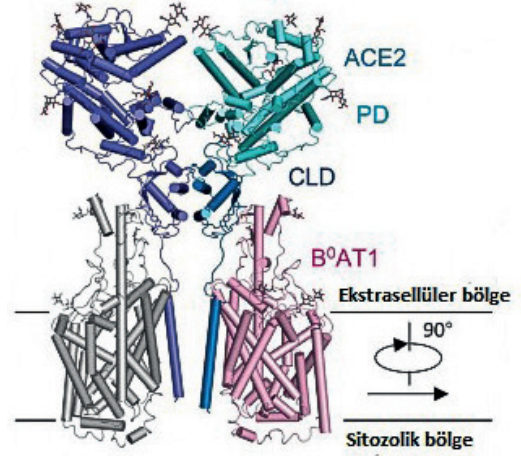


Weiss SR, Leibowitz JL. Coronavirus Pathogenesis.  
Adv Virus Res 2011;81:85-164.



Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. Structural basis for the recognition of SARSCoV-2 by full-length human ACE2.  
Science 2020;367(6485):1444-8.

## ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

### Lösemi Modelinde Tüm Genom RNA Dizileme Analiz Algoritması Geliştirilmesi

*Whole Genome RNA Sequencing Analysis Algorithm in Leukemia Model*

### Bir Üniversite Hastanesinde Kan Kültürlerinden İzole Edilen Bakterilerin Kümülatif Antibiyogram Sonuçları

*Cumulative Antibiogram Results of Bacteria Isolated from Blood Cultures in a University Hospital*

### Hücre Serilerinde Kilitli Nükleik Asitler İle MIR223 Gen Sessizleştirilmesi

*MIR223 Gene Silencing via Locked Nucleic Acids in Cell Lines*

### A Survey Study on Medicinal Plants and Mushrooms Use in Treatment of Cancer by Patients at The Istanbul University Institute of Oncology

*İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü'nde Hastalar Tarafından Kanser Tedavisinde Kullanılan Tıbbi Bitkiler ve Mantarlar Üzerine Bir Anket Çalışması*

## DERLEME MAKALESİ / REVIEW ARTICLE

### Yeni Koronavirüsün (Covid-19) Moleküler Yapısı ve Genomik Karakterizasyonu

*Molecular Structure and Genomic Characterization of The New Coronavirus (Covid-19)*

### Distant Pedicled Flaps for Elbow Coverage- a Systematic Review

*Dirsek Bölgesi Defektlerinin Onarımında Uzak Pediküllü Flepler: Sistemik Derleme*

### İlaça Bağlı Olarak Çene Kemiklerinde Görülen Osteonekrozda Dental Yönetim ve Güncel Tedavi Yaklaşımları: Derleme

*Dental Management in Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws and Current Treatment Approaches: Review*





# SABIAD

SAĞLIK BİLİMLERİNDE İLERİ ARAŞTIRMALAR DERGİSİ

e-ISSN:2651-4060

JOURNAL OF ADVANCED RESEARCH IN HEALTH SCIENCES

Haziran / June 2020  
Cilt / Volume 3  
Sayı / Issue 2



# SABIAD

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

Haziran/June 2020, Cilt/Volume 3, Sayı/Issue 2

e-ISSN:2651-4060

## Sahibi / Sorumlu Müdür

### Ownership / Director

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

## Baş Editör / Editor in Chief

Zeynep Karakaş

## Editör Yardımcıları / Associate Editors

Ümmühan İšoğlu Alkaç  
Volkan Arısan  
Ayşe Evrim Bayrak  
Meryem Sedef Erdal  
İlhan İlkılıç  
Kıvanç Bektaş Kayhan  
Müge Sayitoğlu

## Bilimsel Sekreteryası / Scientific Secretariat

Yasin Yılmaz  
Aslı Gürbüz

## İstatistik Danışmanı / Statistics Editor

Eray Yurtseven

## Dil Editörleri / Language Editors

Alan James Newson, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Türkiye  
Elizabeth Mary Earl, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Türkiye

## Editöryal Ofis / Editorial Office

Birgül Taştemir  
Safiye Özkan Sarılı

## Yazışma Adresi / Correspondence Address

İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Bozdoğan Kemerli Cad. No:8 Vezneciler Hamamı Sk.  
Vezneciler, Fatih 34126 İSTANBUL  
Telefon / Phone: +90 (212) 440 00 00 (11280)  
Faks / Fax: +90 (212) 414 30 16  
E-mail: sabiad@istanbul.edu.tr  
https://dergipark.org.tr/sabiad

## Yayıncı Kuruluş / Publishing Company

İstanbul Üniversitesi Yayınevi / Istanbul University Press İstanbul  
Üniversitesi Merkez Kampüsü, 34452 Beyazıt,  
Fatih / İstanbul, Türkiye  
Telefon / Phone: +90 (212) 440 00 00

## Editör Kurulu/Editorial Board

Rengin Acaroğlu (İstanbul/Türkiye)  
Ahmet Araman (İstanbul/Türkiye)  
Gamze Aren (İstanbul/Türkiye)  
Ahmet Ataş (İstanbul/Türkiye)  
Arzu Funda Bağcıgil (İstanbul/Türkiye)  
Alper Baran (İstanbul/Türkiye)  
Sevim Buzlu (İstanbul/Türkiye)  
Erdal Cevher (İstanbul/Türkiye)  
Tülin Çağatay (İstanbul/Türkiye)  
Mustafa Demir (İstanbul/Türkiye)  
Tamer Demiralp (İstanbul/Türkiye)  
Mübeccel Demirkol (İstanbul/Türkiye)  
Günnur Deniz (İstanbul/Türkiye)  
Birsal Sönmez Uydeş Doğan (İstanbul/Türkiye)  
Sait Mesut Doğan (İstanbul/Türkiye)  
Bilge Donuk (İstanbul/Türkiye)  
Burak Erman (İstanbul/Türkiye)  
Melek Nihal Esin (İstanbul/Türkiye)  
Hakan Ertin (İstanbul/Türkiye)  
Sönmez Fıratlı (İstanbul/Türkiye)  
Godoberto Guevara-Rojas (Viyana/ Avusturya)  
Ahmet Gül (İstanbul/Türkiye)  
Amid Ismail Dean (Philadelphia/Abd)  
Christine Hauskeller (Exeter/ İngiltere)  
Alev Akdoğan Kaymaz (İstanbul/Türkiye)  
Nevin Kanan (İstanbul/Türkiye)  
Ahmet Kizir (İstanbul/Türkiye)  
Dildar Konukoğlu (İstanbul/Türkiye)  
Afife Mat (İstanbul/Türkiye)  
Eitan Mijiritsky (İstanbul/Türkiye)  
Hans-Martin Sass (Bochum/ Almanya)  
Fuat Oduncu (Münih/ Almanya)  
Vedat Onar (İstanbul/Türkiye)  
İlhan Onaran (İstanbul/Türkiye)  
Özen Doğan Onur (İstanbul/Türkiye)  
Semra Özdemir (İstanbul/Türkiye)  
İlgin Özden (İstanbul/Türkiye)  
Emine Akalin Uruşak (İstanbul/Türkiye)  
Yağız Üresin (İstanbul/Türkiye)  
Erdem Tüzün (İstanbul/Türkiye)  
Funda Yalçın (İstanbul/Türkiye)  
T. Mesud Yelbuz (Riyad/S. Arabistan)  
Onur Geçkili (İstanbul/Türkiye)  
Eray Yurtseven (İstanbul/Türkiye)  
Eda Yılmaz Alarçin (İstanbul/Türkiye)  
Fatemah Bahadori (İstanbul/Türkiye)

Dergide yer alan yazılardan ve aktarılan görüşlerden yazarlar sorumludur.  
*Papers and the opinions in the Journal are the responsibility of the authors.*

Şubat, Haziran ve Ekim aylarında, yılda üç sayı olarak yayınlanan hakemli, açık erişimli ve bilimsel bir dergidir.  
*This is a scholarly, peer-reviewed, open-access journal published three times a year in February, June and October.*

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

## **Editörden**

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

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

Sevgi ve saygılarımızla.

**Prof.Dr. Zeynep Karakaş**

Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi Editörü



## İÇİNDEKİLER / CONTENTS

---

<b>Lösemi Modelinde Tüm Genom RNA Dizileme Analiz Algoritması Geliştirilmesi.....</b>	<b>26</b>
<i>Whole Genome RNA Sequencing Analysis Algorithm in Leukemia Model</i>	
Eda Sun, Müge Sayitoğlu	
<b>Bir Üniversite Hastanesinde Kan Kültürlerinden İzole Edilen Bakterilerin Kümülatif Antibiyogram Sonuçları.....</b>	<b>35</b>
<i>Cumulative Antibiogram Results of Bacteria Isolated from Blood Cultures in a University Hospital</i>	
Lütfiye Öksüz, Zerrin Aktaş	
<b>Hücre Serilerinde Kilitli Nükleik Asitler İle MIR223 Gen Sessizleştirilmesi .....</b>	<b>45</b>
<i>MIR223 Gene Silencing via Locked Nucleic Acids in Cell Lines</i>	
Orçun Taşar, Müge Sayitoğlu, Özden Hatırnaz Ng	
<b>A Survey Study on Medicinal Plants and Mushrooms Use in Treatment of Cancer by Patients at The Istanbul University Institute of Oncology .....</b>	<b>51</b>
<i>İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü'nde Hastalar Tarafından Kanser Tedavisinde Kullanılan Tıbbi Bitkiler ve Mantarlar Üzerine Bir Anket Çalışması</i>	
Hüseyin Onur Tuncay, Miraç Ekici, Büşra Teke, Emine Akalın Uruşak	
<b>Yeni Koronavirüsün (Covid-19) Moleküler Yapısı ve Genomik Karakterizasyonu .....</b>	<b>61</b>
<i>Molecular Structure and Genomic Characterization of The New Coronavirus (Covid-19)</i>	
Gözde Öztan, Halim İşsever	
<b>Distant Pedicled Flaps for Elbow Coverage- a Systematic Review .....</b>	<b>72</b>
<i>Dirsek Bölgesi Defektlerinin Onarımında Uzak Pediküllü Flepler: Sistematik Derleme</i>	
Ömer Berköz, H. Utkan Aydın	
<b>İlaça Bağlı Olarak Çene Kemiklerinde Görülen Osteonekrozda Dental Yönetim ve Güncel Tedavi Yaklaşımları: Derleme .....</b>	<b>81</b>
<i>Dental Management in Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws and Current Treatment Approaches: Review</i>	
Ayşem Yurtseven Günay, Gülsüm Ak	



## Lösemi Modelinde Tüm Genom RNA Dizileme Analiz Algoritması Geliştirilmesi

### Whole Genome RNA Sequencing Analysis Algorithm in Leukemia Model

Eda Sun<sup>1,2</sup> , Müge Sayitoğlu<sup>3</sup> 

#### ÖZ

**Amaç:** RNA Dizileme teknolojisi gen anlatım farklılıkları ve kodlayan bölgedeki varyasyonlar, kodlama yapmayan küçük RNAların anlatımları ve gen füzyonlarının belirlenmesi ile bu farklılıkların nedenlerini sunabilmektedir. Ancak bu kadar enformatik bilgiler sunabilen bu teknolojinin analizlerinin yapılması ve yorumlanması oldukça zorludur. T- hücreli akut lenfoblastik lösemi (T-ALL) de prognostik öneme sahip ve hastalığın takibinde kullanılacak güvenilir bir genetik belirteç bulunmamasıyla birlikte, doğrudan tedavi protokolünü ve tedavide yararlanılacak yeni hedef proteinleri belirlemede esas olacak moleküler alt yapı ve sınıflandırma da bilinmemektedir.

**Gereç ve Yöntem:** Biz de bu çalışmamızda, T-ALL gibi karmaşık bir genomik arka plana sahip lösemi hücrelerinde RNA-dizileme için en uygun enformatik iş akış algoritmasını oluşturmayı amaçladık. Bu çalışmada RNA dizileme ile Jurkat ve Molt 4 hücre hatları dizilenmiştir. Doğrulama ve karşılaştırma amacıyla açık veri bankalarından elde edilen sağlıklı timosit alt grupları ve T-ALL hasta (n=12) örnekleri (GSE48173) kullanılmıştır.

**Bulgular:** Açık erişimli veri araçları ile gerçekleştirdiğimiz enformatik analizlerde doku spesifik alternatif kırılma ürünlerinin kantitatif tayinini, spesifik gen varyasyonlarını ve global gen anlatım düzeylerini başarılı bir şekilde tespit ettik ve T-ALL hasta verisinde aynı yaklaşımları kullanarak doğrulama yaptık.

**Sonuç:** Çalışmamızın sonucunda lösemi hastalarının veri analizinde kullanılacak uygun araçlar ve algoritma belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** RNA-Dizileme, enformatik, akut lenfoblastik lösemi

#### ABSTRACT

**Objective:** RNA Sequencing technology can offer gene expression differences and the reasons for these differences by detecting variations in the coding region, expression of non-coding RNAs and gene fusions. However, it is very difficult to analyze and interpret this technology, which can provide such valuable information. Although there is no reliable genetic marker for T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL), which can be used in the follow-up of the disease, the molecular infrastructure and classification that will be directly used in determining the treatment protocol and the new target proteins to be used in treatment are not known.

**Material and Methods:** In this study, we aimed to establish the most suitable workflow algorithm for RNA sequencing in cell lines belonging to a group with a complex genomic background such as T-ALL. With this study, the Jurkat and Molt4 cell lines were sequenced by RNA sequencing. In order to increase the significance of our study, the results of different thymocyte subgroups and 12 T-ALL patient samples (GSE48173) were investigated.

**Results:** We conducted a bioinformatics data approach by using open access data tools, and we successfully detected the tissue specific quantitative alternative splicing gene products, gene specific variations and global gene expression levels, and verified them using the same approach in T-ALL patient data.

**Conclusion:** Aside from these molecular findings that we have achieved, one of our goals in this study was to develop an algorithm of transcriptomic data, which is difficult to work with and to interpret, and showed the correctness of our algorithm by confirming the data described in the literature.

**Keywords:** RNA-Sequencing, informatics, acute lymphoblastic leukemia

<sup>1</sup> İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup> İstinye Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

<sup>3</sup> İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ORCID: E.S. 0000-0003-0320-5784;  
M.S. 0000-0002-8648-213X

#### Sorumlu yazar/Corresponding author:

Müge Sayitoğlu,  
İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp  
Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı,  
İstanbul, Türkiye  
E-posta: mugeay@istanbul.edu.tr

**Başvuru/Submitted:** 14.05.2020

**Kabul/Accepted:** 12.06.2020

**Atıf/Citation:** Sun E, Sayitoglu M. Whole Genome RNA Sequencing Analysis Algorithm in Leukemia Model. Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi 2020; 3(2): 26-34.  
<https://doi.org/10.26650/JARHS2020-737495>



## GİRİŞ

Yeni Nesil Dizileme (YND) teknolojileri, insan genom projesinin tamamlanmasıyla beraber projenin çıktısı olarak sağlık çalışmalarında önemli bir yer edinmiştir. YND teknolojileri genomik, transkriptomik, epigenetik düzenleyiciler ve genomdaki varyasyonları hakkında yüksek hassasiyette veriler sunmaktadır (1). Bu veri, örnek olarak kullanılacak nükleik asidin fragmente edilerek her bir fragmanın eş zamanlı paralel olarak çok sayıda okunmasıyla gerçekleştirilmektedir (2). YND teknolojilerinden transkriptom dizilemenin için birincil kütüphane hazırlamada kullanılan biyolojik materyal RNA'dır ve bu başlığın altındaki tüm teknolojiler aynı zamanda RNA-Dizileme olarak da adlandırılır. RNA Dizileme metodolojisinde RNA kütüphanesi hazırlandıktan sonra, ribozomlar uzaklaştırılıp, takiben cDNA sentezlenen bir örnek hazırlama protokolü ile başlamaktadır (3). Transkriptom dizilemenin en büyük avantajı, aslında bir gen anlatım çalışması olmasıdır. Bu özelliğinden dolayı, tüm transkriptom verisinin anlık bir görüntüsünü bize sunmaktadır. Tüm transkriptom verisi, hüresel transkripsiyonel profilinin kapsamlı olarak incelenmesini sağlamaktadır. Bu diğer YND teknolojilerinin bize sunmadığı alternatif kırılma bölgelerinin, novel transkriptlerin ve gen füzyonlarının tespitini sağlamaktadır (4,5). Tüm bu sunduğu avantajların yanında RNA-dizileme teknolojisi aynı zamanda yeniden hizalama yöntemi kullanarak (6) 18-22 baz çiftinden oluşan gen anlatım sırasında düzenleyici, gen baskılayıcı yada gen susturucu olarak görev alan ve transkripsiyonel ve translasyonel düzenleyici etkisini olan küçük RNAlar, kodlanmayan RNAlar ve mikroRNAların anlatım profilleri hakkında da bilgi sunmaktadır. Tüm bu avantajlarının yanında, ham verinin referans veriye doğru hizalanmasından başlayıp, doğru iş akış algoritması kullanımından ve çıkan sonuçların doğru yorumlanması RNA dizilemenin zorlukları arasındadır (7) ve RNA dizileme analizleri hakkında belirlenmiş bir altın standart bulunmamaktadır.

Akut lenfoblastik lösemi, B ve T lenfosit gelişiminin erken safhasında meydana gelen somatik genetik değişiklikler ile ortaya çıkan ve lenfositlerin aşırı artışı ile sonuçlanan bir lösemi tipidir (8). T-ALL

hastaları için prognostik öneme sahip ve hastalığın takibinde kullanılacak güvenilir bir genetik anlatım değişimi veya varyasyon bulunmamakla birlikte büyük bir grup hasta için, doğrudan tedavi protokolünü ve tedavide yararlanılacak yeni hedef proteinleri belirlemede esas olacak moleküler alt yapı ve sınıflandırma da bilinmemektedir (9).

Bu alışmamızda, T-ALL hücre hatlarını kullanarak RNA dizileme için oluşturulmuş farklı analiz araçlarını karşılaştırarak genomik arka planı oldukça karışık olan bu hastalık grubu için en uygun analiz algoritma yaklaşımının belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Örneklem

Çalışma Lösemilerin tanıları için oluşturulmuş immünofenotiplendirme protokollerine göre gruplandırılmış ve ticari olarak üretilen ALL hücre hatlarından Jurkat ve Molt4 seçilmiştir. T-ALL hastalarında sıklıkla aktivasyonu görülen sinyal ileti yolları için bir model oluşturmak amacıyla seçtiğimiz hücre hatları LiCl ile aktive edilerek dizilenmiştir (10).  $4 \times 10^6$  hücre, 12 ml %10 FCS, 2mM L-glutamin, streptomisin (100mg/mL) ve penisilin (100U/mL) içeren RPMI 1649 besiyeri içerisinde 240µl 1M LiCl eklenerek bir gece inkübe edilmiştir. LiCl muamelesi kanonik WNT yolağındaki β-katenin yıkım kompleksinde kilit rolü olan GSK3β inhibitörü olarak görev alarak Wnt yolağıının aktivasyonunu sağlamaktadır (11).

Kontrol örnekleri olarak da CD3+/CD4+/CD8- ve CD4+/CD8- sağlıklı timosit alt tiplerine ait RNA-dizileme verisi ve 12 T-ALL hastasına ait Gen Anlatım Omnibus (GEO) veri tabanından alınan RNA-dizileme verisi kullanılmıştır (GSE48173).

### RNA İzolasyonu

Hücre kültüründen toplanan Jurkat ve Molt4 hücreleri, 600 µl Solüsyon D içinde homojenize edildi ve kit protokolüne uygun bir şekilde total RNA izole edilmiştir (Qiagen, Almanya). Elde edilen RNA materyallerinin bozulma miktarına dayalı prensip ile 28S/18S oranını ölçmek için RNA örneklerinin kalite kontrollerini çipli sistem olan Bioanalyzer (Agilent, ABD) ile gerçekleştirilmiştir.



## Transkriptom Dizileme

Örnek grupları arasındaki transkriptom düzeyindeki farklılıklarını görebilmek için gerçekleştirdiğimiz RNA dizileme hizmet alımıyla gerçekleştirilmiştir. Örneklerimiz, Illumina HiSeq 2500 teknolojisi ile dizilenmiştir. Illumina cihazının dizileme teknolojisi sentezleyerek dizileme (Sequence by Synthesis (SBS)) teknolojisine dayandırılmıştır.

## Biyoformatik Analizler

RNA dizileme veri analizinde mevcut bir altın standart bulunmamaktadır. Bu nedenle farklı algoritma kombinasyonları test edilip en uygun algoritmanın belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada karşılaştırma için kullanılan tüm analiz araçları Tablo 1’de belirtilmiştir.

## Dizileme Verilerinin Kalite Kontrolü ve Veri Temizleme

RNA dizileme verisinin kalite kontrol değerlendirmeleri ve tekrarlanan adaptörlerin tespiti, “Fast Quality Control” (FastQC) (Babraham Bioinformatics) tespit aracı ile gerçekleştirilmiştir. FastQC aracının “fastq-mcf” alt aracı ile, dizileme sonucunda elimizdeki FastQ formatındaki ham veri, ön işleme raporlaması ile kalite değerlendirmesi yapıp okuma kalite değerleri için belirlenen eşik değere göre değerlendirilmiştir (28 baz çifti ve üzeri okuma değerleri kabul edilir). Bu eşik değer taban alınarak düşük kalitedeki okumalar temizlenip kırılmış, örneklerin dizileme esnasında karışmamaları için eklenen işaret olan adaptörlerden de kalanlar temizlenmiştir.

**Tablo 1.** Çalışmamızdaki analizlerde kullanılan analiz programları ve veri tabanları

Program/Veri Tabanı Adı	Açıklama
fastq-dump	SRA formatındaki RNA dizileme verisini FASTQ biçimine dönüştürüp analiz edilemeye uygun hale getirir.
fast-qc (Fast Quality Control)	FASTQ dosyalarının kalite kontrol değerlendirmelerini ve tekrarlanan adaptörlerini tespit eder.
Python	Python dilinde yazılan program ile tekrarlanan adaptörleri FASTQ formatında kaydeder.
Fast-mcf	Belli okuma değeri altında kalan bölgeleri kırıp, adaptörleri kendi bölgeleri için “false-pozitif”liği önlemek için veriden temizler.
RSEM Generator	Elde edilen referans genomu hizalama için hazırlayıp, “bowtie2” algoritmasına göre hizalamayı gerçekleştirmektedir.
STAR	Elde edilen ham veriyi referans genoma hizalamayı gerçekleştiren ve literatürde en çok tercih edilen araçtır.
The R Project for Statistical Computing	R grafik ve kapsamlı istatistiksel analizlerin yapılmasını sağlayan ücretsiz bir ara yüzüdür.
Bioconductor	Yüksek çözünürlüklü verilerin analizinde R ara yüzünü kullanan bir biyoformatik kaynaktır.
EBSeq2	RNA dizileme grupları arasında farklı anlatıma uğrayan genleri tespit eden veri analizidir.
Cufflinks	Cole Trapnell’s Lab tarafından geliştirilmiş RNA dizileme grupları arasındaki anlatım farklılıklarını belirleyen araçtır.
ClustVis	İnteraktif ısı haritaları ile genom verilerinin görselleştirilmesinde ve analizinde kullanılan bir uygulama birimidir.
UCSC <a href="http://genome.ucsc.edu">http://genome.ucsc.edu</a> GRCh337/hg19	Referans sekans ve genomla ilgili bilgiler içeren, kullanıcıya çalışma alanı sağlayan bir veri tabanıdır.
DAVID (DAVID Bioinformatic Database) <a href="http://david.abcc.ncifcrf.gov">http://david.abcc.ncifcrf.gov</a>	Fonksiyonel anotasyon analizlerinde kullanılan bir veri tabanıdır
GEO (Gene Expression Omnibus) <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/</a>	NCBI veri tabanının altında, ekspresyon ve varyasyon verilerinin depolandığı ve paylaşıldığı bir veri tabanıdır .

## Referans Genoma Hizalanması ve Gen Anlatımlarının Profillendirilmesi

Kalite kontrol ve temizleme sonrasında değerlendirilmeye uygun hale getirdiğimiz veriler, literatürde en çok kullanılan BOWTIE2 ve STAR hizalama araçları ile hg19 referans genoma hizalanmıştır. Hizalama sırasında genlerin uzunlukları ve ilgili gen bölgesi için okuma derinliği değerlendirilerek “Fragment Per Kilobase Per Million” (FPKM) şeklinde ifade edilen gen anlatım değerleri normalizasyonu tamamlanmış şekilde hesaplanmıştır. Kalite kontrol verisinde yer alan okuma derinliği ve fragman uzunluğu parametrelerinin önemi Tablo 2’de hesaplama ile gösterilmiştir.

$$FPKM = \frac{ER \times 10^9}{EL \times MR \times 2}$$

ER) Gen bölgesi için okuma derinliği, EL) İlgili gen bölgesinin uzunluğu, MR) Deneydeki toplam derinlik değeri.

### Gen Anlatım Analizi

Elde ettiğimiz FPKM değerlerini kullanarak tüm veri içerisindeki anlamlı olarak anlatımı değişen genleri tespit etmek için EBSeq paketi ve Cufflinks aracı kullanılmıştır. EBSeq, R programlama içerisindeki biyolojik analizler yapılabilecek platform olan Bioconductor bünyesinde bir pakettir ve gen anlatım profilleri hesaplamalarında kullanılmıştır. Cufflinks (Cole Trapnell’s Lab) ise, RNA-dizileme için diferansiyel gen anlatımı hesaplama üzere ortak üç matematik ve hesaplamalı

Biyoloji laboratuvarlarının geliştirdiği bir araçtır (<http://cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/>) (12).

Gen anlatım hesaplamaları sonucunda anlamlı değişiklik gösteren ( $p < 0,05$ ) genlerin logaritmik kat değişimleri tespit edilmiş ve bu genler ve değişim kat sayıları ClusVis (13) programı aracılığıyla R dilinde yazılmış program ile ısı haritasına yerleştirilmiştir. Tespit ettiğimiz genler, “The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery” (DAVID) veri tabanı kullanılarak yolak ve zenginleştirme analizleri yapılmıştır (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) (14).

### Gen Anlatım Analizi

Hizalanmış veri içerisinde, WNT yolağı ilişkili genlerin FPKM değerleri çekilip EBSeq ve Cufflinks ile bu genlerin anlatım profilleri hesaplanmış, anlamlı olan genlerin ( $p < 0,05$ ) logaritmik kat değişimleri tespit edilmiş ve bu genler ısı haritasında görselleştirilmiştir.

### Alternatif Kırpılma Ürünlerinin Analizi

mRNA oluşurken ortaya çıkan gen ürünleri, alternatif noktalardan kırpılma sonucunda farklı ürünler oluşabilir. Bu oluşan alternatif ürünlerin anlatım miktarlarını ifade eden FPKM değerleri, GraphPad programına yerleştirilip LiCl ile uyarılmış hücre hatlarında, kontrol örneklerinde ve hastalardaki durumlarını gösteren dağılım grafiği çizilmiştir.

### Varyant Analizleri

Hizaladığımız verinin çıktıklarından biri de “Variant Calling File” (.vcf) olan verideki varyasyonlar

**Tablo 2.** Okuma derinliği ve gen uzunluğuna göre normalize edilmemiş (öncesi) ve edilmiş (sonrası) değerlerin temsili olarak gösterimi

	Gen Adı	1. Tekrar Okuma Sayısı	2. Tekrar Okuma Sayısı	3. Tekrar Okuma Sayısı
Öncesi	A Geni (2 kb)	10	12	30
	B Geni (4 kb)	20	25	60
	C Geni (1 kb)	5	8	15
	D Geni (10 kb)	0	0	1
Sonrası	Gen Adı	1. Tekrar Okuma Sayısı	2. Tekrar Okuma Sayısı	3. Tekrar Okuma Sayısı
	A Geni (2 kb)	1.43	1.33	1.42
	B Geni (4 kb)	1.43	1.39	1.32
	C Geni (1 kb)	1.43	1.78	1.42
	D Geni (10 kb)	0	0	0.009

Farklı sayıdaki okuma değerine sahip olan farklı uzunluktaki genlerin aslında aynı gen anlatım profilini gösterebileceğini göstermek için değerler temsili olarak gösterilmiştir

**Tablo 3.** İki farklı araçlarla hizalanmış ve gen anlatım profilleri hesaplanmış örneklerle genel bakış

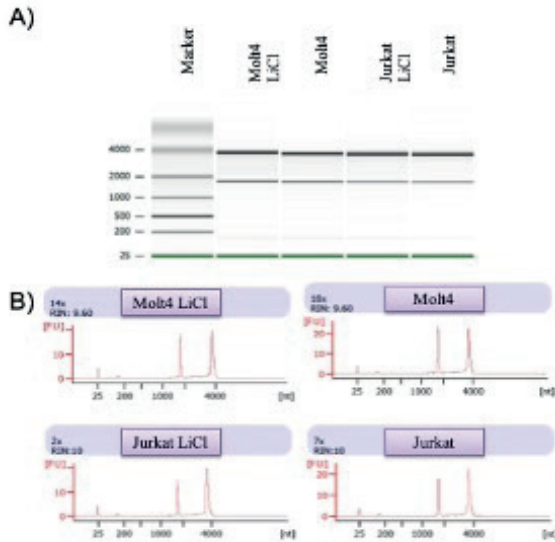
Hizalama Araçları	Tam Kapsamlı Analiz		
	LiCl ile Uyarılmış Hücre Hatları vs Timus Havuzu	EB-Seq	Cufflinks
	Bowtie	1784	116
STAR	1638	1677	

ile ilgili bilgi içeren bir dosyadır. Hizalama sonucunda elde ettiğimiz .vcf uzantılı dosya, Illumina firmasının varyant analizleri için geliştirdiği ticari yazılım olan VariantStudio'da (v3.0.12) analiz edilmiştir.

## BULGULAR

### RNA Kalite Kontrolü

Yeni nesil transkriptom dizilemeden verimli sonuç alabilmek için RNA'nın 28S/18S oranını temsil eden RIN (RNA Integrity Number; RNA Bütünlük Sayısı) sayısının 7'den büyük olması gerekmektedir. Çipli sistem kullanılarak yapılan ölçümlerde (Bioanalizör, Agilent) Jurkat için RIN sayısı 10, Jurkat LiCl için 10, Molt4 için 9.6 ve Molt4 LiCl için de 9.6 olarak ölçülmüştür. Örneklerin çipli sistemdeki yürütme sonuçları Şekil 1'de gösterilmiştir.



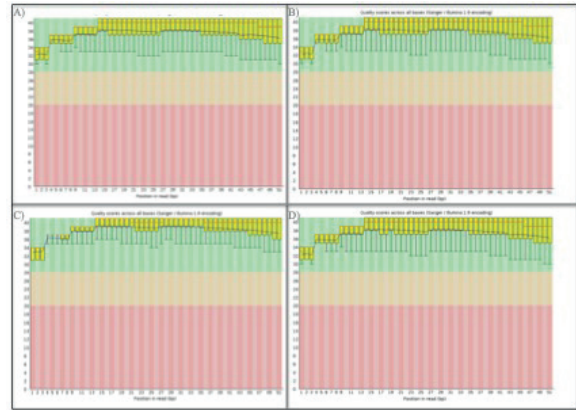
**Şekil 1.** RNA örneklerinin Biyoanalizör 2100 cihazındaki (Agilent) ölçüm sonuçları. A) çipli sisteme yüklenmiş örneklerin jel görüntüsü. B) 28S/18S oranının hesaplanabilmesi için gerekli okuma değerlerinin grafikleri

## Enformatik Bulgular

### Ön İşleme

#### Kalite Kontrol ve Temizleme

Dizileme ham verimizde toplam 71.018.097 okuma sayısı, 30 baz üzerindeki fragmanlarda okuma %94,81 ve 35,65 okuma derinliğine ulaşılmıştır. Dizileme sonucunda elde ettiğimiz fastq dosyalarımız, FastQC (Babraham Bioinformatics) kullanılarak dizilenen örneklerimizin kalite değerleri ve dizi içinde kalmış adaptörler belirlenmiştir. Örnekler içinde tespit edilen adaptörler kırıldı. Şekil 2 'de örneklerin kalite kontrol grafikleri verilmiştir.



**Şekil 2.** RDizilenmiş RNA örneklerinin okumaları gerçekleştirilmiş kalite kontrol analizi sonucu. Sarı barlarda gösterilen her bir fragmanın okuma kaliteleri buldukları alanlarda belirtilmiştir. Yeşil alan; kaliteli okuma, sarı ve kırmızı alanlar ise dizilerde kalan adaptörler veya kısa okumalar olduğunu işaret etmektedir

### Referans Genoma Hizalanması ve Gen Anlatımının Profillendirilmesi

Örnekler literatürde en çok tercih edilen Bowtie2(15) ve STAR(16) hizalama araçları kullanılarak hg19 referans genomuna hizalandı. Hizalanan veride gen okuma değerlerini referans olarak her genin mutlak anlatım değerini ifade eden FPKM değerleri hesaplanmıştır.

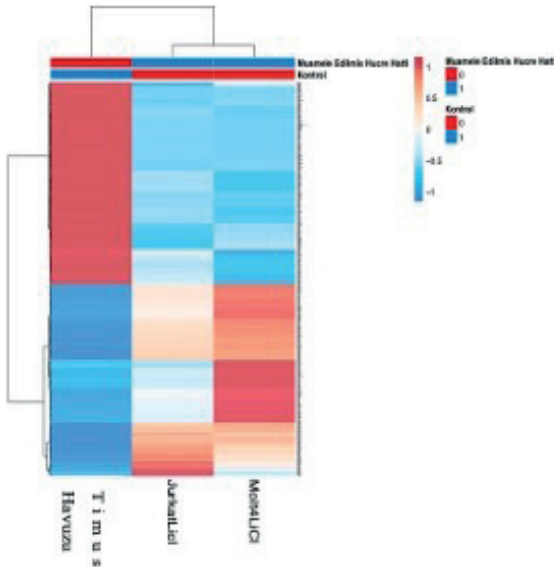
### Gen Anlatım Analizi

Örnek havuzundan belirlenen grupların her biri EBSeq ve Cufflinks analiz araçları ile farklı anlatım profili gösteren genler tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ). Bu sonuçları dikkate aldığımızda, tam kapsamlı analiz-

de Bowtie hizalama sonucunda elde edilen verilerde EBSeq kullanılarak gen anlatımlarını hesaplandığında 1784, Cufflinks kullanıldığında ise 116 diferansiyel anlatım farklılığı gösteren gen tespit edildi. STAR hizalama aracından elde edilen veri sonucunda ise Bowtie ile 1638 ve Cufflinks ile 1677 adet anlatım farklılığı gösteren gen tespit edilmiştir. Anlatım farklılığı olduğunu tespit ettiğimiz gen sayılarında en çok veriye STAR hizalama aracı ile EBSeq hesaplama aracının en doğru yaklaşım gösterdiği ve bu araçlar kullanarak devam edilmeye karar verilmiştir.

### Tüm Transkriptom Analiz

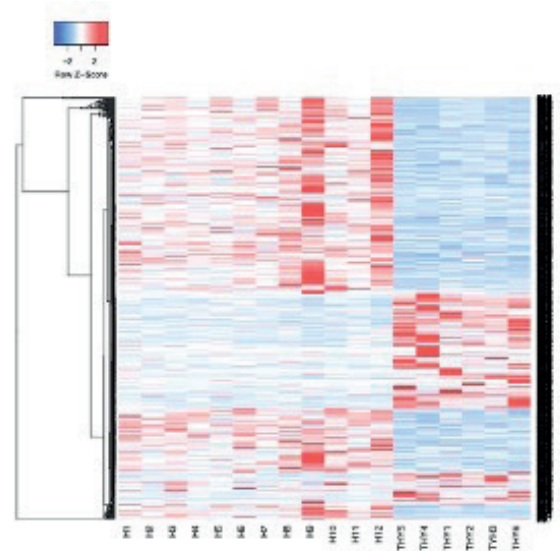
Isı haritası için oluşturduğumuz algoritmada en çok 1200 gen ile çalışılması mümkündür. Seçilen araçlardan elde edilen sonucunda elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda, logaritmik değer ve p değerleri açısından değerlendirildiğinde en anlamlı sonuç veren 1200 gene ait gen anlatım profilleri, ısı haritalarına yerleştirilip gen anlatım düzeyleri görselleştirilmiştir (Şekil 3). LiCl muamelesi görmüş hücre hatlarının, kontrol örneği olan timus havuzundan farklı bir anlatım profili gösterdiği, ısı haritasında herhangi bir etiketleme yapılmadan kümelenebileceği ile gösterilmiştir.



Şekil 3. Tüm transkriptom analizi sonucu, LiCl ile muamele edilmiş hücre hattı ve hastalardaki gen anlatım profillerinin keşif kümesi (n=426)

Hücre hatları için yaptığımız analizler, veri tabanlarından elde edilen 12 adet T-ALL hastasına ait RNA dizileme sonuçları verisinde de uygulanmış ve elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda hasta grubunun, kontrol örneği olan timus havuzundan farklı bir anlatım profili gösterdiği, ısı haritasında herhangi bir etiketleme yapılmadan kümelenebileceği ile gösterilmiştir.

Hem uyarılmış hücre hatlarına ait veriler hem de hastalardan elde edilen veriler birleştirildiğinde, 426 adet genin ortak profil gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. Hasta verilerinde, tüm transkriptom analizinin gen anlatım ısı grafiği. "H" kodları hasta örnekleri, "THY" kodları kontrol timus havuzunu temsil etmektedir

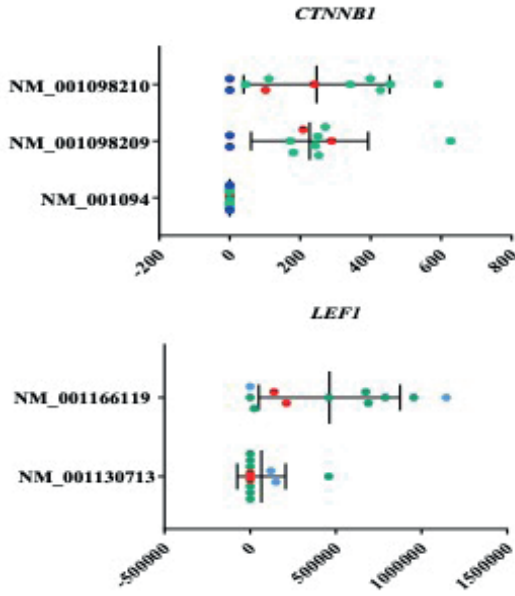
### Alternatif Kırılma Ürünleri

T-ALL hastalarında daha önceden tanımlanmış ve WNT yolağında kilit rolü olan genler seçilerek alternatif kırılma ürünlerinin anlatımları hesaplanmıştır. T-ALL hastaları ve sağlıklı bireylerde anlatım düzeylerinin farklılığı veritabanlarında *CTNNB1* için üç transkript ve *LEF1* için tanımlanmış 2 transkript tespit edilmiş ve bunların dokular arasındaki anlatım düzey farklılıkları Şekil 5'te gösterilmiştir.

