

EXPERIMED

Volume/Cilt **10** Issue/Sayı **2 August/Ağustos 2020**

- » **Neurocognitive Decline Caused by L-Methionine: A Mouse Model of Neurodegeneration**
Yağız M. Altun, Erdem Tüzün, Mark F. Mehler, Şölen Gökhan
- » **Prognostic Significance of Glutathione Peroxidase (GSH-Px) Levels in Lumbar Degenerative Disc Disease**
Cumhur Kaan Yaltırık, Seda Güleç Yılmaz, Fatma Tuba Akdeniz, Kadir Sümerkent, Selçuk Özdoğan, Turgay İsbir
- » **Quantitative Determination of α -Tocopherol in Pharmaceutical Soft Capsule by Spectrophotometry**
Gamze Özgül Artuç
- » **Lime Scale Water in Domestic Boilers as the Main Toxic Factor in the Human Body**
Valdrin M. Beluli, Kathelina Kristollari, Aleksandër Kaso, Fatime Krasniqi
- » **Are Stereotactic Body Radiotherapy and Zoledronic Acid Combination Additive or Synergistic in Bone Metastasis?**
Yasemin Benderli Cihan
- » **Cancer Immunotherapy in Solid Organ Transplanted Patients**
Ali Abdi, Fatma Betül Öktelik, Mehtap Doğruel Biçer, Ali Osman Gürol
- » **Nutritional Immunomodulators**
Farhad Kohansal Koshksaray, Mustafa Murat Özbalak, İlker İnanç Balkan, Gaye Erten Yurdağül
- » **Antibody-dependent Immunopathology, Monoclonal Antibodies and Mutations in COVID-19**
Bülent Çakal

EXPERIMED

REPRESENTATIVE OF OWNER / YAYIN SAHİBİ TEMSİLCİSİ

Representative of Experimed on behalf of owner is
Prof. Dr. Günnur Deniz (Istanbul, Turkey)

*Experimed dergisinin sahibi adına temsilcisi:
Prof. Dr. Günnur Deniz (Istanbul, Türkiye)*

EDITORIAL MANAGEMENT / DERGİ YAZI KURULU

EDITOR IN CHIEF / BAŞ EDITÖR

Bedia Çakmakçoğlu 

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

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

E-mail: bedia@istanbul.edu.tr

ASSOCIATE EDITORS / YARDIMCI EDITÖRLER

Sema Sırma Ekmekçi 

Department of Genetics, İstanbul University,
Aziz Sançar Institute of Experimental Medicine,
İstanbul, Turkey

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

E-mail: sirmasem@istanbul.edu.tr

Umut Can Küçüksezer 

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

*İstanbul Üniversitesi, Aziz Sançar Deneysel Tıp
Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji Anabilim Dalı,
İstanbul, Türkiye*

E-mail: uksezer@istanbul.edu.tr

Vuslat Yılmaz 

Department of Neuroscience, İstanbul
University, Aziz Sançar Institute of Experimental
Medicine, İstanbul, Turkey

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

E-mail: vuslat.yilmaz@istanbul.edu.tr

STATISTICS EDITOR / İSTATİSTİK EDITÖRÜ

Sevda ÖZEL YILDIZ

İstanbul Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim
Dalı, İstanbul, Türkiye

LANGUAGE EDITORS / DİL EDITÖRLERİ

Elizabeth Mary EARL

İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Türkiye

Alan James Newson

İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Türkiye

PAST EDITORS / ÖNCEKİ EDITÖRLER

Erdem Tüzün

Uğur Özbek

This is an international, scholarly, peer-reviewed, open-access journal published, in April, August and December.
Nisan, Ağustos ve Aralık aylarında yayınlanan hakemli, açık erişimli ve uluslararası bilimsel bir dergidir.

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

The journal is covered in Chemical Abstracts Service (CAS) and Sobiad.
Dergi Chemical Abstracts Service (CAS) ve Sobiad'da taranmaktadır.



Publisher

Istanbul University Press

Address: İstanbul University Central Campus,
34452 Beyazıt, Fatih / İstanbul - Turkey
Phone: +90 212 440 00 00

EXPERIMED

EDITORIAL BOARD / YAYIN KURULU

Aziz Sancar (Honorary Member / Onursal Üye)

Department of Biochemistry and Biophysics,
University of North Carolina School of Medicine,
Chapel Hill, North Carolina, USA

*North Carolina Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya
ve Biofizik Bölümü, Chapel Hill, NC, ABD*

Abid Hussaini

Department of Pathology and Cell Biology,
Columbia University, Taub Institute, New York, USA
*Columbia Üniversitesi, Taub Enstitüsü, Patoloji
ve Hücre Biyolojisi Anabilim Dalı, New York, ABD*

Ahmet Gül

Department of Internal Medicine, İstanbul
University School of Medicine, İstanbul, Turkey
*İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi İç
Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye*

Ali Önder Yıldırım

Department of Lung Biology and Diseases,
Helmholtz Zentrum München, München,
Germany
*Helmholtz Zentrum München, Akciğer Biyolojisi
ve Hastalıkları Bölümü, Münih, Almanya*

Batu Erman

Department of Molecular Biology, Genetics and
Bioengineering, İstanbul, Turkey
*Sabancı Üniversitesi, Moleküler Biyoloji,
Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, İstanbul,
Türkiye*

Çağla Eroğlu

Department of Cell Biology, Duke University,
North Carolina, USA
*Duke Üniversitesi, Hücre Biyolojisi Anabilim
Dalı, Kuzey Carolina, ABD*

Ebba Lohmann

Department of Neurodegenerative
Diseases, Tübingen University, Tübingen,
Germany
*Tübingen Üniversitesi, Nörodejeneratif
Hastalıklar Anabilim Dalı, Tübingen, Almanya*

Elif Apohan

Department of Biotechnology, İnönü University
School of Science, Malatya, Turkey
*İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji
Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Malatya, Türkiye*

Erdem Tüzün

Department of Neuroscience, İstanbul
University, Aziz Sancar Institute of Experimental
Medicine, İstanbul, Turkey
*İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp
Araştırma Enstitüsü, Sinirbilim Anabilim Dalı,
İstanbul, Türkiye*

Gökçe Toruner

Department of Hematology, MD Anderson Cancer
Center, Houston, Texas, USA
*MD Anderson Kanser Merkezi, Hematoloji
Anabilim Dalı, Houston, Teksas, ABD*

Günnur Deniz

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

Gürol Tunçman

Department of Genetics and Complex Diseases,
Harvard University, Massachusetts, USA
*Harvard Üniversitesi, Genetik ve Karmaşık
Hastalıklar Anabilim Dalı, Massachusetts, ABD*

Hannes Stockinger

Molecular Immunology Unit, Vienna School of
Medicine, Pathophysiology Center, Vienna, Austria
*Viyana Tıp Fakültesi, Patofizyoloji Merkezi,
Moleküler İmmünoloji Ünitesi, Viyana, Avusturya*

Hülya Yılmaz

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

İhsan Gürsel

Department of Molecular Biology and Genetics,
Bilkent University, Ankara, Turkey
*Bilkent Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve
Genetik Bölümü, Ankara, Türkiye*

Melih Acar

Texas University Pediatric Research Institute,
Dallas, Texas, USA
*Teksas Üniversitesi Çocuk Araştırmaları Enstitüsü,
Dallas, Teksas, ABD*

Numan Özgen

Department of Pathology and Immunology,
Baylor University School of Medicine, Texas, USA
*Baylor Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji ve
İmmünoloji Anabilim Dalı, Texas, ABD*

Serhat Pabuççuoğlu

Department of Reproduction & Artificial
Insemination, İstanbul University-Cerrahpaşa
School of Veterinary, İstanbul, Turkey
*İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Veteriner
Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim
Dalı, İstanbul, Türkiye*

Sühendan Ekmekçioğlu

Texas University, MD Anderson Cancer Center,
Houston, Texas, USA
*Teksas Üniversitesi, MD Anderson Kanser
Merkezi, Houston, Texas, ABD*

Yusuf Baran

Department of Molecular Biology and
Genetics, İzmir Institute of Technology,
İzmir, Turkey
*İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü,
Moleküler Biyoloji Ve Genetik Bölümü,
İzmir, Türkiye*

EXPERIMED

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

- 59** **Neurocognitive Decline Caused by L-Methionine: A Mouse Model of Neurodegeneration**
Yağız M. Altun, Erdem Tüzün, Mark F. Mehler, Şölen Gökhan
- 67** **Prognostic Significance of Glutathione Peroxidase (GSH-Px) Levels in Lumbar Degenerative Disc Disease**
Cumhur Kaan Yaltırık, Seda Güleç Yılmaz, Fatma Tuba Akdeniz, Kadir Sümerkent, Selçuk Özdoğan, Turgay İsbir
- 72** **Quantitative Determination of α -Tocopherol in Pharmaceutical Soft Capsule by Spectrophotometry**
Gamze Özgül Artuç
- 77** **Lime Scale Water in Domestic Boilers as the Main Toxic Factor in the Human Body**
Valdrin M. Beluli, Kathelina Kristollari, Aleksandër Kaso, Fatime Krasniqi
- SHORT COMMUNICATION**
- 84** **Are Stereotactic Body Radiotherapy and Zoledronic Acid Combination Additive or Synergistic in Bone Metastasis?**
Yasemin Benderli Cihan
- REVIEWS**
- 87** **Cancer Immunotherapy in Solid Organ Transplanted Patients**
Ali Abdi, Fatma Betül Öktelek, Mehtap Doğruel Biçer, Ali Osman Gürol
- 97** **Nutritional Immunomodulators**
Farhad Kohansal Koshksaray, Mustafa Murat Özbalak, İlker İnanç Balkan, Gaye Erten Yurdagül
- 112** **Antibody-dependent Immunopathology, Monoclonal Antibodies and Mutations in COVID-19**
Bülent Çakal

EXPERIMED

İÇİNDEKİLER

ORJİNAL ARAŞTIRMALAR

- 59** L-Metiyoninin Neden Olduğu Nörokognitif Yıkılma: Bir Nörodejenerasyon Fare Modeli
Yağız M. Altun, Erdem Tüzün, Mark F. Mehler, Şölen Gökhan
- 67** Lomber Dejeneratif Disk Hastalığında Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Düzeylerinin Prognostik Önemi
Cumhur Kaan Yaltırık, Seda Güleç Yılmaz, Fatma Tuba Akdeniz, Kadir Sümerkent, Selçuk Özdoğan, Turgay İsbir
- 72** Farmasötik Yumuşak Kapsülde α -Tokoferolün Spektrofotometri ile Kantitatif Tayini
Gamze Özgül Artuç
- 77** İnsan Vücudunda Ana Toksik Faktör Olarak Evsel Kazanlardaki Kireç Birikimi Su
Valdrin M. Beluli, Kathelina Kristollari, Aleksandër Kaso, Fatime Krasniqi

KISA BİLDİRİ

- 84** SBRT ve Zoledronik Asid Kombinasyonu Kemik Metastaz Tedavisinde Aditif veya Sinerjistik Etki Mi Yapar?
Yasemin Benderli Cihan

DERLEMELER

- 87** Solid-Organ Transplantasyonu Olan Hastalarda Kansere İmmünoterapisi
Ali Abdi, Fatma Betül Öktelik, Mehtap Doğruel Biçer, Ali Osman Gürol
- 97** Gıda Kaynaklı İmmünomodülatörler
Farhad Kohansal Koshksaray, Mustafa Murat Özbek, İlker İnanç Balkan, Gaye Erten Yurdagül
- 112** COVID-19'da Antikor Bağlı İmmünopatoloji, Monoklonal Antikorlar ve Mutasyonlar
Bülent Çakal

L-Metiyoninin Neden Olduğu Nörokognitif Yıkılma: Bir Nörodejenerasyon Fare Modeli

Neurocognitive Decline Caused by L-Methionine: A Mouse Model of Neurodegeneration

Yağız M. Altun^{1,2} , Erdem Tüzün¹ , Mark F. Mehler^{2,3,4} , Şölen Gökhan² 

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

²Albert Einstein College of Medicine, The Saul R. Korey Department of Neurology, New York

³Albert Einstein College of Medicine, Dominick P. Purpura Department of Neuroscience, New York

⁴Albert Einstein College of Medicine, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, New York

ORCID ID: Y.M.A. 0000-0003-0841-6740; E.T. 0000-0002-4483-0394; M.F.M. 0000-0003-0674-7781; S.G. 0000-0002-5939-9074

Cite this article as: Altun YM, Tuzun E, Mehler MF, Gokhan S. L-metiyoninin neden olduğu nörokognitif yıkılma: Bir nörodejenerasyon fare modeli. Experimed 2020; 10(2): 59-66.

