebrospinal fluid. The subarachnoid space was very extended (Figure 1). Cavum septum pellucidum and cerebellum were absent. The surface of the brain was smooth, and sulcus and gyri pattern vanished. Falx cerebri was preserved, and lateral ventricles were containing the choroid plexus could be demonstrated but markedly diminished. The circle of Willis could not be visualized. In the coronal plane, thalamic nuclei and falx cerebri were demonstrated (Figure 2). After counseling the patient, cordocentesis was performed, and fetal karyotype and microarray results were normal. Fetal hemoglobin was 3.1 gr/dl, and thrombocyte count was 112.000, fetal blood group was A Rh negative and direct Coombs was negative. For the investigation of fetal anemia, hemoglobin electrophoresis was performed and demonstrated normal values (HbF %87, HbA2 %5.7, and HbA %6.6). Indirect Coombs, Parvovirus IgM, and IgG results were negative. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency was ruled out by genetic testing. Toxoplasma and CMV polymerase chain reaction (PCR) analysis in amniotic fluid

were negative. Also, maternal Zika virus (ZIKV) IgM and IgG antibodies were negative. Fetal cranial MRI suggested, and it demonstrated central display of atrophic brain with the wideness of subarachnoid space and confirmed our findings (Figure 3). After counseling with the pediatric neurologist, poor outcome was declared and termination of pregnancy was offered. The family decided to continue the pregnancy. One week later, fetal death and 1280 gr male fetus were delivered. A medical genetic specialist performed the morphologic examination of the fetus and revealed normal morphology. A fetal autopsy was suggested, but it was rejected by the family.



Figure 1: An axial ultrasound image of the fetal brain shows shrunken cerebral hemispheres and wide distance between the brain surface and calvarium bones

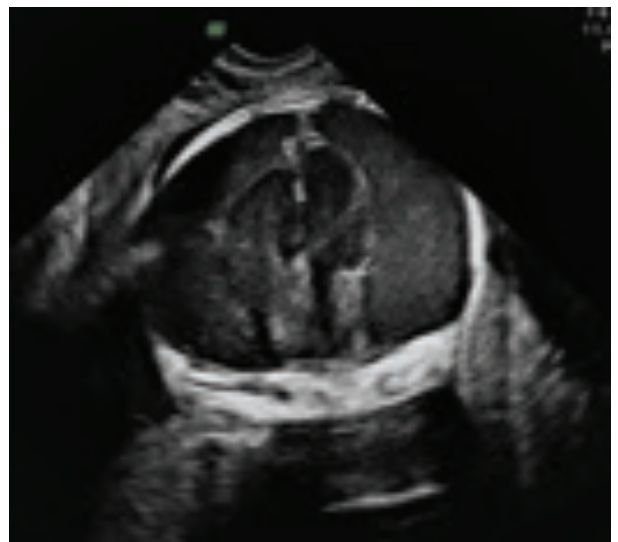


Figure 2: A coronal view of extended subarachnoid space of the brain in ultrasonography