### Varyant Analizleri

Yöntemimizin doğruluğunu gösterebilmek adına seçilen hücre hatlarında daha önce tanımlanmış varyasyonlar RNA dizileme yöntemi ile da analiz edil-





Şekil 5. *CTNNB1* ve *LEF1* için tanımlanmış transkriptlerin dokular arasındaki anlatım farklılıkları. (Kırmızılar Uyarılmış hücre hatları; Yeşiller hastaları; Maviler de kontrol örneklerini temsil etmektedir.)

miştir. Jurkat hücre hattı için literatürde tanımlanan 12. kromozomda yer alan olmuş *CDK4* ve 1. kromozomda lokalize olmuş *ARF1* gen varyasyonları; Molt4 hücre hattı için literatürde tanımlanan 1. kromozomda yer alan olmuş *NRAS* geninde tanımlanan varyasyon ve yine 1. kromozomda lokalize olmuş *ARF1* genindeki varyasyonlar tespit edilmiştir.

## TARTIŞMA

Yeni nesil RNA dizileme, son derece dinamik olan hücre ya da dokuya özgün transkriptom repertuarını belirlemede kullanılabilir yeni bir teknolojidir. Yeni nesil RNA dizi analizi teknolojisi uygulamaları ile kanser genom çalışmaları yeni bir boyut kazanmıştır. RNA dizileme sayesinde gen anlatım profilleri, alternatif kırılma ürünleri ve varyasyonlar gibi genoma özgü değişiklikleri yüksek çözünürlükte tespit edilebilmenin yanında miRNA bağlanma bölgeleri gibi fonksiyonel önemi olan verinin de tespitine olanak sağlamıştır. RNA dizileme ile yüksek çözünürlükte verilerin elde edilebilmesi için ortalama 50 milyon okuma sayısı, %85 üzerinde 30 bazdan uzun okuma ve 20 kattan fazla okuma derinliği olması gerekmektedir. Bu çalışmadaki veri kalitesini

değerlendirdiğimizde, anlamlılığı yüksek veriler elde edebilmek için bu eşik değerlerin oldukça üzerinde kaliteli bir dizileme verisi elde edilmiştir.

RNA dizilemenin avantajlarından biri alternatif kırılma ürünlerinin anlatım farklılıklarını saptamıştır. Zhao ve arkadaşlarının, içerisinde bizim de kullandığımız Jurkat ve Molt4'ün e bulunduğu lösemi hücre hatları ile yaptıkları çalışmada, *IKZF2* geninin farklı transkript ürünlerinin T hücre proliferasyonuna ve apoptozuna müdahale ettiği gösterilmiştir (17). Adamia ve arkadaşlarının yayınladıkları derlemede de, kırılma hatalarının malin dönüşümlere sebep olabileceği ve aday olarak belirlenen alternatif kırılma ürünlerinin özellikle ilaca dirençli klonların tedavisinde kullanılabileceği belirtilmiştir (18). Çalışmamızdan elde ettiğimiz alternatif kırılma ürün sonuçlarına baktığımızda ise, *LEF1* için dört alternatif kırılma ürününden biri (NM\_001130713) tümör baskılayıcı özellikteki transkript varyant, diğeri ise (NM\_001166119) onkogenik özellikli transkript varyanttır. Elimizdeki verilerde uyarılmış hücre hatlarında ve altı hastada tümör baskılayıcı özellikteki transkriptin hiç anlatıma girmediği, sadece bir hastada ve sağlıklı kontrol örneklerinde anlatımın görüldüğünü tespit edilmiştir. Onkogenik özellikte olan transkriptin ise; uyarılmış hücre hatlarında, altı hastada ve Jurkat için kontrol örneğinde anlatımını belirledik. Literatürde, tespit ettiğimiz iki alternatif kırılma ürününün anlatımları hakkında bilgiye ulaşamadık.

Varyant analizlerinde önceden bildirilen (Jurkat için *CDK4* ve *ARF1*; Molt4 için *NRAS* ve *ARF1*) genetik varyasyonların (19). RNA dizileme varyant analizi ile de hassas bir şekilde saptanabildiğini görülmüştür. Bu bulguya ek olarak, Tomov ve arkadaşlarının 2016 yılında yayınladıkları makalede, RNA Dizileme analizlerinde kullandıkları algoritma öncelikle ham verinin FASTQC aracıyla kalite kontrolünün tespitiyle başlamıştır; ardından veriler hizalanıp bizim de kullandığımız EBSeq aracı ile gen anlatım düzeyleri hesaplanmış ve logaritma 2 tabanındaki artış miktarları gösterilmiştir (20). Bu algoritma bizim çalışmamız için belirlediğimiz algoritma ile birebir

örtüşmektedir ve iş akış protokollerimizin doğruluğu bir farklı yoldan da gösterilmiştir.

RNA dizileme yöntemi, gen anlatım analizleri için yüksek hassasiyetteki mikro-dizileme yöntemini geçersiz kılacak kadar güçlü bir transkriptom analiz yöntemi olarak karşımıza çıkmıştır. Analizlerinin göreceli olarak daha kolay olduğu mikro-dizi yöntemi, anlatımları anlamlı düzeyde değişen genlerin tespiti için çoğu çalışmada hala tercih edilen bir yöntemdir. RNA dizileme analizleri ise, araştırmacıların analiz yapmak için bir çok aracı kombine bir şekilde kullanması gereken ve zorluklarla karşı karşıya kaldığı bir yöntemdir. Ancak, mikro-dizilerde yapılan analiz sonucunda, önceden bilinen transkriptlerin anlatım düzeylerine ulaşma imkanı varken, RNA dizileme analizleri sonucunda; gen anlatım düzeyleri, kırılma bölgelerinin tespit edilmesi ve *novel* transkriptlerin tespit edilebilmektedir (21). Literatürde, 31 T-ALL hastası ve 18 hücre hattı toplamda 49 T-ALL örneği ile yapılan bir çalışmada ekzom ve transkriptom daseti karşılaştırılarak, ekzomda tespit edilmeyip transkriptom dasetinde tespit edilebilen yeni driver mutasyonları göstermişlerdir (22).

Sonuç olarak çalışmamızda farklı algoritmalar karşılaştırılmış ve lösemi örneklerinin analizi için RNA-Dizileme data analiz algoritması oluşturulmuş, gen anlatım düzeyindeki farklılıklar; alternatif kırılma ürünlerinin doku spesifik anlatımları ve veri tabanında T-ALL ile ilişkilendirilmiş varyantları belirleyeceğimiz araçlar ve RNA dizileme analiz algoritma yaklaşımı belirlenmiştir. Bu çalışmada hastalığı temsil eden hücre hatları ve açık veri tabanlarından küçük bir T-ALL hasta kohortu verisi kullanılmıştır. Enformatik analizlerin güvenilirliği daha büyük veri setlerinde yapılacak analizler ve validasyon çalışmaları ile kesinlik kazanacaktır.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Peer Review:** Externally peer-reviewed.

**Yazar Katkıları:** Çalışma Konsepti/Tasarım- E.S., M.S.; Veri Toplama- E.S., M.S.; Veri Analizi/Yorumlama- E.S., M.S.; Yazı Taslağı- E.S., M.S.; İçeriğın Eleştirel İncelemesi- M.S.; Son Onay ve Sorumluluk- E.S., M.S.

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

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir

**Conflict of Interest:** Authors declared no conflict of interest.

**Finansal Destek:** Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje No: TYL-2016-20440)

**Financial Disclosure:** This study was supported by Istanbul University Scientific Research Projects Unit. (Project No: TYL-2016-20440)

## KAYNAKLAR/REFERENCES

- Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? Arch Dis Child Educ Pract Ed. 2013;98(6):236–8.
- Johnsen JM, Nickerson DA, Reiner AP. Massively parallel sequencing: The new frontier of hematologic genomics. Blood. 2013;122(19):3268–75.
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. Nature Reviews Genetics. 2009.
- Ozsolak F, Milos PM. RNA sequencing: Advances, challenges and opportunities. Nat Rev Genet. 2011;12(2):87–98.
- Costa V, Angelini C, De Feis I, Ciccodicola A. Uncovering the complexity of transcriptomes with RNA-Seq. J Biomed Biotechnol. 2010;2010:19.
- David M, Dzamba M, Lister D, Ilie L, Brudno M. SHRiMP2: Sensitive yet Practical Short Read Mapping. Bioinformatics [Internet]. 2011 Apr 1 [cited 2018 Jul 13];27(7):1011–2. Available from: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btr046>
- Williams AG, Thomas S, Wyman SK, Holloway AK. RNA-seq Data: Challenges in and Recommendations for Experimental Design and Analysis. Curr Protoc Hum Genet. 2014;83.

8. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J.* 2017;7(6):e577.
9. Van Vlierberghe P, Ferrando A. The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest.* 2012;122(10):3398–406.
10. Galli C, Piemontese M, Lumetti S, Manfredi E, Macaluso GM, Passeri G. GSK3b-inhibitor lithium chloride enhances activation of Wnt canonical signaling and osteoblast differentiation on hydrophilic titanium surfaces. *Clin Oral Implants Res.* 2013 Aug;24(8):921–7.
11. Gottardi CJ, Gumbiner BM. Distinct molecular forms of  $\beta$ -catenin are targeted to adhesive or transcriptional complexes. *J Cell Biol.* 2004 Oct 25;167(2):339–49.
12. Cufflinks [Internet]. [cited 2020 Jun 23]. Available from: <http://cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/>
13. Metsalu T, Vilo J. ClustVis: A web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(W1):W566–70.
14. DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis [Internet]. [cited 2020 Jun 23]. Available from: <https://david.ncifcrf.gov/>
15. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods.* 2012 Apr 4;9(4):357–9.
16. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. Sequence analysis STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. 2013 [cited 2020 Jun 10];29(1):15–21. Available from: <http://code.google.com/p/rna-star/>.
17. Zhao S, Liu W, Li Y, Liu P, Li S, Dou D, et al. Alternative splice variants modulates dominant-negative function of Helios in T-cell leukemia. *PLoS One.* 2016;11(9):e0163328.
18. Adamia S, Pilarski P, Bar-Natan M, Stone R, Griffin J. Alternative Splicing in Chronic Myeloid Leukemia (CML): A Novel Therapeutic Target? *Curr Cancer Drug Targets.* 2013;13(7):735–48.
19. Bennett JM. The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book. Leukemia Research. 2002.
20. Tomov ML, Olmsted ZT, Dogan H, Gongorurler E, Tsompana M, Otu HH, et al. Distinct and Shared Determinants of Cardiomyocyte Contractility in Multi-Lineage Competent Ethnically Diverse Human iPSCs. *Sci Rep.* 2016;6(37636).
21. Ramsköld D, Kavak E, Sandberg R. How to analyze gene expression using RNA-sequencing data. *Methods Mol Biol.* 2012;802:259–74.
22. Kalender Atak Z, Gianfelici V, Hulselmans G, De Keersmaecker K, Devasia AG, Geerdens E, et al. Comprehensive Analysis of Transcriptome Variation Uncovers Known and Novel Driver Events in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *PLoS Genet.* 2013;9(12):e1003997.

## Bir Üniversite Hastanesinde Kan Kültürlerinden İzole Edilen Bakterilerin Kümülatif Antibiyogram Sonuçları

### *Cumulative Antibigram Results of Bacteria Isolated from Blood Cultures in a University Hospital*

Lütfiye Öksüz<sup>1</sup> , Zerrin Aktaş<sup>1</sup> 

#### ÖZ

**Amaç:** Bu çalışmada, kan kültürlerinden izole edilen bakterilerin kümülatif antimikrobiyal verileri araştırılmış ve klinisyenlerin ampirik tedavi seçimine katkıda bulunulması amaçlanmıştır. **Gereç ve Yöntem:** Çalışmaya Ocak 2018-Mayıs2019 arasında çalışılan kan kültürleri dahil edilmiştir. Sadece izolat sayısı >30 olan bakteriler değerlendirilmiştir. Her hasta için ilk izolat çalışmaya dahil edilmiştir. Ampirik tedavi için kümülatif antibiyotik duyarlılık sınırı >90 olarak kabul edilmiştir.

**Bulgular:** Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* izolatlarında ampirik tedavi için en uygun antibiyotiklerin vankomisin, teikoplanin ve linezolid olduğu; metisiline duyarlı *S. aureus* izolatlarında bu antibiyotiklere ek olarak kotrimoksazol ve tetrasiklin seçeneklerinin olduğu bulunmuştur. *Enterococcus faecalis* izolatlarında vankomisin, teikoplanin ve linezolid ek olarak ampisilin ve yüksek düzey gentamisin ampirik tedaviye uygun olduğu bulunurken, *Enterococcus faecium* izolatlarında tek ampirik tedavi seçeneğinin linezolid olduğu belirlenmiştir. Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz oluşturmeyen grupta karbapenemlere ek olarak 3. ve 4. kuşak sefalosporinler, aminoglikozidler ve piperasilin+tazobaktam ampirik tedavi için uygun olmasına rağmen, GSBL oluşturan *Escherichia coli* izolatlarında sadece karbapenem grubu antibiyotikler ampirik tedavi için uygun bulunmuştur. GSBL pozitif *Klebsiella pneumoniae* için ampirik tedavi seçeneği olmadığı ve bu grupta karbapenem direncinin % 50'ye ulaştığı bulunmuştur. GSBL negatif izolatlarda 3. ve 4. kuşak sefalosporinler, karbapenemler, aminoglikozidler ve siprofloksasinin ampirik tedavi için uygun olduğu bulunmuştur.

**Sonuç:** Çalışmamızda elde edilen yüksek direnç oranları nedeniyle, düzenli sürveyans takibinin yapılması gerekmektedir. Karbapenemleri de kapsayan çoğul dirençli mikroorganizmalar için antibiyotik kombinasyonlarının etkinliğini test eden çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar Kelimeler:** Kan kültürü, kümülatif antibiyogram, antimikrobiyal direnç

#### ABSTRACT

**Objective:** This study investigated the cumulative antimicrobial data of bacteria isolated from blood cultures and aimed to contributing to clinicians' empirical treatment selection.

**Material and Methods:** The study included blood cultures studied between January 2018 and May 2019. Only bacteria species that have 30 or more isolates were evaluated. Only the first isolate for each patient was included in the study. The cumulative antibiotic susceptibility limit for empirical treatment was >90%.

**Results:** The most appropriate antibiotics for empirical treatment in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates were vancomycin, teicoplanin and linezolid. Co-trimoxazole and tetracycline options in addition to vancomycin, teicoplanin and linezolid were suitable for therapy in methicillin-sensitive *S. aureus* isolates. Ampicillin and high level-gentamicin alongside vancomycin, teicoplanin and linezolid were found to be appropriate for empirical treatment in *Enterococcus faecalis* isolates, while linezolid was the only option in *Enterococcus faecium* isolates. Although cephalosporins, aminoglycosides and piperacillin tazobactam as well as carbapenems were suitable for empiric therapy in the ESBL-negative group, only carbapenems were found suitable for empirical treatment in *Escherichia coli* isolates producing extended-spectrum beta-lactamase. There was no empirical treatment option for ESBL positive *Klebsiella pneumoniae*. Carbapenem resistance of these bacteria was found to reach 50%. Third and 4th generation cephalosporins, carbapenems, aminoglycosides and ciprofloxacin were appropriate for empirical treatment in ESBL negative *K. pneumoniae* isolates.

**Conclusion:** Due to the high resistance rates in our study, regular surveillance monitoring should be performed. Studies are needed to test the efficacy of antibiotic combinations for multi-resistant organisms, including carbapenem-resistant bacteria.

**Keywords:** Blood culture, cumulative antibiogram, antimicrobial resistance

<sup>1</sup> İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ORCID: L.Ö. 0000-0002-6722-141X;  
Z.A. 0000-0002-5998-0440

#### Sorumlu yazar/Corresponding author:

Lütfiye Öksüz,  
İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye  
E-posta: oksuzl@istanbul.edu.tr

**Başvuru/Submitted:** 05.05.2020

**Kabul/Accepted:** 16.06.2020

**Atf/Citation:** Öksüz L, Aktaş Z. Cumulative Antibigram Results of Bacteria Isolated from Blood Cultures in a University Hospital. Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi 2020; 3(2): 35-44.  
<https://doi.org/10.26650/JARHS2020-732729>



## GİRİŞ

Antibiyotik direnci oranları bölgelere ve zamana göre değişkenlik gösterdiğinden klinik olarak önemli mikroorganizmalara karşı ampirik tedavi seçeneklerinin belirlenebilmesi, morbidite ve mortalitenin azaltılabilmesi için antibiyotik direncinin rutin olarak takip edilmesi gerekir. Antibiyotik direnci takibinde, ampirik antimikrobiyal tedavinin seçiminde klinisyenlere fayda sağlamak amacıyla sıklıkla kümülatif (toplu) antibiyogramlar kullanılmaktadır (1). Güvenilir kümülatif antibiyogram sonuçlarının, hastaya ait kültür sonuçlarının henüz mevcut olmadığı durumlarda, hem etkisiz antibiyotik seçimini, hem de geniş spektrumlu antibiyotiklerin aşırı reçete edilmesini önlemeye yardımcı olabileceği bildirilmiştir (2). Kümülatif antibiyogram verileriyle birlikte kısıtlı antibiyogramın da uygulanmasıyla uygun ampirik tedavi rejimi seçilebilmekte ve antibiyotik direnciyle mücadele için uygun politikalar oluşturulabilmektedir.

Bu çalışmanın amacı, hastanemizde kan dolaşımı enfeksiyonlarından izole edilen bakterilerin kümülatif antimikrobiyal duyarlılık verilerini irdeleyerek klinisyenlerin başlangıç ampirik tedavi seçimine ve antibiyotik yönetimi politikalarına katkıda bulunmaktır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, Ocak 2018-Mayıs 2019 tarihleri arasındaki 16 aylık süreçte, kan kültürlerinden izole edilen belli bakterilerin antibiyotiklere duyarlılıkları değerlendirilmiştir. Hastanemizin çeşitli kliniklerinden Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen kan kültürü örnekleri, BACTEC FX (Beckton Dickinson-ABD) otomatik kan kültürü sisteminde beş gün süreyle inkübe edilmiştir. Pozitif sinyal veren şişelerden izole edilen mikroorganizmaların tanımlanması, konvansiyonel yöntemler ve gerektiğinde otomatik identifikasyon sistemiyle (Phoenix 100, Beckton Dickinson-ABD), antibiyotik duyarlılık testleri disk difüzyon ve bazı antibiyotikler için gradiyent test yöntemiyle yapılmış ve Clinical and Laboratory Standards Institute 2017 (3) önerilerine uygun olarak değerlendirilmiştir. Kümülatif antibiyogram verileri CLSI M39-A4 önerileri kullanılarak değerlendirilmiştir (1,4). Hastalara ait demografik veriler hastane

otomasyon sisteminden alınmıştır. Kümülatif antibiyogram kurallarına uygun olarak izolat sayısı >30 olan bakteri türleri değerlendirmeye alınmıştır (1). Her hasta için ilk izolata ait duyarlılık sonuçları dahil edilmiştir. Çalışmada sadece rutin olarak test edilen antibiyotiklerin duyarlılık sonuçları değerlendirmeye alınmıştır. Ampirik tedavi için kümülatif antibiyotik duyarlılık sınırı > % 90 olarak kabul edilmiştir. Çoğul direnç, sefalosporinlere, aminoglikozidlere ve florokinolonlara direnç olarak ele alınmıştır (4). Çalışma, Helsinki Bildirgesi'ne uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

## BULGULAR

Kan kültürlerinden mikroorganizma izole edilen hastaların 334'ünün (%36,9) çeşitli kliniklerde (%19,7'si yoğun bakım ünitesinde) yattığı, kalan hastaların poliklinik hastası olduğu ve tüm hastaların 338'inin (% 37,5) <18 yaş olduğu belirlenmiştir.

On altı aylık süreçte kan kültürlerinden toplam 929 adet mikroorganizma izole edilmiştir (Tablo 1). Gram pozitif bakteriler arasında, en yaygın patojenin *Staphylococcus aureus* (n=94), ikinci en sık izole edilen patojenin *Enterococcus spp* (n=30) olduğu gözlenmiştir. *S. aureus* izolatlarının % 38,3'ünün metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) olduğu ve bu grupta ampirik tedavi için en uygun antibiyotiklerin vankomisin, teikoplanin ve linezolid olduğu; metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) izolatlarında bu antibiyotiklere ilave olarak kotrimoksazol ve tetrasiklin seçeneklerinin olduğu bulunmuştur. Tüm *Enterococcus spp* izolatlarında vankomisin, teikoplanin ve linezolidin en uygun ampirik tedavi seçenekleri olduğu bulunmuştur. Tür düzeyinde incelendiğinde, *E.faecalis* izolatlarında ampisilin, vankomisin, teikoplanin, linezolid ve yüksek düzey gentamisinin ampirik tedaviye uygun olduğu bulunurken, *E.faecium* izolatlarında tek ampirik tedavi seçeneğinin linezolid olduğu belirlenmiştir (Tablo 2).

Gram negatif bakteriler arasında en sık izole edilen patojenin *Escherichia coli* (n=112) ve ikinci patojenin *Klebsiella pneumoniae* (n=67) olduğu saptanmıştır. Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) oluşturan *E. coli* izolatlarında sadece karbapenem

**Tablo 1.** Kan kültürlerinden izole edilen antibiyotikler ve oranları

Gram pozitif bakteriler	Sayı (n)	Oran (%)	Gram negatif bakteriler	Sayı (n)	Oran (%)
<i>Enterococcus</i> spp	30	4,5	<i>Escherichia coli</i>	112	43,2
<i>Enterococcus faecalis</i>	9		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	66	25,5
<i>Enterococcus faecium</i>	21		<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	1,1
<i>Staphylococcus aureus</i>	93	14	<i>Enterobacter</i> spp	15	5,8
Metisiline dirençli <i>S. aureus</i>	35	37,6	<i>Serratia marcescens</i>	9	3,5
Metisiline duyarlı <i>S. aureus</i>	58	62,4	<i>Salmonella</i> spp	2	0,8
Koagülaz negatif stafilokok	443	66,7	<i>Aeromonas</i> spp	1	0,4
Metisiline dirençli KNS	220		Gram negatif çomak	2	0,8
Metisiline duyarlı KNS	106		<i>Proteus mirabilis</i>	1	0,4
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	17	2,6	<i>Pseudomonas</i> spp	21	8,1
Viridans streptokok	12	1,8	<i>Acinetobacter</i> spp	11	4,2
<i>S. pyogenes</i>	1	0,15	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	0,4
<i>S. agalactiae</i>	1	0,15	Nonferm Gram neg çom	5	1,9
<i>Corynebacterium</i> spp	24	3,6	<i>Haemophilus influenzae</i>	1	0,4
<i>Leuconostoc</i> spp	1	0,15	<i>Brucella</i> spp	3	1,1
Alfa hemolitik streptokok	29	4,4	<i>Neisseria</i> spp	1	0,4
<i>Bacillus</i> spp	5	0,7	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	1	0,4
Beta hemolitik streptokok	5	0,7	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	1	0,4
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	0,15	<i>Burkholderia</i> spp	1	0,4
<i>Streptococcus gordonii</i>	1	0,15	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	1	0,4
<i>Dermaococcus</i> spp	1	0,15			
<b>Toplam</b>	<b>664</b>	<b>99,9</b>	<b>Toplam</b>	<b>259</b>	<b>100</b>
<b>Anaerop bakteriler</b>					
<i>Bacteroides fragilis</i> grubu	1				
<i>Prevotella</i> spp	1				
Anaerop Gram pozitif kok	1				
<b>Mantarlar</b>					
<i>Candida</i> spp	2				
<i>Rhizopus radiobacter</i>	1				
<b>Genel Toplam</b>	<b>929</b>				

**Tablo 2.** Gram pozitif koklarda antibiyotik duyarlılık yüzdeleri

Duyarlılık %	İzolot sayısı	PG	AMP	VA	TEC	E	CC	SXT	TE	LZD	GN 120
<i>Enterococcus</i> spp	30		63,3	90	90					100	83,3
<i>E. faecium</i> (%22 VRE)	9*		11,1	77,7	77,7					100	66,6
<i>E. faecalis</i> (%4,7 VRE)	21*		90,4	95,2	95,2					100	90,4
<i>Staphylococcus aureus</i>	94	15,9	-	100	100	60,6	70,2	91,5 (n=94)	85,1	100	-
Metisiline dirençli <i>S. aureus</i>	36	0	-	100	100	33,3	41,7	85,2 (n=27)	75,0	100	-
Metisiline duyarlı <i>S. aureus</i>	58	25,8	-	100	100	77,5	89,5	95,4 (n=44)	91,4	100	-

\*30'dan az sayıda izolat için hesaplama yapılmıştır.

grubu antibiyotikler ampirik tedavi için uygun bulunurken, GSBL oluşturmeyan Gram negatif çomaklarda karbapenemlere ek olarak 3. ve 4. kuşak sefalosporinler, aminoglikozidler ve piperasilin+tazobaktamın

ampirik tedavi için uygun antibiyotikler olduğu görülmüştür. GSBL pozitif *K. pneumoniae* için ampirik tedavi seçeneği olmadığı ve bu izolatlarda karbapenem direncinin %50'ye ulaştığı; GSBL negatif izolatlarda

3. ve 4. kuşak sefalosporinler, karbapenemler, aminoglikozidler ve siprofloksasinin ampirik tedavi için uygun olduğu bulunmuştur (Tablo 3).

## TARTIŞMA

Sepsis, enfeksiyonların neden olduğu, fizyolojik, patolojik ve biyokimyasal anormalliklerin söz konusu olduğu bir sendrom olup dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunudur. Son yapılan tanımlamaya göre sepsis, enfeksiyona düzensiz konak cevabından kaynaklanan hayatı tehdit eden organ işlev bozukluğu olarak; septik şok ise mortaliteyi önemli ölçüde arttıran dolaşım ve hücrel/metabolik anomalilerin olduğu sepsisin bir alt grubu olarak tanımlanmaktadır (5). Ciddi klinik durumlarda hastaya en kısa sürede uygun antimikrobiyal tedavinin başlanmasının yaşamsal önem taşıdığı; septik şok hastalarının %20'sinde uygun olmayan başlangıç tedavisi uygulandığı ve bu hastaların sağ kalımında beş kat azalma gözlemlendiği; uygun antimikrobiyal seçiminin, etkili antimikrobiyalın hızla başlanmasını etkileyen önemli faktörlerden biri olduğu vurgulanmıştır (6). Bu nedenle, sepsis/septik şok hastalarında kümülatif antibiyogram verilerine uygun ampirik tedavi başlanması hayat kurtarıcı olacaktır.

Bu çalışmada, laboratuvarımıza gönderilen kan kültürlerinden izole edilen Gram pozitif bakterilerden *S. aureus* ve *Enterococcus spp*, Gram negatif bakterilerden *E. coli* ve *K. pneumoniae* için kümülatif antibiyogram raporu hazırlanmıştır. Diğer *Enterobacteriales* ailesi üyeleri ile nonfermentatif bakterilerden *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* suşlarının izolat sayısı <30 olduğu için değerlendirilmeye alınmamıştır (Tablo 1). Çoklu ilaç direnci, “üç veya daha fazla antibiyotik grubunun her birinde en az bir ajana dirençli olan mikroorganizmalar” olarak tanımlanmış olup (7), bu çalışmada 3. kuşak sefalosporinlere, aminoglikozidlere ve florokinolonlara dirençli bakteriler çoğul dirençli olarak belirlenmiştir.

**Staphylococcus aureus:** *Staphylococcus aureus* (n=94) izolatlarının % 38,3'ünün metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) olduğu, bu grupta ampirik tedavi için en uygun antibiyotiklerin vankomisin, teikoplanin ve linezolid olduğu; metisiline duyarlı *S. aureus*

Tablo 3. Gram negatif çomaklarda antibiyotik duyarlılık yüzdeleri

Duyarlılık %	İzolat (n)	AMP	SAM	AMC	KZ	CXM	FOX	CTX	CAZ	FEP	IPM	MEM	ERT	GN	TOB	AK	SXT	CIP	LEV	TZP
<i>E. coli</i>	112	25	57,1	58,03	38,4	39,3	85,7	54,5	58,3 (n=96)	60,7	96,4	97,3	96,4	75,9	76,8	83,03	47,7 (n=88)	69,6		89,3
<i>E. coli</i> GSBL pozitif (% 5,8 TID**)	51	0	27,4	27,4	0	0	78,4	0	0	17,6	94,1	94,1	94,1	52,9	54,9	64,7	40,5 (n=42)	54,9		84,3
<i>E. coli</i> GSBL negatif	61	40,9	81,9	83,6	70,5	70,5	95,1	100	96,1 (n=51)	100	100	100	100	90,2	93,4	98,4	57,4 (n=47)	83,6		96,7
<i>K. pneumoniae</i>	66	0	30,3	27,3	25,8	22,7	69,7	36,4	38,5 (n=52)	42,4	65,2	65,2	59,1	60,1	59,1	68,2	32,6 (n=46)	54,5		53,0
<i>K. pneumoniae</i> GSBL pozitif (% 26,2 TID**)	42	0	0	0	0	0	57,1	0	0	9,5	50	50	38,1	40,5	38,1	50	15,6 (n=32)	33,3		40,5
<i>K. pneumoniae</i> GSBL negatif	24	0	70,8	62,5	66,7	66,7	100	100	100	100	91,7	91,7	95,8	95,8	95,8	100	71,4(n=14*)	91,7		75

\*30'dan az sayıda izolat için hesaplama yapılmıştır.\*\* Tüm ilaçlara dirençli organizma

(MSSA) izolatlarında ise bu antibiyotiklere ilave olarak kotrimoksazol ve tetrasiklinin ampirik tedaviye uygun olduğu bulunmuştur. Vankomisine dirençli (VRSA) veya orta dirençli (VISA) *S. aureus* izolatına rastlanmamıştır (Tablo 2). Ülkemizde yapılan benzer çalışmalara bakıldığında, Şafak ve ark, 2010-2015 yılları arasında 11559 kan kültüründen izole edilen *S. aureus* izolatlarındaki MRSA oranını bizim verimizden çok daha yüksek (%63,6) olarak bildirmişlerdir (8). Avrupa antimikrobiyal direnç sürveyans ağı (EARS-NET)'in 2003-2008 yılları arası raporlarına göre Türkiye'deki MRSA oranları sırasıyla %43, %40, %35, %36, %34, %38 olarak bildirilmiştir (9). Ancak zamanla ülkemizde MRSA oranlarının düşüş gösterdiği bildirilmiş, Ulusal Antibiyotik Direnç Sürveyans Sistemi (UAMDSS) 2016 yılı verilerine göre MRSA oranı % 23,6 olarak belirlenmiştir (10,11). Yurt dışındaki sürveyans çalışmalarına bakıldığında, EARS-NET 2017 yıllık raporunda, ortalama invazif MRSA oranı %16,9 (%1-44) olarak belirtilmiş ve 2014-2017 yılları arasındaki oranlara göre anlamlı oranda düşüş gösterdiği belirtilmiştir (12). Bizim çalışmamızdaki MRSA oranının (%38,3) Türkiye geneli ve Avrupa ülkeleri ortalamasından yüksek olduğu görülmektedir. Buna karşılık, Uzakdoğu ülkelerinden Hindistan'da yapılan direnç sürveyans çalışmasında MRSA izolatlarının oranı ülkemizden ve Avrupa ülkelerinden daha yüksek (% 40) olarak bulunmuş, ayrıca *S. aureus* izolatları arasında %5,8 VISA ve %6,9 hVISA izolatı olduğu bildirilmiştir (13).

**Enterococcus spp:** Kan kültürlerinden izole edilen Gram pozitif bakteriler arasında *Enterococcus spp* (n=30) izolatlarından %70'inin *Enterococcus faecalis* olduğu bulunmuştur. *E. faecalis* izolatlarında ampisilin, glikopeptidler, linezolid ve yüksek düzey gentamisin ampirik tedaviye uygun olduğu, tüm enterokoklar birlikte değerlendirildiğinde ise sadece glikopeptidler ve linezolidin ampirik tedavi seçeneği olabileceği bulunmuştur. İki (% 22) *Enterococcus faecium* ve bir (%4,7) *E. faecalis* izolatının vankomisine dirençli (VRE) olduğu belirlenmiştir. Vankomisine dirençli *E. faecium* izolatlarında sadece linezolidin ampirik tedaviye uygun olduğu görülmektedir (Tablo 2). Ancak *E. faecium* ve *E. faecalis*

izolatlarının izolat sayısı <30 olduğundan duyarlılık oranlarının istatistiksel olarak düşük %95 güven aralığına sahip olduğu dikkate alınmalıdır. Örneğin *E. faecium* izolatlarında vankomisin duyarlılık oranı (%77) için %95 güven aralığı %39-90 ve %48-95 arasındadır (4). Ülkemizde kan kültüründen izole edilen mikroorganizmalarla yapılan çalışmalara bakıldığında, Er ve ark, *E. faecium* için %4,3 oranında vankomisin direnci bildirmişlerdir (14). İstanbul'daki bir devlet hastanesinde yapılan kümülatif antibiyogram çalışmasında Adaleti ve ark, kan kültürlerinden izole edilen *E. faecium* izolatlarında bizimkinden daha düşük (%9,5) VRE oranı bulduklarını bildirmişlerdir (15). Şafak ve ark, 2010-2015 yılları arasında kan kültürlerinden izole edilen toplam 11559 kan izolatının duyarlılık verilerini paylaştıkları araştırmada *E. faecalis* izolatlarında vankomisin direncine rastlanmadığını, *E. faecium* izolatlarında bizim verimizden daha düşük (% 9,4) oranda VRE bulunduğunu bildirmişlerdir (8). Önemli hastane enfeksiyonu etkenleri olduğu bilinen *E. faecalis* ve *E. faecium*'un ampisiline dirençli suşlarının tedavisinde kullanılabilecek seçenekler olmaları nedeniyle, bu suşların glikopeptidlere ve yüksek düzey aminoglikozidlere duyarlı olmaları önemlidir. Ülkemizdeki sürveyans sistemi olan UAMDSS 2016 verilerine göre ampisilin, vankomisin ve yüksek düzey aminoglikozid duyarlılık oranları *E. faecalis* izolatlarında sırasıyla %94; %98,7 ve %43; *E. faecium* izolatlarında ise %8,4; %84 ve %38 olarak bildirilmiştir (11). Bu çalışmada ise aynı antibiyotikler için duyarlılık oranları *E. faecalis* izolatlarında sırasıyla %90,4; %95,2 ve %90,4; *E. faecium* izolatlarında ise %11; %77,7 ve % 66,6 olarak bulunmuştur. EARS-NET 2017 yıllık raporunda *E. faecium* izolatlarında %14,9 VRE oranı bildirilmiş, *E. faecalis* izolatlarında ise VRE oranlarının birçok ülkede çok düşük (%0-5) olduğu belirtilmiştir. Avrupa ülkelerinde *E. faecalis* izolatlarında yüksek düzey gentamisin direnci ortalama %30 iken bizim çalışmamızda %9,6 oranında bulunması, dikkat çekici bir sonuç olarak karşımıza çıkmaktadır (12). Hastanemizde özellikle kan kültürlerinden VRE izole edilmesi durumunda Hastane Enfeksiyonu Kontrol Komitesi sözlü ve yazılı olarak bilgilendirilmekte ve



gerekli önlemlerin alınması sağlanmaktadır. Bu uygulamanın VRE oranlarının düşmesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir.

**Escherichia coli:** Kan kültürlerinden izole edilen Gram negatif bakteriler arasında genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) oluşturan *E. coli* izolatlarında (n=51, %45,5) sadece karbapenem grubu antibiyotikler ampirik tedavi için uygun bulunurken, GSBL oluşturmeyen grupta (n=61, %54,5) karbapenemlere ek olarak 3. ve 4. kuşak sefalosporinler, aminoglikozidler ve piperasilin+tazobaktamın ampirik tedavi için uygun antibiyotikler olduğu bulunmuştur. GSBL pozitif *E. coli* izolatlarının %5,8'inin tüm antibiyotiklere dirençli olduğu belirlenmiştir. Yurt içinde yapılan benzer çalışmalar incelendiğinde, Kılınç ve ark, 1646 kan izolatu ile yaptıkları çalışmada, kan kültürlerinden izole edilen *E. coli* izolatlarında seftazidim duyarlılığını %27, gentamisin duyarlılığını %63 ve kinolon duyarlılığını %36 olarak bulmuşlardır. *E. coli* izolatlarına ait bu sonuçların, bizim verilerimize göre daha düşük (sırasıyla %58, %76, %70) duyarlılığa sahip olduğu bulunmuştur. Araştırmacılar ayrıca *E. coli* izolatlarında %8 oranında imipenem direnci (bu çalışmada %3,6) olduğunu belirtmişlerdir (16). Şafak ve ark, 2010-2015 yılları arasında kan kültürlerinden izole edilen toplam 11559 kan izolatu duyarlılık verilerini paylaştıkları çalışmada *E. coli* izolatlarının %49'unun GSBL oluşturduğunu bildirmiş, gentamisin, amikasin, siprofloksasin ve piperasilin+tazobaktam duyarlılığını sırasıyla %68,6, %97,5, %58,9 ve %88 olarak bulmuşlar ve karbapenem direncine rastlamadıklarını belirtmişlerdir (8). Bu sonuçlar arasında gentamisin ve piperasilin+tazobaktam duyarlılığının bizim verilerimizle benzerlik gösterdiği (sırasıyla, %76, %89), amikasin duyarlılığımızın düşük (%83) ve siprofloksasin duyarlılığımızın daha yüksek (%69,6) olduğu görülmektedir. Ülkemiz UAMDS 2016 verilerine göre invazif *E. coli* izolatlarında ampisiline %21,5, seftotaksime %47,9, gentamisine %70,7, amikasinine %91,3, siprofloksasine %45,5 ve imipeneme %95; Avrupa Birliği ülkelerinde ise 3.kuşak sefalosporinlere %85,1; aminoglikozidlere %88,6; florokinolonlara %74,3 ve karbapenemlere %92,8 ortalama duyarlılık oranları verilmiştir (11,12).