ÖZ

Amaç: Nörodejeneratif hastalıklar geri dönüşü olmayan nöronal ve glial kayıplarla seyreden merkezi sinir sistemi yıkılımdır. Bu hastalıklar her ne kadar nöral hücre yıkım ortak paydasında birleşseler de her biri farklı klinik bulgularla seyretmektedir. Bu hastalıklarda izlenen klinik tablo spektrumunu inceleyebilmek adına çevresel stresör olarak verilen l-metiyonin yüklemesinin yol açtığı davranış değişikliklerinin ve bu davranış değişikliklerinin temelinde olan immünohistokimyasal değişimlerin incelenmesi amaçlanmıştır.

Gerçek ve Yöntem: Bu çalışmada davranış ve immünohistokimya testleri için fareler 4 gruba ayrılmıştır: dişi-kontrol (n=13), dişi-metiyonin (n=12), erkek-kontrol (n=12), erkek-metiyonin (n=13). Kontrol ve deney gruplarına post-natal 6. haftadan başlayarak, 12 hafta boyunca su veya 8.2 g/kg doza ulaşacak şekilde l-metiyoninli su verilmiştir. Bu sürenin sonunda farelere anksiyete, depresyon, hafıza/öğrenme ve motor fonksiyon testleri uygulanmıştır. Davranış testlerinde kullanmadığımız farelerin (her gruptan davranış testleri öncesi rastgele seçilmiş 3 fare) beyin kesitlerinde immünohistokimyasal analizler yapılmıştır.

Bulgular: L-metiyonin alan farelerde almayanlara kıyasla hipokampus bağımlı mekansal hafızada istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmüştür. Depresyon ve anksiyete adına herhangi bir fark bulunmamıştır. Hipokampus formasyonunun dentat girusunda yaptığımız immünohistokimyasal incelemede, hem dişi hem de erkek farelerde senesans astrositlerin tüm astrositlere olan oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Sonuç: Kronik yüksek doz oral l-metiyonin alımı farelerde anlamlı hipokampus bağımlı mekansal hafıza bozukluklarına yol açmıştır. Buna paralel olarak, dentat girusta senesans astrositlerin tüm astrositlere oranı da artmıştır.

Anahtar Kelimeler: L-metiyonin, kognitif yıkım, hücre senesans

ABSTRACT

Objective: Neurodegenerative diseases are defined by irreversible neuronal and glial loss in the central nervous system. Despite sharing neural cell loss as a common denominator, they differ in their clinical manifestations in many aspects. We aimed to analyze the behavioral changes and underlying immunohistochemical changes in mice caused by an environmental stressor, l-methionine, to assess the spectrum of clinical findings observed in these diseases.

Material and Method: In this study, the mice are divided into 4 groups: female-control (n=13), female-methionine (n=12), male-control (n=12), male-methionine (n=13) to perform immunohistochemical and behavioral tests. Starting from post-natal week 6, the mice were either administered water or 8.2g/kg l-methionine for 12 weeks. Consequently, they underwent a series of behavioral tests to assess anxiety, depression, memory/learning, and motor functions. We performed immunohistochemical analysis on mice (3 randomly chosen mice from each group prior to behavior tests) which did not undergo behavioral tests.

Results: Compared to the control group, mice who received l-methionine were found to have significant hippocampus dependent spatial memory deficits. No significant differences were found in regards to anxiety and depression. Our immunohistochemical analysis showed a significantly increased senescent astrocyte to all astrocyte ratio in dentate gyrus of hippocampal formation.

Conclusion: Chronic administration of an oral high dose of l-methionine results in hippocampus dependent memory decline in mice. Parallel to this finding, the ratio of senescent astrocytes to all astrocytes increased in dentate gyrus.

Keywords: L-methionine, cognitive decline, cellular senescence

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Yağız M. Altun **E-posta:** yagizmercaltun@gmail.com, yagiz.altun@einsteinmed.org

Başvuru/Submitted: 24.07.2020 **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 06.08.2020

Son Revizyon/Last Revision Received: 07.08.2020 **Kabul/Accepted:** 10.08.2020



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

GİRİŞ

Nörodejeneratif hastalıklar geri dönüşü olmayan nöronal ve glial kayıplarla seyreden merkezi ve periferik sinir sistemi yıkımıdır. Nörodejeneratif hastalıkların her biri çok farklı klinik tablolarla kendini göstermektedir. Örneğin, Alzheimer hastalığı (AH) hafıza bozukluğu ve diğer kognitif bozukluklarla seyrederken, Parkinson hastalığı (PH) öncelikle motor bozukluklara yol açmaktadır. Süreç içerisinde kognitif bozukluklar da tabloya eklenebilmektedir (1). Hastalık başlangıcı ve seyirleri genetik ve epigenetik farklılıklara ve çevresel stresörlere bağlı olarak değişmektedir. Genel anlamda nörodejeneratif hastalıkların prevalansı insanların ortalama yaşam beklentisinin uzamasıyla artmaktadır. Yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğu nörodejeneratif hastalıkları yaşlanmayla bağdaştırırsa da, sayıları giderek artan yeni araştırmalar, bu hastalıkların temelinde sinir sisteminin gelişimsel bozukluklarının yattığını da öne sürmektedir (2). Bu açıdan bakıldığında nörodejeneratif hastalıkların patolojisi hala tam olarak aydınlatılamamıştır.

Nörodejeneratif süreçlerde hastalığın hedefini oluşturan hücrelerin sitoiskeletinde parçalanma, alt bölmelerinde sitoplazmik organellerin balonlaşması, yıkılması (mitokondriyal balonlaşma, genişlemiş lizozomal vaküoller), nörodejeneratif hastalıklara özgü inklüzyon cisimciklerinin belirmesi, (TDP-43 proteinini içeren (3) ve Lewy inklüzyon cisimcikleri vb.), sitoplazma ve nukleoplazmada işlenememiş artıkların çoğalması ve membranların bütünlüğünün bozulmasıyla seyreden çok çeşitli değişiklikler görülür. Buna paralel olarak hücre nöron ve glial bağlantılarında kesiklikler, nöronlar arası sinapslarda yıkılma ve hücreler arası matriks materyelinde de yine işlenememiş artıkların (amiloid, nörofibriler yumak) çoğaldığı görülür (4). Bu sayılan hücre içi ve dışı değişiklikler süreç içerisinde hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır. Her ne kadar nöronlar merkezi sinir sisteminin yapı taşları olsalar da, astrositler ve oligodendrositlerde de dejeneratif değişiklikler görülmektedir. Ayrıca astrositler ve sinir sisteminde yer alan diğer bir hücre grubunu oluşturan mikroglialar, inflamatuvar yanıt oluşturarak nörodejenerasyonu hızlandırmaktadır (5).

Nörodejeneratif hastalıklar etkiledikleri bölgelere göre nöroanatomi farklılıklar göstermektedir (6). Kolinerjik nöronların birincil hedef olduğu gösterilmiş AH'de bütün kolinerjik nöronlar etkilenmemektedir. Öncelikle Meynert'in bazal nukleusundaki büyük kolinerjik projeksiyon nöronları dejenerasyona uğramaktadır. Bazal nukleustaki bu kolinerjik nöronların fonksiyonlarının bozulmasıyla birlikte bu nöronların uzantılarıyla sinaps yapan kortikal ve hipokampal nöronların fonksiyonlarının değiştiği de gösterilmiştir (7). Hastalığın çok ileri safhalarında hücresel yıkım merkezi sinir sisteminin diğer alanlarına da yayılmaktadır. PH'de ise öncelikli hedef substantia nigra pars kompaktadaki dopaminerjik nöronlardır (8). Benzer bir şekilde Huntington hastalığında hücre dejenerasyonu ve ölümleri öncelikle striatumdaki dopaminerjik orta spinal nöronlarda izlenmektedir (9). Spinocerebellar atakside ise öncelikli yıkım Purkinje hücrelerini etkiler (10). İlginç bir şekilde bunca farklı nörodejeneratif hastalıkta neden bu özel bölgelerin ve hücre gruplarının hedef seçildiği henüz açıklanamamıştır (11,12).

Nörodejeneratif hastalıkların en önemli özelliklerinden biri de klinik bulguların ortaya çıkmasından önce hücreleri etkileyen patolojik değişikliklerin dekatlar boyu sessiz bir şekilde ilerlemeleridir. Kognitif ve diğer nörolojik fonksiyonların klinik tablonun ortaya çıktığı döneme kadar nasıl olup da korunabildiği henüz aydınlatılamamıştır. Bu konuda bir çok hipotez ortaya atılmış olsa da çevresel etmenlerin, klinik öncesi latent dönemin uzunluğunu belirlediği düşünülmektedir (13). Bu yüzden klinik öncesi dönemde sinir sisteminde süre giden fizyopatolojik değişikliklerin tanısının konulmasını sağlayacak biyomarkerlerin ve psikometrik testlerin bulunması çok önem kazanmıştır. Böylece ön tanısı konacak hastaların çevresel zararlı etmenlerden kendilerini koruyabilmeleri ve hastalığın klinik tablosunun ortaya çıkmasının mümkün olduğunca geciktirilmesi hedeflenmektedir. Örneğin otozomal dominant bir hastalık olarak bilinen Huntington hastalığına yakalanacağı belirlenen kişilerin, hastalık tablosunun başlamasından 20-30 yıl öncesinde kontrol grubundakilere göre anlamlı derecede artmış konuşma bozuklukları (parafazi) sergilediği gösterilmiştir (14).

Nörodejeneratif hastalıkların etiopatogenezleri genetik, epigenetik ve çevresel pek çok faktörün etkileşimiyle açıklanmaktadır. Yukarıda saydığımız klasik ailevi nörodejeneratif hastalıkların yanı sıra beslenme (B12 eksikliği) (15), metabolizma bozukluklarına (hipotiroidizm, Wilson hastalığı, glikojen depo hastalıkları vb.) ve çeşitli çevresel toksinlerin (kurşun ve arsenik zehirlenmesi vb.) etkisine bağlı sinir sistemiyle sınırlı olmayan birçok dejeneratif hastalık daha tanımlanmıştır. Son olarak bu çok zengin klinik ve patolojik tabloya genetik ve çevresel faktörlerin nasıl etkili olduğu tam olarak henüz açıklanamayan multipl skleroz hastalığı da eklenmelidir.

Bu hastalıkların çoğu teşhis konulduğunda tedavi edilemeyecek kadar ileri bir klinik tabloya ulaşmış olmaktadır. Bununla birlikte B12 eksikliğinin neden olduğu subakut kombine dejenerasyon, yine hem B12 hem de erişkin hipotiroidizminin neden olduğu geçici demansiyel tabloların, bu besinsel ve endokrin eksikliğin telafi edilmesiyle tedavi edilebiliyor olması nörodejeneratif süreçlerin mutlak geri dönüşümsüz olmadığı umudunu vermektedir. Bu yüzden sayıları giderek artan temel bilim ve klinik araştırmalar ortalama insan ömrünün artmasıyla çağımızın en büyük hastalıkları haline gelen nörodejeneratif tabloların erken teşhisi ve tedavisine odaklanmıştır.