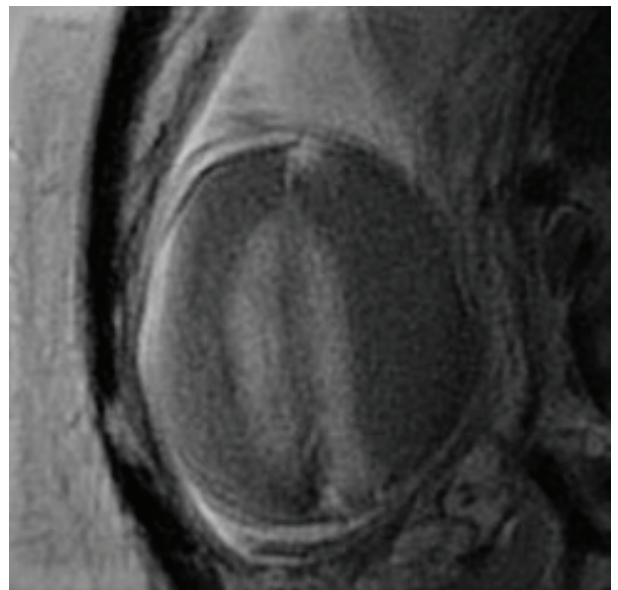


Figure 3: Fetal MRI demonstrates atrophic brain hemispheres

DISCUSSION

Fetal brain shrinkage or atrophy is a rare anomaly, and its incidence is unknown. The diagnosis is based on the presence of very small brain hemispheres in the centrum of the cranium and extreme subarachnoid space widening. Paradoxically, the skull circumference is in the normal range. Only one case report was presented during the prenatal period which was published by Tongsong et al. (2). They demonstrated a fetus at 34 weeks of gestation which was diagnosed with severe brain shrinkage. The cerebral hemispheres were very small but were developed clearly and displayed to the center of the skull. A wide range between the surface of the brain and calvarium bones was present. They elucidated the pathogenesis with heavy maternal alcohol consumption. Possible hazardous effects of alcohol consumption during pregnancy has been interpreted in the literature. Unfortunately, alcohol abuse is common among many populations. Alcohol exposure during the prenatal period is responsible for devastating consequences, which are broadly termed fetal alcohol syndrome (FAS). The diagnosis of FAS is based on individual facial dysmorphologies, growth retardation and central nervous system (CNS) malformations (3). Alcohol alters fetal development by multiple mechanisms. Ethanol (the metabolite of alcohol) disrupt neuronal cell-cell adhesion also, cause apoptosis of neurons (4). Microcephaly and structural CNS defects are findings of FAS. Global loss of volume accompanied by measurement of head circumference (HC) below -2 SD is a strong determination for the diagnosis of microcephaly. A spectrum of structural anomalies; listed as corpus callosum anomalies; dysgenesis, agenesis, or partial agenesis, and posterior fossa anomalies which include cerebellar hypoplasia and Dandy-Walker malformation is present (5, 6). Reduced brain volume; most prominent in basal ganglia and diencephalon; has been implied (7). Our case was similar to the consequence of FAS, but there was no alcohol consumption history of the patient.

Maternal red cell alloimmunization is the leading cause of fetal anemia. The other etiologies are Parvovirus B19 infection, alpha thalassemia, glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency, etc. Fetal anemia can be diagnosed with noninvasive or invasive methods. The noninvasive method is the first line method for assessment of anemia. Investigation of MCA (Middle Cerebral Artery) with Doppler is a suggested tool because of its relative easily measurement and strict measuring conditions (8). Fetal anemia can be indirectly evaluated by fetal blood sampling which is the gold standard for diagnosis; however, 1-2% of the risk of loss is present due to the procedure. Severe anemia leads to hyperdynamic cardiac failure and hydrops fetalis. It can cause edema in the fetal brain, but there is no evidence that it can be related to intracranial shrinkage. We could not evaluate the MCA

Doppler due to severe brain damage and detected the fetal anemia by fetal blood sampling. However we examined the fetal anemia reasons, we could not identify the underlying cause.

We determined Zika virus and CMV infection, Hydranencephaly and fetal brain disruption sequence (FBDS) in the differential diagnosis

Zika virus (ZIKV); member of Flaviviridae; transmitted by Aedes mosquitoes, infections are mostly asymptomatic (9). In pregnancy, it is associated with severe congenital anomalies mainly if infection occurs in the first trimester. Microcephaly and ZIKV relation were demonstrated in several reports, but microcephaly was not the only cranial anomaly observed, and other malformations were reported. Ventriculomegaly, cerebral and cerebellar calcifications, vermian agenesis, mega cisterna magna, abnormal cortical development, and severe brain atrophy were demonstrated in ultrasonography or MRI (10). We performed ZIKV IgM and IgG in maternal blood and resulted negative.

Congenital CMV accounts for common reasons of congenital malformations; such as developmental delay, sensorineural hearing loss, and fetal death; in developed countries (11). Though the frequency is strongly related to the gestational age of primary infection, the rate of congenital CMV infection is reckoned as 0.3-0.7% in all live births worldwide. CMV can cause a wide range of malformations in CNS. Ventriculomegaly and increased periventricular echogenicity are frequently present in periventriculitis. Microcephaly and intracranial calcifications can be seen as the consequence of encephalitis. Periventricular pseudocyst and intraventricular synechiae are specific findings of CMV infection. Also, it can lead to cortical development disorders and agenesis of corpus callosum. Although it is associated with severe cranial destructive lesions, intracranial shrinkage was not reported related to CMV in literature. We performed CMV PCR analysis in amniotic fluid, but it resulted negative.

Hydranencephaly; defined as replacement of cerebral neural tissue by large volumes of fluid accumulation in sacs around brain stem and supratentorial area (12). The definitive cause of hydrocephaly is not explicit; however the mostly accepted theory supports sudden occlusion of bilateral internal carotid arteries; which leads to necrosis of evolving cerebral structures. Ultrasonography reveals large volumes of anechoic fluid accumulation rather than the presence of cerebral hemispheres. We demonstrated atrophic but developed brain hemispheres in our patient.

Partial necrosis of brain tissue leads sequela of several malformations, which is called Fetal Brain Disruption Sequence, such as the failure of proper skull formation, severe microcephaly, overlying sutures along with protrud-

ing occipital bone and scalp rugae (13). Hyperthermia, viral infections, and vascular disruption have been suggested for possible etiologies. Severe microcephaly and marked destruction of cerebral hemispheres are cardinal findings in the prenatal period.