Bizim çalışmamızda elde edilen duyarlılık oranları ampisilin için %25, seftotaksim için %54,5, gentamisin için %75,9, amikasin için %83, siprofloksasin için %69,6 ve imipenem için %96,4 olarak bulunmuştur. Sonuçlarımızın Avrupa ülkeleri ortalamasına (%87,8) göre daha düşük olan GSBL oranımız (%45,5) hariç tutulduğunda, yurt içi ve Avrupa ülkeleri verileri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada kan kültürlerinden izole edilen *E. coli* izolatları için belirtilen %57 seftazidim, %60 sefepim, %95,3 imipenem, %72 gentamisin duyarlılıkları hastanemiz verilerine (sırasıyla, %58, %60,7, %96,4, %76) benzemekle beraber, bizim çalışmamızdan (%69,6 ve %89,3) daha düşük siprofloksasin ve piperasilin+tazobaktam (sırasıyla %52,3 ve %76,2) ve daha yüksek amikasin (%96,2) duyarlılığı bildirmişlerdir. Bu çalışmadaki %46,7 GSBL pozitif *E. coli* oranı bizim çalışmamızdaki oran (%45,5) ile benzerlik göstermektedir (16). EARS-NET yıllık raporunda, Avrupa'da kan akımı enfeksiyonlarının en yaygın etkeninin bizim sonuçlarımıza ve ülkemizdeki pek çok çalışmaya benzer şekilde *E. coli* olduğu belirtilmiştir. Ayrıca 2017 yılında Avrupa Birliği ülkelerinde invazif *E. coli* izolatlarında karbapenem direncinin nadir olduğu, sadece Yunanistan'da %1-5 oranında iken diğer Avrupa ülkelerinde <%1 olduğuna dikkat çekilmiştir (12). Çalışmamızdaki *E. coli* izolatlarında karbapenem direnç oranı %3,6 ve GSBL pozitif izolatlarda %5,4 olup Yunanistan'daki direnç oranları ile benzerlik göstermektedir. İlave olarak GSBL pozitif *E. coli* izolatlarımızın %5,8'inin tüm antibiyotiklere dirençli olduğu bulunmuştur.

**Klebsiella pneumoniae:** Çalışmamızda GSBL pozitif *K. pneumoniae* izolatları için ampirik tedavi seçeneği olmadığı bulunmuş, bu izolatların %28,8'inin çok ilaca dirençli ve %26,2'sinin tüm antibiyotiklere dirençli olduğu belirlenmiştir. GSBL negatif *K. pneumoniae* izolatlarında ise seftotaksim, sefepim, karbapenemler, gentamisin, tobramisin ve siprofloksasinin ampirik tedavi için uygun olduğu bulunmuştur (Tablo 2). Kılınç ve ark, 1646 kan izolatu ile yaptıkları çalışmada, kan kültürlerinden izole edilen *K. pneumoniae* izolatlarında %17 seftazidim, %48 gentamisin, %60 kinolon duyarlılığı bildirmişlerdir. Seftazidim ve

gentamisin sonuçları bizim sonuçlarımıza (sırasıyla %38,5, %60) göre düşük, kinolon duyarlılığı ise benzer (%54,5) olarak bulunmuştur. Araştırmacılar ayrıca *K. pneumoniae* izolatlarında oldukça düşük (% 3,6) oranda imipenem direnci (bu çalışmada %35) olduğunu belirtmişlerdir (16). Şafak ve ark, 2010-2015 yılları arasında kan kültürlerinden izole edilen toplam 11559 kan izolatının duyarlılık verilerini paylaştıkları araştırmada *K. pneumoniae* izolatlarının %69,9'unun (bu çalışmada %63,6) GSBL oluşturduğunu bildirmiş, gentamisin, amikasin, siprofloksasin ve piperasilin+tazobaktam duyarlılığını sırasıyla %60,5, %84,5, %68 ve %48,5 olarak bulmuşlar ve %41 karbapenem direncine rastladıklarını belirtmişlerdir (8). Bu sonuçlar arasında gentamisin ve piperasilin+tazobaktam duyarlılığının bizim verilerimizle (sırasıyla, %60,1 ve %53) benzerlik gösterdiği, amikasin ve siprofloksasin duyarlılığının bizim verilerimize (sırasıyla %68 ve %54,5) oranla daha düşük olduğu görülmektedir. Ayrıca bizim çalışmamızda nispeten daha düşük (%34,8) imipenem direnci bulunmuştur. Coşkun ve ark'nın çalışmasında 621 kan izolatından izole edilen *K. pneumoniae* izolatlarında seftazidim, imipenem, gentamisin, siprofloksasin ve piperasilin+tazobaktam duyarlılıkları sırasıyla %34,2, %68,5, %56,2, %64,4, %50 olarak bildirilmiş, izolatların bizim GSBL oranımıza (%63,6) göre daha düşük (%35,6) oranda olduğu belirtilmiştir (17). Coşkun ve ark'nın sonuçları bizim verilerimizle amikasin ve siprofloksasin dışında (ikiisi de daha duyarlı, %90,4 ve %64,4) benzerlik göstermektedir. Ülkemizde UAMDSS 2016 verilerine göre invazif *K. pneumoniae* izolatlarında sefotaksime %31,5, gentamisine %50,8, amikasine %70, siprofloksasine %37,3 ve karbapenemlere %60; Avrupa Birliği ülkelerinde ise 3.kuşak sefalosporinlere %68,8; aminoglikozidlere %75,9; florokinolonlara %68,5 ve karbapenemlere %92,8 ortalama duyarlılık oranları verilmiştir (11,12). Bizim çalışmamızda sefotaksim için duyarlılık oranı %36,4, gentamisin için %60,1, amikasin için %68,2, siprofloksasin için %54,9 ve imipenem için %65,2 olarak bulunmuştur. Sonuçlarımızın ülke geneli ile uyumlu, Avrupa ülkeleri ortalamasına göre daha düşük olduğu görülmektedir. Avrupa ülkelerinde GSBL pozitif *K. pneumoniae* izolatlarının

oranı ortalama %87,8 iken bu çalışmada daha düşük olarak (%63,6) bulunmuştur. UAMDSS 2016 verilerinde invazif *K. pneumoniae* izolatlarının çoklu ilaç direnci %46 olarak bildirilmiş, bizim çalışmamızda bu oran daha düşük (% 28,8) olarak bulunmuştur. Çalışmamızda *K. pneumoniae* izolatlarında gözlenen %28,8 çoklu ilaç direnci, %34,8 karbapenem direnci ve %26,2 oranındaki tüm ilaçlara direncin oldukça önemli olduğu düşünülmektedir. Son yıllarda Gram negatif bakterilerde karbapenemleri de kapsayan yüksek direnç oranları nedeniyle özellikle yoğun bakım ünitelerinde mortalite oranları ile hastanede yatış sürelerinde ve maliyetlerde artışlar ortaya çıkmaktadır (18). Çoğul dirençli ve tüm antibiyotiklere dirençli izolatlarda tek seçenek kolistin gibi görünmektedir. Ancak kolistin molekülünün yapısının büyük olmasından dolayı agara zayıf difüzyonu nedeniyle duyarlılık deneylerinin sadece sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle yapılması gerektiği uluslararası rehberler tarafından bildirilmiştir (19-22). Ayrıca bazı ticari otomatik identifikasyon sistem firmaları da kolistin duyarlılık sonuçlarının güvenilir olmadığını bildirmişlerdir (23). Ancak sıvı mikrodilüsyon yöntemi birçok laboratuvarında olduğu gibi laboratuvarımızda da rutin olarak uygulanmadığından, kümülatif antibiyogram sonuçlarımızda kolistin duyarlılık sonuçları yer almamaktadır. Laboratuvarımızda pratik ve rutin olarak uygulanabilen bir mikrodilüsyon yöntemi olan disk elüsyon yöntemi (24) ile kolistin duyarlılığı saptama için çalışmalara başlanmış bulunmaktadır. Ayrıca çoklu ilaç direnci ve karbapenem direncinin belirlenmesi ve gerekli önlemlerin alınabilmesi için önümüzdeki dönemlerde en az bir yıllık olmak üzere rutin kümülatif antibiyogram raporlarının hazırlanarak önceki yılların sonuçlarıyla karşılaştırılması planlanmaktadır.

## SONUÇ

Özellikle GSBL pozitif *K. pneumoniae* izolatlarında direnç sorununun arttığı ve ampirik tedavi seçeneğinin olmadığı gözlenmiştir. Tüm ilaçlara dirençli izolatlarda kolistin kullanımının uygulamaya konabilmesi için, rutin kullanıma uygun kolistin direnci saptama yöntemleri üzerinde çalışılması ge-

rekmedir. Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerdeki yüksek direnç oranlarının azaltılabilmesi için, düzenli sürveyans takibinin yapılması ile birlikte Enfeksiyon Kontrol Komitesi çalışmalarının (el yıkama yöntemleri, temas izolasyon önlemleri, sağlık personelinin eğitimi vb) sürdürülmesi gerekmektedir. Ayrıca karbapenemleri de kapsayan çoğul dirençli organizmalar için yeni antibiyotik ve kombinasyonlarının etkinliğini test eden çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Peer Review:** Externally peer-reviewed.

**Yazar Katkıları:** Çalışma Konsepti/Tasarım- L.Ö.; Veri Toplama- L.Ö.; Veri Analizi/Yorumlama- L.Ö.; Yazı Taslağı- L.Ö.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- L.Ö., Z.A.; Son Onay ve Sorumluluk- L.Ö.; Malzeme ve Teknik Destek- L.Ö. Z.A.; Süpervizyon- L.Ö., Z.A.

**Author Contributions:** Conception/Design of Study- L.Ö.; Data Acquisition- L.Ö.; Data Analysis/ Interpretation- L.Ö.; Drafting Manuscript- L.Ö. Z.A.; Critical Revision of Manuscript- L.Ö.; Final Approval and Accountability- L.Ö.; Technical or Material Support- L.Ö. Z.A.; Supervision- L.Ö., Z.A.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir

**Conflict of Interest:** Authors declared no conflict of interest.

**Finansal Destek:** Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

**Financial Disclosure:** Authors declared no financial support.

**Teşekkür:** Mikrobiyoloji alanında yetişmemde büyük emeği geçen sayın Prof. Dr. Nezahat GÜRLER'e, verilerin bir kısmının derlenmesinde destek veren Yüksek Lisans öğrencisi Rama Al Hamwi'ye ve tüm laboratuvar çalışanlarımıza teşekkür ederiz.

**Acknowledgement:** We would like to thank to Prof. Dr. Nezahat Gürler, who contributed greatly to me in the area of medical microbiology, thank to graduate student Rama Al Hamwi, who compiling some data, and all our laboratory staff.

## KAYNAKLAR/REFERENCES

1. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Analysis and Presentation of Cumulative Antimicrobial Susceptibility Test Data; Approved Guideline—Fourth Edition. CLSI document M39-A4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014. Available from: URL: <http://www.standard@clsi.org>
2. Kohlmann R, Gatermann SG. Analysis and Presentation of Cumulative Antimicrobial Susceptibility Test Data- The Influence of Different Parameters in a Routine Clinical Microbiology Laboratory. PLoS ONE. 2016;11(1):e0147965. doi:10.1371/journal.pone.0147965
3. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017. Available from: URL: <http://www.clsi.org>
4. Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanları için Antibiyotik Duyarlılık verilerinin analizi ve sunumu rehberi. KLİMUD Kaynak No: 15, Ankara, Mayıs 2019. Available from: URL: <https://www.klimud.org/content/44/rehberler>
5. Singer M, Deutschman C, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3) JAMA. 2016; 315(8): 801-10. doi:10.1001/jama.2016.0287
6. Kumar A, Ellis P, Arabi Y, Roberts D, Light B, Parrillo JE, et al. Initiation of Inappropriate Antimicrobial Therapy Results in a Fivefold Reduction of Survival in Human Septic Shock. CHEST. 2009; 136: 1237-1248. DOI: 10.1378/chest.09-0087
7. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect 2012;18:268-81.
8. Şafak B, Kılınç O. 2010-2015 yılları arasında kan kültürlerinde üreyen mikroorganizmalar

- ve antibiyotik duyarlılıkları. KLİMİK Dergisi. 2016;29(2):60-4. DOI: 10.5152/kd.2016.15
9. EARSS Annual Report 2008 On-going surveillance of *S.pneumoniae*, *S.aureus*, *E.coli*, *E.faecium*, *E.faecalis*, *K.pneumoniae*, *Paeruginosa* Available from: URL: [http:// www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/Documents/2008\\_EARSS\\_Annual\\_Report.pdf](http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/Documents/2008_EARSS_Annual_Report.pdf)).
  10. Telli M, Okulu Y, Pat Y. Staphylococcus aureus suşlarında metisiline direnç oranındaki değişim: Metisiline direnç azalıyor mu? ANKEM Derg. 2018;32(3):103-8. doi: 10.5222/ankem.2018.1816
  11. Ulusal Antibiyotik Direnç Sürveyans Sistemi (UAMDSS) 2016 yıllık raporu. Available from: URL: [https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Mikrobiyoloji\\_Referans\\_Laboratuvarlari\\_ve\\_Biyolojik\\_Urunler\\_DB/uamdss/yillik\\_raporlar/UAMDSS\\_2016\\_Rapor.pdf](https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Mikrobiyoloji_Referans_Laboratuvarlari_ve_Biyolojik_Urunler_DB/uamdss/yillik_raporlar/UAMDSS_2016_Rapor.pdf)
  12. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2017. Available from: URL: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/EARS-Net-report-2017-update-jan-2019.pdf>
  13. Veeraghavan B, Walia K. Antimicrobial susceptibility profile & resistance mechanisms of Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) priority pathogens from India. Indian J Med Res. 2019;149(2): 87-96. DOI: 10.4103/ijmr.IJMR\_214\_18
  14. Er H, Aşık G, Yoldaş Ö, Demir C, Keşli R. Kan kültürlerinde izole edilerek tanımlanan mikroorganizmaların ve antibiyotik direnç oranlarının belirlenmesi. Türk Mikrobiyol Cem Derg. 2015;45(1):48-54. doi:10.5222/TMCD.2015.048
  15. Adaleti R, Kansak N, Aslan M, Aksaray S. Cumulative Antibiogram Test Results of Isolated Microorganisms from Blood Culture Samples at Haydarpaşa Numune Training and Research Hospital. Haydarpaşa Numune Med J. 2019;59(3):HNHJ-43650 [Epub ahead of print]: HNHJ-43650 | DOI: 10.14744/hnhj.2019.43650.
  16. Kılınç Ç, Güçkan R, Kahveci M, Kayhan Y, Pirhan Y, Özalp T. Kan kültürlerinde üreyen Gram negatif izolatların dağılımı ve antibiyotik direnç profilleri. Int J Basic Clin Med. 2015;3(3):125-30.
  17. Coşkun USŞ. Kan kültürlerinde üreyen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. ANKEM Derg. 2018;32(2):45-52. doi: 10.5222/ankem.2018.045
  18. Shorr AF. Review of studies of the impact on Gram-negative bacterial resistance on outcomes in the intensive care unit. Crit Care Med. 2009; 37(4):1463-9. DOI: 10.1097/CCM.0b013e31819ced02
  19. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST warnings concerning antimicrobial susceptibility testing products or procedures. Available from: URL: [http://www.eucast.org/ast\\_of\\_bacteria/warnings/](http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/warnings/) (Alıntılanma tarihi 19.08.2019)
  20. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST): European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 8.1. 2018. Available from: URL: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_9.0\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_9.0_Breakpoint_Tables.pdf) (Alıntılanma tarihi 19.08.2019)
  21. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). CLSI Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing, CLSI AST News Update. 2016;1(2):1-9. <https://clsi.org/media/1700/clsi-news-winter-2016.pdf> (Alıntılanma tarihi 19.08.2019)
  22. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) as recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. Vaxjo: EUCAST; 2016. Available from: URL: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/General\\_documents/Recommendations\\_for\\_MIC\\_determination\\_of\\_colistin\\_March\\_2016.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Recommendations_for_MIC_determination_of_colistin_March_2016.pdf). (Alıntılanma tarihi 19.08.2019)
  23. Beckton Dickinson. Urgent Field Safety Notice. January 15, 2018. Available from: URL:



<https://laegemiddelstyrelsen.dk/da/udstyr/sikkerhedsmeddelelser/2018/01/bd-phoenix-gram-negative-panels-containing-colistin/~edia/28798D06546141A9B603E3802DE887AF.ashx> (Alıntılanma tarihi 19.08.2019)

24. Simner PJ, Bergman Y, Trejo M, Roberts AA, Marayan R, Tekle T, et al. Two-site evaluation of

the colistin broth disk elution test to determine colistin *in vitro* activity against Gram-negative bacilli. J Clin Microb. 2019;57(2):e01163-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.01163-18>. (Alıntılanma tarihi 19.08.2019)

## Hücre Serilerinde Kilitli Nükleik Asitler İle *MIR223* Gen Sessizleştirilmesi

### *MIR223* Gene Silencing via Locked Nucleic Acids in Cell Lines

Orçun Taşar<sup>1,2</sup> , Müge Sayitoğlu<sup>2</sup> , Özden Hatırnaz Ng<sup>2,3</sup> 

#### ÖZ

**Amaç:** Kodlama yapmayan küçük RNA'lar hücre farklılaşması, büyümesi, gelişmesi, immün reaksiyonlar, stres adaptasyonu gibi fizyolojik süreçlerin yanı sıra, kanser, kalp hastalıkları gibi kompleks hastalıklarla da ilişkilendirilmiştir. *MIR223*, hematopoetik sisteme özgü bir miRNA'dır. T-hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi (T-ALL) patogenezinde katkıda bulunan miRNA'lar arasında yüksek anlatıma sahip olduğu ve onkomiir olarak aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada *MIR223* geninin T-ALL hücre serilerinde alternatif bir yaklaşım olarak özgün kilitli nükleik asit (KNA) kullanılarak baskılanması ve gen sessizleştirme etkinliğinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Kültüre edilen T-ALL hücre serilerine (Jurkat ve Molt4), 24 ve 48 saatlik sürelerde, 100 ve 150pmol konsantrasyonda *MIR223*'e özgü KNA uygulanmıştır. Her iki zaman aralığında RNA izolasyonu sonrası, stem loop polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile cDNA sentezlenerek, kantitatif gerçek zamanlı PZR (QRT-PZR) ile miRNA anlatım düzeyleri belirlenmiştir.

**Bulgular:** Her iki hücre serisinde de 24. saatte, 150pmol KNA, sadece transfeksiyon ajanı uygulanmış (Mock) hücrelerle karşılaştırıldığında *MIR223* düzeyinin yüksek oranda baskılandığı gözlenmiştir (Jurkat %73,  $p=0,001$  ve Molt4%80  $p=0,04$ ). Molt 4 hücre serisinde anlamlı düzeyde baskılanma 48. saatte devam etse de ( $p=0,005$ ), Jurkat hücre serisinde 48. saatteki baskılanma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

**Sonuç:** *MIR223* onkogenik etki gösteren bir miRNA olarak tanımlanmıştır ve antisense oligolar ile *MIR223* geninin sessizleştirilmesi T-ALL gibi artmış *MIR223* anlatımı gösteren kanserlerde hastalığın seyrini ve tedavi alternatiflerini araştırma imkanı sağlamaktadır. Bu çalışmada T-ALL hücrelerinde alternatif bir RNA interferans (sessizleştirme) uygulaması olarak KNA kullanılmıştır ve bu moleküllerin çok etkin ancak kısa süreli olarak kullanılabileceği görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** T-ALL, *MIR223*, kilitli nükleik asitler (KNA), gen sessizleştirilmesi

#### ABSTRACT

**Objective:** Noncoding small RNAs play roles in physiological processes such as cell differentiation, growth, development, immune reactions, stress adaptation as well as complex diseases such as cancer and heart diseases. *MIR223* is a specific miRNA to the hematopoietic system. Among the miRNAs associated with the pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL), *MIR223* was shown to have the highest expression level and functions as an oncomir. In this study we aimed to suppress *MIR223* gene expression by using locked nucleic acid (LNA) in T-ALL cell lines as an alternative gene silencing technique and to show the silencing efficacy.

**Material and Methods:** T-ALL cell lines (Jurkat and Molt4) were cultured and *MIR223* specific LNA was applied in 100pmol and 150pmol concentrations for 24 hours and 48 hours. RNA was isolated from cells at both time points, followed by a stem loop polymerase chain reaction (PCR) for cDNA synthesis and the miRNA expression levels were evaluated by quantitative real time PCR.

**Results:** In both cell lines a 150pmol application of LNA was compared to mock cells and the *MIR223* expression was already suppressed at 24hours (73% in Jurkat ( $p=0,001$ ) and 80% in Molt4 ( $p=0,04$ )). The suppression was continued at 48 hours in Molt4 cell line ( $p=0,005$ ) where as there was no statistical significant difference in Jurkat at 48 hours.

**Conclusion:** *MIR223* has been identified as an oncomir and silencing the *MIR223* with synthetic antisense oligos provide the opportunity to investigate the course and alternative therapy options of cancers with increased *MIR223* expression, such as T-ALL. In this study LNA was used as an alternative RNA interference application in T-ALL cells and showed that LNA can effectively suppress gene expression when used in the short term.

**Keywords:** T-ALL, *MIR223*, locked nucleic acid (LNA), Gene silencing

<sup>1</sup> İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup> İstanbul Üniversitesi, Aziz Sançar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

<sup>3</sup> Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ORCID: O.T. 0000-0002-1504-4669;  
M.S. 0000-0002-8648-213X;  
Ö.H.N. 0000-0001-7728-6527

**Sorumlu yazar/Corresponding author:**  
Özden Hatırnaz Ng,  
Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı,  
İstanbul, Türkiye  
E-posta: ozden.hatirnaz@acibadem.edu.tr

**Başvuru/Submitted:** 18.02.2020  
**Kabul/Accepted:** 23.06.2020

**Atf/Citation:** Taşar O, Sayitoğlu M, Hatırnaz Ng O.  
*MIR223* Gene Silencing via Locked Nucleic Acids  
in Cell Lines. Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar  
Dergisi 2020; 3(2): 45-50.  
<https://doi.org/10.26650/JARHS2020-739221>

## GİRİŞ

RNA interferans (RNAi), mRNA düzeyinde gen anlatımının susturulmasını ifade eder. RNAi, genlerin anlatımlarını durdurabilme ve bunun sonucunda meydana gelen fenotipik değişimleri gözlemleyebilme imkanını vermektedir. Bu yöntem ilk defa *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) modelinde bazı genlerin küçük RNA'lar aracılığıyla susturulmasında denenmiştir (1). RNAi yaklaşımında farklı kodlama yapmayan küçük RNA'lar (miRNA, siRNA, piRNA, rasiRNA, shRNA, scnRNA) kullanılmaktadır. Kodlama yapmayan RNA'lar içerisinde en büyük grubu endojen kökenli miRNA ya da genellikle ekzojen kökenli siRNA'lar oluşturmaktadır (2-4).

MikroRNAlar (miRNA) 17-25 nükleotid uzunluğunda, genomun kodlanmayan bölgesinde yer alan düzenleyici küçük RNA molekülleridir. miRNA'lar post transkripsiyonel aşamada hedef mRNA'ların 3' translasyona uğramayan bölgelerinde (untranslated region, UTR) bulunan, kendilerine komplementer olan dizilere bağlanarak gen anlatımını baskılar. miRNA'ların ilk keşfinden bu yana ökaryotlarda yüzlerce daha tanımlanmış ve hücre farklılaşması, büyümesi, gelişmesi, immün reaksiyonlar, stres adaptasyonu gibi fizyolojik; kanser, kalp hastalıkları gibi patofizyolojik olaylarla ilişkilendirilmişlerdir (5).

*MIR223*, bioinformatik tahmin araçları ile tespit edilmiş, hematopoetik sisteme özgü bir miRNA'dır (6). Yapılan araştırmalarda lösemi, pankreas, kolorektal, meme, mide, over gibi kanser çeşitleri ve lupus eritematozus, romatoid artrit, glioblastoma, kronik astım, tip 2 diyabet gibi hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (7, 8). Ayrıca *MIR223*'ün hücre döngüsü, tümör yayılımı, hematopoetik farklılaşma ve hücrelerin immün fonksiyonlarında da rol aldığı saptanmıştır (9).

*MIR223*'ün, T-Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi (T-ALL) patogenezine katkıda bulunan miRNA'lar arasında en yüksek anlatıma sahip olduğu ve onkormir olarak aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (10).

mirRNA'ların hedeflenerek baskılanması, son yıllarda gündemde olan ve farklı kanser türlerinde de uygulanan bir tedavi yöntemidir. Bu çalışmada T-ALL'de yüksek anlatımı gösterilmiş *MIR223*'ün, T-ALL hücre serilerinde kilitli nükleik asitler (KNA) kullanılarak baskılanması gerçekleştirilmiş ve gen sessizleştirmesinin etkinliği değerlendirilmiştir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Hücre Kültürü

Çalışmada T-ALL hücre hatları Jurkat ve Molt4 kullanılmıştır. Hücreler, içinde çoğalacakları %10 FBS (Fetal Bovine Serum) ile zenginleştirilmiş ve %1 penisilin/streptomisin eklenmiş RPMI 1640 medyum içinde, 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> şartlarında büyütülmüştür.

### Kilitli Nükelik Asit (KNA) Anti-MIR223 ile MIR223 Gen Baskılanması

KNA Anti-MIR223 muamelesi için 24 kuyulu plaklar kullanılmıştır. Öncelikle 3X10<sup>5</sup> hücre, 24. ve 48. saat ölçümleri için FBS içeren 300µl RPMI besi yeri içinde kuyulara dağıtılmıştır. Karşılaştırma için kontrol grupları olarak; muamele edilmemiş (untreated, Unt) ve boş transfeksiyon ajanı ile muamele edilen (Mock) hücreler kullanılmıştır. Daha önceki gen susturma çalışmalarımıza dayanılarak hücre serileri 100pmol ve 150pmol KNA ile muamele edilmiştir (*hakem değerlendirmesinde*).

Yeterli miktarda çoğaldığı gözlenen hücreler üzerine, iki farklı dozda ana stoğu 5000 pmol olan KNA ve transfeksiyon ajanı (FuGENE® 6 Transfection Reagent (Promega, Madison, WI, USA)) 100 µl FBS içermeyen besi yeri ile birlikte kuyulara ilave edilmiştir. Altı saat inkübasyonun ardından kuyulara son bir kez daha 100µl FBS içeren RPMI 1640 besi yeri eklenmiştir. Oluşturulan reaksiyon karışımları Tablo 1'de gösterilmiştir. 24 ve 48. saatlerde hücreler kuyulardan toplanarak PBS ile 1/10 oranında dilüe edildikten sonra (100 µl Medyum + 900 µl PBS) hücre canlılığı belirlenmiştir.

**Tablo 1.** KNA Anti-MIR223 konsantrasyonlarına göre hazırlanan reaksiyon karışımları

LNA-Son Konstrasyon	LNA Anti-miR	Transfeksiyon Ajanı	FBS İçermeyen Medyum	Toplam hacim (µl)
10 pmol	1 µl (5000 pmol)	3 µl	97 µl	100 µl
50 pmol	5 µl (5000 pmol)	3 µl	92 µl	100 µl

### **Stem Loop PZR ve Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR (QRT-PZR)**

Toplanan hücreler, 1 ml trizol ile homojenize edilmiş ve trizol protokolü ile RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RNA'ların kalitesini ve konsantrasyonunu tayin edebilmek için spektrofotometre (nd-1000, NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, USA) kullanılmıştır. *MIR223* gen anlatım düzeyini tespit edebilmek için öncelikle spesifik primerler kullanılarak *SNORD24* (endojen kontrol miRNA) ve *MIR223* için stem-loop cDNA sentezi yapılmıştır. Stem-loop cDNA sentezi için 1000 ng total RNA, 10 mM dNTP, 5 pmol *MIR223* RT Primer, 5 pmol *SNORD24* RT Primer, 0,1M DTT (1,4-ditiotreitol), 40 ünite RNaz, 5X tampon çözeltisi ve 200 ünite ters transkriptaz enzimi Superscript II (Invitrogen Life Technologies, USA) kullanılmıştır. Reaksiyonun uygulandığı sıcaklık ve ilişkili süreleri; 42°C'de 50 dakika ve 70°C'de 15 dakikadır.

Gen anlatım baskılanma düzeyleri gerçek zamanlı kantitatif PZR (LightCycler 480, Roche Diagnostics GmbH, Germany) ile belirlenmiştir. *MIR223* için F 5'-TCGCGGTGTCAGTTTGTCAA-3' ve R 5'-GTGCAGGGTCCGAGGTATTC-3' primerleri ve referans miRNA olarak kullanılan *SNORD24* için F 5'-TGCGGTGCAGATGATGTA-AAA-3' ve R 5'-GTGCAGGGTCCGAGGTATTC-3' primer çiftleri kullanılmıştır. Hedef ve referans genler için final konsantrasyonda 1X ana karışım (Roche Diagnostic, Almanya), 200nM primer, 0,04 ünite prob (*universal probe library* (UPL) prob no:21, Roche) olacak şekilde PZR reaksiyon karışımları hazırlandıktan sonra 96 kuyulu plak içerisine, her bir kuyuya karışımdan 10 µl paylaştırılmıştır. Üzerine 200ng cDNA örneği ilave edilmiştir. Her örnek üç kopya olacak şekilde çalışılmıştır. Rölatif kantifikasyon algoritması ile gen anlatım düzeyleri belirlenmiştir. PZR'nin döngü sıcaklık ve süreleri; 95 °C'de 10 dak inkübasyon (1 döngü), 95 °C'de 10 sn, 60 °C'de 20sn, 72 °C'de 1sn (45 döngü) ve 40 °C'de 10 sn soğutma (1 döngü) olacak şekildedir.

Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalarda GraphPad Software Inc. (La Jolla, California, US) kullanılmıştır. Sadece transfeksiyon ajanı içeren mock hücreleri ile uygulama yapılan hücre grupları arasındaki

rölatif gen anlatımının istatistiksel analizi için student-t test kullanılmıştır ve  $P \leq 0.05$  (hipotezler çift yönlü olarak) istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

### **BULGULAR**

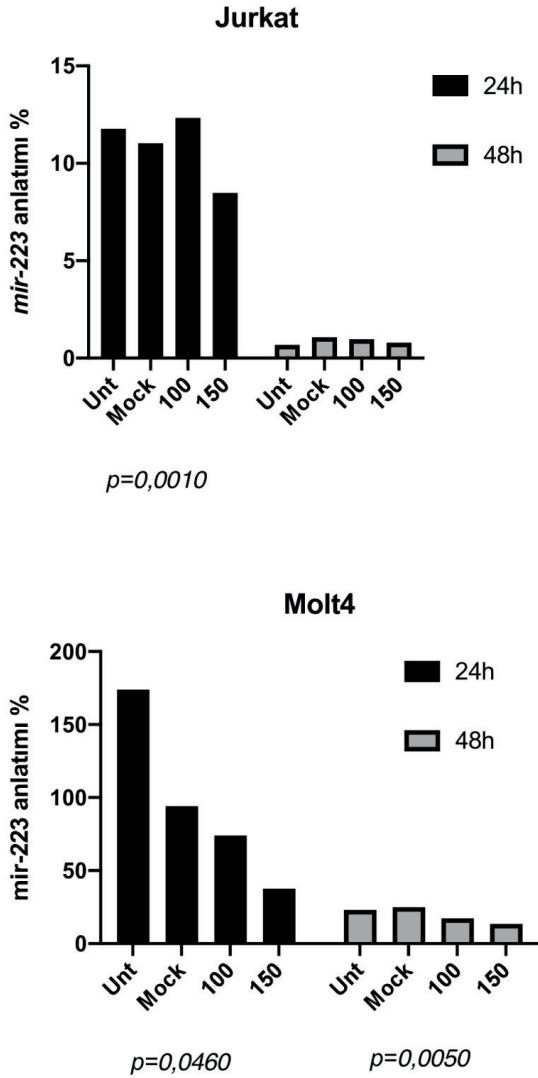
Jurkat ve Molt4 hücre serilerinde, 100 ve 150 pmol konsantrasyonlarda *MIR223*'e özgün KNA ile 24. ve 48. saatlerde uygulama yapılarak *MIR223* gen anlatımları incelenmiştir (Şekil 1A ve 1B). Muamelenin yapıldığı ilk 24. saat içinde hem Jurkat hem de Molt4 hücre serilerinde *MIR223* geni anlatımının, sadece transfeksiyon ajanı içeren hücrelere göre Jurkat hücre serisinde %70 ve Molt4 hücre serisinde %80'den fazla baskılandığı belirlenmiştir.

Her iki hücre serisinde de 24. saatte, 100 pmol ve 150 pmol konsantrasyonlarda *MIR223* anlatımlarının azaldığı ve istatistiksel olarak anlamlılık gösteren baskılanmanın 150 pmol konsantrasyonda olduğu belirlendi. Jurkat ve Molt4 hücrelerinde 24. saat baskılanma için KNA ile muamele edilmemiş hücrelere oranla anlamlı derecede *MIR223* anlatım düzeylerinin azalmış olduğu (sırasıyla,  $p=0.001$  ve  $p=0.046$ ) saptanırken, 48. saatte baskılanmanın özellikle Jurkat hücre serilerinde etkin olarak gerçekleşmediği belirlenmiştir ( $p=0.3$ ). Molt4 hücrelerinde ise 48. saatte baskılanma devam etse de 24. saate göre daha düşük oranlarda olmuştur ( $p=0.005$ ).

### **SONUÇ ve TARTIŞMA**

miRNA'ların anlatımında meydana gelebilecek düzensizlikler hematopoietik sistemin düzenini bozarak lösemilerin ortaya çıkmasına sebebiyet verebilmektedir. miRNA anlatımı hedeflenerek geliştirilen tedavi yöntemleri henüz emekleme aşamasındadır. Bununla beraber miRNA biyolojisi hakkında bilgilerimiz arttıkça bu biyolojik moleküllerin hematolojik kanserlerden akut lösemilerin tanı ve tedavisinde etkin bir şekilde kullanılabileceği öngörülmektedir (11).

Yapılan çalışmalarda miRNA'ların aşırı veya az anlatımlarının ya da tamamen delesyona uğramalarının lösemi tiplerinde tümör baskılayıcı ya da onkogen benzeri rolleri gösterilmiştir (12, 13). Bu çalışmalardan birinde *MIR-92a*'nın, AML hücre hattı olan CD32 hücrelerinin kontrolsüzce çoğalmasına



**Şekil 1.** KNA Anti-MIR223 baskılanması sonrasında, A) Jurkat ve B) Molt4 hücre serisinde 24. ve 48. saatlerdeki MIR223 anlatımının gerçek zamanlı kantitatif PZR ile belirlenmesi. Her deney üç kez tekrarlandı ve örnekler triplicate olarak çalışıldı. SNORD24 referans geni ile normalize edildi (A,  $p=0,001$ ; B,  $p=0,046$  ve  $p=0,005$  - t-test)

sebeplere olacak şekilde, *p63* geninin anlatımını baskıladığı gösterilmiştir (14, 15). Bir diğer çalışmada farelerin hematopoietik sisteminde *MIR-155* ve *MIR-29a*'nın anlatımındaki artışın myeloproliferatif hastalıklar ve lösemiler ile ilişkili olduğu saptanmıştır (16, 17). *MIR223*'ün ektopik anlatımının hematopo-

ietik kök hücrelerinin %30-50 oranında T hücrelerine farklılaşmasını sağladığı gösterilmiştir (18). Bu yönde yapılan bir diğer çalışmada, tetiklenmiş myeloid öncülleri enjekte edilen farelerde *MIR223* anlatımının, lenfosit hücrelerini B yönüne değil, sadece T yönüne farklılaştırdığını ortaya koymuştur. Bu da *MIR223*'ün daha çok T lenfosit soyuna özgü hücrelerde aktif olduğunu göstermektedir (19).

KNA'lar komplementer RNA'ya yüksek afinite ile bağlanabilen çok özgün RNA analoglarıdır. Dolayısıyla son yıllarda KNA'lar miRNA baskılamalarında tercih edilmeye başlanan moleküller arasındadır (20). Etkin gen sessizleştirme potansiyelleri, düşük toksisite ve yüksek metabolik stabilitelelerinden dolayı yeni nesil antisens oligo tedavi yaklaşımlarında da ilgi odağı olmuştur. KNA oligolar riboz kalıntılarını sabitleyen fazladan metilen köprüsüne sahip nükleik asit bloklardır (21, 22). Bildiğimiz kadarıyla ilk defa bu çalışmada, *in vitro* KNA kullanılarak T-ALL hücre serilerinde *MIR223* baskılanması ve etkinliği araştırıldı. Antisens oligo tedavi yaklaşımı için ön araştırma sonuçları olarak, ilk 24. saat içinde yüksek konsantrasyonlu uygulamada hem Jurkat hem de Molt4 hücre serilerinde farklı oranlarda *MIR223* geni anlatımının etkin olarak baskılandığı ve 48. saatte bu etkilerin azaldığı gözlemlendi. İki hücre serisinde birbirinden farklı oranlarda etkinin gözlenmesi iki hücre serisinin birbirinden farklı T-ALL alt gruplarını temsil etmesinden kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca, bu çalışma, hedef miRNA'yı sessizleştirmenin ilk 24 saatteki etkinliğinin 48 saat sonra azalması KNA'ların daha çok, kısa süreli ama etkin olarak tedavi planlarında kullanılabileceği ile ilgili ön bulguların eldesini sağlamıştır. Daha uzun baskılama sürelerinin değerlendirileceği çalışmalarda her uygulama zamanında (24. saat, 48. saat vb) besiyerinin yenilerek KNA'nın yeniden eklenmesi ya da KNA'nın bir viral vektör içine klonlanarak, sabit anlatımının sağlanması daha uygun olabilir. İleride bu amaçla dizayn edilecek araştırmalarda, elde edilen ön bulgular ışığında hem zamansal hem konsantrasyon çeşitlilikleri kullanılması hem de transfeksiyonda kullanılabilecek vektörlerin güvenlik testleri ile birlikte değerlendirilmesi öngörülmüştür.



*MIR223* onkogenik etki gösteren bir miRNA olarak tanımlanmıştır (23) ve antisens oligolar ile *MIR223* geninin susturulması T-ALL gibi artmış *MIR223* anlatımı gösteren kanserlerde hastalığın seyrini araştırma imkanı sağlayabilir. Bu çalışmadan elde edilen ön bulgularda, T-ALL hücrelerinde alternatif bir RNA interferans uygulaması olarak kullanılacak KNA'nın, kısa süreli ancak etkin olduğu gösterilmiş ve hastalık patogenezi araştırılmaya yönelik yapılacak çalışmalarda etkili bir in vitro model olarak bu yaklaşımın kullanılabilceği belirlenmiştir.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Peer Review:** Externally peer-reviewed.