Yukarıda saydığımız çevresel faktörler dışında B12 eksikliğine de neden olabilen yüksek l-metiyonin alımının hiperhomosisteinemiye yol açarak (16) nörodejenerasyona neden olabileceği gösterilmiştir (17). Bu tablo genetik mutasyon sonucu sistatyonin beta sentaz enziminin çalışmadığı durumlarda ortaya çıkmakla birlikte, homosistein siklusunun ön maddesi olan metiyonin amino asitinin aşırı yüklemesiyle de ortaya çıkabilmektedir (Sekil 1). Alınan metiyonini metabolize etmeye yetişemeyen homosistein siklusu vücutta yan ürün olarak hiperhomosistein artışına neden olmaktadır. Bu durum görece folik asit, B12 veya B6 vitamini eksikliği yaratıp çeşitli hematolojik (18), nörodejeneratif tablolara (17) ve hatta inmelere (19) yol açmaktadır (20). Hiperhomosisteinemi ayrıca damar cidarında

endotelial hücrelerin membran bütünlüğünü bozup, yaygın oksidatif stresle (21) birçok homeostatik mekanizmanın bozulmasına neden olduğunu açıklayan çalışmalar da vardır (17,22). Biz bu çalışmamızda öncelikle homosistein metabolizmasının dekompanasyonu ile ortaya çıktığı gösterilen nörodejeneratif tabloyu hazırlayan (17) ve sonucunda nöroanatomi alanları ve buralardaki hücre tiplerini selektif olarak etkileyebilecek hücre yıkılım sürecini incelemek istedik. Özellikle bu değişikliklerin, nörodejeneratif süreçlerin başlamasında rolü olabileceği yakın zaman önce öne sürülmüş senesans savunma mekanizmasıyla olan ilgisini araştırdık. Bu özel moleküler savunma yoluyla öncelikle hücrenin kanserleşmeye karşı geliştirdiği bir direnç mekanizması olarak tanımlanmıştır. İmmünohistokimyasal çalışmalarda, senesans mekanizmasına giren hücreler, özel senesansla alakalı beta-galaktozidaz (SA β -Gal) boyamasıyla belirlenmiştir. Bu hücrelerde SA β -Gal boyası, kanserleşmeyi tetikleyen çevresel strese bağlı olarak aktive olan lizozomlarda β -galaktozidaz enziminin arttığını göstermektedir (23). Ancak bu artış sonucunda tetiklenen kanser, hücre ölümü ve nörodejeneratif süreçleri başlatan moleküler yollardaki değişikliklerin incelenmesi hala devam etmektedir. Özellikle senesansın hedef hücrede nörodejenerasyonu başlatan mı, yoksa ona karşı oluşan moleküler bir savunma mekanizması mı olduğu bilinmemektedir. Bu amaçla çalışmamızda, daha önce nörodejenerasyona neden olduğu gösterilmiş çevresel bir faktörü (organ yetmezliği dozu altı l-metiyonin yüklemesi) kullanarak akut dönemde farelerde gelişebilecek bilişsel, duygudurum, motor ve denge bozuklukları ve bu sürecin altında yatabilecek hüresel değişiklikler çeşitli davranış testleri ve immünohistokimyasal yöntemlerle analiz edilmiştir.

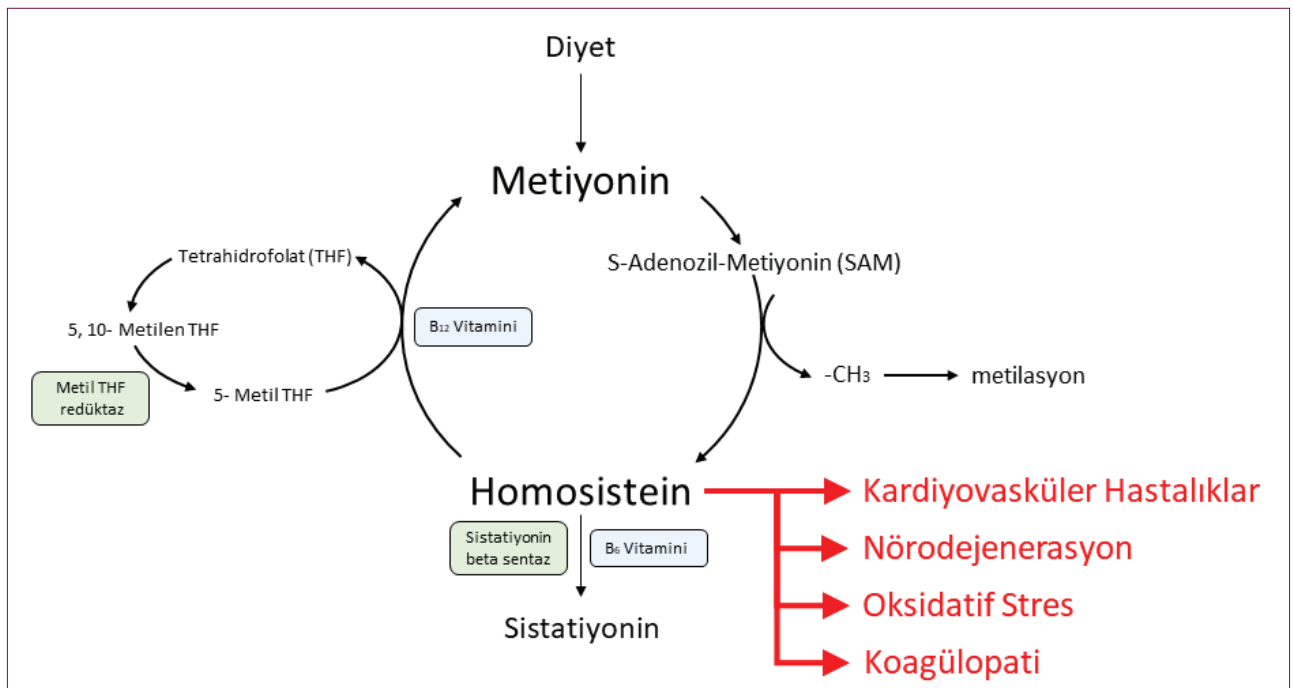
GEREÇ VE YÖNTEM

Kontrol ve Deneysel Grubu Fareler ve L-metiyonin Yüklemesi

T.C. İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'nın 2018/07 nolu etik kurul onayına hayvan deneyleri yürütülmüştür. Deneylerimizde hem dişi hem de erkek C57BL6 fareler kullanılmıştır. Deneysel ve kontrol grubu fareleri, doğumdan itibaren 6 hafta boyunca kontrollü bir ortamda tutulmuş ve hiçbir dış değişkene maruz kalmamışlardır. Diyetleri normal devam etmiştir. İlk 4 hafta boyunca anne fare tarafından emzirilmişlerdir. 4. haftanın sonunda cinsiyetlerine göre ayrılmış ve her kafeste 5 fare olacak şekilde gelişimlerini tamamlamışlardır. Daha önce Tapia-Rojas ve ark. (17) tarafından standardize edildiği üzere, 12 hafta boyunca içme suyu aracılığıyla l-metiyonin (doz: 8.2 g/kg) almışlardır. Bu süre zarfında farelerin su veya l-metiyonin tüketimleri ve kilo değişimleri takip edilmiştir. Veteriner hekim takibinde herhangi bir klinik düşünlük tablosu gözlenmemiştir.

Kas-İskelet Bozukluğu Testi

Açık Alan Testi: Her ne kadar standardize edilmiş davranış testleriyle bilişsel ve duygudurum bozukluklarını ölçüyor olsak da, bu bozukluğun altta yatan temeli bazen inme veya merkezi sinir sistemi (MSS) tümörü vb. fokal strüktürel bozukluklar olabilmektedir. Bu tarz hastalıklar bilişsel bozukluğun yanı sıra pek çok diğer nörolojik bozukluğa neden olup testlerin sonuçlarını olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Ayrıca çeşitli kas-iskelet bozuklukları da MSS motor fonksiyon testlerinde yanlış pozitiflik ortaya çıkarabilmektedir. Bu durum daha sonraki testleri yanlış yönlendirebilmektedir. Bu amaçla açık alan testi ile be-



Şekil 1. Metiyonin/homosistein siklusunu. <https://www.inner-alchemy.com.au/inner-alchemy-blog/2017/10/22/mthfr-10-tips-to-supporting-mthfr> internet sayfasından alınarak modifiye edilmiştir.

lirgin bozukluğu olan fareleri deney ve kontrol gruplarından çıkarmak amaçlanmıştır. Bu test ile fareler 40 cm x 40 cm lik yukarıdan aydınlatılmış üstü açık kutuya konularak belirgin bir lokal motor bozukluğun olup olmadığı incelenmiştir.

Anksiyete Testi

Yükseltilmiş Artı Labirent Testi (YALT): Farelerde anksiyete düzeyini ölçmeye yarayan testlerden biridir. YALT yerden bir metre yükseltilerek "+" şeklinde tasarlanmış bir platformdur. Bu artının iki kolu kapalı ve diğer iki kolu ise açıktır. Test süresince farenin açık ya da kapalı kollarda ne kadar hareket ettiği ve ne kadar süre kaldığı kamera ile kaydedildikten sonra ANY-Maze yazılımı aracılığı ile değerlendirilmektedir. Kapalı kollarda geçiren zamanın öncelikli artışı anksiyeteye işaret etmektedir.

Depresyon Testi

Zorunlu Yüzme Testi: Depresyon benzeri davranışı ölçmek için Porsolt'un zorunlu yüzme testi kullanılmıştır. Bu testte 4 L'lik beher kaplarına oda sıcaklığında su konulduktan sonra fareler tek tek suya bırakılır ve 10 dakika boyunca farelerin sudaki hareketli ve hareketsiz kalma süreleri izlenir. Farelerin su yüzeyinde hareketsiz kalmayı tercih etmesi depresyona işaret etmektedir.

Hafıza ve Öğrenme Testleri

Nesne-mekan testi: Farelerin yalnızca hipokampüse bağımlı hafızalarını test etmek için nesne tanıma testi kullanılmıştır. Bu test için iki adet aynı nesne (kemirgenler için ilgi çekici) test kutusu içinde farklı yerlere yerleştirilir. Farelerin nesnelerin yerlerini hatırlayabilmeleri için davranış testi alanının duvarlarına görsel ipuçları eklenir. Böylelikle fareler uzaysal olarak her iki objeyi 4 dakika boyunca inceleyebilmektedir. Daha sonra nesnelere biri farklı bir konuma yerleştirilir ve farenin bu değişiklikten sonra her iki nesneyi izlediği süreler not edilir. Öğrenim ve test arasındaki süre testten teste değişebilmektedir. Bu yüzden standart olarak bu testler 40 ya da 70 dakikalık aralıklarla yapılır. Farenin ilgisi dağıldığından daha uzun süre verilmemektedir. Çalışmamızda testlerimiz için 70 dakikalık süre uygulanmıştır.

Nesne Tanıma Testi: Farelerin hipokampüsten bağımsız hafızalarını test etmek için nesne tanıma testi kullanılmıştır. Yapılan araştırmalara göre bu test hipokampus ve kortikal nöronal sinir ağlarının ortak katılımını gerektirmektedir (24). Bu test için birbirine tıpatıp benzeyen iki objeyi incelemeleri için fareler 40 cm x 40 cm'lik davranış alanına yerleştirilmiştir. Test alanında herhangi başka bir görsel ipucu olmamasına özen gösterilmiştir. Daha sonra fareler bu iki nesneyi incelemek için 10 dakika test alanında bırakılmıştır. İnceleme sonrasında fareler kafeslerine konup hayvan odasına geri götürülmüşlerdir. Bir gün sonra, aynı test alanında nesnelere bir tanesini değiştirip farelerin verdiği tepki ANY-Maze Behavioral Tracking Software ile kaydedilmiş ve incelenmiştir.

Motor Fonksiyon Testi

Denge Kirişi Testi: Denge kirişi testi için 1 cm kalınlığında ve 1 metre uzunluğunda pleksiglastan yapılmış bir kiriş yerden 1 metre yükseklikte iki tahta ayak üzerine sabitlenmiştir. Farelerin ilk iki gün günde üç defa olmak üzere denge kirişinde yürütüle-

rek ortama alışmaları sağlanmıştır. Sonraki iki gün yine günde üç deneme yaparak farelerin denge kirişindeki yürürken ön ya da arka ayaklarının kayma sayısı takip edilmiştir. Toplamda elde edilen kayma (denge kaybı) sayıları istatistiksel olarak incelenmiştir.

3,3'-Diaminobenzidine Boyaması

3,3'- Diaminobenzidine (DAB) boyaması için ise dokular endojen peroksidaz enzimi aktivitesini bertaraf etmek için öncelikle 10 dakikalık H₂O₂ solüsyonuna tabi tutuldu. Daha sonra uygun hayvan serumu ile sabitlenen beyin kesitleri uygun antikorlarla işaretlendi. Akabinde ikincil biyotinlenmiş antikorlar, DAB kokteyli ve ABC kiti solüsyonlarıyla kesit mikroskopik incelemeye hazır hale getirildi.

Senesansla Alakalı β-Galaktozidaz Boyaması

SA β-Gal yukarıda belirtilen immünolojik boyamaya ek olarak yapılan ve senesans savunma mekanizmasını oluşturmuş hücrelerin ek olarak boyanmasını sağlayan bir metottur. Buna göre daha önceki reaksiyonlara ek olarak, dokular CBA-230 Cellular Senescence Assay Kit solüsyonları ile fikse edildi ve ek olarak X-Gal solüsyonu ile birlikte +37°C'de 24 saat inkübe edildi.