However brain volume was markedly decreased, cranium circumference was within normal range, and relatively well developed cerebral hemispheres existed. Based on this findings, we hypothesized that the brain malformation has occurred after the basic brain structures were fully formed. Most likely a vascular disruption may have damaged the brain and caused globally necrosis. Unfortunately, we could not perform a fetal autopsy to reveal the exact reason.

CONCLUSION

We described a unique fetal brain malformation which comprises of intracranial shrinkage and extreme sub-arachnoid space wideness without microcephaly. We could not determine the exact etiology, however it is most likely a consequence of vascular insult.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the local ethics committee.

Informed Consent: Written consent was obtained from the participants.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study- G.T., E.E., M.C., R.H.; Data Acquisition- G.T., E.E., T.S.; Data Analysis/Interpretation- G.T., E.E., A.Y.; Drafting Manuscript- İ.K., R.H., A.Y.; Critical Revision of Manuscript- G.T., M.C.; Final Approval and Accountability- G.T., Ş.A., U.A., E.E., M.C., T.S., İ.K., R.H., A.Y.; Technical or Material Support- G.T., E.E.; Supervision- G.T., R.H.

Conflict of Interest: Author declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: Author declared no financial support.

Etik Komite Onayı: Etik komite onayı bu çalışma için, yerel etik komiteden alınmıştır.

Bilgilendirilmiş Onam: Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- G.T., E.E., M.C., R.H.; Veri Toplama- G.T., E.E., T.S.; Veri Analizi/Yorumlama- G.T., E.E.,

A.Y.; Yazı Taslağı- İ.K., R.H., A.Y.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- G.T., M.C.; Son Onay ve Sorumluluk- G.T., Ş.A., U.A., E.E., M.C., T.S., İ.K., R.H., A.Y.; Malzeme ve Teknik Destek- G.T., E.E.; Süpervizyon- G.T., R.H.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

REFERENCES

1. Maiser SE, Chen WJ, Miller JA, West JR. Fetal alcohol exposure and temporal vulnerability regional differences in alcohol-induced microencephaly as a function of the timing of binge-like alcohol exposure during rat brain development. *Alcohol Clin Exp Res* 1997;21:1418-28. [\[CrossRef\]](#)
2. Tongsong T, Puntachai M, Mekjarasnapa M, Traisrisulp K. Severe fetal brain shrinkage following heavy maternal alcohol consumption. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2014;44:245-47. [\[CrossRef\]](#)
3. Jones KL, Smith DW. Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *Lancet* 1973;302:999-1001. [\[CrossRef\]](#)
4. Charness ME, Safran RM, Perides G. Ethanol inhibits neural cell-cell adhesion. *J Biol Chem* 1994;269:9304-9.
5. Mattson SN, Jernigan TL, Riley EP. MRI and prenatal alcohol exposure: images provide insight into FAS. *Alcohol Health Res. World* 1994;18:49-52.
6. Astley S, Aylward EH, Olson HC, et al. Magnetic resonance imaging outcomes from a comprehensive magnetic resonance study of children with fetal alcohol syndrome spectrum disorders. *Alcohol Clin Exp Res* 2009;33:1671-89. [\[CrossRef\]](#)
7. Roussotte F, Sulik K, Mattson S, et al. Regional brain volume reductions relate to facial dysmorphology and neurocognitive function in fetal alcohol spectrum disorders. *Hum. Brain Mapp* 2012;33:920-37. [\[CrossRef\]](#)
8. Bhide A, Acharya G, Bilardo CM, Brezinka C, Cafici C, Hernandez-Andrade E. ISUOG practice guidelines: use of Doppler ultrasonography in obstetrics. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013;41:233-9. [\[CrossRef\]](#)
9. Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res* 2003;59:23-61. [\[CrossRef\]](#)
10. Junior E, Carvalho FH, Tonni G, Werner H. Prenatal imaging findings in fetal Zika virus infection *Curr Opin Obstet Gynecol* 2017;29:95-105. [\[CrossRef\]](#)
11. Kagan K, Hamprecht K. Cytomegalovirus infection in pregnancy. *Arch Gynecol Obstet* 2017;296:15-26. [\[CrossRef\]](#)
12. Bianchi DW, Crombleholme TM, D'Alton ME, Malone FD. Hydranencephaly. In: *Fetology: Diagnosis and Management of the Fetal Patent*. New York NY: McGraw-Hill; 2010:130-3.
13. Russell LJ, Weaver DD, Bull MJ, Weinbaum M. In utero brain destruction resulting in collapse of the fetal skull, microcephaly, scalp rugae, and neurologic impairment: the fetal brain disruption sequence. *Am J Med Genet* 1984;17(2):509-21. [\[CrossRef\]](#)