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

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

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir

**Conflict of Interest:** Authors declared no conflict of interest.

**Finansal Destek:** Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje numarası: 40487)

**Financial Disclosure:** This study was supported by Istanbul University Scientific Research Projects Unit. (Project No: 40487)

## KAYNAKLAR/REFERENCES

1. Lee RC, Feinbaum RL and Ambros V. The *c. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75:843-54.
2. Mochizuki K, Fine NA, Fujisawa T, Gorovsky MA. Analysis of a piwi-related gene implicates small RNAs in genome rearrangement in tetrahymena. *Cell* 2002;110:689-99.
3. Peragine A, Yoshikawa M, Wu G, Albrecht HL, Poethig RS. SG3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes Dev* 2004;18:2368-79.
4. O'Donnell KA and Boeke JD. Mighty Piwis defend the germline against genome intruders. *Cell* 2007;129:37-44.
5. Vishnoi A, Rani S. MiRNA Biogenesis and Regulation of Diseases: An Overview. *Methods Mol Biol* 2017;1509:1-10.
6. Sun W, Shen W, Yang S, Hu F, Li H, Zhu TH. MIR223 and miR-142 attenuate hematopoietic cell proliferation, and MIR223 positively regulates miR-142 through LMO2 isoforms and CEBP-β. *Cell Res* 2010;20(10):1158-69.
7. Fulci V, Scappucci G, Sebastiani GD, Giannitti C, Franceschini D, Meloni F. et. al. MIR223 is overexpressed in T-lymphocytes of patients affected by rheumatoid arthritis. *Hum Immunol* 2010;71(2):206-11.
8. Han L, Rachel B, Stuart C. MicroRNA-223 regulates Glut4 expression and cardiomyocyte glucose metabolism. *Cardiovasc Res* 2010;86(3):410-20.
9. Haneklaus M, Gerlic M, O'Neill LAJ, Masters SL. MIR223: infection, inflammation and cancer. *J Intern Med* 2013;274(3):215-26.
10. Mansour MR, Sanda T, Lawton LN, Li X, Kreslavsky T, Novina CD, Brand M et.al. The TAL1 complex targets the FBXW7 tumor suppressor by activating MIR223 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med* 2013;210(8):1545-57.
11. Yimei C, Xiaomin Y, Songnian H, Jun Yu. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2009;7(4):147-54.
12. Mardani R, Abadi MHJN, Taghizadeh-Boroujeni S, Bayat A, Farsinezhad A, Hayat SMG. et. al. MicroRNA in Leukemia: Tumor Suppressors and Oncogenes with Prognostic Potential. *J Cell Physiol* 2018;234(6):8465-86.

13. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E. et.al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(24):15524-29.
14. Tanaka M, Oikawa K, Takanashi M, Kudo M, Ohyashiki J, Ohyashiki K. et.al. Down-regulation of miR-92 in human plasma is a novel marker for acute leukemia patients. *PLoS One* 2009;4(5):e5532.
15. Ohyashiki JH, Umezu T, Kobayashi C, Hamamura RS, Tanaka M, Kuroda M. Impact on cell to plasma ratio of miR-92a in patients with acute leukemia: in vivo assessment of cell to plasma ratio of miR-92a. *BMC Res Notes* 2010;3:347.
16. Den Boer ML, van Slegtenhorst M, De Menezes RX, Cheok MH, Buijs-Gladdines JG, Peters ST et. al. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *Lancet Oncol* 2009;10(2):125-34.
17. Schotte D, Akbari-Moqadam F, Lange-Turenhout EA, Chen C, Pieters R, Den Boer ML. Discovery of new microRNAs by small RNAome deep sequencing in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2011;25(9):1389-99.
18. Bellon M, Yves L, Hermine O. and Nicot C. Dereglulation of micorRNA involved in hematopoiesis and the immune response in HTLV-I adult T-cell leukemia. *Blood* 2009;113(20):4914-17.
19. Chen C, Li L, Lodish HF. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 2004;303(5654):83-6.
20. Stenvang J, Silahtaroglu AN, Lindow M, Elmen J, Kauppinen S. The utility of KNA in microRNA based cancer diagnostics and therapeutics. *Semin Cancer Biol* 2008;18(2):89-102.
21. Grünweller A, Hartmann RK. Locked nucleic acid oligonucleotides: the next generation of antisense agents? *BioDrugs* 2007;21(4):235-43.
22. Nedaeinia R, Avan A, Ahmadian M, Nia SN, Ranjbar M, Sharifi M. et al. Piroozmand A, Nourmohammadi E, Manian M, Ferns GA, Ghayour-Mobarhan M, Salehi R. Current Status and Perspectives Regarding KNA-Anti-miR Oligonucleotides and microRNA miR-21 Inhibitors as a Potential Therapeutic Option in Treatment of Colorectal Cancer. *J Cell Biochem* 2017;118(12):4129-40.
23. Landgraf, P., M. Rusu, R. Sheridan, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 2007;129(7):1401-14.

## **A Survey Study on Medicinal Plants and Mushrooms Use in Treatment of Cancer by Patients at The Istanbul University Institute of Oncology**

### ***İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü'nde Hastalar Tarafından Kansere Tedavisinde Kullanılan Tıbbi Bitkiler ve Mantarlar Üzerine Bir Anket Çalışması***

Hüseyin Onur Tuncay<sup>1</sup> , Miraç Ekici<sup>1</sup> , Büşra Teke<sup>2</sup> , Emine Akalın Uruşak<sup>1</sup> 

#### **ABSTRACT**

**Objective:** Medicinal herbs are commonly used as complementary or prophylaxis in common illness, as well as in diseases such as cancer, where the disease is severe. In order to determine the use of plants and mushrooms among cancer patients, a survey was conducted with 100 cancer patients who are receiving treatment at polyclinics at the Istanbul University Institute of Oncology.

**Material and Methods:** The questionnaires were conducted face to face with the patients and the results were evaluated in computer.

**Results:** According to the survey results, only 24 of 100 patients were found to use the plants and mushrooms for treatment, to reduce the side effects of the treatment or to feel better. As a result, it was determined that a total of 17 different plants and 1 mushroom were used. The mechanism of action, side effects, and warnings of these plants and mushrooms on cancer treatment have been investigated. With this study, it was determined how the patients obtained the plants and mushrooms, how the age, gender or socioeconomic status affect the plants and mushrooms used and what kind of feedback the patients give about their experience.

**Conclusion:** The fact that the plants and mushrooms are not supplied by pharmacies, the application of herbal treatments with the advice of people under the title "expert" and "reliable" cause many problems. The survey study yielded promising results about the use of plants and mushrooms by cancer patients in Turkey. Similar studies are expected to be conducted in more clinics.

**Keywords:** Survey, cancer, Istanbul University Institute of Oncology, medicinal plants, medicinal mushrooms

#### **ÖZ**

**Amaç:** Bitkiler ve mantarlar, tamamlayıcı veya koruyucu olarak basit hastalıklarda kullanıldığı gibi kanser gibi tedavisi ağır olan hastalıklarda da yaygın olarak kullanılmaktadır. Kanser hastaları arasında bitki ve mantar kullanımını belirlemek amacıyla İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü'nde polikliniklerde tedavi gören 100 kanser hastası ile bir anket çalışması yapılmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Anketler hastalarla yüz yüze gerçekleştirilmiş ve sonuçlar bilgisayar ortamında değerlendirilmiştir.

**Bulgular:** Anket sonuçlarına göre, 100 hastanın sadece 24'ünün bitki ve mantarları tedavi edici, tedavinin yan etkilerini azaltıcı veya daha iyi hissetmek için kullandığı saptanmıştır. Anket sonucunda toplam 17 farklı bitki ve 1 mantarın kullanıldığı tespit edilmiştir. Bu bitki ve mantarların kanser tedavisi üzerindeki etki mekanizması, yan etkileri ve uyarıları araştırılmıştır. Bu çalışma ile kanser hastalarının bitki ve mantarları nasıl temin ettikleri, yaş, cinsiyet veya sosyoekonomik durumun bitki ve mantar kullanımını nasıl etkilediği, kullanılan bitki veya mantardan yarar veya zarar nedeniyle ne tür geri bildirimler alındığı belirlenmiştir.

**Sonuç:** Bitkilerin ve mantarların eczanelerden tedarik edilmemesi, "uzman" ve "güvenilir" başlığı altındaki kişilerin tavsiyesi ile bitkisel tedavilerin uygulanması birçok soruna neden olmaktadır. Yapılan anket çalışması, Türkiye'de kanser hastalarının bitki ve mantar kullanımına ilişkin fikir oluşturması açısından umut verici sonuçlar vermiştir. Gelecekte yapılacak benzer çalışmalar ile kanser tedavisi almakta olan hastaların bitki ve mantar kullanımının öğrenilmesi ve hastanın bir bütün olarak ele alınarak bu konuda eğitim almış uzmanların tavsiye vermeleri ümit edilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Anket, kanser, İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü, tıbbi bitki, tıbbi mantar

<sup>1</sup> Istanbul University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Botany, Istanbul, Turkey

<sup>2</sup> Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Ankara, Turkey

ORCID: H.O.T. 0000-0003-1566-4806;  
M.E. 0000-0002-2793-3084;  
B.T. 0000-0001-5813-8625;  
E.K.U. 0000-0002-0307-2128

#### **Corresponding author/Sorumlu yazar:**

Hüseyin Onur Tuncay,  
Istanbul University, Faculty of Pharmacy,  
Department of Pharmaceutical Botany,  
Istanbul, Turkey  
E-mail: mugeay@istanbul.edu.tr

**Submitted/Başvuru:** 04.06.2020

**Accepted/Kabul:** 24.06.2020

**Citation/Atf:** Tuncay HO, Ekici M, Teke B, Akalın Uruşak E. A Survey Study on Medicinal Plants and Mushrooms Use in Treatment of Cancer by Patients at The Istanbul University Institute of Oncology. Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi 2020; 3(2): 51-60.  
<https://doi.org/10.26650/JARHS2020-748136>



## INTRODUCTION

Plants have been used by humans since ancient times. Neanderthal remains dating back to 60 thousand years ago, have been identified between 1957 and 1961 in Şanidar Cave in Northern Iraq. Next to this human residue that is thought to be a shaman, plants such as hibiscus, cornflower, purple hyacinth, groundsel, yarrow, and ephedra have been founded. This discovery is considered to be the first data for the beginning of the relationship between the human and plants (1). Some relics which belong to Mesopotamian, Hittite, Greek, Egyptian, Roman, Byzantine, Arabic; Ottoman and Seljuk Civilizations demonstrate that plants are used for treatments by humans. The most important of these pieces is *Materia Medica*, written by the Greek physician and pharmacologist Dioscorides who lived in the 1st century AD. *Materia Medica* includes more than 660 herbal substances. Dioscorides, due to this contribution, is considered the founder of modern plant science (2).

Treatments and methods that are used in addition to the standard treatments or instead of standard treatments are called Complementary & Alternative Medicine (CAM). When applied together with today's Western Medicine, these methods are used to improve the condition of the patient without reducing the effect of the current treatment. These treatments are expected to support the current treatment and to have a more rapid recovery when applied to the patient (3).

Phytotherapy is a field of medicine that aims to treat the disease with plants or maintain health. Phytotherapy is a science-based medical practice and therefore differs from traditional approaches based on traditional knowledge. It is one of the traditional and complementary treatment methods and contains the most satisfying data in terms of scientific evidence. Although it is sometimes referred to as Complementary and Alternative Medicine (CAM), phytotherapy, as a branch of science, has never emerged as an alternative to modern medicine (4,5).

In a study, 300 participants who were randomly chosen at the city center of Eskişehir filled out the questionnaires (6). Results showed that 60% of the respondents use various types of CAM. 21.3% of

participants use only one CAM method whereas 38.7% of them use two or more CAM methods. The main methods are using plants, megavitamins, diet, fish and animals, practising acupuncture, massage, physical therapy, bonesetting, prayer, yoga, reiki, and meditation. Considering the general distribution of CAM methods, plants are the first with 30% (6).

In studies conducted in Turkey on the use of CAM in cancer patients, data has been collected from 5,252 cancer patients (5,069 adults and 183 pediatric) so far. The literature review about the CAM usage of cancer patients in Turkey shows that the frequency of CAM usage varies between 22.1% and 84.1%. The most used type of CAM was herbal preparations (mostly "*Urtica dioica*"). Other methods are praying, doing religious practices, using vitamins, and special diets. Most of the patients used these therapies upon the recommendation of family members, friends, or other patients did not report the use of CAM to the doctor or nurse (7).

In studies with 156 patients diagnosed with gynecologic cancer in Turkey, 40% of the patients said that they used CAM methods to strengthen the immune system, 25% of patients used them to fight cancer directly, 18% of the patients used them to prevent progress of the disease, and the majority of the patients used them to support the treatment. Although prayer with a ratio 94.7% is one of the most common approaches, the usage rates of herbal approaches were found to be quite high, differing between 28.2% and 95.2% from study to study (8). The most commonly used plants are *Urtica dioica*, *Camellia sinensis*, *Aloe vera*, *Zingiber officinale*, *Vitis vinifera*, and *Linum usitatissimum* (9).

The aim of this study is to determine the use of the plants and mushrooms as one of the CAM methods among cancer patients. Within this scope, a questionnaire survey was conducted with 100 cancer patients who are receiving treatment at polyclinics at the Istanbul University Institute of Oncology. It was determined how the patients obtained the plants and mushrooms, how the age, gender or socioeconomic status affect the plants and mushrooms used and what kind of feedback the patients give about their experience.

## MATERIALS AND METHODS

After the approval of the Ethics Committee (Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Clinical Research Ethics Committee) in March 2017, a survey was conducted with 100 patients receiving treatment at the polyclinics of the Istanbul University Institute of Oncology from March to May 2017. Questionnaires were administered verbally in a face-to-face interview with patients. The purpose of the questionnaire was explained to the patients, it was stated that they can skip questions if they didn't want to answer and they could finish the survey at any point. After receiving the approval of participation, questions (Table 1) were asked. The aim of the questionnaire was to establish a relationship between plant use and socio-economic status through questions about education, monthly income and marital status of the patients. The relationship between plant use and the status of cancer is intended to be established by asking questions regarding the type of cancer, stage, chemotherapy-radiotherapy status, and the presence of cancer diseases in the family. The questions that were asked to the patients included the names of the plants they used, which parts of these plants they used, the harms and benefits of the plants, from whom they heard about these plants, where they obtained them, how much money they spent, whether or not they recommended them, and whether they informed their medical staff or not. By this way, it

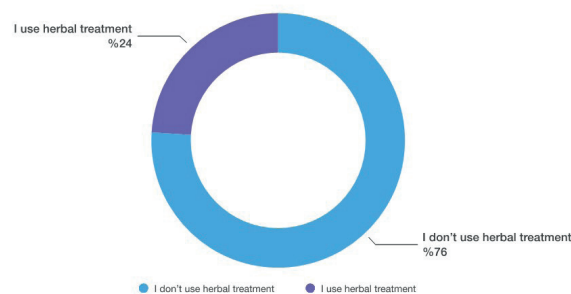
**Table 1.** Survey questions

Name-Surname (optional)	Which plants and mushrooms do you use?
Gender and Age	Which parts of the plant do you use?
Marital and educational status	How do you use the plants and mushrooms?
The monthly income	Did you benefit or harm from plants and mushrooms?
Do you have a history of cancer in your family?	Where or from whom did you hear about these plants and mushrooms?
Cancer type	Where did you get it from?
Do you have chemotherapy / radiotherapy?	What is your reason for using plants and mushrooms?
Do you use plants and mushrooms for this disease?	Did you report the use to the doctor? What was the reaction of the doctor?

was aimed to find out the prevalence of plants used in Turkey and to compare the plants obtained in the literature survey with the plants used by the patients. The Microsoft® Excel version 16.37 software was used to evaluate the results of the questionnaires which were obtained in the survey. The data were analyzed by entering the program manually. According to the answers, the relationship between cancer patients' use of plants and their socio-economic status, the severeness of their disease and treatment was determined. According to the results of the survey, the plants and mushrooms used by the patients were identified and their anticancer mechanism of action, side effects and warnings were investigated.

## RESULTS

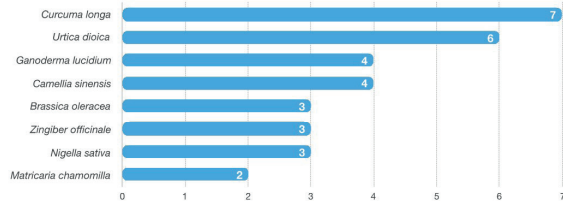
100 cancer patients (51 male, 49 female) completed questionnaires at the Istanbul University Institute of Oncology between March and May 2017. The rate of using CAM methods as herbal treatment was found to be 24% (Figure 1). *Curcuma longa* was the most commonly used plant among these patients.



**Figure 1.** The rate of using CAM methods as herbal treatment in cancer patients

While 7 of the respondents said that they used *Curcuma longa*, 6 of them used *Urtica dioica*, 4 of them used *Ganoderma lucidum*, 4 of them used *Camellia sinensis*, 3 of them used *Brassica oleracea*, 3 of them used *Zingiber officinale*, 3 of them used *Nigella sativa*, and 2 of them used *Matricaria chamomilla*. (Figure 2).

*Vitis vinifera*, *Cynara scolymus*, *Hypericum perforatum*, *Rosa canina*, *Dittrichia viscosa*, *Momordi-*



**Figure 2.** According to the survey results, the most used plants among cancer patients

*ca charantia*, *Rheum palmatum*, *Anethum graveolens*, *Cinnamomum cassia* and *Silybum marianum* were used by one of the participants. Plants are used alone or in combination with each other.

The anticancer efficacy of plants and mushrooms used by cancer patients has been confirmed by literature review. The anticancer mechanism of action, side effects and warnings of 17 plants and one mushroom used by cancer patients are given in Table 2.

Three of the participants were diagnosed with breast cancer, 3 of them with prostate cancer, 3 of them with lymphoma, 2 of them with melanoma, 2 of them with kidney cancer, and one person was diagnosed with each of the following diseases: lung cancer, soft tissue cancer, pancreatic cancer, bone marrow cancer, nasopharynx cancer, cholangiocellular cancer, brain cancer. Prostate and breast cancer patients have been found to use more plants and mushrooms. No relationship was found between plants and mushrooms use and cancer type in this survey study.

Education level of the participants who use plants was as follows: 4.1% (1 patient) of them was illiterate and for the rest the highest degree obtained was as follows: 16.7% (4 patients) primary school, 58.3% (14 patients) middle school, 20.8% (5 patients) high school or higher degree. A positive correlation between education level and plant use was found. Herbal treatment was used by these patients particularly to reduce the side effects of treatment and to treat the disease.

Among participants who use plants, 10 of them were female and 14 of them were male. The monthly income of 25% of the participants (6 patients) was less than 1,000 TL, 66.7% of them (16 patients) were between 1,000-3,000 TL, 8.3% of them (2 patients)

were more than 3,000 TL. Therefore, it can be said that the herbal treatment is preferred more by people with a middle income.

The distribution of age among patients who use plants was as follows: 12.5% of them (3 patients) were 29 years-old or younger, 16.7% of them (4 patients) were between 30-45 years-old, 58.3% of them (14 patients) were between 46-64 years-old, 12.5% of them (3 patients) were 65 years-old or older. The mean age of the patients who use plants and mushrooms was high due to the high average age of the patients.

The 8.3% of participants (2 patients) who use plants were widows, 25% of them (6 patients) were single and 66.7% of them (16 patients) were married. Demographic and clinical attributes of the patients who use plants or mushrooms for their cancer treatment are given in Table 3.

While 79.2% (19 patients) of the respondents stated that they benefited from herbal treatment, 20.8% (5 patients) stated that they did not see any benefit or harm. No serious adverse effects were reported by respondents. The most common sources of information about herbal treatment among cancer patients were friends / relatives 50.0% (11 patients), and media / internet 40.9% (9 patients). While 52.4% (11 patients) of the respondents said that they obtained the plants from herbalists, 23.8% (5 patients) of them were provided by friends, 19% (4 patients) of them were provided from nature, no one obtained them from a pharmacy. The patients stated the reasons for using plants and mushrooms as follows; 66.7% (10 patients) used them to support treatment, 13.3% (2 patients) used them to reduce the side effects of medications and 20% (3 patients) used them to relax. 58.8% (10 patients) of the patients reported that the doctor didn't know about the plants they used. Characteristics of the plants and mushrooms used by patients are shown in Table 4.

Overall, it was observed that the use of herbal products increase with being married, being in the middle or older age group, having middle or upper-income level, having a high level of education and being diagnosed with particular types of cancer, namely, prostate and breast cancer.

**Table 2.** The anticancer mechanism of action, side effects and warnings of 17 plants and one mushroom used by cancer patients

Scientific name / Turkish name	The anticancer mechanism of action	Side effects / Warnings
<i>Curcuma longa</i> L. / Zerdeçal	Anticancer (10).	Gastric irritation, stomach upset, nausea, diarrhea, allergic skin reactions, antithrombotic effects may be seen (11). Curcumin could reduce the effect of immunosuppressants. Turmeric could interact with non-steroidal anti-inflammatory drugs, antiplatelet agents, antihyperlipidemic drugs and warfarin (12).
<i>Urtica dioica</i> L. / Isırgan	Cytotoxic and apoptosis inducing effects (13).	Gastrointestinal adverse effects, allergic reactions, pruritus, decreased urine volume, edema (14). The use of <i>U. dioica</i> is contraindicated in people who have reduced cardiac and renal function due to fluid retention (15).
<i>Ganoderma lucidum</i> (Curtis) P.Karst. / Reishi Mantarı	Anticancer (16).	Because <i>Ganoderma lucidum</i> inhibits platelet aggregation, it may have a synergistic effect with blood thinners such as Aspirin and Warfarin. Patients taking immunosuppressive drugs should be careful (17).
<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze / Yeşil Çay	Apoptosis (18).	Insomnia, nervousness, nausea, rash, gastrointestinal problems (19). Patients with hypertension, severe liver disease, cardiac arrhythmias, psychiatric disorders, insomnia should avoid using the plant (20).
<i>Brassica oleracea</i> L. / Brokoli	Antioxidant, enzyme regulator, apoptosis and cell cycle regulatory effect (21).	The plant should not be used for a long time in diseases related to liver and thyroid (22).
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe / Zencefil	Anticancer activity (23).	Allergic rashes, heartburn, palpitations, gas, nausea, diarrhea, mouth irritation, bleeding, uterine contraction (24). It has been recommended that ginger supplements should be avoided in cases of gallstones due to stimulating the secretion of bile (25).
<i>Nigella sativa</i> L. / Çörek Otu	Antioxidant, anticancer and antimutagenic effects (26).	Allergic contact dermatitis, gastrointestinal adverse effects (27). It may interact with immunosuppressive or immunostimulant drugs (28).
<i>Matricaria chamomilla</i> L. / Papatya	Anticancer, apoptosis of tumour cells (29).	Allergic reactivity (30).
<i>Vitis vinifera</i> L. / Üzüm	Inhibited aromatase activity and expression (31).	Gastrointestinal disturbances, nausea, indigestion (20).
<i>Cynara scolymus</i> L. / Enginar	Antioxidant, anti-apoptotic effects (32).	Allergic reactions, gastrointestinal disorders, edema (33).
<i>Hypericum perforatum</i> L. / Sarı Kantaron	Apoptosis of tumour cells and inhibit angiogenesis (34).	Agitation, gastrointestinal symptoms, photosensitivity, skin conditions (35).
<i>Rosa canina</i> L. / Kuşburnu	Antiproliferative activity (36).	Rash, gastrointestinal complaints (37).
<i>Ditrichia viscosa</i> (L.) Greuter / Yapışkan Andız Otu	Anticancer (38).	It has hypoglycemic effects (39).
<i>Momordica charantia</i> L. / Kudret Narı	Anticancer potency against cancer cell lines (40).	Hypoglycaemia and convulsions in children, it should not be administered to children or taken during breastfeeding (41).
<i>Rheum palmatum</i> L. / Işgın	Antiproliferative effect and anti-apoptotic effects (42).	The plant is used with calcium; calcium oxalate crystals can accumulate in the kidney and gallbladder (43).
<i>Anethum graveolens</i> L. / Dere Otu	Suppressed the proliferation (44).	No side effects reported.
<i>Cinnamomum cassia</i> (L.) J.Presl / Tarçın	It inhibited the expression of pro-angiogenic factors and regulators of tumour progression (45).	Allergic contact dermatitis, hypoglycemia (46).
<i>Silybum marianum</i> L. Gaertn. / Meryemana Dikeni	Antioxidant and hepatoprotective effects (47).	Nausea, stomachache, diarrhea, headache, allergic reaction, indigestion (48).



**Table 3.** Demographic and clinical characteristics of the patients who use plants or mushrooms for their cancer treatment

Gender	Male	14	58.3%
	Female	10	41.7%
Marital status	Married	16	66.7%
	Single	6	25%
	Widow	2	8.3%
Age Group	29 and under	3	12.5%
	30-45	4	16.7%
	46-64	14	58.3%
	65 and over	3	12.5%
Educational status	Illiterate	1	4.1%
	Primary school	4	16.7%
	Middle school	14	58.3%
	High school	2	8.3%
	University	3	12.5%
The monthly income	Less than 1000₺	6	25.0%
	Between 1000-3000₺	16	66.7%
	More than 3000₺	2	8.3%
Cancer Type	Breast cancer	3	12.5%
	Prostate cancer	3	12.5%
	Lymphoma	3	12.5%
	Melanoma	2	8.3%
	Kidney cancer	2	8.3%
	Other	11	45.8%

It was observed that there was no plant use in some of the polyclinics due to doctor's prohibition. Doctors do not recommend the use of plants to their patients or leave them to their own decisions due to reasons such as having side effects of plants, risk of drug interaction, not believing the effect of the plant, not being able to obtain correct information and information pollution. In addition, it was noticed that patients were timid in reporting the herbs they used to the healthcare professionals. All these situations are among the factors that limit this study.

## DISCUSSION

The survey was conducted in order to determine the application of herbal use among cancer patients at the Istanbul University Institute of Oncology, one of the most important oncology clinics in Turkey.

**Table 4.** Characteristics of plants and mushrooms used by patients

Benefit / Harm	I saw benefit.	19	79.2%
	I saw harm.	0	0.0%
	I saw neither benefit nor harm.	5	20.8%
Information source	Friends / Relatives	11	50.0%
	Media /Internet	9	40.9%
	Herbalist	1	4.5%
	Pharmacy	0	0.0%
Supply	Books	1	4.5%
	Collecting from nature	4	19.0%
	Friends / Relatives	5	23.8%
	Herbalist	11	52.4%
	Pharmacy	0	0.0%
The purpose of using plants/ mushrooms	Other	1	4.8%
	Support the treatment	10	66.7%
	Reduce side effects	2	13.3%
Whether the doctor knows that the patient uses plants and/ or mushrooms.	Relaxation	3	20.0%
	Yes	7	41.2%
	No	10	58.8%

The aims of this study were to find out how patients obtain plants, how the age, gender or socioeconomic status affect the plant use and what kind of feedback the patients give about their experience. The results showed that there is no statistically significant relationship between gender, socioeconomic status and plant use. Prostate and breast cancer patients have been found to use more plants. This might be due to the high incidence of the disease (49). No relationship was found between plant use and cancer type in this survey study. A positive correlation between the education level and plant use was found. This might be due to the higher ratio of access to the media and internet among more educated patients in comparison to less educated one. It can be said that herbal treatment is preferred more by middle-income people. The mean age of the patients who use plants and mushrooms was high due to the high average age of the patients. This situation can be explained by the increase in the incidence of cancer in advanced ages (50).

Furthermore, the results of this study were compared to plants with proven efficacy in cancer treatment. As a result, it has been observed that the plants used by patients with cancer are compatible with the plants that are proven to be used in cancer treatment.

In general, the use of plants and mushrooms was less than expected. This may be because cancer patients do not provide information due to doctor prohibition because of the reasons such as the side effects of plants, the risk of drug interaction, and the disbelief of the effect of the plant.

## CONCLUSION

It has been observed that patients especially use plants in cancer treatment because of the common belief that plants, and mushrooms are beneficial, and have no side effects. Insufficient audits and controls, negative effects of the media, the insufficient number of physicians trained in the use of plants and the application of the treatment with plants by unqualified people bring about many problems.

Our personal observations make us think that there are deficiencies in the transfer of information of the patient. Primarily we have to discuss for which reasons patients use these products. Due to the nature of cancer disease, patients are seeking alternative searches and follow the suggestions of unqualified people under the title "expert" and "reliable" in uncontrolled media and social media. Secondly, and the most influencing part of the treatment process is the strict approach of oncologists.

With this study, which was conducted at the Istanbul University Institute of Oncology, it is hoped to give an idea about the plant use among cancer patients in Turkey. With similar studies in the future, we hope that more information will be learned about the use of plants and mushrooms to cure the diseases of cancer while trained experts will provide recommendations for the patient.

Phytotherapy should be used as a complementary treatment in addition to standard medical treatment. Evidence-based information about the advantages, disadvantages, and limitations of herbal treatment should be provided by experts trained in this field for all cancer patients and patient-centered

guidance should be provided. This approach requires a multidisciplinary practice.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Peer Review:** Externally peer-reviewed.

**Etik Komite Onayı:** Bu çalışma için etik komite onayı alınmıştır.

**Ethics Committee Approval:** Ethics committee approval was received for this study.

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

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

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir

**Conflict of Interest:** Authors declared no conflict of interest.

**Finansal Destek:** Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

**Financial Disclosure:** Authors declared no financial support.

**Acknowledgements:** Thanks to Fatma Betül Aydın for her contributions.

**Teşekkür:** Katkılarından dolayı Fatma Betül Aydın'a teşekkür ederiz.

## REFERENCES/KAYNAKLAR

1. Faydaoglu E, Sürücüoğlu MS. History of the Use of Medical and Aromatic Plants and their Economic Importance Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi 2011;11(1): 52-67.
2. Riddle MJ. Dioscorides on pharmacy and medicine. Austin: University of Texas Press; 1985.

3. Engel LW, Straus SE. Development of therapeutics: opportunities within complementary and alternative medicine. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1(3):229-37.
4. Falzon CC, Balabanova A. Phytotherapy An Introduction to Herbal Medicine. *Prim Care* 2017;44(2):217-27.
5. Fürst R, Zündorf I. Evidence-based phytotherapy in Europe: Where do we stand? *Planta Med*. 2015;81(12-13):962-7.
6. Çetin O. The Use of Complementary and Alternative Medicine in Eskisehir. *SosyoEkonomi* 2007;6(6): 89-106. (article in Turkish with an abstract in English)
7. Kav S, Hanoglu Z, Algier L. Use of Complementary and Alternative Medicine by Cancer Patients in Turkey: A Literature Review. *UHOD* 2008;28(4):32-8.
8. Başgöl Ş, Aslan E. Complementary and Alternative Medicines In Gynecologic Cancers: The Evidence-Based Approach. *YBÜ Sağlık Bilimleri Fakültesi Hemşirelik E-Dergisi* 2014;2(3):51-62.
9. Yıldırım Y, Tinar S, Yorgun S, Toz E, Kaya B, Sonmez S, et al. The use of complementary and alternative medicine (CAM) therapies by Turkish women with gynecological cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* 2006;27(1):81-5.
10. Shukla M, Jaiswal S, Sharma A, Srivastava PK, Arya A, Dwivedi AK, et al. A combination of complexation and self-nanoemulsifying drug delivery system for enhancing oral bioavailability and anticancer efficacy of curcumin. *Drug Dev Ind Pharm* 2016;43(5):847-61.
11. Nagpal M, Sood S. Role of curcumin in systemic and oral health: An overview. *J Nat Sci Biol Med* 2013;4(1):3-7.
12. Fetrow CW, Avila JR, editors. *Professional's handbook of complementary and alternative medicine*. Springhouse, PA: Springhouse; 1999.
13. Mohammadi A, Mansoori B, Aghapour M, Baradaran B. *Urtica dioica* dichloromethane extract induce apoptosis from intrinsic pathway on human prostate cancer cells (PC3). *Cell Mol Biol* 2016;62(3):78-83.
14. Chrubasik JE, Roufogalis BD, Wagner H, Chrubasik SA. A comprehensive review on nettle effect and efficacy profiles, Part I: *Herba urticae*. *Phytomedicine* 2007;14(6):423-35.
15. World Health Organization. WHO Monographs on Selected Medicinal Plants Volume 2, World Health Organization. Geneva: World Health Organization; 2002.
16. Ameri A. Ganoderic Acid in the Treatment of Prostate Cancer. *Jundishapur J Nat Pharm Prod* 2012;7(3):85-6.
17. Wasser SP. Reishi or Ling Zhi (*Ganoderma lucidum*). *Encyclopedia of Dietary Supplements* 2005;1:603-2
18. Saganuma M, Saha A, Fujiki H. New cancer treatment strategy using combination of green tea catechins and anticancer drugs. *Cancer Sci* 2011;102(2):317-23.
19. Schönthal AH. Adverse effects of concentrated green tea extracts. *Mol Nutr Food Res* 2011;55(6):874-85.
20. Braun L, Cohen M, editors. *Herbs and Natural Supplements Volume 2: An Evidence-Based Guide*. Australia: Elsevier Health Sciences; 2015.
21. Vasanthi HR, Mukherjee S, Das DK. Potential health benefits of broccolichemico-biological overview. *Mini-Rev Med Chem* 2009;9(6):749-59.
22. Kruger CL. Generally Recognized As Safe (GRAS) otification for the Use of Aqueous Broccoli Seed Extract Powder in Food. U.S. Food Drug Administration. Office of Food Additive Safety: 2013 July. Report No: 496.
23. El-Ashmawy NE, Khedr NF, El-Bahrawy HA, Abo Mansour HE. Ginger extract adjuvant to doxorubicin in mammary carcinoma: study of some molecular mechanisms. *Eur J Nutr* 2018;57(3):981-89.
24. Altman RD, Marcussen KC. Effects of a Ginger Extract on Knee Pain in Patients with Osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2001;44(11):2531-8.
25. Blumenthal M, Busse WR, Goldberg A, Gruenwald J, Hall T, Riggins W, Rister RS, editors. *German Commission E Monographs: Therapeutic Monographs on Medicinal Plants*.

- Austin, Texas: American Botanical Council; 1998.p.135-136.
26. Bourgou S, Bellila A, Falleh H, Ksouri R, Marzouk B. Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots. *C R Biol* 2008;331(1):48-55.
  27. Ali BH, Blunden G. Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytother Res* 2003;17(4):299-305.
  28. El-Obeid A, Al-Harbi S, Al-Jomah N, Hassib A. Herbal melanin modulates tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), interleukin 6 (IL-6) and vascular endothelial growth factor (VEGF) production. *Phytomedicine* 2006;13(5):324-33.
  29. Sung B, Chung HY, Kim N. Role of Apigenin in Cancer Prevention via the Induction of Apoptosis and Autophagy. *J Cancer Prev* 2016;21(4):216-26.
  30. Andres C, Chen WC, Darsow U, Mempel M, Ollert M, Ring J. Anaphylactic Reaction to Camomile Tea. *Allergol Int* 2009;58(1):135-6.
  31. Kijima I, Phung S, Hur G, Kwok SL, Chen S. Grape seed extract is an aromatase inhibitor and a suppressor of aromatase expression. *Cancer Res* 2006;66(11):5960-7.
  32. Miccadei S, Di venere D, Cardinali A, Romano F, Durazzo A, Foddai MS, et al. Antioxidative and apoptotic properties polyphenolic extracts from edible part of artichoke (*Cynara scolymus* L.) on cultured rat hepatocytes and on human hepatoma cells. *Nutr Cancer* 2008;60(2):276-83.
  33. Englisch W, Beckers C, Unkauf M, Ruepp M, Zinserling V. Efficacy of Artichoke dry extract in patients with hyperlipoproteinemia. *Arzneimittelforschung* 2000;50(3):260-5.
  34. Lorusso G, Vannini N, Sogno I, Generoso L, Garbisa S, Noonan DM, et al. Mechanisms of Hyperforin as an anti-angiogenic angioprevention agent. *Eur J Cancer* 2009;45(8):1474-84.
  35. Linde K, Knuppel L. Large-scale observational studies of hypericum extracts in patients with depressive disorders: a systematic review. *Phytomedicine* 2005;12(1-2):148-57.
  36. Jiménez S, Gascon S, Luquin A, Laguna M, Ancin-Azpilicueta C, Rodriguez-Yoldi MJ. Rosa canina extracts have antiproliferative and antioxidant effects on caco-2 human colon cancer. *PloS one* 2016;11(7):e0159136.
  37. Chrubasik E, Rougofalis BD, Müller-Ladner U, Chrubasik S. Systematic review on the Rosa canina effect and efficacy profiles. *Phytother Res* 2008;22(6):725-33.
  38. Merghoub N, Btaouri H, Benbacer L, Gmouh S, Trentesaux C, Brassart B, et al. Inula Viscosa Extracts Induces Telomere Shortening and Apoptosis in Cancer Cells and Overcome Drug Resistance. *Nutr Cancer* 2016;68(1):131-43.
  39. Zeggwagh NA, Quahidi ML, Lemhadri A, Eddouks M. Study of hypoglycaemic and hypolipidemic effects of *Inula viscosa* L. aqueous extract in normal and diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2006;108(2):223-7.
  40. Güneş H, Alper M, Çelikoğlu N. Anticancer effect of the fruit and seed extracts of *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae) on human cancer cell lines. *Trop J Pharm Res* 2019;18(10):2057-65.
  41. Basch E, Gabardi S, Ulbricht C. Bitter melon (*Momordica charantia*): a review of efficacy and safety. *Am J Health-Syst Pharm* 2003;60(4):356-9.
  42. Sui JQ, Xie KP, Zou W, Xie MJ. Emodin inhibits breast cancer cell proliferation through the ERα-MAPK/ Akt-cyclin D1/Bcl2 signaling pathway. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15(15):6247-51.
  43. Malik MA, Bhat SA, Fatima B, Ahmad SB, Siddiqui S, Shrivastava P. *Rheum emodi* as valuable medicinal plant. *IJGMP* 2016;5(4):35-44.
  44. Mohammed FA, Elkady AI, Syed FQ, Mirza MB, Hakeem KR, Alkarim S. *Anethum graveolens* (dill) - A medicinal herb induces apoptosis and cell cycle arrest in HepG2 cell line. *J Ethnopharmacol* 2018;219:15-22.
  45. Kwon HK, Jeon WK, Hwang JS, Lee GG, So JS, Park JS, et al. Cinnamon extract suppresses tumor progression by modulating angiogenesis and the effector function of CD8+ T cells. *Cancer Lett* 2009;278(2):174-82.
  46. Chevallier A. *Encyclopedia of Herbal Medicine: 550 Herbs and Remedies for Common Ailments.*



- Third ed. Dorling New York, USA: Kindersley Book; 2016.
47. Zhu XX, Ding YH, Wu Y, Qian LY, Zou H, He Q. Silibinin: a potential old drug for cancer therapy. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2016;9(10):1323-30.
48. El-Kamary SS, Shardell MD, Adel-Hamid M, Ismail S, El-Ateek M, Metwally M, et al. A randomized controlled trial to assess the safety and efficacy of silymarin on symptoms, signs and biomarkers of acute hepatitis. *Phytomedicine* 2009;16(5):391-400.
49. Stewart BW, Wild CP. *World Cancer Report*. Lyon: IARC; 2014.
50. NCI (National Cancer Institute) Age and Cancer Risk. serial online 2015 April (cited 2020 April 20) Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/age>



## Yeni Koronavirüsün (Covid-19) Moleküler Yapısı ve Genomik Karakterizasyonu

### *Molecular Structure and Genomic Characterization of The New Coronavirus (Covid-19)*

Gözde Öztan<sup>1</sup> , Halim İşsever<sup>2</sup> 

#### ÖZ

İnsandan insana bulaşan ve atipik pnömoni salgınıyla ilişkili yeni bir şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2 (SARS-CoV-2), Çin'in Wuhan şehrinde ortaya çıkmıştır. Yarasalar, SARS-CoV, MERS-CoV ve COVID-19 için birincil rezervuar olsa da, SARS-CoV'nin, Çin'deki misk kedilerinden, MERS-CoV'nin, Orta Doğu'daki develerden, COVID-19'un yarasadan insana pangolin (pullu karıncayiyen) aracılığıyla bulaşmış olabileceği ortaya çıkmıştır. Epidemiyolojik salgınlara yol açan koronavirüs ailesine ve betakoronavirüs cinsine ait üç insan koronavirüsü (SARS-CoV, MERS-CoV ve SARS-CoV-2) yaklaşık 32 Kb uzunluğunda pozitif anlamlı tek iplikli RNA'sı olan zarfı virüslerden olup enfeksiyonla ilişkili yüksek mortalite oranlarıyla proenflamatuar yanıtların patogenezinde rol oynamaktadırlar. 2019-nCoV genomu, yarasa SARS benzeri CoVZXC21 ile % 89 ve insan SARS-CoV'siyle % 82 nükleotid benzerliğine sahiptir. Orf1a/b, spike, zarf, membran ve nükleoproteinlerinin filogenetik ağaçları yarasa, misk kedisi ve insan SARS koronavirüslerinininkine yakından ilişkilidir. Anjiyotensin-I dönüştürücü enzim 2 (ACE2), şiddetli akut solunum sendromu koronavirüsünün reseptörüdür. Viral protein ve ACE2 reseptörü arasındaki etkileşim, replikasyon döngüsünde önemli bir adımdır. Bu derlemenin amacı SARS ve MERS ile karşılaştırıldığında COVID-19 akut solunum yolu hastalığına neden olan SARS-CoV-2 virüsünün moleküler yapısı ve genetik özellikleriyle hastalığın klinik etkilerini ortaya koymaktır. COVID-19'un spesifik moleküler detaylarının açıklığa kavuşturulması, tedavi hedeflerine ulaşılmasında yol gösterici olacaktır. Böylelikle COVID-19 için moleküler genetik yöntemlerin geliştirilmesi gelecekte virüse karşı kontrol önlemlerimizi arttıracaktır.