İstatistiksel Analiz

Davranış testlerindeki değişimler istatistiksel olarak ki-kare testi, iki yönlü ANOVA ve post-hoc analiz olarak Tukey'in çoklu karşılaştırması kullanılarak hesaplandı ve $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi. Grafiklerde su ve metiyonin alanları arasındaki istatistiksel anlamlılık* (asterisk) ile, metiyonin alan erkek ve dişi fareler arasındaki istatistiksel anlamlı farklılık Δ (delta) ile gösterildi ($p \leq 0.05$ için *; $p \leq 0.01$ için **; $p \leq 0.001$ için ***; $p \leq 0.0001$ için **** sembolleri kullanıldı). İstatistiksel analiz için Graphpad Prism 8.4.3 programı kullanıldı.

BULGULAR

Kontrol ve Deney Grubu Farelerinin Klinik Açılan Karşılaştırılması

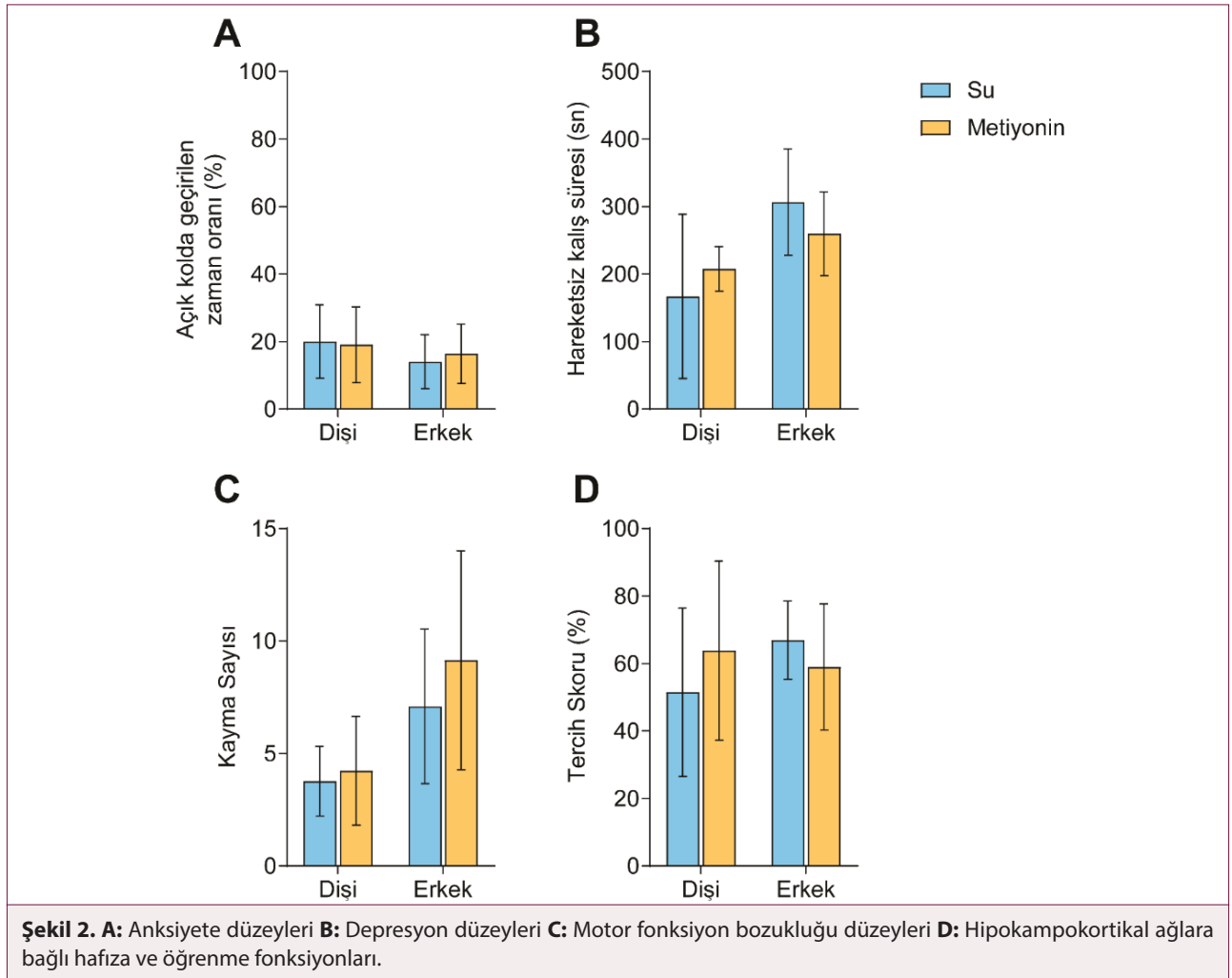
Davranış testleri başlamadan önce farelerin herhangi bir klinik nörolojik defisitlerinin olmadığı açık alan testi ile teyit edilmiştir. Deneylerimizde tüm fareler birbirine benzer davranışlar sergilediğinden hiçbir fare deney dışında bırakılmamıştır.

Kontrol ve Deney Grubu Farelerinin Anksiyete Düzeyleri Açısından Karşılaştırılması

L-metiyonin alımının hemen ardından yapılan yükseltilmiş labirent testinin sonuçları iki yönlü ANOVA ile analiz edildiğinde l-metiyonin alan ve almayan dişi ve erkek grupları arasında anlamlı bir istatistiksel farklılık gözlenmemiştir ($F_{(1, 35)}=0.2778$; $p=0.6015$) (Şekil 2-A).

Kontrol ve Deney Grubu Farelerinin Depresyon Düzeyleri Açısından Karşılaştırılması

Farelerin yüzme davranışlarına göre depresyon paternlerini inceledik. Zorunlu yüzme testinin sonuçları iki yönlü ANOVA ile analiz edildiğinde l-metiyonin alan ve almayan dişi ve erkek grupları arasında anlamlı bir istatistiksel farklılık gözlenmemiştir ($F_{(1, 15)}=1.317$; $p=0.2690$) (Şekil 2-B).



Kontrol ve Deney Grubu Farelerinin Motor Fonksiyonları Açısından Karşılaştırılması

Denge kirişi testinin sonuçları iki yönlü ANOVA ile analiz edildiğinde l-metiyonin alan ve almayan dişi ve erkek grupları arasında anlamlı bir istatistiksel bir farklılık gözlenmemiştir ($F_{(1, 25)}=0.3036$; $p=0.5865$) (Şekil 2-C).

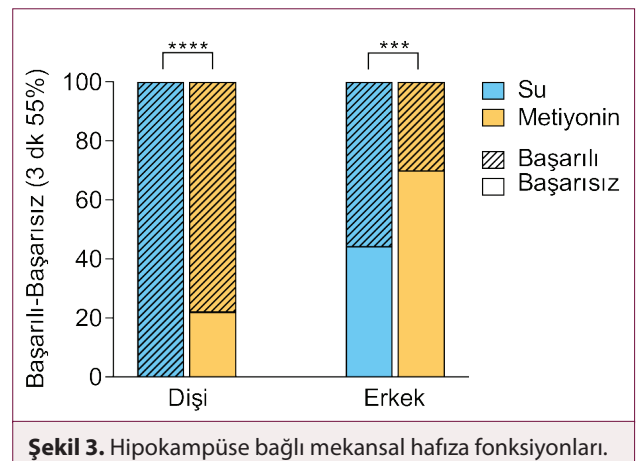
Kontrol ve Deney Grubu Farelerinin Hipokampokortikal Ağlara Bağlı Hafıza ve Öğrenme Fonksiyonları Açısından Karşılaştırılması

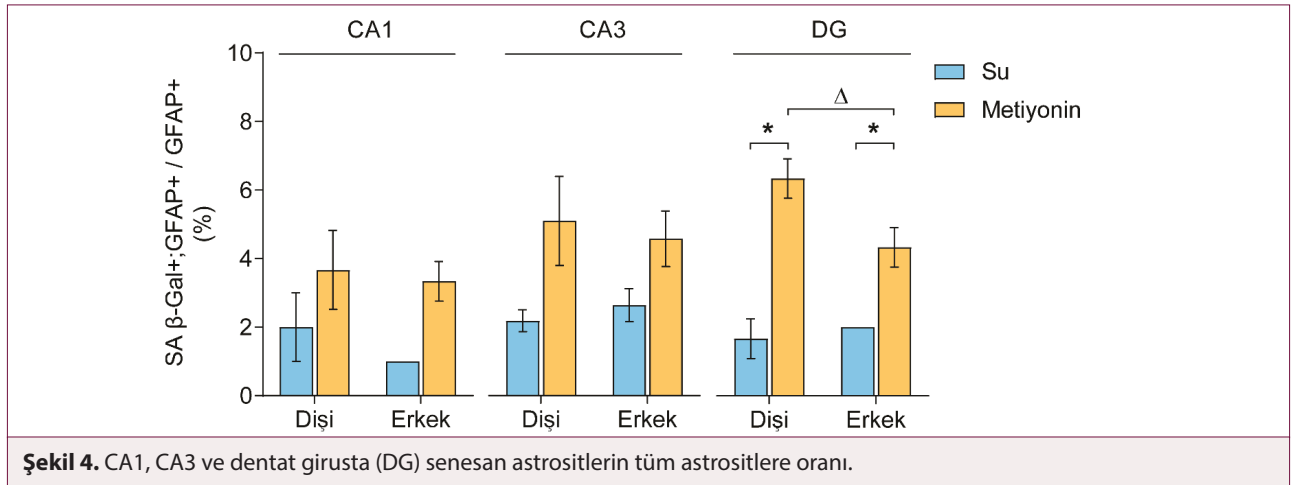
Bu test ile farelerin bir gün arayla yeni objeyi tanıyarak onu inceleme isteğini analiz ettik. Bu test ile yalnızca hipokampüse değil hafızanın işlenmesine katılan diğer kortikal yapıları da (entorinal, peririnal korteks ve parahipokampal bölge) test etmiş olduk. Nesne tanıma testinin sonuçları iki yönlü ANOVA ile analiz edildiğinde l-metiyonin alan ve almayan dişi ve erkek grupları arasında anlamlı bir istatistiksel bir farklılık gözlenmemiştir ($F_{(1, 34)}=2.147$; $p=0.1521$) (Şekil 2-D).

Kontrol ve Deney grubu farelerinin hipokampüse bağlı mekansal hafıza fonksiyonları açısından karşılaştırılması

Nesne-mekan testinin sonuçları dişiler ve erkekler olarak ayrı

ayrı ki-kare testine tabi tutulmuştur. Dişilerin su alanları ile l-metiyonin alanları arasında anlamlı bir fark görülmektedir. ($\chi^2(1)=24.72$; $p<0.0001$) Buna ek olarak su alan erkek fareler ile l-metiyonin alan erkek fareler arasında da anlamlı bir istatistiksel fark görülmektedir ($\chi^2(1)=13.79$; $p=0.0002$) (Şekil 3).





Şekil 4. CA1, CA3 ve dentat girusta (DG) senesans astrositlerin tüm astrositlere oranı.

Hipokampal Bölgelerde Senesans Hücre Oranlarındaki Değişikliklerin Karşılaştırılması

Yaptığımız immünohistokimyasal ön taramalar, hipokampüste nöron, mikroglia ve oligodendrositlerin yoğunluğunda ve bu hücrelerin senesans olanlarının yoğunluğunda belirgin bir değişiklik göstermemiştir (veriler gösterilmedi). Her üç alanda (dentat girus, CA1, CA3) senesans astrositlerin tüm astrositlere oranını incelediğimizde, bu oranın l-metiyonin alan dişi ve erkek farelerin su alanlara kıyasla trend olarak daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4). CA1'de senesans astrositlerin tüm astrositlere oranını cinsiyet ve l-metiyonin iki değişkenine bağlı olarak iki yönlü ANOVA testi incelediğimizde anlamlı istatistiksel fark saptanmamıştır ($F_{(1, 8)}=0.5000$; $p=0.4996$). Bu oranı CA3'te yine aynı değişkenler açısından iki yönlü ANOVA testi ile incelediğimizde yine istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($F_{(1, 8)}=1.071$; $p=0.3309$). Son olarak dentat girusta, senesans astrositlerin tüm astrositlere oranı adına l-metiyonin alma ve cinsiyet değişkenleri dahilinde iki yönlü ANOVA testinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmektedir ($F_{(1, 8)}=16.33$; $p=0.0037$). Akabinde yaptığımız Tukey çoklu analizinde, su alan ($n=3$, 1.667 ± 0.5774 , 95% CI [0.234, 3.101]) ve l-metiyonin alan ($n=3$, 6.333 ± 0.5774 , 95% CI [4.899, 7.768]) dişi fareler arasında ($p<0.0001$), su alan ($n=3$, 2.000 ± 0 , 95% CI [2.000, 2.000]) ve l-metiyonin alan ($n=3$, 4.333 ± 0.5774 , 95% CI [2.899, 5.768]) erkek fareler arasında ($p=0.0037$) ve son olarak l-metiyonin alan dişi ($n=3$, 6.333 ± 0.5774 , 95% CI [4.899, 7.768]) ve erkek fareler ($n=3$, 4.333 ± 0.5774 , 95% CI [2.899, 5.768]) arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.0052$) farklılıklar saptanmıştır. Bu ön çalışma sonucunda MSS'deki diğer hücrelerden farklı olarak astrositlerde senesans yolağının öncelikli olarak aktive edildiğini düşünmekteyiz. Bu hücresel değişikliğin akut bir reaksiyon mu, yoksa uzun dönemde nörodejenerasyon ve hücre kaybıyla sonlanacak kronik bir sürecin başlangıcı mı olduğu sorusuna cevaplar daha sonraki çalışmalarımızda incelenecektir.

TARTIŞMA

Hiperhomosisteinemi kemirgen modelleri uzun yıllardır çok farklı hastalıkların etiyopatogenezinin araştırılması için kullanılmaktadır (25,26). Kardiyovasküler, nörodejeneratif hastalıklardan

retinal inflamasyona kadar birçok patolojinin araştırılmasında hiperhomosisteinemi modelleri kullanılmıştır (27,28). Hiperhomosisteineminin nörodejenerasyondaki rolünün, vasküler yapıya olan direk hasardan mı, neden olduğu oksidatif stresten mi, yoksa bunların kombinasyonunun tetiklediği başka moleküler yolların işlev değiştirmesinden dolayı mı olduğu henüz tam anlamıyla netleştirilememiştir (29). Homosistein, bulunduğu ortamda sahip olduğu sülfür bağı nedeniyle çevresindeki moleküllerle artmış elektron alışverişinde bulunarak Red/Ox dengesini bozmaktadır (30). Bu durum bu aminoasitin çok farklı patofizyolojik yollarda etkili olmasına neden olmaktadır (31).

Çalışmamızda her ne kadar biyokimyasal testlerle dinamik plazma homosistein konsantrasyonunu incelememiş olsak da, daha önce yüksek doz l-metiyoninin alınmasının hiperhomosisteinemiye yol açtığını kanıtlayan bir çalışmadan (32) daha yüksek bir doz kullanılmıştır. Kronik l-metiyonin yüklemesine tabi tutulmuş farelerde hiperhomosisteinemi modeli oluşturmaya çalışılmış ve bu negatif etkinin beyinde hangi hücre gruplarını etkilediği araştırılmıştır. l-metiyonin alıp almamalarına ve cinsiyetlerine göre karşılaştırılabilir gruplara ayrılmış fareler, standardize edilmiş çeşitli davranış testleriyle incelenmiştir. Bu çalışmalarda seçilen l-metiyonin yükleme dozunun organ yetmezliğine neden olabilecek eşiğin altında olmasına dikkat edilmiştir. (33). Bu yükleme sonucunda beklemediğimiz bir şekilde hem dişi hem de erkek farelerde sadece hipokampüse bağlı mekansal hafızaya bağlı bir bozulma olduğu gözlenmiştir. Ayrıca erkek farelerin dişilere kıyasla nesne-mekan testinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da farklılık gösterdiği saptanmıştır (17,34) (Şekil 2-C). Bu farklılık bize, dişi ve erkek fare cinslerinin l-metiyonin yüklemesine karşı değişik dirence sahip olduğunu düşündürmüştür. Cinsiyet farklılığının davranış paternleri üzerine etkisi ile ilgili bir çok yayın yapılmış olmasına rağmen (35), bu farklılığın alt yapısını oluşturan nöroanatomik alanların cinsiyete göre işlevselliği ve stresör hassasiyetleri henüz tam anlamıyla anlaşılammıştır.

Daha önce yapılan çalışmalarda hafıza fonksiyonlarının teste tabi tutulan öznenin duyu durumundan etkilenebileceği gösterilmiştir (36). Bununla birlikte çalışmamızda kullandığımız yüksek doz l-metiyonin uygulanmış fare modelinde ne dişi,

ne de erkek farelerde anksiyete ve depresyon görülmemiştir. Böylelikle duygudurum değişikliklerinin hafıza testlerinin sonuçlarını etkileme ihtimali ortadan kalkmaktadır. Bu açıdan bakıldığında kullandığımız modelin salt hafıza bozukluğunu incelemek açısından avantajlı olduğu ortaya çıkmaktadır.

Çalışmamızda nörodejenerasyonun sinir sisteminde etkilediği alanların yaygınlığını incelemek açısından bilişsel ve duygudurum testlerinin yanı sıra motor ve denge testleri de kullanılmıştır. Ne dişi, ne de erkek farelerde herhangi bir motor ya da denge kusuruna rastlanmamıştır. Dolayısıyla yaptığımız çalışmada yüksek doz l-metiyoninin olumsuz etkisine en fazla duyarlı nörolojik alanın hipokampal bölgeler olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte uzun dönemde l-metiyonin yüklemesinin etkileri sinir sisteminde yaygın hasara da neden olabilir. Öte yandan hipokampokortikal devrelere bağlı hafıza üzerinde anlamlı bir farklılık bulamamış olmamız, ya bu bölgelerin l-metiyonin etkisine daha dirençli olduğunu, ya da bu devreleri oluşturan diğer nöroanatomik alanlarda (striatum, substantia nigra, entorinal korteks vb.) bilişsel işlevleri negatif etkileyebilecek nörodejenerasyonun henüz oluşmadığını düşündürmektedir. Bu söz konusu anatomik ve hücrel değişiklikleri daha sonra yapacağımız çalışmalarda daha derinlemesine araştırmayı planlamaktayız.

Günümüze kadar nörodejenerasyonu açıklayan moleküler yollar içinde oksidatif stres (37), apoptozis (38), bağırsak disbiyozu (39,40), hücrel senesans (41) vb. pek çok mekanizma öne sürülmüştür. Bu çalışmamız l-metiyonin yüklemesinin akabinde hipokampüste hücre kaybı olmaksızın, hücrel senesans mekanizmasının özellikle astrositlerde artmış olduğunu göstermektedir. Ancak bu hücrel yanıtın akut bir cevap mı olduğunu, yoksa giderek nörodejenerasyon ve hücre kaybıyla seyredecek bir sürecin başlangıcı mı olduğu konusunda çalışmalarımız devam etmektedir.

Hücrel senesans ilk tanımlandığında çeşitli stresörlere maruz kalan hücrenin kanserleşmeyi önlemek adına geliştirdiği bir savunma yöntemi olarak tanımlanmıştır. Bu teori senesans, kanserleşme ve apoptozis arasında seçim yapmak durumunda kalan hücrenin, hücre siklusundan çıkıp, apoptotik yolları geçici olarak inhibe edip on yıllar boyunca temel işlevlerini idame ettirebildiği bir dönem olarak tanımlanmıştır (42). Ancak bu savunma mekanizması hücreyi ilelebet koruyamamaktadır. Senesansa giren hücreler, daha önce de belirttiğimiz gibi immünohistokimyasal yöntemlerle SA β -Gal boyası ile belirlenir. Ancak son yıllarda yapılan immünohistokimyasal çalışmalar bu SA β -Gal boyamasının, kanser dışındaki sinir sisteminin embriyonik gelişiminde programlı hücre ölümünden çok çeşitli nörodejeneratif süreçlere varan ortamlarda senesansa girmiş hücrelerin varlığını göstermiştir (43-45). Bu bağlamda embriyonik gelişim ya da nörodejenerasyon sürecinde hücrel senesansın kanserde olduğu gibi genetik, epigenetik ve çevresel stresler tarafından işlevselliği bozulmuş hücrelerin ayıklanmasını etkileyen bir süreç mi olduğu, yoksa bu özel hücrel konumlarda nörodejenerasyonu engellemek için geliştirilmiş bir savunma mekanizması mı olduğu, ya da tam tersine nörodejenerasyonu başlatan moleküler yolları aktive mi ettiği bilinmemektedir. Son olarak hücrel senesans, bütün bu fizyolojik gelişimsel ve

patolojik süreçlerden bağımsız olarak, moleküler yollarda ortaya çıkan epifenomenolojik değişiklikleri de yansıtır olabilir. Bu soruları cevaplayabilmek için daha sonraki çalışmalarımızda l-metiyonin yüklemesi yapılmış farelerde uzun dönemde hipokampüste ve hafızayı destekleyen diğer nöroanatomik alanlarda ortaya çıkabilecek immünohistokimyasal ve ultrastrüktürel değişimleri incelemeyi amaçlıyoruz. Böylece hücrel senesans mekanizmasının tek başına nörodejenerasyonu başlatmaya yeterli olup olmadığı konusunda açıklık getirilecektir.

Etik Komite Onayı: İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'nın 2018/07 no'lu etik kurul onayınca hayvan deneyleri yürütülmüştür.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - Y.M.A., E.T., M.F.M., S.G.; Denetleme - Y.M.A., E.T., M.F.M., S.G.; Gereçler - M.F.M., S.G.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - Y.M.A.; Analiz ve/veya Yorum - Y.M.A., S.G.; Literatür Taraması - Y.M.A.; Yazan - M.F.M., S.G.; Eleştirel İnceleme - S.G.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışmada bildirilen araştırmalar Ulusal Sağlık Enstitüleri (Amerika Birleşik Devletleri) tarafından desteklenmiştir (Ulusal Nörolojik Bozukluklar ve İnme Enstitüsü – R01NS073758).

Ethics Committee Approval: Animal experiments were conducted after the approval of the Ethics Committee of Istanbul University Rectorate Animal Experiments Local Ethics Committee No: 2018/07.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept – Y.M.A., E.T., M.F.M., S.G.; Supervision - Y.M.A., E.T., M.F.M., S.G.; Materials - M.F.M., S.G.; Data Collection and/or Processing - Y.M.A.; Analysis and/or Interpretation - Y.M.A., S.G.; Literature Search - Y.M.A.; Writing - M.F.M., S.G.; Critical Reviews - S.G.

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

Financial Disclosure: Research reported in the present work was supported by the National Institutes of Health (National Institute of Neurological Disorders and Stroke Grant R01NS073758).