**Anahtar Kelimeler:** COVID-19, yeni koronavirüs, ACE2, spike protein

#### ABSTRACT

SARS-CoV-2, transmitted from person to person and associated with the outbreak of atypical pneumonia, first emerged in Wuhan, China. Although bats, SARS-CoV and MERS-CoV are the primary reservoirs for COVID-19, it turns out that SARS-CoV may have been transmitted from the civet in China, MERS-CoV from camels in the Middle East, and COVID-19 from the bat to humans via the pangolin (scaly anteater). SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2 are coronaviruses belonging to the Coronaviridae family and Betacoronavirus genus, which cause epidemiological outbreaks, are enveloped viruses with approximately 32 Kb long positive sense, ssRNA, and play a role in the pathogenesis of proinflammatory responses with high mortality rates associated with infection. The 2019-nCoV genome has 89% nucleotide identity with bat SARS-like CoVZXC21 and 82% with human SARS-CoV. ACE2 is the receptor of this severe acute respiratory syndrome coronavirus. The aim of this review is to reveal the molecular structure and genetic features of the SARS-CoV-2 virus and the clinical effects of the disease, which causes COVID-19 acute respiratory disease, and to compare it to SARS and MERS. Clarifying the specific molecular details of COVID-19 will guide researchers to the discovery of its treatment. Thus, the development of the molecular genetic methods for COVID-19 will increase our control measures against the virus in the future.

**Keywords:** COVID-19, novel coronavirus, ACE2, spike protein

<sup>1</sup> İstanbul üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup> İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye.

ORCID: G.Ö. 0000-0002-2970-1834;  
H.İ. 0000-0002-5435-706X

#### Sorumlu yazar/Corresponding author:

Gözde Öztan,  
İstanbul üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye  
E-posta: gozdeoztan@yahoo.com

**Başvuru/Submitted:** 24.05.2020

**Kabul/Accepted:** 24.06.2020

**Atf/Citation:** Öztan G, İşsever H. Molecular Structure and Genomic Characterization of The New Coronavirus (Covid-19). Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi 2020; 3(2): 61-71.  
<https://doi.org/10.26650/JARHS2020-726533>



## GİRİŞ

2019 yeni koronavirüsünün (2019-nCoV olarak da adlandırılan şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2 (SARS-CoV-2)) neden olduğu pnömoni yakın zamanda Çin'in Wuhan şehrinde ortaya çıkmış ve COVID-19 olarak adlandırılmıştır. Hastalığın yayılmasıyla, Çin'in diğer bölgelerinde de benzer vakaların olduğu doğrulanmıştır. 30 Aralık 2019'da Dünya Sağlık Örgütü, olayın yeni koronavirüs enfeksiyonları tarafından küresel sağlığa büyük bir tehdit teşkil ettiğini belirterek Uluslararası Önemi Haiz Halk Sağlığı Acil Durumu oluşturulduğunu açıklamıştır (1). Koronavirüsler son yirmi yılda iki büyük pandemiye, SARS ve Orta Doğu solunum sendromuna (MERS) neden olmuştur (2). 2019-nCoV, SARS-CoV ve MERS-CoV'yi içeren koronavirüs ailesinin betakoronavirüs cinsinin B soyuna aittir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, ateş, öksürük, miyalji veya yorgunluğun yaygın semptomlar olduğu ve balgam üretimi, baş ağrısı, hemoptizi ve ishalin daha az yaygın semptomlar olduğu bildirilmiştir (3).

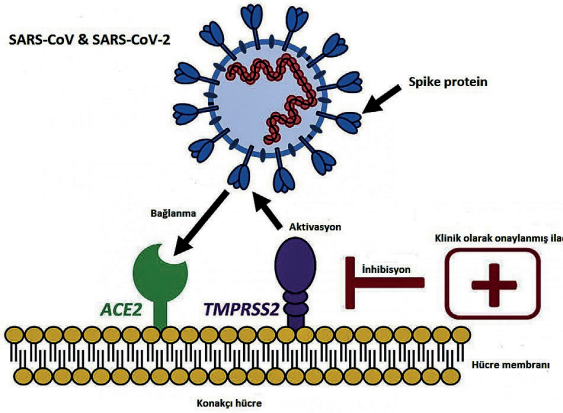
SARS-CoV ve MERS-CoV arasında epidemiyolojik ve klinik özelliklerde benzerlikler ve farklılıklar bulunmaktadır. SARS-CoV ve MERS-CoV virüslerinin her ikisi de pozitif sarmallı RNA betakoronavirüslerdir. Yarasalardan izole edilen SARS-CoV ve MERS-CoV'nin sıra homolojisi insanlardan veya misk kedisi izolatlarından elde edilen izolatlarla ortaktır bu durum yarasaların rezervuar olduğunu göstermektedir (4).

Viral genom, çoklu gen ürünlerini eksprese eden bir dizi iç içe geçmiş subgenomik RNA'yı kodlar. İnsan Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2) ve CD209L, SARS-CoV için hücre reseptörleri olarak tanımlanmıştır. ACE2 baskın reseptör olup CD209L, S proteini için çok daha düşük bir afiniteye sahiptir. MERS-CoV için hücre yüzeyi reseptörü, CD26 olarak da bilinen insan dipeptid peptidaz 4'tür (hDPP4) (5). COVID-19'lu hastaların hem klinik hem de epidemiyolojik özellikleri, SARS-CoV-2 enfeksiyonunun, SARS-CoV'ye büyük ölçüde benzeyen klinik bulgularla şiddetli solunum hastalığı kümelerine yol açabileceği ve yoğun bakım ünitesinin kabulüne ve yüksek mortaliteye neden olduğunu göstermektedir (6).

Koronavirüsler 60 nm ila 140 nm çapında değişen pozitif yüklü RNA virüsleridir ve yüzeyindeki spike benzeri çıkıntılar elektron mikroskobu altında saç benzeri bir görünüm vermektedir bu yüzden koronavirüs olarak adlandırılmaktadırlar. HKU1, NL63, 229E ve OC43 şeklinde isimlendirilen dört ayrı koronavirüs, insanların dolaşım sisteminde yer alarak genellikle hafif solunum yolu hastalığına neden olur (7). SARS-CoV-2'nin SARS-CoV ile % 75 ila % 80 aynı genom dizisine sahip olduğu ve birkaç yarasaya CoV ile daha fazla benzerlik taşıdığı ortaya konmuştur (6).

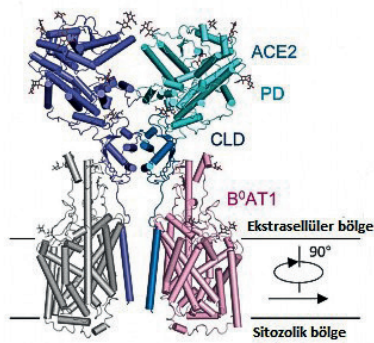
## 1. SARS-CoV-2 GENOMİK ÖZELLİKLERİ

Yeni koronavirüsün tam genomik uzunluğu 29891 ila 29903 nükleotitten oluşmaktadır. Elde edilen tüm viral genom dizileri, % 99.98'den fazla dizi benzerliği göstermektedir. SARS-CoV-2, SARS-CoV ile % 79 nükleotid dizi benzerliği ve MERS-CoV ile de yaklaşık %50 civarında bir dizi benzerliğine sahiptir. SARS-CoV-2'nin ORF1ab'daki korunmuş yedi replikaz domaini, SARS-CoV ile % 94,6 oranında benzerdir bu durum bu virüslerin aynı türe ait olduğu anlamına gelmektedir (8). ACE2, membrana bağlı aminopeptidazdır. ACE2 enziminin, kardiyovasküler ve bağışıklık sistemlerini etkilemede fizyolojik açıdan önemli iki farklı mekanizma ile rol oynadığı tespit edilmiştir. ACE2, anjiyotensin I'de dahil vazodilatör peptitlerin üretimini katalize eder ve anjiyotensin II'nin güçlü vazokonstriktör etkilerinin dengelenmesinden sorumludur. ACE2'nin SARS'a neden olan koronavirüs için fonksiyonel bir reseptör olduğu belirlenmiştir. SARS'ın temel nedeni olan koronavirüs (SARS-CoV), ektoenzime bağlandığında membran füzyonuyla pulmoner endotel hücrelerine girer. Bu etkileşime SARS-CoV spike proteini aracılık eder (9). COVID19'un hücreye girişinin tamamlanması için, spike proteininin TMPRSS2 adı verilen bir proteaz tarafından hazırlanması söz konusudur. Virüs reseptörünün hücresel liganda bağlanması için ACE2 enzimi, virüsün aktivasyonu içinse TMPRSS2 proteazı gerekmektedir. (Şekil 1). 2019-nCoV, konakçı hücreye girip katlanarak virüs RNA genomu kopyalanır ve ardından translasyona uğrar. 2019-nCoV genom rep-



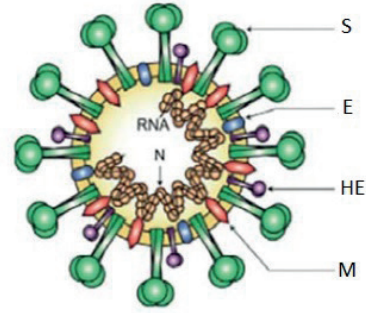
**Şekil 1.** COVID-19 ve SARS-CoV'nin spike proteini, virüs aktivasyonu için hücresel bağlanma faktörü ACE2 ve hücresel proteaz TMPRSS2'yi kullanır (10)

likasyonu ve transkripsiyon aşamaları, 20 kb replikaz geni tarafından kodlanan viral replikatın aracılık ettiği sürekli ve süreksiz RNA sentezini içermektedir (10). Tam uzunluktaki ACE2, bir N terminal PD ve tek bir transmembran heliks ile biten bir C-terminal kollektin benzeri alandan (CLD) ve ~40 rezidürlük hücre içi segmentten oluşur. ACE2-B<sup>0</sup>AT1 kompleksi, ACE2'nin homodimerizasyonuna aracılık eden kollektin benzeri alanla birlikte heterodimerlerin bir dimeri olarak bir araya gelmektedir (Şekil 2) (11).



**Şekil 2.** ACE2-B<sup>0</sup>AT1 kompleksinin atomik modeli. Glikozilasyon bölgeleri çubuklar şeklinde gösterilmiştir (11)

Koronavirüsler genomlarındaki beş yapısal proteinleri kodlar. Bunlar Spike (S), Membran (M), Zarf (E) glikoproteinleri, Hemagglutinin Esteraz (HE) ve Nükleokapsid (N) proteindir (Şekil 3) (12). Zarf glikoproteinleri ve N proteini tüm virionlarda olmakla birlikte HE proteinleri yalnızca beta koronavirüs-



**Şekil 3.** Koronavirüs virion yapısı yapısal proteinlerle gösterilmiştir. N: Nükleokapsid proteini; S: Spike proteini, M: Membran proteini, HE:Hemagglutinin-Esteraz E: Zarf proteini (12)

lerde bulunmaktadır (13). S Glikoproteinler virionun dışında bulunur ve viriona tipik bir şekil verir. M proteinleri Golgi cihazında glikozillenir (14). M proteininde meydana gelen modifikasyon, virionun hücreye kaynaşması ve proteinin antijenik hale getirilmesi için gereklidir. M proteini, hücrede virionların yenilenmesinde önemli rol oynar (15). E proteinleri, hücre içindeki virionların birleştirilmesinde ve morfogenezinde fonksiyon göstermektedirler (16). N proteinleri, helikse bağlanabilen ve viral genomik RNA'nın esnek yapısına sahip olan fosfoproteinler olup virion yapısı, koronavirüslerin replikasyonu ve transkripsiyonunda kritik bir etkiye sahiptir (17).

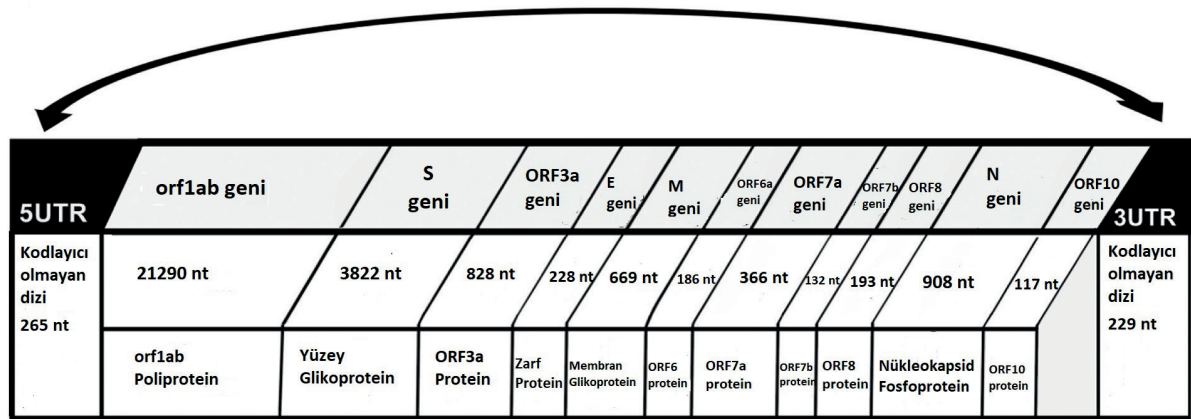
SARS-CoV-2'nin genom boyutu 29.8 kb ila 29.9 kb arasında değişiklik göstermektedir. Genomun 5' ucunun üçte ikisinden fazlası orf1ab kodlayan orf1ab poliproteinlerini içermekle birlikte 3' ucunun üçte biri S, E, M ve N proteinlerini içeren yapısal proteinleri kodlayan genlerden oluşmaktadır. SARS-CoV-2 genomu, ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF7b ve ORF8 genleri tarafından kodlanan 6 yardımcı proteine sahiptir (Şekil 4) (18).

## 2. SARS-CoV İLE KARŞILAŞTIRILDIĞINDA 2019-nCoV'NİN GENEL SEKANS ÖZELLİKLERİ

Yapılan çalışmalarda, SARS-CoV-2 amino asit seviyesinde SARS-CoV ile karşılaştırıldığında, SARS-CoV-2'nin SARS CoV ile oldukça benzer olduğu bulunmuştur ancak 8a, 8b ve 3b proteinlerinde bazı



## SARS-CoV-2 Tüm Genom (29903 nükleotid)



Şekil 4. SARS-CoV-2 genomunun yapısı (18)

önemli farklılıklar tespit edilmiştir. Tüm genom temelli dizi analizi, SARS CoV-2'nin SARS benzeri bat CoV'lere SARS CoV'lerden daha yakın olduğunu göstermektedir. Tüm genom seviyesinde, SARS-CoV-2, SARS-CoV (%70) ve MERS-CoV (%50)'e genetik olarak daha az benzemekle birlikte Bat-SL-CoVZXC2 ile % 87.23 dizi benzerliği ve bat-SL-CoVZC45 ile % 87.99 dizi benzerliğini paylaşır. Protein düzeyinde, SARS-CoV-2 ile bat-SL-CoVZC45 ve bat-SL-CoVZXC21 tarafından kodlanan proteinlerin çoğunun uzunlukları sadece birkaç minör insersiyon ve delesyonla birlikte benzerlik taşımaktadır (19).

Spike glikoprotein, koronavirüslerin yüzeyinde sivri uçlar oluşturarak virüslerin konakçı hücrelere girmesinden sorumludur. Spike glikoprotein molekülündeki reseptör bağlanma alanı (RBD), konakçı hücrelerin yüzeyindeki reseptörleri doğrudan bağlar. 2019-nCoV genomik dizisine GenBank veritabanından (MN908947.3) erişmek mümkündür. DNA ve prote-

in dizileri BLAST programıyla karşılaştırılmaktadır. Spike glikoproteininin ve bu glikoprotein RBD'sinin tüm genomu ve kodlama bölgesi için kapsama yüzdesi ve dizi benzerlik yüzdesi için veriler belirlenmiştir (Tablo 1). 2019-nCoV'un en yakın homologu, %99/87.99 dizi benzerliği ile yarasadan (MG772933.1) izole edilmiş SARS benzeri koronavirüstür (20).

GenBank erişim numaraları, SARS için AY274119, SARSv için AY525636, misk kedisi için AY304486, yarasa için AGZ48806.1 ve 2019-nCoV için MN908947.3'dür. SARS-CoV RBD'sinde ACE2 ile etkileşen amino asit kalıntıları ve diğer virüslerde korunmuş olanlar kırmızı ile vurgulanmıştır. Majör ikincil yapıların altı çizilmiştir ( $\beta$ -tabakası için çift alt çizgi). 2019-nCoV'deki majör değişmiş amino asitler yeşil renkle gösterilmiştir. Disülfür bağları oluşturan sistein kalıntıları ve N-bağlı glikozilasyon bölgeleri, sırasıyla sarı ve camgöbeği renkleriyle işaretlenmiştir (Şekil 5) (20).

SARS	323	CPFGVEVFNATKFPVSVYAWERKRIISNCVADYSVLYNSTFESTFKCYGVSATKLNLDLFCFSNVYADSFVVKGGDDVRQIAPGQTGVIADYNYKL
SARSv	323	CPFGVEVFNATKFPVSVYAWERKRISNCVADYSVLYNSTSFSTFKCYGVSATKLNLDLFCFSNVYADSFVVKGGDDVRQIAPGQTGVIADYNYKL
Misk kedisi	323	CPFGVEVFNATKFPVSVYAWERKRISNCVADYSVLYNSTSFSTFKCYGVSATKLNLDLFCFSNVYADSFVVKGGDDVRQIAPGQTGVIADYNYKL
Yarasa	324	CPFGVEVFNATKFPVSVYAWERKRISNCVADYSVLYNSTSFSTFKCYGVSATKLNLDLFCFSNVYADSFVVKGGDDVRQIAPGQTGVIADYNYKL
nCoV	336	CPFGVEVFNATKFPVSVYAWERKRISNCVADYSVLYNSTSFSTFKCYGVSATKLNLDLFCFSNVYADSFVVKGGDDVRQIAPGQTGVIADYNYKL
SARS	413	PDDFMGCVLAWNTRNIDATSTGNYNYKYRYLRHGKLRPFERDISNVFPSPDGKPCPTPF-ALNCYVWPLNDYGFYTTSGIGYQPYRVVLSFE
SARSv	413	PDDFMGCVLAWNTRNIDATSTGNYNYKYRYLRHGKLRPFERDISNVFPSPDGKPCPTPF-ALNCYVWPLNDYGFYTTSGIGYQPYRVVLSFE
Misk kedisi	413	PDDFMGCVLAWNTRNIDATSTGNYNYKYRYLRHGKLRPFERDISNVFPSPDGKPCPTPF-ALNCYVWPLNDYGFYTTSGIGYQPYRVVLSFE
Yarasa	414	PDDFMGCVLAWNTNSKDSSTSGNYNYLYRWRKSLNPFERDISNDIYSGGQSCAV-EPNCNPLRPYCFETTAGVGHQPYRVVLSFE
nCoV	426	PDDFTGCVLAWNTNSKDSSTSGNYNYLYRWRKSLNPFERDISNDIYSGGQSCAV-EPNCNPLRPYCFETTAGVGHQPYRVVLSFE

İlmeç 1 Tabaka 5

İlmeç 2 Tabaka 6 İlmeç 3

Şekil 5. Yakın ilişkili beş koronavirüsten spike glikoproteininin RBD'si için amino asit dizi sıralaması (20)



**Tablo 1.** Koronavirüslerle yakından ilişkili 2019-nCoV'un nükleotid dizilerindeki benzerlik (20)

Tanıml	Erişim numarası	Tüm virüs kapsamı/benzerlik	Spike glikoprotein kapsamı/benzerlik	RBD kapsamı/benzerlik
Yarasa SARS benzeri koronavirus izolatı bat-SL-CoVZC45	MG772933.1	%99/%87.99	%94/%83.45	%57/%75.52
Yarasa SARS benzeri koronavirus izolatı Rs4231	KY417146.1	%99/%80.70	%97/%74.4	%100/%72.71
Rhinolophus affinis koronavirus izolatı LYRa11	KF569996.1	%98/%80.60	%94/%75.53	%100/%72.29
Yarasa SARS benzeri koronavirus Rs3367	KC881006.1	%99/%80.67	%95/%75.16	%100/%74.18
Yarasa SARS benzeri koronavirus izolatı Rs9401	KY417152.1	%99/%80.66	%94/%74.85	%100/%73.44
Yarasa SARS benzeri koronavirus RsSHC014	KC881005.1	%99/%80.57	%95/%74.88	%100/%72.89
Yarasa SARS benzeri koronavirus izolatı bat-SL-CoVZXC21	MG772934.1	%98/%87.23	%92/%83.20	%55/%73.79
SARS koronavirus ZS-C	AY395003.1	%98/%80.30	%97/%74.56	%100/73.63
SARS koronavirus civet020	AY572038.1	%98/%80.21	%97/%74.5	%100/%73.21

### 3. COVID 19 TANISINDA MOLEKÜLER YÖNTEMLER

#### 3.1. Virüs izolasyonu ve Nükleik asit ekstraksiyonu

Virüs izolasyonu için, hastalardan alınan bronkoalveoler lavaj sıvıları veya nazofaringeal bölgenin apikal yüzeyleri yoluyla hava yolu epiteli (HAE) hücreleri kullanılmaktadır. HAE hücreleri, 37 °C'de inkübe edilen bir hava-sıvı arayüzünde tutulmaktadır. Hücreler, ışık mikroskopisi ile sitopatik etkiler açısından günlük olarak izlenerek hücre üst fazları, kantitatif RT-PCR yönteminde kullanılmak üzere toplanmaktadır (21). RNA, Nükleik Asit Pürifikasyon Sistemiyle hasta örneklerinden ve viral RNA mini kiti ile hücre kültürü üst fazlarından ekstrakte edilir (22).

Nükleik asit ekstraksiyonu için kullanılan örneklerin hacmi ve elüsyon hacmi, örnek tipine ve örneğin mevcut miktarına bağılıdır. Genel olarak, her bir solunum yolu örneği, idrar örneği, rektal sürüntü ve dışkıdan 250 µl, 55 µl'lik bir elüsyon hacmi ile her bir plazma örneğinin 100 µl'si, 25 µl'lik bir elüsyon hac-

miyle ekstraksiyona tabi tutulur. Ekstraktlar kullanılabileceği kadar -80°C'de saklanır (23).

#### 3.2. Primerler ve Problar

SARS-CoV-2'nin farklı gen bölgelerini (RdRp / helikaz [Hel], spike [S] ve N) hedefleyen primer ve prob setleri tasarlanır. SARS-CoV-2'ye spesifik olan problemlerin belirlenmesinde, BLASTn analiziyle yanlış pozitif test sonuçlarına yol açabilecek insan, diğere insan-patojenik koronaviruslar veya mikrobiyal genlerle homolojilerinin olmadığından emin olunmalıdır (23).

#### 3.3. Gerçek zamanlı-PCR (RT-PCR)

Gerçek zamanlı-ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), tanı virolojisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Akut solunum yolu enfeksiyonunda, RT-PCR rutin olarak solunum sekresyonlarından kaynaklanan virüsleri tespit etmek için kullanılır. Yapılan testlerde, örneklerdeki viral RNA konsantrasyonu, gerçek zamanlı RT-PCR'ler ve viral yükün mutlak ölçümü için tasarlanmış in vitro transkripsiyonlu RNA standartlarıyla belirlenmektedir (22).

RT-PCR, erken enfeksiyonu teşhis etmemize yardımcı olmak için yeterli hassasiyete sahiptir. Gerçek zamanlı RT-PCR testi ile ilgili önemli bir sorun, yanlış negatif ve yanlış pozitif sonuçlar ortaya çıkarma riskidir. COVID-19'un tipik klinik özelliklerine ve özdeş spesifik bilgisayarlı tomografi görüntülerine sahip birçok şüpheli vakanın teşhis edilmediği bildirilmiştir. Bu yüzden, negatif bir sonuç COVID-19 enfeksiyonu olasılığını dışlamaz ve tedavi veya hasta yönetimi kararları için tek kriter olarak kullanılmamalıdır (24).

Gerçek zamanlı RT-PCR ve klinik özelliklerin kombinasyonu, SARS-CoV-2 salgınının yönetimini kolaylaştırdığı görülmektedir. Farklı gen bölgeleri için primerler kullanılan RT-PCR sonuçlarının, viral RNA dizilerinin varyasyonundan etkilenebileceği iyi bilinmektedir. SARS-CoV-2 genomundaki primer ve prob hedef bölgelerindeki mutasyonlar nedeniyle yanlış negatif sonuçlar ortaya çıkabilir. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri, yanlış pozitif sonuç olasılığını en aza indirmek için SARS-CoV-2 Gerçek Zamanlı RT-PCR Teşhis Paneli tasarlamıştır (24).

Üretici protokolüne göre COVID-19 nükleik asit saptama kiti kullanılarak SARS-CoV-2 RT-PCR'i gerçekleştirilir. Spesifik olarak, açık okuma çerçevesi 1ab (ORF1ab) ve nükleokapsid protein (N) dahil olmak üzere iki hedef gen, gerçek zamanlı RT-PCR yöntemiyle test edilir. İki ardışık negatif sonuç elde edilirse, semptomların başlaması ile ilk negatif RT-PCR test sonucunun tarihi arasındaki süre viral nükleik asit dönüşüm süresi olarak tanımlanmaktadır (25).

Pfefferle S ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, E genini hedefleyen custom yapımı bir primer / prob seti, otomatik sistemde kullanım için optimize edilmiştir. Kullanılan her iki primer de, primer dimerlerin oluşumunu önlemek için sondan bir önceki bazlarından 2'-O-metil bazları ile modifiye edilmiştir. Master karışım (Mmx) kaseti (96 test için) 84 µL forward primer (400 nM, 5'-ACAGGTA-CGTTAATAGTTAATAGCmGT-3'), 84 µL reverse primer (400 nM, 5' ATATTGCAGCAGTACGCACAmCA-3') ve 10,5 µL prob (50 nM, 5'-Fam-ACA-CTAGCC/ZEN/ATCCTTACTGCGCTTCG-Iowa Black FQ-3') ile 182 µL su ve 5,640 µl Mmx2 karışımı birleştirilerek hazırlanmıştır. Cobas Omni Utility Channel yazılımındaki (Roche, Los Gatos, ABD) cihaz ayarları ve RT-PCR reaksiyonu için kullanılan sıcaklık profili Tablo 2'de özetlenmiştir (26).

### 3.4. SARS-CoV-2'nin Tam Genom Analizi

SARS-CoV-2'nin tam genom dizi analizi, betakoronavirüse ait olduğunu ancak geçmişte salgınlara neden olan SARS-CoV ve MERS-CoV'den farklı olduğunu ortaya koymuştur. SARS-CoV-2, Bat\_SARS benzeri koronavirüs ile birlikte sarbecovirüsün alt cinsinde farklı bir soy oluşturmaktadır. SARS-CoV-2'nin bir mozaik olmadığını ve Yunnan Eyaletinden yarasalarda tespit edilen BatCoV RaTG13 ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir. 2019-nCoV ve RaTG13 arasındaki genetik benzerlik seviyeleri, RaTG13'ün insanlarda salgına neden olan tam varyantı sağlamadığını, ancak 2019-nCoV'nin yarasa-

**Tablo 2.** SARS-CoV-2 PCR döngü koşulları ve çalışma şablonu oluşturmak için kullanılan Utility Channel yazılım ayarları (26)

Örnek tipi	Alkol bazlı sürüntü (400 µL giriş)				
	1	2:SARS-CoV-2 E-geni	3	4	IC
Kanallar	NA	1.5	NA	NA	Önceden tanımlanmış
RFI	NA	1.5	NA	NA	Önceden tanımlanmış
PCR döngü koşulları	UNG inkübasyonu	Pre-PCR basamağı	1. ölçüm	2. ölçüm	Soğutma
Döngü sayısı	Önceden tanımlanmış	1	5	45	Önceden tanımlanmış
Basamak sayısı		3	2	2	
Sıcaklık		55°C;60°C; 65 °C	95°C;55°C	91°C;58 °C	
Durdurma zamanı		120 s; 360 s; 240 s	5 s; 30 s	5 s; 25 s	
Veri toplama		-	Her döngünün sonu	Her döngünün sonu	

IC: iç kontrol; NA: uygulanamaz; RFI: nispi floresan artışı; UNG: urasil-DNA N-glikosilaz.

lardan kaynaklandığı hipotezinin çok muhtemel olduğunu göstermektedir. 2019-nCoV ve RaTG13 klanları arasında en yakın ortakları Bat\_SARS benzeri koronavirüs sekansları ile uyumsuz filogenetik ilişkiler olduğuna dair kanıtlar mevcuttur (27).

Swab örnekleri, Vero E6 hücreleri üzerine ekilerek sitopatik etki ve N bölgesi için primerler kullanılarak RT-PCR protokolü ile izlenmektedir. İzolatların pasaj 1'inden (P1) elde edilen hücre kültürü süpernatantı toplanır ve RNA, Viral RNA mini kiti ile izole edilir ve in vitro transkribe edilmiş RNA standardı ile nicelebilir. RNA'nın miktarı ve kalitesi Florometre ve Biyoanalizör kullanılarak değerlendirilir. Her örnek için 100 ng toplam RNA, Zymo-Seq RiboFree Ribozomal depleksiyon kütüphanesi hazırlama kiti kullanılarak işlenir. Elde edilen tüm kütüphaneler kalite kontrolünden geçirilerek ekimolar konsantrasyonda toplanmadan önce ölçülür ve standart prosedürler izlenerek Illumina Nano MiSEQ 2x150bp çift uçlu modda dizilenir. Kalite kontrolünden geçen sıralı okumalar (Phred skor  $\geq 30$ ) adaptör ve kalite kırılması uğrarken, kalan okumalar varsayılan parametre ayarlarıyla Megahit kullanılarak de novo olarak birleştirilir (28).

Genom Detektif Koronavirüs Tiplendirme Aracı, bilinen tüm virüs genomlarını yeni nesil dizileme veri setlerinden hızlı ve doğru bir şekilde bir araya getirmek için kullanılan web tabanlı bir yazılım uygulamasıdır. Bu uygulama, FASTA formatında birleştirilmiş genomlardan filogenetik kümelerin ve genotiplerin tanımlanmasını sağlar. Ayrıca Genom Detektif Koronavirüs Tiplendirme Aracı, koronavirüs türlerinin tüm genom ile test edilmesiyle SARS-CoV-2'nin tüm halka açık verilerin doğru bir şekilde sınıflandırılmasını sağlar ve salgın küresel olarak genişledikçe yeni viral mutasyonların izlenmesine de izin verir (29).

### 3.5. COVID-19 tanısında serolojik testlerin kullanımı

Spesifik IgM ve IgG antikorları için enzim bağlı immüno-sorbent assay (ELISA) gibi geleneksel serolojik analizler, yüksek verimli bir avantaja sahiptir ve RT-PCR yöntemiyle ortaya çıkan yanlış negatif durumlardan kaçınırlar. Serumdaki koronavirüs S ve N proteinlerinden sorumlu antikorların (IgM ve IgG) konsantrasyo-

nunu tespit etmek için serum örneklerinden ELISA ve kemilüminesans yöntemleri kullanılmaktadır (30).

Kaplama antijenleri olarak saflaştırılmış rekombinant N proteinleri (rNP) kullanılarak SARS-CoV-2'ye karşı IgM, IgA ve IgG antikorlarının saptanması için ELISA protokolü kullanılmaktadır. ELISA için kaplanmış rNP'lerin konsantrasyonu ve plazma dilüsyonları, satranç tahtası titrasyon testleri kullanılarak optimize edilmektedir. ELISA'ların kesim değerlerini belirlemek için, sağlıklı bireylerden alınan plazmanın ortalama değerleri ve SD'leri belirlenir. Antijenin optimal kaplama konsantrasyonu ve optimal plazma dilüsyonları tespit edilir. Cut off değerleri, negatif serumun 450 nm (A450) 'sindeki ortalama absorbans ve IgM, IgA ve IgG için sırasıyla belirlenen SD değerlerinin 3 katı olarak hesaplanır (31). SARS-CoV-2'ye özgü IgM ve IgG antikorlarının saptanması da teşhis için kullanılabilir. COVID-19 enfeksiyonu, pozitif spesifik IgM, spesifik IgG'nin negatiften pozitive dönüşümü, iyileşme döneminde IgG titresinde 4 kat artış şeklindeki kriterlerden biriyle belirlenebilmektedir (32). Bununla birlikte, daha yüksek hassasiyetli qPCR deneyleri, IgM ELISA'ları ile birleştirildiğinde tespit yöntemini daha da geliştirebilir (31).

Plazma örneklerinde SARS-CoV-2'ye karşı Ab, IgM antikor ve IgG antikor, üreticinin talimatlarına göre Beijing Wantai Biological Pharmacy Enterprise Co.,Ltd tarafından sağlanan ELISA kitleri kullanılarak test edilmiştir. HRP ile konjüge edilmiş antijen ve immobilize SARS-CoV-2 spike proteininin reseptör bağlanma alanını (RBD) içeren çift antijen sandviç immünoassayine (Ab-ELISA) dayalı toplam antikor tespiti için ELISA yöntemi geliştirilmiştir. IgM  $\mu$ -zinciri yakalama yöntemi (IgM-ELISA), Ab-ELISA ile aynı HRP-konjugat RBD antijenini kullanarak IgM antikorlarını saptamak için kullanılmaktadır. IgG antikorları, bir rekombinant nükleoprotein temelli indirekt ELISA kiti (IgG-ELISA) kullanılarak test edilmiş Ab, IgM ve IgG için assaylerin özgüllüğü, SARS-CoV-2 salgını öncesinde sağlıklı bireylerden toplanan örneklerin test edilmesiyle % 99.1 (211/213), % 98.6 (210/213) ve % 99.0 (195/197) olarak belirlenmiştir (33).

Yapılan çalışmalar, SARS-CoV-2'ye karşı IgM ve IgG antikorlarının hastalığın orta ve sonraki aşamala-

rında tespit edilebildiğini ve COVID-19'un serolojik tanısında ELISA tabanlı IgM ve IgG antikor testlerinin COVID-19 tanısı için büyük özgüllüğe sahip olduğunu göstermiştir. Patojen enfeksiyonuna karşı bağışıklık yanıtları sırasında IgM genellikle IgG antikorundan daha erken üretilir. Ayrıca, SARS-CoV-2'ye karşı hem IgM hem de IgG antikorları, semptom başladıktan sonraki 4. gün kadar erken bir zamanda tespit edilmektedir. Spesifik dolaşan antikorlar ELISA yöntemiyle düzgün bir şekilde tespit edilebilir, bu nedenle örnekleme veya solunum sisteminde virüs bulunmaması nedeniyle yanlış negatif sonuçlardan kaçınılır. COVID-19 pnömonisi, belirgin avantajlarla viral nükleik asit saptamaya alternatif olarak spesifik antikorların seropozitifine dayanarak belirlenebilir (34).

Bu derlemenin, COVID-19'un benzersiz özellikleri hakkındaki bakış açımızı geliştireceği ve gelecekte kontrol önlemlerimizi arttıracığı görüşündeyiz. COVID-19 hastalığına genetik yatkınlığın moleküler temellerinin ortaya konulmasıyla hastalığın etki mekanizmasının açıklığa kavuşturulması ve çözüm yollarının belirlenmesinde son derecede etkili olacaktır.

## SONUÇ

Koronavirüsler, tek sarmallı RNA virüsleri ailesinden olup, hayvanları ve insanları enfekte ederek solunum, gastrointestinal, hepatik ve nörolojik hastalıklara neden olabilir. Bu zamana kadar, alfa-koronavirüsler (HCoV-NL63 ve HCoV-229E) ve beta-koronavirüsler (HCoV-OC43, HCoV-HKU1), SARS-CoV ve MERS-CoV dahil olmak üzere altı insan koronavirüsü tanımlanmıştır (35).

SARS-CoV olduğu gibi, 2019-nCoV da solunum damlacıkları ile kişiden kişiye doğrudan geçebilir ve temas ve cansız objeler yoluyla da geçebileceği ortaya çıkan kanıtlarla doğrulanmıştır. 2019-nCoV ile enfekte olan bireylerin asemptomatik kuluçka süresinin 1 ila 14 gün (yüksek ihtimalle 3-10 gün) arasında değiştiği tahmin edilmektedir (36). 2019-nCoV, Wuhan, Çin'de şiddetli pnömonili hastalarda tanımlanmasından bu yana hızla yayılmıştır (37). COVID-19 hastalığının bilinen şiddeti, üst solunum yolu enfeksiyonu hafif semptomlarından ciddi pnömoniyeye kadar değişmekle birlikte, bildirilen vakaların

yüksek bir oranı hafif seyretmektedir (38).