KAYNAKLAR

1. Kovacs GG. Concepts and classification of neurodegenerative diseases. *Handb Clin Neurol* 2017; 145: 301-7. [CrossRef]
2. Molero, AE, Gokhan S, Gonzalez S, Feig JL, Alexandre LC, Mehler MF. Impairment of developmental stem cell-mediated striatal neurogenesis and pluripotency genes in a knock-in model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 21900-5. [CrossRef]
3. Hardiman O, Al-Chalabi A, Chio A, Corr EM, Logroscino G, Robberecht W, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Nature Reviews Disease Primers* 2017; 3: 17071. [CrossRef]
4. DeTure MA, Dickson DW. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 2019; 14: 32. [CrossRef]
5. Gelders G, Baekelandt V, Van der Perren A. Linking neuroinflammation and neurodegeneration in parkinson's disease. *Journal of Immunology Research* 2018; 4784268. [CrossRef]

6. Braak H, Del Tredici K, Schultz C, Braak E. Vulnerability of select neuronal types to Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 924: 53-61. [\[CrossRef\]](#)
7. Whitehouse PJ, Price DL, Clark AW, Coyle JT, DeLong MR. Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Ann Neurol* 1981; 10: 122-6. [\[CrossRef\]](#)
8. Dickson DW. Parkinson's disease and parkinsonism: neuropathology. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2. [\[CrossRef\]](#)
9. Sapp E, Schwarz C, Chase K, Bhide PG, Young AB, Penney J, Vonsattel JP, Aronin N, DiFiglia M. Huntingtin localization in brains of normal and Huntington's disease patients. *Ann Neurol* 1997; 42: 604-12. [\[CrossRef\]](#)
10. Pérez Ortiz JM, Orr HT. Spinocerebellar Ataxia Type 1: Molecular Mechanisms of Neurodegeneration and Preclinical Studies. *Adv Exp Med Biol* 2018; 1049: 135-45. [\[CrossRef\]](#)
11. Mehler MF, Gokhan S. Mechanisms underlying neural cell death in neurodegenerative diseases: alterations of a developmentally-mediated cellular rheostat. *Trends Neurosci* 2000; 23: 599-605. [\[CrossRef\]](#)
12. Mehler MF, Gokhan S. Developmental mechanisms in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Prog Neurobiol* 2001; 63: 337-63. [\[CrossRef\]](#)
13. Armstrong RA. Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuro-pathologica* 2019; 57: 87-105. [\[CrossRef\]](#)
14. Illes J. Neurolinguistic features of spontaneous language production dissociate three forms of neurodegenerative disease: Alzheimer's, Huntington's, and Parkinson's. *Brain Lang* 1989; 37: 628-42. [\[CrossRef\]](#)
15. Brian C, Dalla Torre C, Citton V, Manara R, Pompanin S, Binotto G, et al. Cobalamin deficiency: clinical picture and radiological findings. *Nutrients* 2013; 5: 4521-39. [\[CrossRef\]](#)
16. Hrnčić D, Rašić-Marković A, Stojković T, Velimirović M, Puškaš N, Obrenović R et al. Hyperhomocysteinemia induced by methionine dietary nutritional overload modulates acetylcholinesterase activity in the rat brain. *Mol Cell Biochem* 2014; 396: 99-105. [\[CrossRef\]](#)
17. Tapia-Rojas C, Lindsay CB, Montecinos-Oliva C, Arrazola MS, Retamales RM, Bunout D et al. Is L-methionine a trigger factor for Alzheimer's-like neurodegeneration?: Changes in A β oligomers, tau phosphorylation, synaptic proteins, Wnt signaling and behavioral impairment in wild-type mice. *Molecular neurodegeneration* 2015; 10: 62. [\[CrossRef\]](#)
18. Durand P, Prost M, Loreau N, Lussier-Cacan S, Blache D. Impaired Homocysteine Metabolism and Atherothrombotic Disease. *Laboratory Investigation* 2001; 81: 645-72. [\[CrossRef\]](#)
19. Bath PM, Appleton JP, Sprigg N, The Insulin Resistance Intervention after Stroke trial: A perspective on future practice and research. *International Journal of Stroke* 2016; 11: 741-43. [\[CrossRef\]](#)
20. Yoshitomi R, Nakayama K, Yamashita S, Kumazoe M, Lin T-A, Mei C-Y et al. Plasma Homocysteine Concentration is Associated with the Expression Level of Folate Receptor 3. *Scientific reports* 2020; 10: 10283. [\[CrossRef\]](#)
21. Schöneich C. Methionine oxidation by reactive oxygen species: reaction mechanisms and relevance to Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1703: 111-9. [\[CrossRef\]](#)
22. Li Y, Huang T, Zheng Y, Muka T, Troup J, Hu FB. Folic Acid Supplementation and the Risk of Cardiovascular Diseases: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Am Heart Assoc* 2016; 5. [\[CrossRef\]](#)
23. Debaqç-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nature Protocols* 2009; 4: 1798-806. [\[CrossRef\]](#)
24. Tomé WA, Gökhan Ş, Brodin NP, Gulinello ME, Heard J, Mehler MF, et al. A mouse model replicating hippocampal sparing cranial irradiation in humans: A tool for identifying new strategies to limit neurocognitive decline. *Sci Rep* 2015; 5: 14384. [\[CrossRef\]](#)
25. Quéré I, Hillaire-Buys D, Brunschwig C, Chapal J, Janbon C, Blayac JP, et al. Effects of homocysteine on acetylcholine- and adenosine-induced vasodilatation of pancreatic vascular bed in rats. *British journal of pharmacology* 1997; 122: 351-7. [\[CrossRef\]](#)
26. Montalescot G. Homocysteine: the new player in the field of coronary risk. *Heart (British Cardiac Society)* 1996; 76: 101-2. [\[CrossRef\]](#)
27. Elsherbiny NM, Sharma I, Kira D, Alhusban S, Samra YA, Jadeja R et al. Homocysteine Induces Inflammation in Retina and Brain. *Bio-molecules* 2020; 10: 393. [\[CrossRef\]](#)
28. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *The American journal of pathology* 1969; 56: 111-28.
29. Bellamy MF, McDowell IFW. Putative mechanisms for vascular damage by homocysteine. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 1997; 20: 307-15. [\[CrossRef\]](#)
30. Chen S, Wu P, Zhou L, Shen Y, Li Y, Song H. Relationship between increase of serum homocysteine caused by smoking and oxidative damage in elderly patients with cardiovascular disease. *International journal of clinical and experimental medicine* 2015; 8: 4446-54.
31. Sikora M, Lewandowska I, Marczak Ł, Bretes E, Jakubowski H. Cystathionine β -synthase deficiency: different changes in proteomes of thrombosis-resistant Cbs(-/-) mice and thrombosis-prone CBS(-/-) humans. *Scientific reports* 2020; 10: 10726. [\[CrossRef\]](#)
32. de Rezende MM, D'Almeida V. Central and systemic responses to methionine-induced hyperhomocysteinemia in mice. *PloS one* 2014; 9: e105704. [\[CrossRef\]](#)
33. Hännell A, Marklund N. Structured evaluation of rodent behavioral tests used in drug discovery research. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 2014; 8. [\[CrossRef\]](#)
34. Thériault R-K, Perreault ML. Hormonal regulation of circuit function: sex, systems and depression. *Biology of sex differences* 2019; 10: 12. [\[CrossRef\]](#)
35. Eltokhi A, Kurpiers B, Pitzer C. Behavioral tests assessing neuropsychiatric phenotypes in adolescent mice reveal strain- and sex-specific effects. *Scientific Reports* 2020; 10: 11263. [\[CrossRef\]](#)
36. Darcet F, Mendez-David I, Tritschler L, Gardier AM, Guilloux J-P, David DJ. Learning and memory impairments in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 2014; 8. [\[CrossRef\]](#)
37. Beal MF. Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol* 1995; 38: 357-66. [\[CrossRef\]](#)
38. Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2000; 1: 120-30. [\[CrossRef\]](#)
39. Kowalski K, Mulak A. Brain-Gut-Microbiota Axis in Alzheimer's Disease. *Journal of neurogastroenterology and motility* 2019; 25: 48-60. [\[CrossRef\]](#)
40. Bulgart HR, Neczypor EW, Wold LE, Mackos AR. Microbial involvement in Alzheimer disease development and progression. *Mol Neurodegener* 2020; 15: 42. [\[CrossRef\]](#)
41. Saez-Atienzar S, Masliah E. Cellular senescence and Alzheimer disease: the egg and the chicken scenario. *Nat Rev Neurosci* 2020; 21: 433-44. [\[CrossRef\]](#)
42. Calcinotto A, Kohli J, Zagato E, Pellegrini L, Demaria M, Alimonti A. Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury. *Physiol Rev* 2019; 99: 1047-78. [\[CrossRef\]](#)
43. Piechota M, Sunderland P, Wysocka A, Nalberczak M, Sliwinska MA, Radwanska K, et al. Is senescence-associated β -galactosidase a marker of neuronal senescence? *Oncotarget* 2016; 7: 81099-109. [\[CrossRef\]](#)
44. Muñoz-Espín D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2014; 15: 482-96. [\[CrossRef\]](#)
45. Muñoz-Espín D, Cañamero M, Maraver A, Gómez-López G, Contreras J, Murillo-Cuesta S, et al. Programmed Cell Senescence during Mammalian Embryonic Development. *Cell* 2013; 155: 1104-18. [\[CrossRef\]](#)

Prognostic Significance of Glutathione Peroxidase (GSH-Px) Levels in Lumbar Degenerative Disc Disease

Lomber Dejeneratif Disk Hastalığında Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Düzeylerinin Prognostik Önemi

Cumhur Kaan Yaltırık¹ , Seda Güleç Yılmaz² , Fatma Tuba Akdeniz² , Kadir Sümerkent³ , Selçuk Özdoğan⁴ , Turgay İsbir² 

¹Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Yeditepe University, Istanbul, Turkey

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

³Department of Molecular Medicine, Institute of Health Science, Yeditepe University, Istanbul, Turkey

⁴Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Beykent University, Istanbul, Turkey

ORCID ID: C.K.Y. 0000-0002-4312-5685; S.G.Y. 0000-0002-8119-2862; F.T.A. 0000-0002-6076-0509; K.S. 0000-0001-6942-4491; S.Ö. 0000-0003-1711-5771; T.İ. 0000-0002-7350-6032

Cite this article as: Yaltırık CK, Gulec Yilmaz S, Akdeniz FT, Sumerkent K, Ozdogan S, Isbir T. Prognostic significance of glutathione peroxidase (GSH-PX) levels in lumbar degenerative disc disease. Experimed 2020; 10(2): 67-71.

ABSTRACT

Objective: In this study, the main aim was to research whether decreased antioxidant activity was manifesting the intervertebral disc degeneration in a population in which the degeneration could be compatible with their ages.

Material and Method: The study group consisted of 39 patients with lumbar disc degeneration (LDD) and 37 healthy controls. Patient data including age, symptoms, neurological examination findings, lumbar MRI findings, Oswestry Disability Index (ODI) scores, and Visual Analogue Scale of pain (VAS) were used. Human Glutathione peroxidase (GSH-Px) level was determined using the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) method.

Results: Serum GSH-Px levels were significantly lower in the patients with LDD when compared to the healthy controls ($p=0.011$).

Conclusions: In the present study, we demonstrated that, in addition to environmental factors, there is a correlation between GSH-Px enzyme deficiency and lumbar disc degeneration.

Keywords: Glutathione peroxidase, lumbar degenerative disc disease, ELISA

ÖZ

Amaç: Bu çalışmanın temel amacı, yaş nedeniyle disk dejenerasyonu potansiyeli olan bir popülasyonda, azalmış antioksidan aktivitesinin intervertebral disk dejenerasyonu ile ilişkisini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya lomber disk dejenerasyonu (LDD) tanısı almış 39 hasta ve 37 sağlıklı gönüllü dahil edildi. Hasta verileri yaş, semptomlar, nörolojik muayene bulguları, lomber MRG bulguları, Oswestry Skala (ODI) skorları ve Visüel Analog Skala (VAS) kullanıldı. İnsan Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) seviyeleri Enzime Bağlı İmmünosorbent Ölçüm (ELISA) yöntemi ile tespit edildi.

Bulgular: Serum GSH-Px düzeylerinin LDD tanısı almış hasta grubunda sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak düşük olduğu belirlendi ($p=0,011$).

Sonuç: Çalışmamızda çevresel faktörlere ek olarak GSH-Px enzim eksikliği ile lomber disk dejenerasyonu arasında bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Glutasyon peroksidaz, lomber dejeneratif disk hastalığı, ELISA

Corresponding Author/Sorumlu Yazar: Turgay Isbir **E-mail:** turgay.isbir@yeditepe.edu.tr

Submitted/Başvuru: 03.06.2020 **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 05.06.2020

Last Revision Received/Son Revizyon: 13.07.2020 **Accepted/Kabul:** 16.08.2020



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

INTRODUCTION

Intervertebral disc tissue is one of the earliest tissues in the human body to degenerate (1,2) and is one of the major pathological causes of chronic pain and debility, especially in the elderly population. The decrease of hydration in disc content, loss in the height of disc space, thinning, microfractures, ossification, and Modic changes in endplates and neighboring vertebral bodies are essential indicators of intervertebral disc degeneration (3-8). Such a degeneration evolves in every human being's intervertebral disc during the aging process, but, in some cases, it starts earlier and seems more like a pathological degenerative disease than an indication of aging (9-13).

Genetic predisposition, trauma, environmental factors, and smoking are other predisposing factors apart from aging in intervertebral disc degeneration (11,14-17). Glutathione, a substantial antioxidant peptide in the human cytoplasm, plays a crucial role in protecting cells from oxidative damage (18). Glutathione peroxidase (GSH-Px) belongs to an antioxidant enzyme family that has peroxidase properties. GSH-Px has the essential biological role of protecting the organism from oxidative damage. Lifelong reduction in GSH-Px was shown to increase lifespan and decrease age-related effects on pathology and increase tissues' sensitivity to oxidative stress-induced apoptosis (19).

In the present study, the main aim was to research whether the decreased antioxidant activity manifested the intervertebral disc degeneration in a population that the degeneration could be compatible with their ages.

MATERIAL AND METHOD

Study Population

In a total of 76 cases, our study group consisted of 39 lumbar disc degeneration (LDD) patients and 37 healthy controls. The study's patient population was composed of operated LDD patients who were admitted to the Neurosurgery Department of Yeditepe University. Patient data included: age, symptoms, neurological examination, lumbar MRI examination, Oswestry disability index (ODI) scores, and Visual Analogue Scale (VAS) of pain (20). The same neuroradiologist reported the lumbar MRI results of patients and control groups. The Medical Faculty Ethics Committee approved the present study protocol at Yeditepe University. Informed consent was obtained from all participants included in the study.

The inclusion criteria for patients in the present study were having lower back pain and radiculopathy and identification of lumbar disc herniation in the lumbar MRI. The exclusion criteria for patients were history or radiodiagnosis of infection, vertebral fractures or spinal deformities, spondylolisthesis, oncologic diseases, congenital anomalies, and osteoporosis. Erythrocyte sedimentation rate (ESR) and C-reactive protein (CRP) were checked to exclude inflammatory diseases. In the patient group, the severity of pain was analyzed using the Visual Analogue Scale (VAS) of pain scores and the Oswestry Disability Index (ODI) (20).

In the control group, the individuals who had lumbar MRI scans reported as normal for nonspecific low back pain. They also had laboratory analysis included CRP and ESR results as normal levels. The demographic data information of the patients was evaluated using the patient data system (Table 1).

In the patient group, the blood samples were collected before the surgery. After the centrifugation process, separated serum samples were frozen and stored at -80°C. The collected samples were analyzed once a week, for a total of 60 days.

Determination of Glutathione Peroxidase Enzyme Levels

GSH-Px was determined by the two-site sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) method. Serum GSH-Px level was measured by Human GSH-Px ELISA Kit (Abbkine Scientific Co., Ltd., Wuhan, Hubei, China). The serum GSH-Px levels were determined by spectrophotometrically.

Statistical Analyses

Statistical analyses were performed by the IBM SPSS version 23 Statistics program (SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA). The statistical significance was determined at a p-value <0.05. A Chi-square analysis was performed, and the values were expressed in numbers and percentages. The student t-test was used to compare the quantitative parameters in the patient and control groups. The results were expressed in means±standard deviations.

RESULTS

The present study included a total of 76 individuals as 39 patients with LDD and 37 healthy controls. The demographic data of all cases are presented in Table 1. The mean age of patients was 43±10.34, and controls were 45.43±10.01, and there was no statistically significant difference between the groups (p=0.301). The examination of patients' gender distribution

Table 1. Demographic information of patient and control groups.

	Control Group (n= 37)	LDDD (n= 39)	P value
Age (years) (Mean±SD)	45.43±10.01	43±10.34	0.301
GENDER (Male /Female)	23(62.2%) / 14 (37.8%)	14 (35.9%) / 25(64.1%)	0.022*

* statistically significant difference; LDDD: Lumbar disc degeneration disease, SD: Standart deviation

Table 2. The patients mean VAS and ODI scores.

Score	Minimum	Median	Maximum
Oswestry	26	66	94
VAS	60	70	100

showed that 35.9% were male, and 64.1% were female. The ratio of males and females in the control group were 62.2% and 37.8%, respectively. The gender distribution was significantly different between the groups. The risk of developing LDD was 2.9 times higher in females compared to males ($p=0.022$). Also, 12 had a lumbar MRI scanning before the diagnosis and a history of low back pain on at least one occasion. Of these 39 patients, 16 had a black disc, and 23 had a lumbar disc herniation. The patient's mean VAS and ODI scores are presented in Table 2.

The serum GSH-Px levels were statistically significantly lower in the patient group than the controls ($p=0.011$). The serum GSH-Px levels of the study groups are presented in Figure 1.

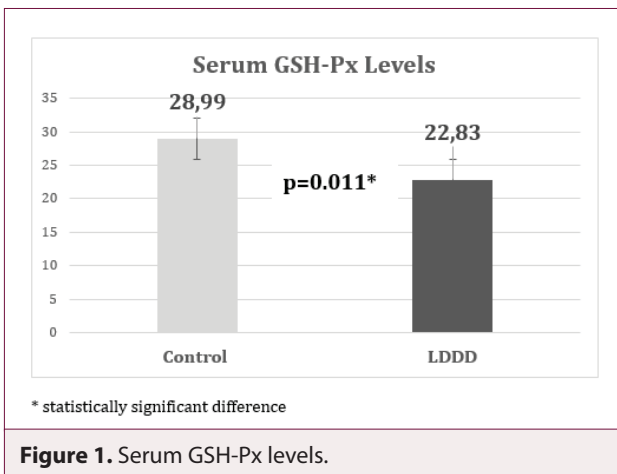


Figure 1. Serum GSH-Px levels.

DISCUSSION

Although intervertebral disc degeneration is a normal part of the aging process, in recent years, some indicators have shown that some genetic predispositions and environmental factors, such as smoking and chronic injuries, could also play a part (11, 14-16, 21). Typically, disc tissue, the counterpart to the intervertebral disc space, is mostly devoid of vascular tissue, so blood supply is mainly with diffusion from the outer layer of the annulus fibrosis and vertebral endplates (22). Even this reality is one of the critical factors, regeneration of such tissue would be difficult without an optimal vascular supply. This is such an irony that one of the most important suspension points of the body, the "intervertebral disc tissue" exposed to mobility, erected posture, and loading stresses, discloses a weak point against secondary insults of movement-related trauma. Working under traumatic stress cause

limited tissue perfusion during whole life-time, so degeneration of vertebral disc space can be accepted as a normal consequence. However, modern underlying molecular mechanisms playing roles in this degeneration point out multiple clues (21).

As in all aging processes, genomic instability, epigenetic alterations, mitochondrial dysfunction, disorders in intercellular communication, accumulation of damaged molecules, disorders in cellular response, and dysfunction of biological responses may play essential roles in degeneration (21,23). This molecular mechanism set thinking that some unknown disorders in this metabolic mechanism may aggravate disc degeneration, and these may intern leads to earlier pathologic clinically detected disorders in our clinical practice as lumbar disc herniation and degenerative spinal disorders with stenosis.

Programmed cell death and degeneration of extracellular matrix-induced oxidative stress participate in the pathophysiology of disc degeneration. Vo et al. reported that the healthy intervertebral disc's significant characteristic is an absence of vascularization. Reactive Oxygen Species (ROS) are produced as a result of oxidative phosphorylation caused by hypoxic conditions in disc cells (24). Dimozi et al. investigated that oxidative stress could trigger premature senescence and reduce cell proliferation in the aged intervertebral disc (25). Also, the catabolic processes of these senescent cells could contribute to the degeneration of the tissue.

The GSH-Px biochemical function reduces lipid hydroperoxides to their corresponding alcohols and hydrogen peroxide to water. The effect of GSH-Px on various diseases such as celiac disease, coronary heart disease, diabetic nephropathy, and vitiligo has been studied previously (26-29).

Yang et al. (27) investigated that GSH-Px plays an essential role in oxidative stress-induced disc degeneration in human nucleus pulposus cells. In this study, they claim that the antioxidative effect of GSH-Px could be a candidate marker in reduced oxidative stress in disc degeneration.

Our study is the first study to investigate the effect of GSH-Px on lumbar disc herniation patients. In comparison between patient and control groups in similar age groups, GSH-Px levels were decreased significantly in the lumbar disc degeneration group compared to the healthy controls ($p=0.011$). This suggests that GSH-Px enzyme deficiency might correlate with degeneration of lumbar disc tissue and lumbar disc herniation in addition to environmental factors. Anti-oxidant mechanisms seem to play a significant part in lumbar disc herniations. In light of these results, if a biomarker could be found for the deficiency of anti-oxidant mechanisms, diagnosis of lumbar degenerative diseases could be made earlier, and treatment with anti-oxidant therapies could prevent patients from surgery.

CONCLUSION

The present study showed that there is a correlation between GSH-Px enzyme deficiency and lumbar disc degeneration in addition to environmental factors. However, there are some limitations to our study. Namely, the number of individuals should be increased in order to confirm these results. Moreover, degenerative spinal diseases like spinal stenosis, spondylolisthesis, and spondylosis could be added and compared with our results to work out correlations between all lumbar degenerative spine diseases for enzyme levels.

Ethical Approval: All procedures in this study was accordance with the ethical standards of the 1975 Declaration of Helsinki guidelines and its later amendments. The present study protocol was approved by The Yeditepe University Medical Faculty Ethics Committee. Informed consent was obtained from all participants included in the study.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - C.K.Y., T.İ.; Clinical Data and Sample Collection - C.K.Y., S.Ö.; Analysis of the Clinical Data and Samples - S.G.Y., K.S., T.İ.; Laboratory Analysis - S.G.Y., F.T.A.; Statistical Analysis - S.G.Y., K.S.; Analysis of the Results, Supervision - T.İ.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Financial Disclosure: The present study was supported by Yeditepe University Project Management Office.

Etik Komite Onayı: Bu çalışmadaki tüm prosedürler, 1975 Helsinki Bildirgesinin etik standartlarına ve daha sonraki değişikliklerine uygundur. Mevcut çalışma protokolü Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı. Çalışmaya dahil edilen tüm katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alındı.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - C.K.Y., T.İ.; Denetleme - C.K.Y., S.Ö.; Analiz ve/veya Yorum - S.G.Y., K.S., T.İ.; Laboratuvar Analizi - S.G.Y., F.T.A.; İstatistiksel Analiz - S.G.Y., K.S.; Eleştirel İnceleme - T.İ.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma Yeditepe Üniversitesi Proje Yönetim Ofisi tarafından desteklenmiştir.