SARS-CoV-2, 26-32kb boyutunda tek sarmallı pozitif sarmallı RNA genomuna sahiptir. Virüs, insan hücrelerinin yüzeyinde bulunan reseptörler aracılığıyla insan hücrelerine girer. Reseptör bağlanma bölgesinin girişini belirleyen spike proteini kullanılarak yapılan genom dizisi analizi, hem SARS-CoV hem de SARS-CoV-2 için baskın hücre yüzeyi reseptörünün ACE-2 olduğunu gösterir. MERS-CoV için baskın reseptör, dipeptidil peptidaz 4 (DPP4)'tür. COVID-19 ile enfekte olmuş bir kişiden enfekte olan ortalama birey sayısını veren temel üreme sayısı (R0), 2.2 ila 2.6 arasında değişmekte olup ikiye katlama zamanı 6.4 gündür. R0 1'den büyükse sürekli transmisyon öngörülür. SARS-CoV ve MERS-CoV'nin R0 değeri sırasıyla 1 ve 1,4 - 2,5'ten düşük olarak belirlenmiştir. SARS-CoV-2'nin daha yüksek R0'ı, virüsün daha bulaşıcı doğasını ve SARS-CoV-2'nin bir pandemi olarak potansiyelini göstermektedir (39).

SARS-CoV-2 enfeksiyon mekanizması, koronavirüsün, ACE2'nin membrana bağlı formuna bağlanması ve oluşan kompleksin konakçı hücre tarafından internalizasyonudur. ACE2'nin koronavirüs için ko-reseptör olmasından yola çıkarak, akciğer, kalp, böbrek, beyin gibi ACE2'yi eksprese eden çeşitli dokularda hücresel girişini ve SARS-CoV-2 enfeksiyonunu önlemek amacıyla bu enzimi bloke etmek ve ekspresyonunu azaltmak için yeni terapötikler üzerinde çalışılmaktadır (40).

COVID-19'lu yaşlı olguların mortalitesi genç ve orta yaşlı olguların mortalitesinden daha yüksek olup Pnömoni Şiddet Endeksi derecesi IV ve V olan olguların oranı genç ve orta yaşlı olgularınkinden anlamlı derecede fazladır. COVID-19'lu yaşlı olguların ciddi hastalığa geçme olasılığı daha yüksektir. 2019-nCoV'in risk değerlendirmesini ve yanıtını ortaya koyabilmek için virüsün biyolojik ve epidemiyolojik özellikleri hakkında daha fazla bilgiye hızlı bir şekilde ihtiyaç duyulmaktadır ve bu durum 2019-nCoV kontrolüne ve önlenmesine fayda sağlayacaktır.

Sonuç olarak; COVID-19'un dünyaya yayılmasını önlemek için alınan tedbirlerle, pandeminin SARS ve MERS'de olduğu gibi iki-üç aylık zaman dilimi içinde



vaka sayılarının azalacağını düşünmekteyiz. Koronavirüs hastalığına karşı geliştirilmiş bir aşı Ŗu anda mevcut değildir. Alınan önlemler daha çok kaynak kontrolü ve bulaş yoluna yöneliktir. Yeni koronavirüs ile ilgili temas zincirinin taranarak hastalığın kaynağının belirlenmesi ve gerekli önlemlerin daha yayılmadan alınması COVID19 ile mücadele açısından son derece önem arz etmektedir. 2019-nCoV'un bulaşmadığı insanları bağışık kılarak, salgının önüne geçmeyi hedefleyen aşı çalışmalarıyla birlikte var olan olguları tedavi etmeye yönelik ilaç geliştirme çalışmaları tüm dünyada hızla devam etmektedir. SARS-CoV-2 genom bazlı spesifik aşilar ve terapötik antikorlar üzerinde denemeler test edilirken, güvenilirlikleri kapsamlı deneme çalışmaları gerektirdikleri için bu süreç uzun zaman almaktadır. Ayrıca; direkt SARS-CoV-2'yi hedefleyebilecek en hızlı tedavi seçeneklerinden biri bu hastalığı atlatan insanların bu virüse karşı antikor içerdiği kabul edilen serum veya plazmalarının gerek koruyucu ve gerekse de tedavi amaçlı olarak kullanılmasını içermektedir.

Hastalığa yakalanan bireylerin klinik tablosunda görülen ileri derecede farklılıklar Covid-19'a yanıtta bireysel genetik faktörlerin önemli bir yeri olduğunu göstermektedir. SARS-CoV2 virüsünün bloke edilmesini sağlayacak ilaçların üretilmesine yönelik viral zarf glikoproteinlerinin yüzeyinde bulunan glikanları hedefleyebilen proteinlerin (lektinler) kullanımı genetik mühendisliğin etkili yaklaşımları arasında yer almaktadır. Genetik yatkınlığa ek olarak, virüsün vücuda girme yolu, viral maruz kalma miktarı gibi diğer olası nedenlerin de hastalığın seyri açısından dikkate alınması gerekmektedir. Ayrıca, COVID-19 ile mücadelede genomun farklı bölgelerine yeni genetik materyalin eklenmesini var olanın ise çıkartılarak değişimine olanak sağlayan CRISPR genom düzenleme teknolojisi, in vitro ortamda COVID-19'un %90'a yakın bir oranında yok edilmesini sağlarken insanlarda hastalığı durdurmak için de kullanılabilceği yönünde ortaya atılan hipotezlerde mevcuttur.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Peer Review:** Externally peer-reviewed.

**Yazar Katkıları:** Çalışma Konsepti/Tasarım- G.Ö, H.İ.; Veri Toplama- G.Ö, H.İ.; Veri Analizi/Yorumlama- G.Ö, H.İ.; Yazı Taslağı- G.Ö, H.İ.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- G.Ö, H.İ.; Son Onay ve Sorumluluk- G.Ö, H.İ.; Süpervizyon- G.Ö, H.İ.

**Author Contributions:** Conception/Design of Study- G.Ö, H.İ.; Data Acquisition- G.Ö, H.İ.; Data Analysis/Interpretation- G.Ö, H.İ.; Drafting Manuscript- G.Ö, H.İ.; Critical Revision of Manuscript- G.Ö, H.İ.; Final Approval and Accountability- G.Ö, H.İ.; Supervision- G.Ö, H.İ.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir

**Conflict of Interest:** Authors declared no conflict of interest.

**Finansal Destek:** Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

**Financial Disclosure:** Authors declared no financial support.

## KAYNAKLAR/REFERENCES

1. Xu X, Yu C, Qu J, Zhang L, Jiang S, Huang D, et al. Imaging and clinical features of patients with 2019 novel coronavirus SARS-CoV-2. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2020;47(5):1275-280.
2. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 2020;579(7798):270-73.
3. Liu Y, Yang Y, Zhang C, Huang F, Wang F, Yuan J, et al. Clinical and biochemical indexes from 2019-nCoV infected patients linked to viral loads and lung injury. *Sci China Life Sci* 2020;63(3):364-74.
4. Al-Tawfiq JA, Zumla A, Memish ZA. Travel implications of emerging coronaviruses: SARS and MERS-CoV. *Travel Med Infect Dis* 2014;12(5):422-8.
5. Sutton TC, Subbarao K. Development of animal models against emerging coronaviruses: From SARS to MERS coronavirus. *Virology* 2015;479-480:247-58.
6. Chen G, Wu D, Guo W, Cao Y, Huang D, Wang H, et al. Clinical and immunological features of



- severe and moderate coronavirus disease 2019; *J Clin Invest* 2020; 130(5):2620-9. doi: 10.1172/JCI137244.
7. Singhal T. A Review of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19). *Indian J Pediatr* 2020;87(4):281-6.
  8. Wang Y, Wang Y, Chen Y, Qin Q. Unique epidemiological and clinical features of the emerging 2019 novel coronavirus pneumonia (COVID-19) implicate special control measures. *J Med Virol* 2020;1-9. doi: 10.1002/jmv.25748.
  9. Huentelman MJ, Zubcevic J, Hernández Prada JA, Xiao X, Dimitrov DS, Raizada MK, et al. Structure-Based Discovery of a Novel Angiotensin-Converting Enzyme 2 Inhibitor. *Hypertension* 2004;44(6):903-6.
  10. Mousavizadeh L, Ghasemi S. Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis. *J Microbiol Immunol Infect* 2020; doi.org/10.1016/j.jmii.2020.03.022. (Epub ahead of print)
  11. Yan R, Zhang Y, Li Y, Xia L, Guo Y, Zhou Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science* 2020;367(6485):1444-8.
  12. Weiss SR, Leibowitz JL. Coronavirus Pathogenesis. *Adv Virus Res* 2011;81:85-164. doi: 10.1016/B978-0-12-385885-6.00009-2
  13. Lissenberg A, Vrolijk MM, van Vliet AL, Langereis MA, de Groot-Mijnes JD, Rottier PJ, et al. Luxury at a cost? Recombinant mouse hepatitis viruses expressing the accessory hem agglutinin esterase protein display reduced fitness in vitro. *J Virol* 2005;79:15054-63.
  14. Graham RL, Baric RS. Recombination, reservoirs, and the modular spike: mechanisms of coronavirus cross-species transmission. *J Virol* 2010; 84 (7):3134-46.
  15. de Haan CA, de Wit M, Kuo L, Montalto-Morrison C, Haagmans BL, Weiss SR, et al. The glycosylation status of the murine hepatitis coronavirus M protein affects the interferogenic capacity of the virus in vitro and its ability to replicate in the liver but not the brain. *Virology* 2003;312(2): 395-406.
  16. Ruch TR and Machamer CE. The Coronavirus E Protein: Assembly and Beyond. *Viruses* 2012;4(3):363-82.
  17. Escors D, Ortego J, Enjuanes L. The membrane M protein of the transmissible gastroenteritis coronavirus binds to the internal core through the carboxyterminus. *Adv Exp Med Biol* 2001; 494: 589-93.
  18. Khailany AR, Safdar M, Ozaslan M. Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2. *Gene Rep* 2020: 1-6. doi: 10.1016/j.genrep.2020.100682
  19. Wang H, Li X, Li T, Zhang S, Wang L, Wu X, et al. The genetic sequence, origin, and diagnosis of SARS-CoV-2. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2020; 24: 1-7. doi: 10.1007/s10096-020-03899-4 [Epub ahead of print]
  20. Chen Y, Guo Y, Pan Y, Zhao ZJ. Structure analysis of the receptor binding of 2019-nCoV. *Biochem and Biophys Res Commun* 2020; 525(1):135-40.
  21. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* 2020;395(10224):565-74.
  22. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DKW, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill* 2020; 25(3): doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
  23. Chan JF, Yip CC, To KK, Tang TH, Wong SC, Leung KH, et al. Improved Molecular Diagnosis of COVID-19 by the Novel, Highly Sensitive and Specific COVID-19-RdRp/Hel Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay Validated In Vitro and with Clinical Specimens. *J Clin Microbiol* 2020;23:58(5) : doi: 10.1128/JCM.00310-20.
  24. Tahamtana A, Ardebili A. Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results. *Expert Rev Mol Diagn* 2020 May;20(5):453-454. doi: 10.1080/14737159.2020.1757437.
  25. Xiao TA, Tong XY, Zhang S. Profile of RT-PCR for SARS-CoV-2: a preliminary study from 56 COVID-19 patients. *Clin Infec Dis*. 2020; doi: 10.1093/cid/ciaa460.
  26. Pfefferle S, Reucher S, Nörz D, Lütgehetmann M. Evaluation of a quantitative RT-PCR assay for the detection of the emerging coronavirus SARS-

- CoV-2 using a high throughput system. *Euro Surveill* 2020;25(9):200152. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.9.2000152
27. Paraskevis D, Kostaki EG, Magiorkinis G, Panayiotakopoulos G, Sourvinos G, Tsiodras S. Full-genome evolutionary analysis of the novel corona virus (2019-nCoV) rejects the hypothesis of emergence as a result of a recent recombination event. *Infect Genet Evol* 2020;79:104212. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104212.
  28. Licastro D, Rajasekharan S, Dal Monego S, Segat L, D'Agaro P, Marcello A, et al. Isolation and full-length genome characterization of SARS-CoV-2 from COVID-19 cases in Northern Italy. *J Virol* 2020; doi: 10.1128/JVI.00543-20.
  29. Cleemput S, Dumon W, Fonseca V, Karim WA, Giovanetti M, Alcantara LC, et al. Genome Detective Coronavirus Typing Tool for rapid identification and characterization of novel coronavirus genomes. *Bioinformatics* 2020; doi: 10.1093/bioinformatics/btaa145.
  30. Zhong L, Chuan J, Gong BO, Shuai P, Zhou Y, Zhang Y, et al. Detection of serum IgM and IgG for COVID-19 diagnosis. *Sci China Life Sci* 2020;25 :1-4. doi: 10.1007/s11427-020-1688-9. (Epub ahead of print)
  31. Guo L, Ren L, Yang S, Xiao M, Chang, Yang F, et al. Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). *Clin Infect Dis* 2020;21: doi: 10.1093/cid/ciaa310.
  32. Zhou M, Zhang X, Qu J. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): a clinical update. *Front Med* 2020;1-10. doi: 10.1007/s11684-020-0767-8. (Epub ahead of print)
  33. Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clin Infect Dis* 2020;28: doi: 10.1093/cid/ciaa344.
  34. Xiang F, Wang X, He X, Peng Z, Yang B, Zhang J, et al. Antibody Detection and Dynamic Characteristics in Patients with COVID-19. *Clin Infect Dis* 2020; 19: doi: 10.1093/cid/ciaa461.
  35. Wu D, Wu T, Liu Q, Yang Z. The SARS-CoV-2 outbreak: What we know. *Int J Infect Dis* 2020;94:44-8. doi: 10.1016/j.ijid.2020.03.004. (Epub ahead of print)
  36. Chen J. Pathogenicity and transmissibility of 2019-nCoVdA quick overview and comparison with other emerging viruses. *Microbes Infect* 2020; 22(2):69-71.
  37. Li G ve De Clercq E. Therapeutic options for the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV). *Nat Rev Drug Discov* 2020;19(3):149-50.
  38. Lake MA. What we know so far: COVID-19 current clinical knowledge and research. *Clinical Medicine* 2020; 20(2):124-7.
  39. Meethal ME, Ollakkott S, Varma GG. COVID-19 and SARS-CoV-2: Molecular Genetics Perspectives. *Indian J Nat Sci* 2020; 59(10):18751-18757.
  40. South AM, Diz DI, Chappell MC. COVID-19, ACE2, and the cardiovascular consequences. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2020;318(5): doi: 10.1152/ajpheart.00217.2020.



## Distant Pedicled Flaps for Elbow Coverage- a Systematic Review

### Dirsek Bölgesi Defektlerinin Onarımında Uzak Pediküllü Flepler: Sistemik Derleme

Ömer Berköz<sup>1</sup> , H. Utkan Aydın<sup>1</sup> 

#### ABSTRACT

Coverage of elbow defects can be challenging for reconstructive surgeons. The intended reconstruction not only has to cover and protect the underlying structures but also allow for smooth functioning of the joint. Even in the era of microsurgery, certain defects are not amenable to reconstruction with regional flaps or free flaps. Pedicled flaps from the abdomen play a critical role in such cases to salvage the elbow and hence the limb. While there are multiple such flaps mentioned, a systematic review is lacking. This systematic review aims to look at all the pedicled flaps from the abdomen to the elbow reported in the literature. After an extensive search of multiple databases, 159 articles were obtained, of which 31 were selected. The flaps reported in the selected articles were grouped into muscle/musculocutaneous or skin/fasciocutaneous flaps. While the latissimus dorsi appeared to be the most utilized flap overall to cover the defect in the elbow region, paraumbilical perforator-based flaps were the most common among the fasciocutaneous flaps. This review highlights the commonly used flaps, and discusses the advantages and disadvantages of each. In view of the considerable overlapping names of various fasciocutaneous flaps, we offer a nomenclature for better communication and understanding.

**Keywords:** Elbow, reconstruction, pedicled flap

#### Öz

Dirsek bölgesi defektlerinin kapatılması rekonstrüktif cerrahlar için kendine özgü çeşitli güçlükler içerir. Amaçlanan rekonstrüksiyon sadece allta yatan yapıları örterek korumakla kalmamalı, aynı zamanda dirsek ekleminin sorunsuz hareketine de izin vermelidir. Mikrocerrahi çağında bile bazı defektlerin bölgesel ya da serbest fleplerle onarımı olanaklı olmayabilir. Bu tip olgularda abdomenden hazırlanan pediküllü flepler dirseğin ve dolayısı ile ekstremitenin kurtarılmasında çok önemli bir rol oynarlar. Bu amaçla pek çok flep tanımlanmış olsa da bu konu üzerine yazılmış derlemelerin sayısı kısıtlıdır. Bu sistemik derlemenin amacı literatürde dirsek bölgesi defektlerinin onarımı için abdomen bölgesinden hazırlanan flepleri konu alan çalışmalarını gözden geçirmektir. Bu amaçla çeşitli veri bankalarının kapsamlı taraması sonucu bulunan 159 makalenin 31 tanesi seçildi. Seçilen makalelerde bahsi geçen flepler kas / muskulokutan ya da cilt/ fasyokutan flepler olarak sınıflandırıldı. Genel olarak, latissimus dorsi flebi dirsek bölgesi fleplerinin kapatılması için kullanılan en yaygın flep olarak ortaya çıksa da, paraumbilikal perforatörlere baze flepler en sık kullanılan fasyokütan flepler idi. Bu derleme, en sık kullanılan flepleri ortaya koyup bunların kullanımı ile ilgili avantaj ve dezavantajları tartışmaktadır. Farklı fasyokütan flepleri tanımlamak için kullanılan terimler arasında karışıklığa yol açacak derecede bir örtüşme olduğundan, bu fleplerin daha iyi anlaşılması ve daha iyi iletişim için yeni bir tanımlama şablonu da sunulmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Dirsek, rekonstrüksiyon, pediküllü flep

<sup>1</sup> Istanbul University, Faculty of Medicine,  
Department of Plastic, Reconstructive and  
Aesthetic Surgery, Hand Surgery,  
Istanbul, Turkey

ORCID: Ö.B. 0000-0001-8063-9995;  
H.U.A. 0000-0001-7091-2599

#### Corresponding author/Sorumlu yazar:

Ömer Berköz,  
Istanbul University, Faculty of Medicine,  
Department of Plastic, Reconstructive and  
Aesthetic Surgery, Hand Surgery, Istanbul, Turkey  
E-mail: berkoz@gmail.com

Submitted/Başvuru: 18.04.2020

Accepted/Kabul: 24.05.2020

**Citation/Atf:** Berköz O, Aydın HU. Distant Pedicled  
Flaps for Elbow Coverage- a Systematic Review.  
Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi 2020;  
3(2): 72-80.  
<https://doi.org/10.26650/JARHS2020-722703>



## INTRODUCTION

Elbow defects arise due to a variety of causes such as trauma, infection, burn contracture release or tumor excision. Defects around the elbow are challenging to manage due to a multitude of factors. The reconstruction should cover the exposed joint, bones, tendons, vessels, nerves, hardware and thus necessitate flap coverage. A pliable yet well-padded reconstruction is needed to prevent any contracture and to facilitate mobilization. The reconstruction should be durable and also allow for future procedures if needed. Finally, there should be minimal donor site morbidity.

For smaller defects of the elbow there are many options from the same arm. Transposition flaps, lateral arm flaps, radial artery flaps, posterior interosseous flaps and various local muscle flaps can be used (1-3). However, if the defect is large and the zone of injury extends further, local and regional flaps may not be sufficient. Healthy vascularized tissue needs to be brought in for reconstruction. This can be done in two ways, either as a free flap or as a pedicled flap from abdominal tissues. Free flaps have a unique set of advantages and disadvantages independent of the location of the defect. The recipient site considerations are related to finding suitable vessels for anastomosis. Nevertheless, free flaps are not always possible or successful. The donor vessels may be in the zone of trauma necessitating long vein grafts.

The alternative option is pedicled flaps from abdominal tissues. While there are different abdominal flaps mentioned, a detailed review is lacking. Most discussion on elbow coverage highlights various local flaps followed by free flaps with little description of pedicled flaps from the abdomen (4). However, many authors have noted that even in the era of microsurgery, the distant pedicled flaps have a role to play in elbow coverage (2-3). We believe that a review of literature to investigate all flaps for elbow coverage from abdomen with their anatomical basis, surgical technique and clinical outcome would be beneficial. The current study is based on reviewing the literature for various pedicled abdominal flaps for elbow coverage to highlight the indications, the advantages, and disadvantages.

## MATERIAL AND METHODS

This systematic review was conducted following the guidelines published by Khan and colleagues (5). Review was done as per PRISMA guidelines. A search was carried out on various databases such as Scopus, Google Scholar, PubMed, Web of Science and Cochrane Library. The keywords "Elbow defect" and "Abdominal flap" were used to search the databases. The resulting articles were retrieved and the abstracts were read. Duplicated articles or articles not in English were excluded. Only articles pertaining to flap for elbow defect were selected. Full text articles were obtained and were read by two authors. Only relevant articles were selected.

The articles were included if they described any pedicled flap from abdomen to cover the defects around the elbow. The exclusion criteria were - the flap not from the abdomen, flap was a free flap, no clinical application mentioned or the defect was other than the elbow region. The references in the full text articles were reviewed for additional articles. The extracted articles were independently reviewed by two authors.

## RESULTS

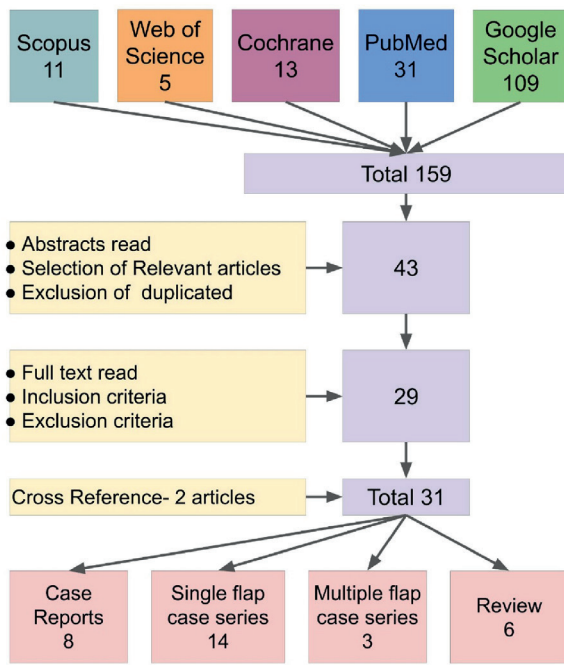
A total of 159 articles were obtained; 11 articles in Scopus, 5 articles in Web of Science, 109 articles in Google Scholar, 31 in PubMed and 3 in Cochrane Library. In the first step, the abstracts were read and duplicates were excluded- thus selecting 43 articles. In the second step, the full length articles were obtained and read. According to previously mentioned inclusion and exclusion criteria, a total of 29 articles were included. Two additional articles were obtained after searching the references. Hence a total of 31 articles were included.

Among the 31 articles, eight were case reports, 14 were case series with a single flap, 3 were case series with multiple flaps and six were review articles (Fig. 1). Various flaps were utilized for coverage of elbow defects. The types of flaps done from abdomen to the elbow region is shown in Table 1.

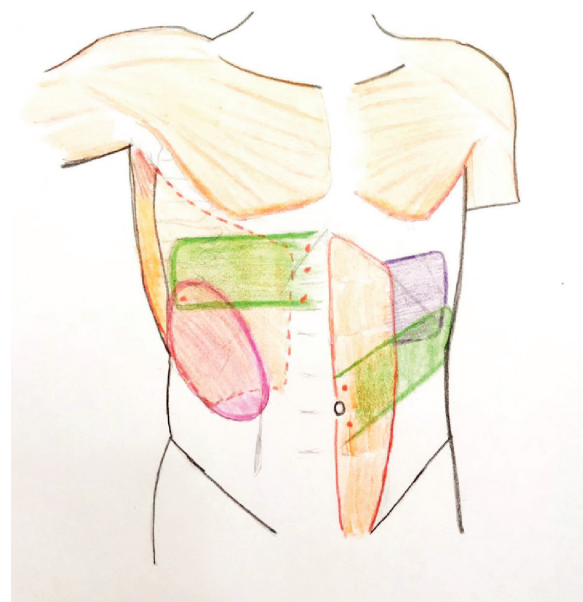
Latissimus dorsi flap, either as a muscle or myocutaneous, was by far the most common flap used for elbow coverage from the abdomen. This was followed by various fasciocutaneous flaps. There were rare instances of rectus muscle flap, parascapular flap, and bilateral groin flaps being used.

**Table 1.** A summary of flaps from abdominal tissue to the elbow reported in the articles which are included in our systematic review

Skin/ Fasciocutaneous		No. of cases (%)	Complications reported
1	Paraumbilical perforator based flaps <ul style="list-style-type: none"> <li>• Oblique (Thoraco umbilical)</li> <li>• Transverse (Thoraco epigastric)</li> <li>• Thoraco abdominal (random pattern)</li> </ul>	25 (16.8%)	Donor site scar, bulky in females, Hematoma
2	Lateral intercostal perforator based flap	8 (5.4%)	Scar, Bulky flap
3	External oblique fasciocutaneous	5 (3.3%)	Donor site scar, Cellulitis of abdominal wall-treated with antibiotics
4	Islanded Parascapular flap	1 (0.6%)	None reported
5	Extended/ Bilateral Groin	3 (2%)	None reported
Muscle/ myocutaneous flaps			
1	Latissimus dorsi	96 (64.8%)	Donor site seroma, wound infection, dehiscence, partial skin graft loss
2	Rectus abdominis	4 (2.7%)	Abdominal wall laxity, hernia, Bulky flap



**Figure 1.** Flowchart diagram showing the process of systematic review



**Figure 2.** Representative diagram showing common pedicled flaps from abdomen. a. (Pink): Intercostal perforator flap; b. (Purple): Thoracoabdominal flap; c. (Green) Thoracoumbilical flap; d. (Green): Thoracoepigastric flap. Also outlined are the muscle flaps - rectus abdominis (e) and latissimus dorsi (f)

### Clinical and Research Consequences

Various pedicled flaps have been described in the literature, that can be broadly classified into skin or fasciocutaneous flaps and muscle or myocutaneous flaps. (Fig. 2).

#### A. Skin or Fasciocutaneous flaps from abdomen for elbow coverage

The vascularity of the anterior abdomen mainly consists of the perforators of superficial and deep inferior epigastric circulation medially, and segmen-



tal branches of intercostal, subcostal and lumbar arteries laterally (6). The fasciocutaneous flaps follow a similar pattern.

#### **a. Medially based flaps**

Earlier publications of use of abdominal skin for coverage of elbow defects were predominantly about random flaps. Based on their location and pattern, they were named thoracoabdominal, thoracoepigastric, thoracoumbilical, etc. With increase in the awareness of vascularity of the abdominal wall, the nomenclature of such flaps has changed. There are numerous terminologies used for these flaps with considerable overlap, especially for the umbilical perforator based flaps. Depending on its geometrical design, the flap has been named as thoracoumbilical flap, thoracoepigastric flap, extended deep inferior epigastric artery flap, paraumbilical flap or oblique paraumbilical perforator-based flap.

As it is appropriate to name the flap based on its principal blood supply, we recommend the term paraumbilical perforator flap. The location and direction of the flap determines whether it is oblique or transverse. Oblique flaps extend from the umbilical (thoracoumbilical) to the thoracic region, and transverse flaps extend from the epigastric region (thoracoepigastric) to the thoracic region. We have provided the following nomenclature for better understanding and communication.

**i. Thoracoumbilical:** This term should be reserved for flaps which have their base around the umbilicus and extend laterally and superiorly towards the lateral chest wall. The vascularity is based on paraumbilical perforators.

**ii. Thoracoepigastric:** This term should be used for flaps which have a transverse orientation with their base in the epigastric area and extending laterally towards the chest wall. Their vascularity is based on the perforating branches of deep inferior epigastric and internal mammary networks.

**iii. Thoracoabdominal:** We propose this term to be reserved for random pattern flaps. They can be anteriorly based or posteriorly based. The term tho-

raco-abdominal flap should be limited to broad based random pattern flaps as the term thoracoabdominal is nonspecific and does not specify the underlying blood supply nor orientation.

#### **i. Thoracoumbilical flaps**

Thoracoumbilical flaps have their bases at the umbilicus and derive their blood supply from paraumbilical perforators. Seitchik and Garnick were the first to describe such a flap for elbow coverage (8). They named it extended deep inferior epigastric artery flap as they extended it to the level of the scapular tip. However, this was often complicated with tip necrosis of the flap. With advances in the knowledge of the vascular anatomy of the abdomen, O'Shaughnessy and Ralwani termed this flap "oblique paraumbilical perforator flap". This flap was based on the paraumbilical perforators of the deep inferior epigastric artery and its anastomosis between the perforators of the intercostal vessels (9). In the two cases described by the authors, one was for a proximal forearm and elbow, and the second was for a below elbow amputation stump. The authors noted that this design allows for a longer length of the flap and comfortable positioning compared to other pedicled flaps.

Similar observations were noted by Naduthodikayil and Bhandari, who in addition noted that this flap would place the hand in a nondependent position (10). They noted that 3-4 perforators were consistently present at the base of the flap obviating a need for a preoperative Doppler examination. Their series of 11 patients included a case of circumferential elbow defect, which is a challenge to reconstruct. Naduthodikayil and Bhandari were successful in covering the circumferential elbow defect with the oblique design and delay of the flap posterior to the mid-axillary line. This significant achievement demonstrated the importance of pedicled abdominal flaps for elbow coverage and, importantly, limb salvage. Ramadevi and Kumar demonstrated successful reconstruction of defects on the volar, dorsal, medial and lateral aspect of the elbow with this flap (11). As recommended by several authors, we recommend delaying the flap when extending beyond the mid-axillary line.

In this review, we found that thoracoumbilical flaps were the most commonly used fasciocutaneous flaps for elbow coverage. This flap has the advantage of long length, ability to close the donor site primarily, nondependent positioning of the hand. The drawbacks include scar widening.

## ii. Thoracoepigastric flaps

These flaps are based on the epigastric region and extend to the thoracic region. The upper margin of the flap is at inframammary fold, the lower margin about 10-16cm caudal to the upper margin. This flap is based on the perforators of the deep inferior epigastric artery and the internal mammary artery.

Davis and McCraw reported this flap as “Thoracoabdominal flap” in 38 patients. Although they predominantly used this flap for mastectomy and chest wall defects, they also used it for elbow defects. They noted that the axial supply extends till anterior axillary line and any extension further is random pattern (7). They emphasized the importance of including fascia with the flap and including the vessels perforating the rectus sheath, failure to do so would jeopardize the flap. Hallock and Dingeldien described the use of flap which was similar to the one described by Davis and termed it more appropriately as “thoracoepigastric flap”. Like the description by Davis, the upper margin was in inframammary fold and the lower margin was 10-16 cm caudal to upper margin. They also suggested delaying the flap if it extends beyond the posterior axillary line. They reported two patients with post-burn elbow defects where they used this flap successfully for coverage (6). This flap has been largely replaced by the thoracoumbilical flap as described above.

## iii. Thoracoabdominal flaps (Random pattern flaps)

As mentioned previously, we reserved the term thoracoabdominal for random pattern flaps emerging from the chest and abdominal wall. The term thoracoabdominal is nonspecific and does not state the orientation or vascularity (Fig. 3).



**Figure 3.** A case with an exposed elbow arthrodesis plate after resection of a giant cell tumor. Exposed flap was covered with a pedicled thoracoabdominal flap

Even in the era of microsurgery, these pedicled flaps have a role in treatment of both civilian and military injuries. In case of military injuries, Farber and Taylor noted that free flaps are often not a viable solution because vascular tie-in points are often compromised or a far proximal anastomosis is needed, that is not practical (12). In their series of 2 patients, Farber et al used this flap based both anteriorly and posteriorly. They noted several advantages such as adequate soft tissue coverage of small to significant size and durability of the flap over joint motion and prosthetic wear. These flaps were broad based and not dependent on any single source vessel. Hence, they are likely to have a “random pattern” vascularity.

## b. Laterally based flaps

### i. Intercostal perforator based flap

The use of lateral intercostal perforator-based flaps for reconstruction of elbow defects was described by Yunchuan and Jiaqin et al (13). These flaps were based on the lateral cutaneous branch of the posterior intercostal artery. The authors preferred the area between the 7th and 10th intercostal space. The flap could be designed as vertical, oblique or short transverse. Flaps measuring up to 16x12 cm were demonstrated by the authors. The authors believe that patient positioning is superior with this flap compared to other flaps.

Further, intercostal perforator flaps can be harvested from the contralateral side.

Pirela-Cruz and Reddy et al described an anteriorly based, intercostal perforator flap (14). While posteriorly based flaps are solely dependent on intercostal perforators, the anteriorly based flaps do receive contribution from periumbilical perforators based on the location.

#### ii. External oblique fasciocutaneous flap

This flap is based on the perforators entering the skin through the external oblique muscle. Flap elevation begins on the lateral margin of the rectus abdominis muscle. The external oblique aponeurosis is included in the flap. As flap dissection proceeds laterally, the fascia overlying external oblique muscle is included in the flap, dissecting it off the muscle fibers. This dissection is continued until the mid-axillary line when the vascular pedicle comes into view. Fisher described the use of external oblique fasciocutaneous flap in five patients in 1983 (15). Flaps measuring up to 8x18 cm were used, predominantly for posterior defects of the elbow.

### Other Less Common Fasciocutaneous Flaps

Our literature review resulted in some uncommon flaps. Leena reported the use of pedicled parascapular flaps for coverage of elbow stump in a single stage reconstruction (16). The parascapular flap is based on the circumflex scapular artery, which has a pedicle length up to 10cm. The flap was eccentrically based in order to gain more length. The flap was tunneled through the posterior axillary fold to reach the defect. Reyad and Tallal reported a case of bilateral groin and hypogastric flap for coverage of an extended wound involving elbow, forearm and hand (17).

### B. Muscle or myocutaneous flaps from abdomen for elbow coverage

The two main muscle flaps from the abdomen include latissimus dorsi and rectus abdominis.

#### a. *Latissimus dorsi (LD)*

LD is a large muscle with a wide arc of rotation. It can be used for a variety of defects including the elbow. Ooi and Ng et al have described LD to be the workhorse flap for elbow reconstruction (18). Its advantages include coverage of large surface area, reliable and constant blood supply, the ability to reconstruct in a single stage procedure without need for immobilization, minimal donor site morbidity in most patients and the possibility of using it as a functional muscle transfer for elbow flexion or extension. Schottstaedt et al first described functional muscle transposition (19). This work was further elaborated by Zancolli and Mitre (20). Jutte and Rees et al described the use of pedicled LD flaps to cover soft tissue defects at the elbow (21). In a detailed description Stevanovic and Sharpe et al even went on to suggest using pedicled LD as a prophylactic measure in complex elbow injuries (3).

LD can be used as a muscle flap with skin grafting over the muscle, and it can be used as a myocutaneous flap with a skin island overlying the muscle (Fig. 4, Fig 5). The island can be designed obliquely or transversely in women to hide under the brassiere. Skin islands as large as 8x20 cm can be closed primarily. The anterior transposition can reach 8.4 cm distal to olecranon, while the posterior transposition can reach up to 6.5 cm distal to olecranon. Stevanovic et al recommend incising the skin overlying the trans-



**Figure 4.** A case with an open elbow fracture resulting from a motor vehicle accident. Ulnar nerve defect was reconstructed with a sural nerve graft and the soft tissue defect was covered with a pedicled latissimus dorsi musculocutaneous flap and split thickness skin graft





**Figure 5.** The case presented in Fig. 4 eleven months after wound coverage with pedicled latissimus dorsi musculocutaneous flap

posed muscle rather than a subcutaneous tunnel to avoid pressure on the pedicle.

To cover a very large area following soft tissue sarcoma resection and axillary node dissection, Nicolli and Orfanotis et al used the latissimus dorsi with its skin paddle continuing onto groin flap including inguinal nodes. The large myocutaneous flap was transposed and supercharged by anastomosing superficial circumflex iliac artery to radial artery (22). While the LD muscle acted as a functional transfer, the inguinal nodes were transferred to prevent upper limb edema.

Use of LD muscle can be contraindicated in patients who would need lifelong crutch or wheelchair use. Caution should be exercised while using them in patients who have a high risk of breast cancer as it may be needed for future breast reconstruction.

### ***b. Rectus abdominis***

The less common muscle flap from the abdomen is the rectus, which can be used as a muscle only flap with a skin graft or as a myocutaneous flap. However, compared to LD, the rectus flap is a two staged procedure and would need a division after three weeks. Further, loss of rectus is not without complications. Hence, this flap has fallen out of favor for elbow defects and replaced by the fasciocutaneous flaps previously listed. The discussion is mainly of academic interest.

Sbitany and Wray described a case of post traumatic infected elbow coverage with superiorly based rectus abdominis muscle flap with skin graft. The flap was

divided after three weeks and the superior part of the muscle was returned to the abdomen. (23). Similarly, Burstien and Salomon described transverse rectus island flap, where a transverse skin island was harvested based on a superiorly based rectus muscle. This flap was applied in three patients with elbow defects (24).

## **CONCLUSION**

Even in the era of microsurgery, there is a definite role for pedicled flaps in elbow reconstruction. Knowledge about these flaps is very beneficial in salvaging the elbow in difficult clinical situations. These flaps can be the back-up or even preferred flaps in elbow and limb salvage. Based on our review, we found that LD is the most common pedicled abdominal flap used for reconstruction of elbow defects. It has many advantages - being a single stage procedure, not requiring immobilization and the ability to provide motor function. Among the fasciocutaneous flaps, the paraumbilical perforator-based flaps appears to be the most frequently utilized. This flap has the potential to be used for coverage of circumferential elbow defects. However, donor site scar and a necessary period of immobilization are some of potential drawbacks associated with its use. Other less frequently used flaps are thoracoabdominal, thoracoepigastric, intercostal perforator based flaps and parascapular flaps. These fasciocutaneous flaps have replaced the rectus abdominis muscle flap for this purpose. There is a discrepancy in the nomenclature of fasciocutaneous flaps. With better understanding of flap circulation and vascular basis, the terminology of flaps has been evolving. We have provided a simplified definition for better understanding and communication.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Peer Review:** Externally peer-reviewed.

**Yazar Katkıları:** Çalışma Konsepti/Tasarım- Ö.B, H.U.A.; Veri Toplama- S.S.A., H.S.B., H.B.; Veri Analizi/Yorumlama- Ö.B, H.U.A.; Yazı Taslağı- Ö.B, H.U.A.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- Ö.B.; Son Onay ve Sorumluluk- Ö.B, H.U.A.

**Author Contributions:** Conception/Design of Study- Ö.B, H.U.A.; Data Acquisition- S Ö.B, H.U.A;

Data Analysis/Interpretation- Ö.B, H.U.A.; Drafting Manuscript- Ö.B, H.U.A.; Critical Revision of Manuscript- Ö.B.; Final Approval and Accountability- Ö.B, H.U.A.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir

**Conflict of Interest:** Authors declared no conflict of interest.

**Finansal Destek:** Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

**Financial Disclosure:** Authors declared no financial support.

## REFERENCES/KAYNAKLAR

- Choudry UH, Moran SL, Li S, Khan S. Soft-tissue coverage of the elbow: an outcome analysis and reconstructive algorithm. *Plast Reconstr Surg.* 2007;119(6):1852–1857.
- Kelley BP, Chung KC. Soft-Tissue Coverage for Elbow Trauma. *Hand Clin.* 2015;31(4):693–703.
- Stevanovic M, Sharpe F, Thommen VD, Itamura JM, Schnall SB. Latissimus dorsi pedicle flap for coverage of soft tissue defects about the elbow. *J Shoulder Elbow Surg.* 1999;8(6):634–643
- Jensen M, Moran SL. Soft tissue coverage of the elbow: a reconstructive algorithm. *Orthop Clin North Am.* 2008;39(2):251–vii.
- Khan KS, Kunz R, Kleijnen J, Antes G. Five steps to conducting a systematic review. *J R Soc Med.* 2003;96(3):118–121
- Hallock GG, Dingeldein GP. The Thoracoepigastric Flap as an Alternative for Coverage of the Burned Elbow. *J Burn Care & Rehab.* 1982;3(6):393–396.
- Davis WM, McCraw JB, Carraway JH. Use of a direct, transverse, thoracoabdominal flap to close difficult wounds of the thorax and upper extremity. *Plast Reconstr Surg.* 1977;60(4):526–533.
- Seitchik SH, Granick MS, Solomon MP, Berman AT. Posttraumatic upper extremity wound coverage utilizing the extended deep inferior epigastric flap. *Ann Plast Surg.* 1992;28(5):465–471
- O'Shaughnessy KD, Rawlani V, Hijjawi JB, Dumanian GA. Oblique pedicled paraumbilical perforator-based flap for reconstruction of complex proximal and mid-forearm defects: a report of two cases. *J Hand Surg Am.* 2010;35(7):1105–1110
- Naduthodikayil P, Bhandari L, Sreedhar SL. Pedicled Oblique Para-Umbilical Perforator (OPUP) Flap for Upper Limb Reconstruction. *J Hand Surg Asian Pac Vol.* 2016;21(2):229–233.
- Ramadevi V. Pedicle Thoracoumbilical Flap for Soft Tissue Coverage Defects Around Elbow Region. *IOSR J Dent & Med Sci.* 2019;18(2):23–27.
- Farber GL, Taylor KF, Smith AC. Pedicled thoracoabdominal flap coverage about the elbow in traumatic war injuries. *Hand (N Y).* 2010;5(1):43–48.
- Yunchuan P, Jiaqin X, Sihuan C, Zunhong L. Use of the lateral intercostal perforator-based pedicled abdominal flap for upper-limb wounds from severe electrical injury. *Ann Plast Surg.* 2006;56(2):116–121
- Pirela-Cruz MA, Reddy KK, Higgs M. Soft tissue coverage of the elbow in a developing country. *Tech Hand Up Extrem Surg.* 2007;11(3):214–220
- Fisher J. External oblique fasciocutaneous flap for elbow coverage. *Plast Reconstr Surg.* 1985;75(1):51–61
- Leena J. Islanded Parascapular Flap: An Above Elbow Stump Cover. *Anaplastology.* 2015; 4(1): 144.
- Reyad KA, Talal RS. Bilateral Combined Groin and Hypogastric Flap for Coverage of Extremely Huge Combined Hand, Forearm and Elbow Defects. *Egypt, J. Plast. Reconstr. Surg.* 2019; 43(3) 545-547.
- Ooi A, Ng J, Chui C, Goh T, Tan BK. Maximizing Outcomes While Minimizing Morbidity: An Illustrated Case Review of Elbow Soft Tissue Reconstruction. *Plast Surg Int.* 2016;2016:2841816.
- Schottstaedt ER, Larsen LJ, Bost FC. Complete muscle transposition. *J Bone Joint Surg Am.* 1955;37-A(5):897–919.
- Zancolli E, Mitre H. Latissimus dorsi transfer to restore elbow flexion. An appraisal of eight cases.



- J Bone Joint Surg Am. 1973;55(6):1265–1275
21. Jutte DL, Rees R, Nanney L, Bueno R, Lynch JB. Latissimus dorsi flap: a valuable resource in lower arm reconstruction. South Med J. 1987;80(1):37–40.
22. Nicoli F, Orfaniotis G, Lazzeri D, et al. The latissimus dorsi-groin-lymph node compound flap: A comprehensive technique with three features including skin coverage, restoration of motor function, and prevention of upper limb lymphedema. Microsurgery. 2016;36(8):689–694.
23. Sbitany U, Wray RC Jr. Use of the rectus abdominis muscle flap to reconstruct an elbow defect. Plast Reconstr Surg. 1986;77(6):988–989
24. Burstein FD, Salomon JC, Stahl RS. Elbow joint salvage with the transverse rectus island flap: a new application. Plast Reconstr Surg.



## **İlaça Bağlı Olarak Çene Kemiklerinde Görülen Osteonekrozda Dental Yönetim ve Güncel Tedavi Yaklaşımları: Derleme**

### ***Dental Management in Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws and Current Treatment Approachs: Review***

**Ayşem Yurtseven Günay<sup>1</sup> , Gülsüm Ak<sup>1</sup> **

<sup>1</sup> İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi  
Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı,  
İstanbul, Türkiye

ORCID: A.Y.G. 0000-0002-1161-1005;  
G.A. 0000-0002-3339-1568

**Sorumlu yazar/Corresponding author:**

Ayşem Yurtseven Günay,  
İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız,  
Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı,  
İstanbul, Türkiye  
E-posta: aysem.yurtsevengunay@istanbul.edu.tr

**Başvuru/Submitted:** 19.03.2020

**Kabul/Accepted:** 09.06.2020

**Atıf/Citation:** Yurtseven Gunay A, Ak G. Dental Management in Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws and Current Treatment Approachs: Review. Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi 2020; 3(2): 81-92.  
<https://doi.org/10.26650/JARHS2020-706253>

#### **ÖZ**

Günümüzde meme, prostat veya akciğer kanseri, hiperkalsemi, multipl myelom veya osteolitik yapıdaki metastatik lezyonların tedavisinde antirezorptif ve antianjiyojenik ilaçlar kullanılmaktadır. Bu hastalıklara ek olarak osteoporoz tedavisinde de kullanılabilirler. Bu ilaçların kullanımına bağlı olarak, maksilla ve mandibulada osteonekroz oluşabilmektedir. Bu derlemede; çenelerde ilaç kullanımına bağlı olarak gelişen osteonekrozların etiyojisi, risk faktörleri, klinik seyri, radyolojik özellikleri, güncel tedavi protokolleri ve ayrıca diş hekimi yaklaşımı hakkında bilgi vermeyi amaçladık.

**Anahtar Kelimeler:** İlaça bağlı gelişen çene kemiği osteonekrozu, antirezorptif ve antianjiyojenik ilaçlar, dental tedavi yaklaşımları

#### **ABSTRACT**

Today, antiresorptive and antiangiogenic drugs are used in the treatment of breast, prostate or lung cancer, hypercalcemia, multiple myeloma or osteolytic metastatic lesions. In addition to these diseases, they can also be used in the treatment of osteoporosis. Depending on the use of these drugs, osteonecrosis may occur in the maxilla and mandible. In this review, we aimed to provide information about the etiology, risk factors, clinical course, radiological features, current treatment protocols and dental approach of the osteonecrosis that develops due to drug use in the jaws.

**Keywords:** Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws, antiresorptive and antiangiogenic drugs, dental treatment approaches



## GİRİŞ

İlaça bağlı olarak çene kemiklerinde görülen osteonekroz baş-boyun radyoterapisi öyküsü bulunmayan ancak antianjiyojenik veya antirezorptif ilaç kullanan hastalarda görülen, maksillofasiyal bölgede 8 hafta içinde iyileşmeyen eksoze veya intraoral ya da ekstraoral fistül oluşumuyla gözlenen nekrotik kemik dokusudur. Nekrotik kemik gelişiminde etkili olan ilaçlar temel olarak antirezorptif ajanlar olan bifosfonatlar ve denosumab (Rank ligand inhibitörü) dir (1). Antianjiyojenik ajanlar arasından da çoğunlukla Bevasizumab ve Sunitinibdir (2).

Bifosfonat grubu ilaçlar ilk kez 1990'lı yıllarda osteoporoz tedavisinde ve tümörlerin kemik içerisinde gelişmesini yavaşlatmak amacıyla, hormon replasman tedavilerine alternatif olarak kullanılmaya başlamıştır (3).

Bifosfonatların kullanıldığı hastalıklar aşağıdaki gibi sıralanabilir:

1. Kemikte yüksek oranda metastaz yapan meme, prostat, akciğer kanserleri gibi kanserlerde intravenöz olarak kullanılır (4,5).

Malign tümör varlığında gelişebilen patolojik kırıklar, hiperkalsemi veya omurilik kanalının daralması gibi hayatı tehdit eden komplikasyonların azaltılması için kullanılır (6).

2. Kadınlarda postmenopozal dönemde osteoporoz için hem profilaktik, hem terapötik olarak kullanılır (7,8).
3. Fibröz displazi, Paget hastalığı, ankilozan spondilit gibi metabolik kemik hastalıklarının tedavi etmek için kullanılır (9,10).
4. Multipl myelomda, iskeletsel deformiteleri engellemek ve kemik yıkımına sebep olan metastatik lezyonları tedavi etmek amacıyla kullanılır.

Osteogenezis imperfekta tanısı koyulmuş pediatrik hastalarda, kemiğin frajilitesini azaltmak amacıyla kullanılır (11,12).

Bifosfonat grubu ilaçların yan etkileri arasında; çene kemiklerinde osteonekroz, özofagal inflamasyon, mide problemleri, ateş, grip bulguları, kaslarda ve/veya kemiklerde ağrılar sayılabilir (13).

RANK-L inhibitörlerinin aktivatör reseptörü olan, 2010'da FDA onayı alan, yeni bir ilaç olan Denosumab

ise; osteoporoz ile meme ve prostat kanserinin kemik metastazlarının tedavisinde kullanılmaktadır. Yarılanma ömrü 25-32 gün olup, bifosfonatların tersine kemiğe bağlanmaz ve kemik remodellingi üzerine etkileri tedavi bırakıldıktan 6 ay sonra geriler (2).

Antirezorptif ve antianjiyojenik ilaçların diş hekimleri açısından en ciddi yan etkisi olan çene kemiklerinin osteonekrozu, üzerinde devamlı olarak çalışılan önemli bir sorundur. İlaça bağlı çene kemiği osteonekrozu vakaları ilk olarak bifosfonat kullanımına bağlı olarak bildirilmiştir (14,15). Denosumab ise renal komplikasyonların oluşmaması amacıyla tercih edilen bir ilaçtır. Ancak çene kemiklerinde osteonekroz görülme olasılığı zoledronata benzer orandadır (zoledronate %1,3, denosumab %1,8) veya göreceli olarak yüksektir (zoledronat %1, denosumab %2) (2,16).

Bu derleme ile amacımız, çenelerde ilaca bağlı görülen osteonekroz gelişen hastalarda güncel yaklaşımları belirtmektir.

## İlaçların Etki Mekanizması

Klondronat veya etidronat gibi oral yolla kullanılan ve nitrojen içermeyen bifosfonatlar, osteoklastlar üzerinde apoptozisi tetikleyerek etki gösterirler (17). Alendronat, risedronat, pamidronat, zoledronat gibi ilaçlar ise daha güçlü etkileri olan, nitrojen içeren yeni nesil bifosfonatlardır. Bu ilaçlar kolesterol sentezinde görev alan farnesildifosfat enziminin sentezini inhibe ederek osteoklast inhibisyonunu sağlar (18). Böylece osteoklast fonksiyonu baskılanır. Bifosfonatlar osteoklastlara, hidroksiapatit ve aktif kemik yapımını uyarıcı bölgelere seçici olarak bağlanarak etki gösterir (19).

Bifosfonatların terapötik dozlarda kullanılması; osteoklastların rezorpsiyon yapmasını inhibe ederken, osteoblastların diferansiyasyon ve kemik deposisyonu yapmasını stimüle eder. Ancak bisfosfonat grubu ilaçların yüksek dozlarda kullanılmaları, osteoblastlar ve osteoklastlarda sitotoksik etki oluşturur. Böyle durumlarda kemik rejenerasyonu sağlanamamaktadır. Ayrıca remodelasyonun azalmasına bağlı olarak avasküler nekroz oluşma riski artar (20).

Bifosfonata bağlı osteonekrozun histolojik yapısı incelendiğinde aktif akut inflamasyonu olan alanlar ve nekrotik değişikliklerin yaygın olduğu alanlar ile bir-

likte, iltihabi ve nekrotik değişikliklerin olmadığı alanlar da mevcuttur. Nekrotik olmayan bölgelerde, Haversian kanallarından yoksun ve farklı derecelerde kalsifikasyon gösteren büyük kemik dokusu kitleleri görülür. Diğer alanlarda ise aktif kemik iltihabı, kemik spikülleri, osteoklast benzeri hücreler ve büyük kemik dokusu kayıpları izlenir. Bu alanlar çoğunlukla polimorfonükleer fagositler, plazma hücreleri, monositler ve lenfositler, asellüler nekroz, ince duvarlı ve dilate kan damarları ve bazofilik kemik spiküllerini içeren inflamasyon ile karakterizedir (21). Mikrobiyolojik incelemede baskın olarak Aktinomiçes, takiben Streptokok, Kandida, Stafilokok, Klebsiella, Eikenella, Haemophilus, Fusobacterium, Escherichia izole edilmiştir (22).

Denosumab ise osteoklastik kemik rezorpsiyonunun temel sitokini olan nükleer faktör kappa B ligandının reseptör aktivatörüne karşı insan kaynaklı monoklonal IgG2 antikorudur. 6 ayda bir subkutan enjeksiyon yoluyla uygulanır. Öncü osteoklast hücrelerinin farklılaşmasını ve fonksiyonunu inhibe eder (23).

İlaçların çene kemiklerinde özellikle kemik metabolizması döngüsünün daha yüksek olduğu alveolar kemikte nekroza sebep olduğu bildirilmektedir (24). Buna ek olarak oral mikrofloranın, periodontal aralık aracılığı ile çene kemikleri ile ilişkide olmasının ve çene kemiklerinin toruslar veya milohiyoid kenar gibi bölgelerinin travmaya maruz kalmasının da bu bölgelerde osteonekroz riskini arttırdığı düşünülmektedir (24,25).

Çene kemiklerinde osteonekroz, spontan ya da oral cerrahi işlemlere bağlı olarak gelişebilir. Hastaların %60'ında diş çekimi veya farklı cerrahi işlemler sonrası gelişebilirken, %40'ında spontan olarak gelişir (26). Spontan osteonekrozlarda prognoz daha kötüdür (27). Genellikle toruslar ya da mylohiyoid çıkıntı gibi çevre mukozanın ince olduğu bölgelerde gelişir (15,28).

### **İlaça Bağlı Olarak Çene Kemiklerinde Görülen Osteonekroz İnsidansı**

Bifosfonata bağlı çenelerde gelişen osteonekroz %65 oranında mandibulada, %26 oranında maksillada, %9 oranında da hem mandibula hem maksillada görülebilmektedir. Olguların 1/3'ünde ağrı yoktur. 2/3 oranı ile kadınlarda daha sık gözlenir (29).

Yapılan çalışmalara göre i.v. bifosfonat kullanımında, %0.8-%12 osteonekroz gelişim riski bildirilmiştir (19,30-32). Oral bifosfonat kullanımında ise risk oldukça düşüktür. Ancak uzun dönem [3 yıldan fazla (33)] ilaç kullanımında gelişebilir.

Denosumab ilişkili çene kemiği osteonekrozu insidansı %0-%4,7 arasında bildirilmektedir. 2012 yılında Saad F ve ark. 52 olguyu içeren Denosumab ilişkili çene kemiği osteonekrozu çalışmasında diş çekimine bağlı %59,6, oral enfeksiyona bağlı %50 oranında osteonekroz gelişimi rapor etmiştir (34). Lancet Onkoloji dergisinde yayınlanan denosumab ile ilgili klinik araştırmada da, hastaların sadece %1'inde çenede kemiklere kan akışının engellenmesi sonucu osteonekroz oluştuğu, %5'inde ise hipokalsemi gözlenmiştir (35).

### **Tanı Kriterleri**

Amerikan Oral ve Maksillofasiyal Cerrahi Birliği'ne göre ilaç kullanımına bağlı olarak çene kemiklerinde gelişen osteonekrozun kesin tanısı için şu kriterler gerekir: (1) devam eden ya da geçmişte uygulanmış antirezorptif veya antianjiyojenik ilaç tedavisi görmüş olmak, (2) ekspoze nekrotik kemiğin en az 8 hafta süre ile var olması, (3) baş-boyun bölgesine önceden radyoterapi uygulanmamış olması (36).

Çene kemiklerinde gelişen osteonekrozun klinikteki en belirgin bulgusu, kokulu akıntı ve alveol kemiği nekrozudur (Resim 1-6). Ancak kemik hiçbir semptom göstermeden de ekspoze olabilir. Çevre mukozada inflamasyon ve baskıda ağrı gözlenir. Hastaların şikayetleri genellikle ağrı, şişlik ve akıntıdır. Orofasiyal ağrı, trismus, enfeksiyon, dişlerde mobilite ve fistülizasyon da diğer sık rastlanan bulgulardır. Bazı olgularda künt bir ağrı, alt dudakta parestezi, anestezi, çenede büyüme hissi ya da oroantral fistül oluşmuş ise kronik sinüzit semptomları bulunabilir (37).

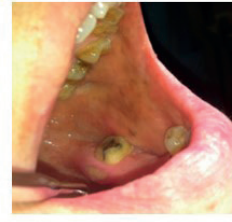
İlaça bağlı olarak çene kemiklerinde görülen osteonekrozun hem tanısında, hem de lezyon sınırlarının belirlenebilmesinde radyografik değerlendirmeler oldukça yardımcıdır. Panoramik radyografiler tanı için yeterli olmasalar da, kemikte lezyon varlığının kontrolü ve osteonekroz gelişmiş hastaların rutin muayeneleri için önerilirler (37,38). Kemikteki vaskülarizasyon değişikliklerini görüntüleme en başarılı yöntem olan



Resim 1



Resim 2



Resim 3



Resim 4



Resim 5



Resim 6

**Resim 1-6.** i.v. bifosfonat kullanımına bağlı gelişen çene kemiğinde osteonekrozların klinik görüntüleri

radyonükleotid görüntüleme (sintigrafi), erken tanı koyulmasında iyi bir alternatiftir. Tanıda en sık tercih edilen görüntüleme yöntemleri ise bilgisayarlı tomografi (BT) ve manyetik rezonans görüntüleme (MRG)'dir. BT ile osteonekrozun kortikal ve trabeküler kemikteki yayılımı, sınırları, boyutları, komşu anatomik yapılarla ilişkisi detaylı olarak değerlendirilebilir. MRG ise yumuşak doku tutulumunda tercih edilir (39).

### Risk Faktörleri

İlaç kullanımına bağlı olarak çene kemiklerinde osteonekroz gelişmesinde rol oynayan risk faktörleri; ilaca bağlı, lokal ve demografik/sistemik risk faktörleri olmak üzere 3 başlıkta incelenir (33).

İlaça bağlı faktörler arasında ilacın çeşidi, uygulanma şekli, tedavi süresi değerlendirilir. Özellikle intravenöz kullanım, osteonekroz gelişme riskini arttırmaktadır (31,36).

Lokal faktörler arasında kötü ağız hijyeni, uyumsuz protezler, periodontal hastalıklar, abse oluşumu gibi dental enfeksiyonlar, diş çekimi, periodontal cerrahi, dental implant uygulamaları gibi cerrahi uygulamalar, travma yer alır. Bunların yanında palatinal veya lingual bölge yerleşimli torus veya kemik ekzostozları, mylohiyoid çıkıntının bulunduğu bölge gibi mukozanın ince olduğu alanlar riskli bölgelerdir (40,41).

Demografik/sistemik faktörler arasında ise 65 yaşın üzerinde olmak, cinsiyet (kadınlarda daha sık), yetersiz beslenme, diyabet, uzun süre kortikosteroid kullanımı, hipotiroidizm, bağ dokusu hastalıkları, östrojen tedavisi, alkol ve/veya sigara bağımlılığı, kanser tanısı, kanserle birlikte osteoporöz/osteopeni tanısı, kemoterapi, immünosupresyon, anemi, talasemi, pıhtılaşma bozuklukları, kan anomalileri, damarsal bozukluklar yer alır (42).

### Ayırıcı Tanı

İlaça bağlı olarak çene kemiklerinde gelişen osteonekrozun ayırıcı tanısında osteoradyonekroz, osteomyelit, alveolar osteit, herpes zoster enfeksiyonu ile ilişkili osteonekroz, nekrotizan ülseratif periodontitis, Paget hastalığı, multiple myelom, metastatik tümörler gibi lezyonlar değerlendirilir (2,43,44).

Kemik rezorpsiyonunun tek belirteci Serum C-terminal telopeptid (CTX)'dir (45). Serum CTX'ten özellikle osteopeni veya osteoporoz nedeniyle oral bifosfonat kullananlarda, suprese kemik rejenerasyon seviyesinin ölçülmesinde faydalanılır (46). Osteonekroz değerlendirilmesinde de bu test hekim için bir rehber olabilir. Ancak kesin bir sonuca varılması gerektiği göz önünde bulundurulmalıdır.



## Diş Hekimi Yaklaşımı

İlaça bağlı olarak çene kemiklerinde gelişen osteonekroza diş hekimi yaklaşımı 3 başlık altında toplanabilir (42):

1. Antirezorptif ve antianjiyojenik ilaç tedavisi gören veya önceden tedavi görmüş olan hastalarda çene kemiği osteonekrozu oluşmuş ise diş hekiminin yaklaşımı
2. Oral veya intravenöz ilaç tedavisi gören veya daha önce tedavi görmüş olan hastalarda çene kemiği osteonekrozu oluşmamış ise diş hekiminin yaklaşımı
3. İlaç tedavisi başlamadan önce diş hekiminin yaklaşımı

### 1- Antirezorptif ve antianjiyojenik ilaç tedavisi gören veya önceden tedavi görmüş olan hastalarda çene kemiği osteonekrozu oluşmuş ise diş hekiminin yaklaşımı

1. Detaylı oral muayene yapılır.
2. Hasta MRONJ açısından değerlendirilir:
  - a. 1-2 ay aralıkla periyodik klinik takip, 4-6 ay aralıkla radyografik inceleme yapılır.
  - b. Derecelendirme-evreleme yapılır.
3. Gerekli görülür ise özel muayene tekniklerinden faydalanılır:
  - a. Sekonder enfeksiyon riskine karşı mikrobiyolojik kültür alınabilir.
  - b. Halitozis için değerlendirme yapılabilir.
4. Cerrahi olmayan tedaviler uygulanabilir:
  - a. Periodontal ve dental sağlık optimum seviyeye getirilir.
  - b. Direkt kemikle ilgili yaralanmalardan kaçınılır ve kemiğe gelebilecek zararlar önlenir.
  - c. Vazokonstriktörlü lokal anestezi kullanımından kaçınılır.
  - d. Keskin kenarlı kuronlar, uyumsuz protezler ve konservatif restorasyonlar veya kemikte travma oluşturabilecek benzer durumlar ortadan kaldırılır.
  - e. Hareketli protez kullanımında mukozada travma oluşturabilecek mylohiyoid çıkıntı, palatinal veya lingual toruslar ve ekzostozların varlığı değerlendirilir.
  - f. 1. ve 2. derecede mobilitesi bulunan dişlerin, stabilitesi sağlanır.

g. Konservatif restorasyonlar ve protetik tedaviler uygulanabilir.

h. Ekspoze kemiği örtmek, çevre yumuşak dokuyu korumak, hasta konforunu sağlamak ve teröpatik ajanları uygulamak için akrilik stent ya da kişiye özel plak hazırlanabilir.

i. Diş çekimi gerektiğinde ilk sırada penisilin veya amoksisilin; penisilin alerjisi varsa klindamisin, eritromisin veya azitromisin; tedaviye yanıt alınmıyorsa metronidazol reçete edilir.

5. Profesyonel ağız hijyeni sağlanır ve hastaya hijyen eğitimi verilerek motivasyonu sağlanır.

6. MRONJ hakkında eğitim verilir.

7. Farmakolojik tedavi uygulanır:

a. Hasta değerlendirildikten sonra geniş spektrumlu antibiyotik reçete edilir. Ciddi enfeksiyon durumunda ampicilin, amoksisilin+klavulonik asit, metronidazol; penisilin alerjisi durumunda siprofloksasin+metronidazol, eritromisin+metronidazol; gerekli ise antifungal veya antiviral ajanlar reçete edilir.

b. Gerekli görülür ise antifungal ilaç reçete edilir.

c. Ağrı mevcutsa sistemik analjezik reçete edilir.

8. Nekrotik kemik mevcutsa cerrahi tedavi uygulanır:

a. Daha az travmatik olacak şekilde debridman ve/veya sökestrektomi, tercihen piezocerrahi ile uygulanır (33,47,48).

b. Vazokonstriktörlü lokal anestezi kullanımından kaçınılır.

c. Nekrotik kemiğin en az travmatik olacak şekilde, gerekli ise piezocerrahi kullanılarak, rezeksiyonu yapılır (33,47,48).

d. Gerekli ise parsiyel, marjinal veya segmental rezeksiyon yapılır ve takiben rekonstrüktif cerrahi uygulanır.

9. Nekrotik kemik mevcutsa alternatif tedavi uygulamaları da seçenektir. Düşük doz lazer tedavisinde He-Ne veya diyot lazer tercih edilir.

### 2- Oral veya intravenöz ilaç tedavisi gören veya daha önce tedavi görmüş olan hastalarda çene kemiği osteonekrozu oluşmamış ise diş hekiminin yaklaşımı

1. Erken evredeki MRONJ'un tanısı için:

(1) Hasta hikayesi alınarak kaydedilmeli. (2) 3-4

ay aralıklarla klinik takip yapılmalı. (3) 6 ay aralıklarla röntgen alınmalı. (4) Gerekli ise BT alınmalı. (5) Erken dönem değişimlerini tespit etmek için kemik sintigrafisi istenebilir.

Radyografik olarak MRONJ'da hastaların 2/3'sinde alveolar kemik etkilenmiştir. Kemik sklerozu, kemikte yıkım, lamina durada kalınlaşma, iyileşmeyen çekim soketleri, periodontal ligament aralığının genişlemesi, sökestr oluşumu, fistül, yumuşak dokuda kalınlaşma ve periostal yeni kemik oluşumu gözlenen radyografik değişikliklerdir. Kemikte oluşan sklerotik değişiklikler ilerleyerek mandibular kanalda daralmaya yol açabilir (49,50).

Diş çekimi gerekli ise:

a. Aktif olarak onkolojik dozda i.v. antirezorptif ilaç kullanan hastalarda acil olmayan diş çekimleri, alveoloplasti, dental implantlar gibi işlemler uygulanmamalıdır.

b. i.v. bifosfonat kullanan hastalarda diş çekimi ertelenemiyor ise, takip eden onkolog ile konsültasyon sonucuna göre diş çekimi öncesi ve sonrasında 1-3 ay bifosfonat kullanımına ara verilir. Doku iyileşmesi gerçekleşene kadar (6-8 hafta) ilaç kullanımına başlanmaz.

c. Diş çekiminden 5 gün önce geniş spektrumlu antibiyotik tedavisine başlanarak çekimden sonra 20 gün tedavi devam ettirilir. Doku iyileşmesi döneminde topikal klorheksidin glukonat içerikli gargaralar uygulanır.

d. Çekim sırasında ve 1 hafta sonrasında düşük doz lazer tedavisi uygulanır. 1 dk süre ile 5 (en az 3) topikal uygulama yapılmalıdır. Bu tedavi doku rejenerasyonunu ve bölgedeki bakteri kolonizasyonunun azalmasını sağlar.

2. Detaylı oral muayene yapılır.

a. Dişlerde furkasyon defekti varlığı, fistül varlığı, yumuşak dokuda şişlik, daha önce sağlıklı olan dişlerde mobilite varlığı, kemik hasarı dikkatle değerlendirilir.

b. Tanı koyulamayan oral ağrı ve dizestezilerin varlığı değerlendirilir.

3. Optimal periodontal ve dental sağlığı sağlamak ve korumak için:

a. Kemikte direkt travma oluşturabilecek dental

uygulamalardan (preprotetik/implant öncesi kemik cerrahileri, dental implant uygulamaları, apikal lezyonlu olmayan, hafif mobilitesi bulunan dişlerin çekimi, ileri periodontal cerrahiler (51) kaçınılır.

b. Vazokonstriktör içeren lokal anestezikler tercih edilmez.

c. Tespit edilen lokal risk faktörleri ortadan kaldırılır.

d. Hareketli protez kullanımında mukozada travma oluşturabilecek mylohiyoid çıkıntı, palatinal veya lingual toruslar ve ekzostozların varlığı değerlendirilerek; protezlerde gerekli düzenlemeler yapılır.

e. 1. ve 2. derecede mobilite gösteren dişlerin stabilizasyonu sağlanır.

f. Konservatif, protetik ve endodontik tedaviler gibi cerrahi olmayan tedavilerin uygulanmasında sakınca yoktur. Cerrahi olmayan başlangıç periodontal tedaviler uygulanabilir (52).

4. Profesyonel ağız hijyeni sağlanır ve sürdürmesi için hastaya eğitim verilir.

5. Hastaya MRONJ hakkında eğitim verilir.

### 3- İlaç tedavisi başlamadan önce diş hekiminin yaklaşımı

1. İntraoral sert ve yumuşak dokular detaylı olarak muayene edilir.

2. Radyografi alınarak tüm dişler ve çene kemikleri değerlendirilir.

3. Optimal periodontal ve dental sağlığın sağlanması için:

a. Parsiyel mukoza retansiyonlu, ileri derecede periodontal kaybı olan, restoratif tekniklerle tedavi edilemeyen, prognozu kötü olan dişler çekilir.

b. Pediatrik hastalarda mobil süt dişleri çekilir.

c. 1. ve 2. derecede mobilite gösteren dişlerin stabilizasyonu sağlanır.

d. Kronik apikal periodontal lezyonu olan dişlere endodontik tedavi yapılır.

e. Gerekli görülen konservatif ve protetik restorasyonlar yapılır.

f. Hareketli protez varlığında mukozada travma oluşturabilecek bölgelerin kontrolü yapılır.

g. Keskin kenarlı kuronlar, uyumsuz protezler veya konservatif restorasyonlar gibi lokal risk faktörleri ortadan kaldırılır.

4. Optimal oral hijyenin sağlanması için;
- Detertraj yapılıdır.
  - Bireysel ağız bakımı sağlanır.
  - Antiseptikli ağız gargaraları kullanılır.
  - Lokal florid uygulanır.
  - Ağız hijyeninin sağlanması ve korunmasında hasta motive edilir.
5. İlaç tedavisinin ertelenmesinde riskler ve faydalar değerlendirilir:
- Mümkünse tedavi süreci, periodontal ve dental sağlık optimumuna gelene kadar ertelenmelidir. Gerekli invaziv tedavileri takiben ortalama 3-4 haftalık iyileşme sürecinden sonra ilaç tedavisi başlamalıdır.
  - İlacın kesilmesinde hastayı takip eden doktor, onkolog, diş hekimi ve diğer tüm uzmanlar işbirliği içinde olmalıdır.
  - MRONJ ile ilgili hastaya eğitim verilir (42,53):
    - Bilgilendirici broşürler verilir.
    - İlaç tedavisi boyunca ve takiben 5 yıl süre ile kemik ile ilişkili invaziv dental işlemler yapılmamalıdır.
    - Tüm erken semptomları veya klinik bulgular kaydedilmelidir.
    - Hastalara rutin klinik ve radyolojik muayenelerin gerekliliği ve önemi, risk faktörleri ve genel dental sağlık konularında eğitim verilmelidir.

### Tedavi Yaklaşımları

Tedavi yaklaşımları, AAOMS'un ilaca bağlı çene kemiklerinde görülen osteonekroz olgularına yönelik olarak 2014 yılında yayımladığı bildiri hastalığın evresine göre belirlenmiştir (1,53,54).

- **Evre 0:** Nekrotik kemik olduğuna dair klinik bir bulgu yok, ancak non spesifik klinik bulgular ve semptomlar var ise; ağrı kesici ve antibiyotikler ile sistemik tedavi uygulanabilir.

- **Evre 1:** Ağız içinde üzeri mukoza ile örtülü olmayan nekrotik kemik var, ancak asemptomatik ve enfeksiyona dair bir bulgu yok ise; antibakteriyel ağız gargarası kullanımı, 3 ayda bir klinik takip ve hasta eğitimi ile devam eden ilaç tedavisi endikasyonu değerlendirilir.

- **Evre 2:** Ekspoze ve nekrotik kemik varlığıyla birlikte enfeksiyon bulguları, ağrı, eritem, pürülan eksuda (olmayabilir) var ise; oral antibiyotikler ile

sempomatik tedavi, antibakteriyel ağız gargarası, ağrı kontrolü uygulanır ve yumuşak doku irritasyonu için yüzeysel debridman yapılır.

- **Evre 3:** Ekspoze ve nekrotik kemik bulunan hastada ağrı, enfeksiyon ve şu bulgulardan birinin veya daha fazlasının bulunması: (1) alveolar kemikte geniş sınırlara yayılan ekspoze ve nekrotik kemik varlığı (mandibulanın inferior sınırı ve ramusu, maksillada maksiller sinüs ve zigomalar), (2) patolojik kırık, (3) ekstraoral fistül, (4) oral, antral/oral veya nazal bölgelerin etkilenmesi veya maksiller sinüs ön duvarı boyunca uzanan osteoliz. Bu evrede antibakteriyel ağız gargarası, antibiyotik uygulaması ve ağrı kontrolü, cerrahi debridman veya uzun dönem enfeksiyon ve ağrı oluşumu var ise rezeksiyon yapılabilir.

İlaca bağlı olarak çene kemiklerinde osteonekroz geliştiğinde başlangıç tedavisi konservatif metodlar olmalıdır. Bu metodlar antimikrobiyal ağız gargaları ve klinik olarak belirtilmişse antibiyotiklerin kullanımını, etkili ağız hijyeninin sağlanmasını veya yüzeysel kemik çıkıntılarının çıkarılmasını içerir.

Kalıcı semptomlar oluşursa veya ilk konservatif tedaviye rağmen fonksiyon olumsuz etkilenirse, agresif cerrahi girişimler (mukoza flep elevasyonu, nekrotik kemiğin blok rezeksiyonu veya yumuşak dokunun kapatılması) kullanılabilir. Ancak asemptomatik olgularda agresif cerrahi müdahale önerilmemektedir.

Ekspoze, nekrotik kemik alanındaki semptomatik dişlerin çekimi dikkatle değerlendirilmelidir çünkü diş çekimi, var olan nekrotik süreci agresif hale getirebilir. i.v. bifosfonatın kesilmesi kısa dönemde yarar sağlamaz. Ancak sistemik durum değerlendirilerek uzun dönem ilacı kesmek; var olan nekroz alanını sınırlamak, yeni nekroz alanları oluşma riskini ve klinik semptomları azaltmak için faydalı olabilir. Denosumab ise kemiğe bağlanmaz ve bu ilaçların kemik üzerindeki etkileri 6 ayda sonlanır. Devam eden ilaç tedavisinin riskleri ve faydaları onkolog, oral ve maksillofasiyal cerrahi uzmanı ve hastanın kendisi tarafından değerlendirilmelidir (33).

Antirezortif veya antianjiyojenik ilaç kullanan hastalarda dental implant uygulamaları ile ilgili kesin bir görüş birliği yoktur. Bazı çalışmalarda i.v. ilaç kullanan hastalarda, osteonekroz gelişimi tetiklendiği için

implant uygulamasının kontrendike olduğu bildirilmiştir (55-57). Ancak genel olarak bu riskin bireysel olarak değerlendirilmesi gerektiği, oral/i.v bifosfonat ve denosumab kullanımının direkt bir kontrendikasyon oluşturmadığı belirtilmektedir (54,58).

Dental implant uygulamaları, hastaların diş kaybına bağlı azalmış olan yaşam kalitelerinin artırılması açısından da oldukça önemlidir.

### Alternatif Tedavi Yaklaşımları

Avasküler osteonekroz birçok tedavi seçeneğine dirençlidir. Alternatif tedaviler arasında hiperbarik oksijen tedavisi, düşük doz lazer terapisi, fotodinamik terapi, trombosit zengin plazma/fibrin uygulamaları, bazı medikasyonlar yer alır.

Hiperbarik oksijen tedavisi ile ilgili olumlu (59) ve olumsuz (60,61) sonuçlar gösteren çalışmalar mevcuttur. Düşük doz lazer tedavisi (62) ve fotodinamik terapinin (63) de olumlu etkilerinin olduğu araştırmalarda bildirilmiştir. Trombosit zengin plazma/fibrin uygulamaları pek çok çalışmada marginal rezeksiyon ya da cerrahi debridman uygulamalarının ardından iyileşmeyi oldukça olumlu etkilemiştir (64,65). Epstein ve ark. bifosfonata bağlı osteonekrozu olan hastalarda antimikrobiyal tedaviyle birlikte pentoksifilin ve tokoferol reçete etmişler ve iyileşme üzerine olumlu etkileri olduğunu bildirmişlerdir (66).

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Peer Review:** Externally peer-reviewed.

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

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

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir

**Conflict of Interest:** Authors declared no conflict of interest.

**Finansal Destek:** Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

**Financial Disclosure:** Authors declared no financial support.

### KAYNAKLAR/REFERENCES

1. Valente NA, Chatelain S, Alfonsi F, Mortellaro C, Barone A. Medication-related osteonecrosis of the jaw. *J Craniofac Surg* 2019;30:1095-101. doi:10.1097/SCS.0000000000005475
2. Yazıcı T, Şentürk MF, Koçer G. İlaça bağlı olarak çene kemiklerinde görülen osteonekroz (Mronj):Derleme. *SDÜ Sağlık Bil Enst Derg* 2017;8(2):50-7. doi:10.22312/sdusbed.302041
3. Değim T. Bifosfonatlar ve çene kemiğinde kemik erimesi. *Ecza Derg* 2006;13: 26-8.
4. Walter C, Al-Nawas B, Grötz KA, Thomas C, Thüroff JW, Zinser V, et al. Prevalence and risk factors of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw in prostate cancer patients with advanced disease treated with zoledronate. *Eur Urol* 2008;54:1066-72. doi:10.1016/j.eururo.2008.06.070
5. Walter C, Al-Nawas B, du Bois A, Buch L, Harter P, Grötz KA. Incidence of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws in breast cancer patients. *Cancer* 2009;115:1631-37. doi:10.1002/cncr.24119
6. Van Poznak C, Estilo C. Osteonecrosis of the jaw in cancer patients receiving iv bisphosphonates. *Oncology* 2006;20(9):1053-62.
7. Delmas PD, Recker RR, Chesnut CH 3rd, Skag A, Stakkestad JA, Emkey R, et al. Daily and intermittent oral ibandronate normalize bone turnover and provide significant reduction in vertebral fracture risk: Results from the bone study. *Osteoporos Int* 2004;15:792-8. doi:10.1007/s00198-004-1602-9
8. Pazianas M, Miller P, Blumentals WA, Bernal M, Kothawala P. A review of the literature on osteonecrosis of the jaw in patients with



- osteoporosis treated with oral bisphosphonates: prevalence, risk factors, and clinical characteristics. *Clin Ther* 2007;29:1548–58. doi:10.1016/j.clinthera.2007.08.008
9. Siris ES, Lyles KW, Singer FR, Meunier PJ. Medical management of Paget's disease of bone: Indications for treatment and review of current therapies. *J Bone Miner Res* 2006;21:94–8. doi:10.1359/jbmr.06s218
  10. Hosking D, Lyles K, Brown JP, Fraser WD, Miller P, Curiel MD, et al. Long-term control of bone turnover in Paget's disease with zoledronic acid and risedronate. *J Bone Miner Res* 2007;22:142–8. doi:10.1359/jbmr.061001
  11. Rauch F, Glorieux FH. Osteogenesis imperfecta. *Lancet* 2004;363:1377–85. doi:10.1016/S0140-6736(04)16051-0
  12. Kamoun-Goldrat A, Ginisty D, Merrer ML. Effect of bisphosphonates on tooth eruption in children with osteogenesis imperfecta. *Eur J Oral Sci* 2008;116:195–8. doi: 10.1111/j.1600-0722.2008.00529.x
  13. Duman AE, Güven GS, Gürlek A. Erkek osteoporozu. *Hacettepe Tıp Derg* 2005;36:175–83.
  14. Marx RE. Palmidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg* 2003;61:1115-7. doi:10.1016/s0278-2391(03)00720-1
  15. Ruggiero SL, Mehrotra B, Rosenberg TJ, Engroff SL. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: A review of 63 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62:527–34. doi:10.1016/j.joms.2004.02.004
  16. Fizazi K, Carducci M, Smith M, Damião R, Brown J, Karsh L, et al. Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with castration-resistant prostate cancer: A randomised, double-blind study. *Lancet* 2011;377:813–22. doi:10.1016/S0140-6736(10)62344-6
  17. Reszka AA, Rodan GA. Mechanism of action of bisphosphonates. *Curr Osteoporos Rep* 2003;1:45–52. doi: 10.1007/s11914-003-0008-5
  18. Reszka AA, Rodan GA. Nitrogen-containing bisphosphonate mechanism of action, *Mini Rev Med Chem* 2004;4:711–9. doi:10.2174/1389557043403648
  19. Stepensky D, Kleinberg L, Hoffman A. Bone as an effect compartment: models for uptake and release of drugs. *Clin Pharmacokinet* 2003;42:863–81. doi:10.2165/00003088-200342100-00001
  20. Naidu A, Dechow PC, Spears R, Wright JM, Kessler HP, Opperman LA. The effects of bisphosphonates on osteoblasts in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;106:5–13. doi:10.1016/j.tripleo.2008.03.036
  21. Favia G, Pilolli GP, Maiorano E. Histologic and histomorphometric features of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: An analysis of 31 cases with confocal laser scanning microscopy. *Bone* 2009;45(3):406–13. doi:10.1016/j.bone.2009.05.008
  22. Hinson AM, Smith CW, Siegel ER, Stack BC Jr. Is bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw an infection? A histological and microbiological ten-year summary. *Int J Dent* 2014;2014:452737. doi:10.1155/2014/452737
  23. Soydan SS, Veziroğlu Şenel F, Araz K. Bifosfonata bağlı olarak çene kemiklerinde gelişen osteonekrozun patogenezi ve tedavisi. *Hacettepe Diş Hek Fak Derg* 2009;33(3):61-8.
  24. Gupta M, Gupta N. Bisphosphonate Related Jaw Osteonecrosis. [Updated 2019 Sep 19]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-.
  25. Aghaloo T, Hazboun R, Tetradis S. Pathophysiology of osteonecrosis of the jaws. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 2015;27(4):489-96. doi:10.1016/j.coms.2015.06.001
  26. Landesberg R, Cozin M, Cremers S, Woo V, Kousteni S, Sinha S, et al. Inhibition of oral mucosal cell wound healing by bisphosphonates. *J Oral Maxillofac Surg* 2008;66(5):839–47. doi:10.1016/j.joms.2008.01.026
  27. Scoletta M, Arduino PG, Dalmaso P, Broccoletti R, Mozzati M. Treatment outcomes in patients with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a prospective study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;110(1):46–53. doi:10.1016/j.tripleo.2010.02.020



28. Woo SB, Hellstein JW, Kalmar JR. Narrative [corrected] review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws [published correction appears in *Ann Intern Med*. 2006 Aug 1;145(3):235]. *Ann Intern Med* 2006;144(10):753–61. doi:10.7326/0003-4819-144-10-200605160-00009
29. Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg* 2005;63(11):1567–75. doi:10.1016/j.joms.2005.07.010
30. Durie BG, Katz M, Crowley J. Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonates. *N Engl J Med* 2005;353(1):99–102. doi:10.1056/NEJM200507073530120
31. Bamias A, Kastiris E, Bamia C, Mouloupoulos LA, Melakopoulos I, Bozas G, et al. Osteonecrosis of the jaw in cancer after treatment with bisphosphonates: incidence and risk factors. *J Clin Oncol* 2005;23(34):8580–7. doi:10.1200/JCO.2005.02.8670
32. Zavras AI, Zhu S. Bisphosphonates are associated with increased risk for jaw surgery in medical claims data: is it osteonecrosis?. *J Oral Maxillofac Surg* 2006;64(6):917–23. doi:10.1016/j.joms.2006.02.011
33. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw--2014 update [published correction appears in *J Oral Maxillofac Surg*. 2015 Jul;73(7):1440] [published correction appears in *J Oral Maxillofac Surg*. 2015 Sep;73(9):1879]. *J Oral Maxillofac Surg* 2014;72(10):1938–56. doi:10.1016/j.joms.2014.04.031
34. Saad F, Brown JE, Van Poznak C, Ibrahim T, Stemmer SM, Stopeck AT, et al. Incidence, risk factors, and outcomes of osteonecrosis of the jaw: integrated analysis from three blinded active-controlled phase III trials in cancer patients with bone metastases. *Ann Oncol* 2012; 23(5): 1341–7. doi: 10.1093/annonc/mdr435
35. Chawla S, Henshaw R, Seeger L, Choy E, Blay JY, Ferrari S, et al. Safety and efficacy of denosumab for adults and skeletally mature adolescents with giant cell tumour of bone: interim analysis of an open-label, parallel-group, phase 2 study. *Lancet Oncol* 2013; 14(9): 901-8. doi: 10.1016/S1470-2045(13)70277-8
36. Colella G, Campisi G, Fusco V. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper: Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws-2009 update: the need to refine the BRONJ definition. *J Oral Maxillofac Surg* 2009;67(12):2698–9. doi:10.1016/j.joms.2009.07.097
37. Vassiliou V, Tselis N, Kardamakis D. Osteonecrosis of the jaws: clinicopathologic and radiologic characteristics, preventive and therapeutic strategies. *Strahlenther Onkol* 2010;186(7):367–73. doi:10.1007/s00066-010-2066-9
38. Stockmann P, Hinkmann FM, Lell MM, Fenner M, Vairaktaris E, Neukam FW, et al. Panoramic radiograph, computed tomography or magnetic resonance imaging. Which imaging technique should be preferred in bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw? A prospective clinical study. *Clin Oral Investig* 2010;14(3):311–7. doi:10.1007/s00784-009-0293-1
39. Dore F, Filippi L, Biasotto M, Chiandussi S, Cavalli F, Di Lenarda R. Bone scintigraphy and SPECT/CT of bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw. *J Nucl Med* 2009;50(1):30–5. doi:10.2967/jnumed.107.048785
40. Ruggiero SL, Fantasia J, Carlson E. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: background and guidelines for diagnosis, staging and management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102(4):433–41. doi:10.1016/j.tripleo.2006.06.004
41. Zervas K, Verrou E, Teleioudis Z, Vahtsevanos K, Banti A, Mihou D, et al. Incidence, risk factors and management of osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma: a single-centre experience in 303 patients. *Br J Haematol* 2006;134(6):620–3. doi:10.1111/j.1365-2141.2006.06230.x
42. Campisi G, Di Fede O, Musciotto A, Lo Casto A, Lo Muzio L, Fulfaro F, et al. Bisphosphonate-

- related osteonecrosis of the jaw (BRONJ): run dental management designs and issues in diagnosis. *Ann Oncol* 2007;18(6):168–72. doi:10.1093/annonc/mdm250
43. Hino S, Murase R, Terakado N, Shintani S, Hamakawa H. Response of diffuse sclerosing osteomyelitis of the mandible to alendronate: follow-up study by <sup>99m</sup>Tc scintigraphy. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2005;34(5):576–8. doi:10.1016/j.ijom.2005.01.003
  44. van der Waal RI, Buter J, van der Waal I. Oral metastases: report of 24 cases. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2003;41(1):3–6. doi:10.1016/s0266-4356(02)00301-7
  45. Marx RE. Oral and intravenous bisphosphonate induced osteonecrosis of the jaws: history, etiology, prevention, and treatment. 2nd ed. Quintessence Pub Co; 2011.
  46. Karaçelebi E, Öztürk M. Oral ve maksillofasial cerrahide bifosfonatlar ve bifosfonatlar ilişkili çene osteonekrozu tedavisinde yeni yaklaşımlar. *ADO Klin Bil Derg* 2012(5): 1052–62.
  47. Perini AT, de Oliveira GR, Seguin F. Medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) treated with piezosurgery – case report and review of literature. *RSBO* 2018;15(2):123-9. doi: 10.21726/rsbo.v15i2.679
  48. Merigo E, Cella L, Oppici A, Cristina Arbasi M, Clini F, Fontana M, et al. Combined Approach to Treat Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws. *J Lasers Med Sci* 2018;9(2):92-100. doi: 10.15171/jlms.2018.19.
  49. Phal PM, Myall RW, Assael LA, Weissman JL. Imaging findings of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws. *Am J Neuroradiol* 2007;28:1139–45. doi: 10.3174/ajnr.A0518
  50. Berg BI, Mueller AA, Augello M, Berg S, Jaquiéry C. Imaging in Patients with Bisphosphonate-Associated Osteonecrosis of the Jaws (MRONJ). *Dent J (Basel)* 2016;4(3):29. doi:10.3390/dj4030029
  51. Rosella D, Papi P, Giardino R, Cicalini E, Piccoli L, Pompa G. Medication-related osteonecrosis of the jaw: Clinical and practical guidelines. *J Int Soc Prev Community Dent* 2016;6(2):97-104. doi:10.4103/2231-0762.178742
  52. Di Fede O, Panzarella V, Mauceri R, Fusco V, Bedogni A, Lo Muzio L, et al. The dental management of patients at risk of medication-related osteonecrosis of the jaw: new paradigm of primary prevention. *Biomed Res Int* 2018;2018:2684924. doi: 10.1155/2018/2684924.
  53. Yarom N, Shapiro CL, Peterson DE, Van Poznak CH, Bohlke K, Ruggiero SL, et al. Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: MASCC/ISOO/ASCO Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol* 2019;37(25):2270–90. doi:10.1200/JCO.19.01186
  54. Öztürk E, Saruhan N. İlaça bağlı olarak çene kemiklerinde görülen osteonekroz (Mronj): Derleme. *J BHSR* 2019;3(1):8-20. doi: 10.34084/bshr.535974
  55. Favia G, Piattelli A, Sportelli P, Capodiferro S, Iezzi G. Osteonecrosis of the posterior mandible after implant insertion: a clinical and histological case report. *Clin Implant Dent Relat Res* 2011;13(1):58–63. doi:10.1111/j.1708-8208.2009.00181.x
  56. Lazarovici TS, Yahalom R, Taicher S, Schwartz-Arad D, Peleg O, Yarom N. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw associated with dental implants. *J Oral Maxillofac Surg* 2010;68(4):790–6. doi:10.1016/j.joms.2009.09.017
  57. Shirota T, Nakamura A, Matsui Y, Hatori M, Nakamura M, Shintani S. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw around dental implants in the maxilla: report of a case. *Clin Oral Implants Res* 2009;20(12):1402–8. doi:10.1111/j.1600-0501.2009.01801.x
  58. Walter C, Al-Nawas B, Wolff T, Schiegnitz E, Grötz KA. Dental implants in patients treated with antiresorptive medication - a systematic literature review. *Int J Implant Dent* 2016;2(1):9. doi:10.1186/s40729-016-0041-7
  59. Freiburger JJ, Padilla-Burgos R, McGraw T, Suliman HB, Kraft KH, Stolp BW, et al. What is the role of hyperbaric oxygen in the management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a randomized controlled trial of hyperbaric oxygen as an adjunct to surgery and antibiotics.

- J Oral Maxillofac Surg 2012;70(7):1573–83. doi:10.1016/j.joms.2012.04.001
60. Adornato MC, Morcos I, Rozanski J. The treatment of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws with bone resection and autologous platelet-derived growth factors. *J Am Dent Assoc* 2007;138(7):971–7. doi:10.14219/jada.archive.2007.0294
61. Erkan M, Bilgi O, Mutluoğlu M, Uzun G. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in cancer patients and hyperbaric oxygen therapy. *JOP* 2009;10(5):579–82.
62. Momesso GAC, de Souza Batista FR, de Sousa CA, de Lima VN, Polo TOB, Hassumi JS, et al. Successful use of lower-level laser therapy in the treatment of medication-related osteonecrosis of the jaw. *J Lasers Med Sci* 2017;8(4):201–3. doi:10.15171/jlms.2017.37
63. Sarkarat F, Modarresi A, Chiniforush N, Yazdanparast L, Rakhshan V. Efficacy of photodynamic therapy in minimizing bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws after dental extraction: A preliminary animal study. *J Oral Maxillofac Surg* 2019;77(2):307–14. doi:10.1016/j.joms.2018.09.036
64. Cicciù M, Herford AS, Juodžbalys G, Stoffella E. Recombinant human bone morphogenetic protein type 2 application for a possible treatment of bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw. *J Craniofac Surg* 2012;23(3):784–8. doi:10.1097/SCS.0b013e31824dbdd4
65. Curi MM, Cossolin GS, Koga DH, Zardetto C, Christianini S, Feher O, et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws-an initial case series report of treatment combining partial bone resection and autologous platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg* 2011;69(9):2465–72. doi:10.1016/j.joms.2011.02.078
66. Epstein MS, Wicknick FW, Epstein JB, Berenson JR, Gorsky M. Management of bisphosphonate-associated osteonecrosis: pentoxifylline and tocopherol in addition to antimicrobial therapy. An initial case series. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;110(5):593–6. doi:10.1016/j.tripleo.2010.05.067

**Amaç ve Kapsam**

Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi (SABİAD); bağımsız, önyargısız ve çift-kör hakemlik ilkeleri çerçevesinde yayın yapan İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün uluslararası ve açık erişimli bilimsel yayın organıdır. Dergi Şubat, Haziran ve Ekim aylarında olmak üzere dört ayda bir yayınlanır ve üç sayıda bir cilt tamamlanır. Yayın dili Türkçe ve İngilizcedir.

Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi (SABİAD), tıbbın tüm alanlarında klinik ve deneysel, özgün araştırmalar, ender görülebilecek olgu sunumları, özel ve güncel konularda literatür derlemeleri ve editöre mektup yayınlamaktadır. Orijinal metot geliştirme, yeni bir girişim tekniği ve orijinal çalışmaların ön sonuçlarını içeren kısa raporlara da dergide yer verilmektedir.

**Editöryal Politikalar ve Hakem Süreci**

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

Özgünlük, yüksek bilimsel kalite ve atif potansiyelli bir makalenin yayına kabulü için en önemli kriterlerdir. Gönderilen yazıların daha önce başka bir elektronik ya da basılı dergide, kitapta veya farklı bir mecrada sunulmamış ya da yayınlanmamış olması gerekir. Toplantılarda sunulan çalışmalar için, sunum yapılan organizasyonun tam adı, tarihi, şehri ve ülkesi belirtilmelidir.

Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi'ne (SABİAD) gönderilen tüm makaleler çift-kör hakem değerlendirme sürecinden geçmektedir. Tarafsız değerlendirme sürecini sağlamak için her makale alanlarında uzman en az iki dış-bağımsız hakem tarafından değerlendirilir. Dergi Yayın Kurulu üyeleri tarafından gönderilecek makalelerin değerlendirme süreçleri, davet edilecek dış bağımsız editörler tarafından yönetilecektir. Bütün makalelerin karar verme süreçlerinde nihai karar yetkisi Editöründür.

Klinik ve deneysel çalışmalar, ilaç araştırmaları ve bazı olgu sunumları için World Medical Association Declaration of Helsinki "Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects", (amended in October 2013, www.wma.net) çerçevesinde hazırlanmış

Etik Komisyon raporu gerekmektedir. Gerekli görülmesi halinde yazarlardan Etik Komisyon raporu veya eşdeğeri olan resmi bir yazı talep edilebilir. İnsanlar üzerinde yapılmış deneysel çalışmaların sonuçlarını bildiren yazılarda, çalışmanın yapıldığı kişilere uygulanacak prosedürler tümüyle açıklandıktan sonra, onaylarının alındığına dâir bir açıklamaya metin içinde yer verilmelidir. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda ise ağrı, acı ve rahatsızlık verilmemesi için yapılmış olanlar açık ve net olarak makalede belirtilmelidir. Hasta onamları, Etik Kurul raporunun alındığı kurumun adı, onay belgesinin numarası ve tarihi ana metin dosyasında yer alan Gereç ve Yöntem başlığı altında yazılmalıdır. Hastaların kimliklerinin gizliliğini korumak yazarların sorumluluğundadır. Hastaların kimliğini açığa çıkarabilecek fotoğraflar için hastadan ya da yasal temsilcilerinden alınan imzalı izinlerin de gönderilmesi gereklidir.

Bütün makalelerin eşleşme oranı değerlendirmesi, iThenticate yazılımı aracılığıyla yapılmaktadır.

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

Yazar olarak listelenen herkesin ICMJE (www.icmje.org) tarafından önerilen yazarlık koşullarını karşılaması gerekmektedir.

ICMJE, yazarların aşağıdaki 4 koşulu karşılamasını önermektedir:

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

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



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

Derginin Yayın Kurulu, itiraz ve şikâyet durumlarında, COPE rehberleri kapsamında işlem uygular. Yazarlar, itiraz ve şikâyetleri için doğrudan Yayıncılık Birimi ile temasa geçebilirler. İhtiyaç duyulduğunda Yayın Kurulu'nun kendi içinde çözemediği konular için tarafsız bir temsilci atanmaktadır. İtiraz ve şikâyetler için karar verme süreçlerinde nihai kararı Baş Editör verecektir.

Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi her makalenin <https://dergipark.org.tr/tr/pub/sabiad> adresinden erişebileceğiniz Telif Hakkı Anlaşması Formu ile beraber gönderilmesini talep eder. Yazarlar, basılı ya da elektronik formatta yer alan resimler, tablolar ya da diğer her türlü içerik dâhil daha önce yayınlanmış bir alıntıyı kullanırken telif hakkı sahibinden izin almalıdırlar. Bu konudaki yasal, mali ve cezai sorumluluk yazar(lar)a aittir.

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

### Telif Hakkında

Yazarlar Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi 'nde yayınlanan çalışmalarının telif hakkına sahiptirler ve çalışmaları Creative Commons Atıf-GayriTicari 4.0 Uluslararası (CC BY-NC 4.0) olarak lisanslıdır. Creative Commons Atıf-GayriTicari 4.0 Uluslararası (CC BY-NC 4.0) lisansı, eserin ticari kullanım dışında her boyut ve formatta paylaşılmasına, kopyalanmasına, çoğaltılmasına ve orijinal esere uygun şekilde atıfta bulunmak kaydıyla yeniden düzenleme, dönüştürme ve eserin üzerine inşa etme dâhil adapte edilmesine izin verir.

### Makale Hazırlama

Makaleler, ICMJE-Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals (updated in December 2015 - <http://www.icmje.org/icmje-recommendations.pdf>) ile uyumlu olarak hazırlanmalıdır. Randomize çalışmalar CONSORT, gözlemsel çalışmalar STROBE, tanısal değerli çalışmalar STARD, sistematik derleme

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

Makaleler sadece <https://dergipark.org.tr/tr/pub/sabiad> adresinde yer alan derginin online makale yükleme ve değerlendirme sistemi üzerinden gönderilebilir. Farklı mecralardan gönderilen makaleler değerlendirilmeye alınmayacaktır.

Gönderilen makalelerin dergi yazım kurallarına uygunluğu ilk olarak Yayıncılık Birimi tarafından kontrol edilecek, derginin yazım kurallarına uygun hazırlanmamış makaleleri teknik düzeltme talepleri ile birlikte yazarlarına geri gönderilecektir.

Yazar(lar)ın aşağıdakileri sunmaları gerekir:

### Telif Hakları Formu

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

- Makalenin Türkçe ve İngilizce başlığı ve 50 karakteri geçmeyen Türkçe ve İngilizce kısa başlığı,
- Yazarların isimleri, kurumları, eğitim dereceleri ve ORCID numaraları
- Finansal destek bilgisi ve diğer destek kaynakları hakkında detaylı bilgi,
- Sorumlu yazarın ismi, adresi, telefonu (cep telefonu dâhil), faks numarası ve e-posta adresi,
- Makale hazırlama sürecine katkıda bulunan ama yazarlık kriterlerini karşılamayan bireylerle ilgili bilgileri içermelidir.

**Özet:** Editöre Mektup türündeki yazılar dışında kalan tüm makalelerin Türkçe ve İngilizce özetleri olmalıdır. Özgün Araştırma makalelerinin özetleri “Amaç”, “Gereç ve Yöntem”, “Bulgular” ve “Sonuç” alt başlıklarını içerecek biçimde hazırlanmalıdır. Olgu sunumu ve derleme türündeki yazıların Özet bölümlerinde alt başlıklar yazılmamalıdır.

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



## Makale Türleri

**Özgün Araştırma:** Ana metin; “Giriş”, “Gereç ve Yöntem”, “Bulgular” ve “Tartışma” alt başlıklarından oluşmalıdır.

Özgün Araştırmalarla ilgili sınırlandırmalar için lütfen Tablo 1’i inceleyiniz.

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

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

**Editöryel Yorum:** Dergide yayınlanan bir araştırmanın, o konunun uzmanı olan veya üst düzeyde değerlendirme yapan bir hakem tarafından kısaca yorumlanması amacını taşımaktadır. Yazar(lar), dergi tarafından seçilip davet edilir. Özet, anahtar sözcük, tablo, şekil, resim ve diğer görseller kullanılmaz.

**Derleme:** Konunun alanında birikimi olan ve bu birikimleri uluslararası literatüre yayın ve atıf sayısı olarak yansıtmış uzmanlar tarafından hazırlanmış yazılar değerlendirmeye alınır. Yazar(lar) dergi tarafından da davet edilebilir. Bir bilgi ya da konunun klinikte kullanılması için vardığı son düzeyi anlatan, tartışan, değerlendiren ve gelecekte yapılacak çalışmalara yön veren bir düzeyde hazırlanmalıdır. Ana metin; “Giriş”, “Klinik ve Araştırma Etkileri” ve “Sonuç” bölümlerini içermelidir. Derleme türündeki yazılarla ilgili kısıtlamalar için lütfen Tablo 1’i inceleyiniz.

**Olgu Sunumu:** Olgu sunumları için sınırlı sayıda yer ayrılmakta ve sadece ender görülen, tanı ve tedavisi güç

olan hastalıklarla ilgili, yeni bir yöntemi tarif eden, kitaplarda yer verilmeyen bilgiler yansıtan, ilgi çekici ve öğretici özelliği olan olgular yayına kabul edilmektedir. Ana metin; “Giriş”, “Olgu Sunumu”, “Tartışma” ve “Sonuç” alt başlıklarını içermelidir. Olgu Sunumlarıyla ilgili kısıtlamalar için lütfen Tablo 1’i inceleyiniz.

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

## Tablolar

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

## Resim ve Resim Altyazıları

Resimler, grafikler ve fotoğraflar (TIFF ya da JPEG formatında) ayrı dosyalar halinde sisteme yüklenmelidir. Görseller bir Word dosyası dokümanı ya da ana metin içerisinde sunulmamalıdır. Alt birimlere ayrılan görseller olduğunda, alt birimler tek bir görsel içerisinde verilmemelidir. Her bir alt birim sisteme, ayrı bir dosya olarak yüklenmelidir. Resimler alt birimleri belli etmek

**Tablo 1: Makale türleri için kısıtlamalar**

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

amacıyla etiketlenmemelidir (a, b, c vb.). Resimlerde altyazıları desteklemek için kalın ve ince oklar, ok başı, yıldızlar, asteriksler ve benzer işaretler kullanılabilir. Makalenin geri kalanında olduğu gibi resimlerde kör olmalıdır. Bu sebeple, resimlerde yer alan kişi ve kurum bilgilerine kesinlikle yer verilmemelidir.. Görsellerin minimum çözünürlüğü 300 DPI olmalıdır. Değerlendirme sürecindeki aksaklıkları önlemek için gönderilen tüm görsellerin çözünürlüğü net ve büyük boyutlu (minimum boyutlar 100x100 mm) olmalıdır. Resim altyazıları ana metnin sonunda yer almalıdır.

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

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

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

Özgün araştırmaların kısıtlılıkları, engelleri ve yetersizlikleri Sonuç paragrafı öncesi "Tartışma" bölümünde yer almalıdır.

### Revizyonlar

Yazar(lar) makalelerin revizyon dosyalarını gönderirken, ana metin üzerinde yaptıkları değişiklikleri işaretlemeli, ek olarak, hakemler tarafından öne sürülen önerilerle ilgili notlarını "Hakemlere Cevap" dosyasında göndermelidir. Hakemlere Cevap dosyasında her bir hakemin yorumunun ardından yazarın cevabı gelmeli ve değişikliklerin yapıldığı satır numaraları da ayrıca belirtilmelidir. Revize edilen makaleler karar mektubunu takip eden 30 gün içerisinde dergiye gönderilmelidir. Makalenin revize versiyonu belirtilen süre içerisinde yüklenemezse, revizyon seçeneği iptal olabilir. Yazar(lar)ın revizyon için ek süreye ihtiyaç duyması durumunda uzatma taleplerini ilk 30 gün sona ermeden dergiye iletmeleri gerekmektedir.

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

### Kaynaklar

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### Son Kontrol Listesi

- **Editöre mektup**
  - Makalenin türü
  - Başka bir dergiye gönderilmemiş olduğu bilgisi
  - Sponsor veya ticari bir firma ile ilişkisi (varsa belirtiniz)
  - İstatistik kontrolünün yapıldığı (araştırma makaleleri için)
  - Kaynakların NLM referans sistemine göre belirtildiği
- Yazar Formu
- Telif Hakkı Anlaşması Formu
- Makale kapak sayfası
  - Makalenin kategorisi
  - Makalenin Türkçe ve İngilizce başlığı
  - Makalenin Türkçe ve İngilizce kısa başlığı
  - Yazarların ismi soyadı, unvanları ve bağlı oldukları kurumlar (üniversite ve fakülte bilgisinden sonra şehir ve ülke bilgisi de yer almalıdır), e-posta adresleri
  - Sorumlu yazarın e-posta adresi, açık yazışma adresi, iş telefonu, GSM, faks no'su
  - Tüm yazarların ORCID'leri
- Makale ana metin dosyasında olması gerekenler
  - Makalenin Türkçe ve İngilizce başlığı
  - Özetler 250 kelime Türkçe ve 250 kelime İngilizce, (olgu sunumlarında özet 200 kelime Türkçe ve 200 kelime İngilizce)
  - Anahtar Kelimeler: 3 -6 Türkçe ve 3 -6 İngilizce
  - Makale ana metin bölümleri
  - Kaynaklar
  - Teşekkür (varsa belirtiniz)
  - Tablolar-Resimler, Şekiller (başlık, tanım ve alt yazılarıyla)

### **Aims and Scope**

Journal of Advanced Research in Health Sciences (JARHS) is an international, scientific, open access periodical published in accordance with independent, unbiased, and double-blinded peer-review principles. The journal is the official publication of Institute of Health Sciences of İstanbul University and it is published every 4 months on February, June, and October. The publication languages of the journal are Turkish and English.

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

### **Editorial Policies and Peer Review Process**

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

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

Manuscripts submitted to Journal of Advanced Research in Health Sciences will go through a double-blind peer-review process. Each submission will be reviewed by at least two external, independent peer reviewers who are

experts in their fields in order to ensure an unbiased evaluation process. The editorial board will invite an external and independent editor to manage the evaluation processes of manuscripts submitted by editors or by the editorial board members of the journal. The Editor in Chief is the final authority in the decision-making process for all submissions.

An approval of research protocols by the Ethics Committee in accordance with international agreements (World Medical Association Declaration of Helsinki “Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects,” amended in October 2013, [www.wma.net](http://www.wma.net)) is required for experimental, clinical, and drug studies and for some case reports. If required, ethics committee reports or an equivalent official document will be requested from the author(s). For manuscripts concerning experimental research on humans, a statement should be included that shows that written informed consent of patients and volunteers was obtained following a detailed explanation of the procedures that they may undergo. For studies carried out on animals, the measures taken to prevent pain and suffering of the animals should be stated clearly. Information on patient consent, the name of the ethics committee, and the ethics committee approval number should also be stated in the Materials and Methods section of the manuscript. It is the author(s)’ responsibility to carefully protect the patients’ anonymity. For photographs that may reveal the identity of the patients, signed releases of the patient or of their legal representative should be enclosed.

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

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

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

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

1. Substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; AND
2. Drafting the work or revising it critically for important intellectual content; AND

3. Final approval of the version to be published; AND
4. Agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

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

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

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

Journal of Advanced Research in Health Sciences requires each submission to be accompanied by a Copyright Transfer Form (available for download at <https://dergipark.org.tr/en/pub/sabiad>). When using previously published content, including figures, tables, or any other material in both print and electronic formats, authors must obtain permission from the copyright holder. Legal, financial and criminal liabilities in this regard belong to the author(s).

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

### Copyright Notice

Authors publishing with **Journal of Advanced Research in Health Sciences** retain the copyright to their work, licensing it under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0) license that gives permission to copy and redistribute

the material in any medium or format other than commercial purposes as well as remix, transform and build upon the material by providing appropriate credit to the original work.

### Manuscript Preparation

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

Manuscripts can only be submitted through the journal's online manuscript submission and evaluation system, available at <https://dergipark.org.tr/tr/pub/sabiad>. Manuscripts submitted via any other medium will not be evaluated.

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

Author(s) are required to submit the following:

- **Copyright Transfer Form,**

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

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



fulfil the authorship criteria.

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

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

**Manuscript Types**

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

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

Units should be prepared in accordance with the

International System of Units (SI).

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

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

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

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

Type of manuscript	Word limit	Abstract word limit	Reference limit	Table limit	Figure limit
Original Article	3500	250 (Structured)	30	6	7 or total of 15 images
Review Article	5000	250	50	6	10 or total of 20 images
Case Report	1000	200	15	No tables	10 or total of 20 images
Technical Note	1500	No abstract	15	No tables	10 or total of 20 images
Letter to the Editor	500	No abstract	5	No tables	No media

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

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

### Figures and Figure Legends

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

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

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

All references, tables, and figures should be referred to within the main text, and they should be numbered

consecutively in the order they are referred to within the main text.

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

### Revisions

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

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

### References

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

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

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

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

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

Conference Proceedings: Bengissson S. 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](http://www.cdc.gov/ncidod/EID/cid.htm).

### Submission Checklist

- **Cover letter to the editor**
  - The category of the manuscript
  - Confirming that “the paper is not under consideration for publication in another journal”

- Including disclosure of any commercial or financial involvement.
- Confirming that the statistical design of the research article is reviewed.
- Confirming that the references cited in the text and listed in the references section are in line with NLM.

- **Copyright Agreement Form**

- **Author Form**

- **Permission of previous published material if used in the present manuscript**

- Acknowledgement of the study “in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional and national) and with the Helsinki Declaration.
- Statement that informed consent was obtained after the procedure(s) had been fully explained. Indicating whether the institutional and national guide for the care and use of laboratory animals was followed as in “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”.

- **Title page**

- The category of the manuscript
- The title of the manuscript both in Turkish and in English
- Short title (running head) both in Turkish and in English
- All authors’ names and affiliations (institution, faculty/department, city, country), e-mail addresses
- Corresponding author’s email address, full postal address, telephone and fax number
- ORCIDs of all authors.

- **Main Manuscript Document**

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

## COPYRIGHT AGREEMENT FORM / TELİF HAKKI ANLAŞMASI FORMU



Istanbul University  
İstanbul Üniversitesi

Journal name: Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi  
Dergi Adı: Journal of Advanced Research in Health Sciences

Copyright Agreement Form  
Telif Hakkı Anlaşması Formu

<b>Responsible/Corresponding Author</b> Sorumlu Yazar	
<b>Title of Manuscript</b> Makalenin Başlığı	
<b>Acceptance date</b> Kabul Tarihi	
<b>List of authors</b> Yazarların Listesi	

Sıra No	Name - Surname Adı-Soyadı	E-mail E-Posta	Signature İmza	Date Tarih
1				
2				
3				
4				
5				

<b>Manuscript Type (Research Article, Review, Short communication, etc.)</b> Makalenin türü (Araştırma makalesi, Derleme, Kısa bildiri, v.b.)	
--	--

<b>Responsible/Corresponding Author:</b> Sorumlu Yazar:	
--	--

<b>University/company/institution</b>	Çalıştığı kurum	
<b>Address</b>	Posta adresi	
<b>E-mail</b>	E-posta	
<b>Phone; mobile phone</b>	Telefon no; GSM no	

**The author(s) agrees that:**  
The manuscript submitted is his/her/their own original work, and has not been plagiarized from any prior work, all authors participated in the work in a substantive way, and are prepared to take public responsibility for the work, all authors have seen and approved the manuscript as submitted, the manuscript has not been published and is not being submitted or considered for publication elsewhere, the text, illustrations, and any other materials included in the manuscript do not infringe upon any existing copyright or other rights of anyone. İSTANBUL UNIVERSITY will publish the content under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0) license that gives permission to copy and redistribute the material in any medium or format other than commercial purposes as well as remix, transform and build upon the material by providing appropriate credit to the original work.  
The Contributor(s) or, if applicable the Contributor's Employer, retain(s) all proprietary rights in addition to copyright, patent rights; to use, free of charge, all parts of this article for the author's future works in books, lectures, classroom teaching or oral presentations, the right to reproduce the article for their own purposes provided the copies are not offered for sale.  
All materials related to manuscripts, accepted or rejected, including photographs, original figures etc., will be kept by İSTANBUL UNIVERSITY for one year following the editor's decision. These materials will then be destroyed.  
I/We indemnify İSTANBUL UNIVERSITY and the Editors of the Journals, and hold them harmless from any loss, expense or damage occasioned by a claim or suit by a third party for copyright infringement, or any suit arising out of any breach of the foregoing warranties as a result of publication of my/our article. I/We also warrant that the article contains no libelous or unlawful statements, and does not contain material or instructions that might cause harm or injury.  
This Copyright Agreement Form must be signed/ratified by all authors. Separate copies of the form (completed in full) may be submitted by authors located at different institutions; however, all signatures must be original and authenticated.

**Yazar(lar) aşağıdaki hususları kabul eder**  
Sunulan makalenin yazar(lar)ın orijinal çalışması olduğunu ve intihal yapmadıklarını,  
Tüm yazarların bu çalışmaya aslı olarak katılmış olduklarını ve bu çalışma için her türlü sorumluluğu aldıklarını,  
Tüm yazarların sunulan makalenin son halini gördüklerini ve onayladıklarını,  
Makalenin başka bir yerde basılmadığını veya basılmak için sunulmadığını,  
Makalede bulunan metnin, şekillerin ve dokümanların diğer şahıslara ait olan Telif Haklarını ihlal etmediğini kabul ve taahhüt ederler.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ'nin bu fikri eseri, Creative Commons Atıf-GayriTicari 4.0 Uluslararası (CC BY-NC 4.0) lisansı ile yayınlamasına izin verirler. Creative Commons Atıf-GayriTicari 4.0 Uluslararası (CC BY-NC 4.0) lisansı, eserin ticari kullanım dışında her boyut ve formatta paylaşılmasına, kopyalanmasına, çoğaltılmasına ve orijinal esere uygun şekilde atıfta bulunmak kaydıyla yeniden düzenleme, dönüştürme ve eserin üzerine inşa etme dâhil adapte edilmesine izin verir.  
Yazar(lar)ın veya varsa yazar(lar)ın işverenin telif dâhil patent hakları, yazar(lar)ın gelecekte kitaplarında veya diğer çalışmalarında makalenin tümünü ücret ödemesiz kullanma hakkı makaleyi satmamak koşuluyla kendi amaçları için çoğaltma hakkı gibi fikri mülkiyet hakları saklıdır.  
Yayımlanan veya yayıma kabul edilmeden önce makalelerle ilgili dokümanlar (fotoğraf, orijinal şekil vb.) karar tarihinden başlamak üzere bir yıl süreyle İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ'nce saklanır ve bu sürenin sonunda imha edilir.  
Ben/Biz, telif hakkı ihlali nedeniyle üçüncü şahıslarca vuku bulacak hak talebi veya açılacak davalarda İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ ve Dergi Editörlerinin hiçbir sorumluluğunun olmadığını, tüm sorumluluğun yazarlara ait olduğunu taahhüt ederim/ederiz.  
Ayrıca Ben/Biz makalede hiçbir suç unsuru veya kanuna aykırı ifade bulunmadığını, araştırma yapılırken kanuna aykırı herhangi bir malzeme ve yöntem kullanılmadığını taahhüt ederim/ederiz.  
Bu Telif Hakkı Anlaşması Formu tüm yazarlar tarafından imzalanmalıdır/onaylanmalıdır. Form farklı kurumlarda bulunan yazarlar tarafından ayrı kopyalar halinde doldurularak sunulabilir. Ancak, tüm imzaların orijinal veya kanıtlanabilir şekilde onaylı olması gerekir.

<b>Responsible/Corresponding Author;</b> Sorumlu Yazar;	<b>Signature / İmza</b>	<b>Date / Tarih</b>
		...../...../.....