REFERENCES

1. Miller JA, Schmatz C, Schultz AB. Lumbar disc degeneration: correlation with age, sex, and spine level in 600 autopsy specimens. *Spine (Phila Pa 1976)* 1988; 13: 173-8. [CrossRef]
2. Yuceli S. *Facet Cysts*. JTSS 2018; 29: 219-21.
3. Prescher A. Anatomy and pathology of the aging spine. *Eur J Radiol* 1998; 27: 181-95. [CrossRef]
4. Edelson JG, Nathan H. Stages in the natural history of the vertebral end-plates. *Spine (Phila Pa 1976)* 1988; 13: 21-6. [CrossRef]
5. Maatta JH, Wadge S, MacGregor A, Karppinen J, Williams FM. ISSLS Prize Winner: Vertebral Endplate (Modic) Change is an Independent Risk Factor for Episodes of Severe and Disabling Low Back Pain. *Spine (Phila Pa 1976)* 2015; 40: 1187-93. [CrossRef]
6. Antar V, Baran O, Yuceli S, Erdogan H, Altintas O, Baran GE, et al. Assessment of the neuroprotective effects of the acetylcholinesterase inhibitor huperzine A in an experimental spinal cord trauma model. *J Neurosurg Sci* 2018; 62: 128-39.
7. Cecen DA, Tatarli N, Turan Suslu H, Ozdogan S, Barisik NO. Primary Dural Spinal Lymphoma Presentation of a Rare Spinal Tumor Case. *Case Rep Surg* 2015; 639253. [CrossRef]
8. Kazanci B, Ozdogan S, Kahveci R, Gokce EC, Yigitkanli K, Gokce A, et al. Neuroprotective Effects of Pregabalin Against Spinal Cord Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *Turk Neurosurg* 2017; 27: 952-61. [CrossRef]
9. Kumaresan S, Yoganandan N, Pintar FA, Macias M, Cusick JF. Morphology of young and old cervical spine intervertebral disc tissues. *Biomed Sci Instrum* 2000; 36: 141-6.
10. Vo N, Seo HY, Robinson A, Sowa G, Bentley D, Taylor L, et al. Accelerated aging of intervertebral discs in a mouse model of progeria. *J Orthop Res* 2010; 28: 1600-7. [CrossRef]
11. Chan D, Song Y, Sham P, Cheung KM. Genetics of disc degeneration. *Eur Spine J* 2006; 15 Suppl 3: S317-25. [CrossRef]
12. Adams MAR, P. J. What is intervertebral disc degeneration, and what causes it? *Spine (Phila Pa 1976)* 2006; 31: 2151-61. [CrossRef]
13. Yuceli S. Minimally invasive surgery for one level spinal stenosis: Unilateral approach bilateral microdecompression. *JTSS* 2018; 29: 189-92.
14. Nasto LA, Ngo K, Leme AS, Robinson AR, Dong Q, Roughley P, et al. Investigating the role of DNA damage in tobacco smoking-induced spine degeneration. *Spine J* 2014; 14: 416-23. [CrossRef]
15. Livshits G, Popham M, Malkin I, Sambrook PN, Macgregor AJ, Spector T, et al. Lumbar disc degeneration and genetic factors are the main risk factors for low back pain in women: the UK Twin Spine Study. *Ann Rheum Dis* 2011; 70: 1740-5. [CrossRef]
16. Sambrook PN, MacGregor AJ, Spector TD. Genetic influences on cervical and lumbar disc degeneration: a magnetic resonance imaging study in twins. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 366-72. [CrossRef]
17. Samartzis D, Karppinen J, Chan D, Luk KD, Cheung KM. The association of lumbar intervertebral disc degeneration on magnetic resonance imaging with body mass index in overweight and obese adults: a population-based study. *Arthritis Rheum* 2012; 64: 1488-96. [CrossRef]
18. Yang D, Wang D, Shimer A, Shen FH, Li X, Yang X. Glutathione protects human nucleus pulposus cells from cell apoptosis and inhibition of matrix synthesis. *Connect Tissue Res* 2014; 55: 132-9. [CrossRef]
19. Ran Q, Liang H, Ikeno Y, Qi W, Prolla TA, Roberts LJ, 2nd, et al. Reduction in glutathione peroxidase 4 increases life span through increased sensitivity to apoptosis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2007; 62: 932-42. [CrossRef]
20. Ruiz FK, Bohl DD, Webb ML, Russo GS, Grauer JN. Oswestry Disability Index is a better indicator of lumbar motion than the Visual Analogue Scale. *Spine J* 2014; 14: 1860-5. [CrossRef]
21. Vo NV, Hartman RA, Patil PR, Risbud MV, Kletsas D, Iatridis JC, et al. Molecular mechanisms of biological aging in intervertebral discs. *J Orthop Res* 2016; 34: 1289-306. [CrossRef]
22. Urban JP, Smith S, Fairbank JC. Nutrition of the intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976)* 2004; 29: 2700-9. [CrossRef]
23. Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell* 2013; 153: 1194-217. [CrossRef]

24. Vo N, Niedernhofer LJ, Nasto LA, Jacobs L, Robbins PD, Kang J, et al. An overview of underlying causes and animal models for the study of age-related degenerative disorders of the spine and synovial joints. *J Orthop Res* 2013; 31: 831-7. [\[CrossRef\]](#)
25. Dimozi A, Mavrogonatou E, Sklirou A, Kletsas D. Oxidative stress inhibits the proliferation, induces premature senescence and promotes a catabolic phenotype in human nucleus pulposus intervertebral disc cells. *Eur Cell Mater* 2015; 30: 89-102; discussion 3. [\[CrossRef\]](#)
26. Katar M, Ozugurlu AF, Ozyurt H, Benli I. Evaluation of glutathione peroxidase and superoxide dismutase enzyme polymorphisms in celiac disease patients. *Genet Mol Res* 2014; 13: 1030-7. [\[CrossRef\]](#)
27. Yang S, Jensen MK, Rimm EB, Willett W, Wu T. Erythrocyte superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase activities and risk of coronary heart disease in generally healthy women: a prospective study. *Am J Epidemiol* 2014; 180: 901-8. [\[CrossRef\]](#)
28. Sedighi O, Makhloogh A, Shokrzadeh M, Hoorshad S. Association between plasma selenium and glutathione peroxidase levels and severity of diabetic nephropathy in patients with type two diabetes mellitus. *Nephrourol Mon* 2014; 6(5): e21355. [\[CrossRef\]](#)
29. Zedan H, Abdel-Motaleb AA, Kassem NM, Hafeez HA, Hussein MR. Low glutathione peroxidase activity levels in patients with vitiligo. *J Cutan Med Surg* 2015; 19: 144-8. [\[CrossRef\]](#)

Quantitative Determination of α -Tocopherol in Pharmaceutical Soft Capsule by Spectrophotometry

Farmasötik Yumuşak Kapsülde α -Tokoferolün Spektrofotometri ile Kantitatif Tayini

Gamze Özgül Artuç¹ 

¹Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Istanbul Yeni Yüzyıl University, Istanbul, Turkey

ORCID ID: G.Ö.A. 0000-0002-7869-1281

Cite this article as: Özgül Artuç, G. Quantitative determination of α -tocopherol in pharmaceutical soft capsule by spectrophotometry. Experimed 2020; 10(2): 72-6.

ABSTRACT

Objective: Vitamin E is an essential micronutrient for maintaining a healthy status and preventing disease. The purpose of this study was to develop and validate a simple, sensitive and easily applicable spectrophotometric method for determination of α -tocopherol in pharmaceutical preparations.

Material and Method: The quantitative determination of the α -tocopherol in pharmaceutical preparation was carried out using the maximum absorbance value measured at 290 nm. Calibration graphs were constructed by plotting the absorbance against the corresponding concentration of standart α -tocopherol samples at five different concentrations (10-100 μ g/mL).

Results: The amount of α -tocopherol in the pharmaceutical soft capsule was calculated as 101.572% (203.145 IU/capsule) (Evicap soft capsule labelled content: 200 IU/capsule).

Conclusion: It suggested that the developed spectrophotometric method in this study is accurate, sensitive, precise, reproducible and easily applied to soft capsules and the other pharmaceutical preparations.

Keywords: Spectrophotometry, pharmaceutical soft capsule, α -tocopherol

ÖZ

Amaç: E vitamini sağlıklı durumun korunması ve hastalıkların önlenmesi için gerekli bir mikro besin maddesidir. Bu çalışmanın amacı, farmasötik preparatlarda α -tokoferolün belirlenmesi için basit, duyarlı ve kolayca uygulanabilir bir spektrofotometrik yöntem geliştirmek ve doğrulamaktır.

Gereç ve Yöntem: Farmasötik preparatlarda α -tokoferolün kantitatif tayini 290 nm'de ölçülen maksimum absorpsiyon değeri kullanılarak gerçekleştirildi. Kalibrasyon grafikleri, beş farklı konsantrasyonda (10-100 μ g/mL) standart α -tokoferol örneklerinin absorpsiyonlarına karşılık gelen konsantrasyonların çizilmesiyle oluşturuldu.

Bulgular: Farmasötik yumuşak kapsüldeki α -tokoferol miktarı %101,572 (203,145 IU/kapsül) olarak hesaplandı (Evicap yumuşak kapsül etiket içeriği: 200 IU/kapsül).

Sonuç: Bu çalışmada geliştirilen spektrofotometrik yöntemin doğru, duyarlı, hassas, tekrarlanabilir olduğu ve yumuşak kapsül ve diğer farmasötik preparatlara kolayca uygulanabileceği ileri sürülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Spektrofotometri, farmasötik yumuşak kapsül, α -tokoferol

INTRODUCTION

Vitamin E discovered by Evans and Bishop (1922) is an essential micronutrient soluble in fat and must be provided to the human body on regular basis to prevent deficiency and maintain a healthy status (1,2).

Vitamin E is very important for health promotion, disease prevention and therapeutic applications due to its chemical and biological antioxidant activity (3).

Vitamin E is a classical antioxidant due to properties free-radical scavenger (4) and has been used in treating reactive oxygen species (ROS) related diseases (5). Vitamin E derivatives have been shown to be potent inducers of apoptosis in cancer cells because of their antioxidant activity. In addition, Vitamin E derivatives have been shown induce protective effects and prevent apoptosis in some experimental model systems (1,3). In addition to protective effects against some types of cancer (6,7), it has been

Corresponding Author/Sorumlu Yazar: Gamze Özgül Artuç **E-mail:** gamze.ozgul@yeniuyuzuil.edu.tr

Submitted/Başvuru: 13.05.2020 **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 15.05.2020

Last Revision Received/Son Revizyon: 17.07.2020 **Accepted/Kabul:** 06.08.2020



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

reported that in the literature that Vitamin E has protective effect against cardiovascular, neurological and inflammatory diseases (4,8,9), and an incidence reducing effect against some diseases such as fibroplasia, bronchopulmonary dysplasia and hemolytic anemia (10,11). In literature, there are a lot of studies about *in vitro* and *in vivo* antitumor potential, antioxidant activity, antiradical activity and cytotoxicity of Vitamin E (12-16).

Vitamin supplements attract a lot of attention due to these effects. Numerous vitamin preparations often formulated are available on the market and can be taken easily.

Vitamin E is the name for molecules with α -tocopherol, describes eight lipophilic, naturally occurring compounds containing four tocopherols and four tocotrienols (α , β , γ and δ). The well-known function of vitamin E is antioxidant activity. Vitamin E requirements in humans are limited only to α -tocopherol because only α -tocopherol has been shown to reverse human vitamin E deficiency symptoms. Chemical structure of α -tocopherol is given in Figure 1 (3,17).

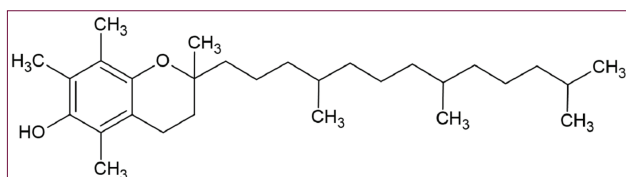


Figure 1. Chemical structure of α -tocopherol.

For the determination of α -tocopherol, several methods have been reported in different samples such as foods (18), cosmetics (19), biological fluids (20–22), natural compounds (23) and pharmaceutical preparations (24) in the literature. Chromatographic methods such as gas chromatography, liquid chromatography and spectroscopic methods such as mass spectrometry, UV-Vis spectrophotometry, fluorescence spectrophotometry have been widely used for the quantification of tocopherols (25). Although mostly chromatographic methods such as high performance liquid chromatography (HPLC) are used, spectrophotometric methods are also highly preferred due to their simplicity and specificity for determination of pharmaceutical preparations (24).

In this work, it was aimed to develop a validated, sensitive and simple UV spectrophotometric method for the quantitative determination of α -tocopherol and also to apply the developed method to the commercial pharmaceutical preparations. For this purpose, the proposed method was validated according to International Council for Harmonisation (ICH) guideline (26) in terms of precision, linearity and accuracy.

MATERIAL AND METHOD

Instrumentation and chemicals

Ultraviolet visible spectrophotometer (Shimadzu UV Visible Spectrophotometer UVmini-1240) with local control software

was used for determination of α -tocopherol. UV spectra of the solutions were recorded in 1 cm quartz cells at the range between 250 and 400 nm.

α -Tocopherol (CAS number 10191-41-0) and methanol (CAS number 67-56-1) was purchased from Sigma Aldrich (Germany). Evicap soft capsule (labelled content: 200 IU α -tocopherol/capsule) was purchased from pharmacy (Istanbul, Turkey).

Preparation of stock and quality control solutions

The α -tocopherol stock solution was prepared at a concentration of 5 mg/mL in methanol. For preparation of the quality control samples the stock α -tocopherol solution was diluted with methanol at the concentrations of 10, 25, 50, 75 and 100 μ g/mL. Methanol was used blank solution. All solutions were stored 4 °C for 2 weeks.

Assay of pharmaceutical soft capsule

Three pharmaceutical soft capsules (200 IU α -tocopherol in a capsule) were diluted to 30 mL with methanol and sonicated for 30 seconds. The mixture was filtered and then completed to 50 mL with methanol. The amount of α -tocopherol in capsule was calculated using regression equation.

Method validation

The developed method was validated according to ICH guidelines (26). Calibration curves were constructed by plotting the absorbance against to the corresponding concentration of quality control samples. Limit of quantification (LOQ) and limit of detection (LOD) were determined as 10 σ /s and 3.3 σ /s respectively. Intra- and interday precisions were tested at three concentration levels (25, 50, 75 μ g/mL) of α -tocopherol. Accuracy of the method was examined by recovery studies performed at three concentrations. Recovery and RSD were calculated for commercial capsule form.

RESULTS

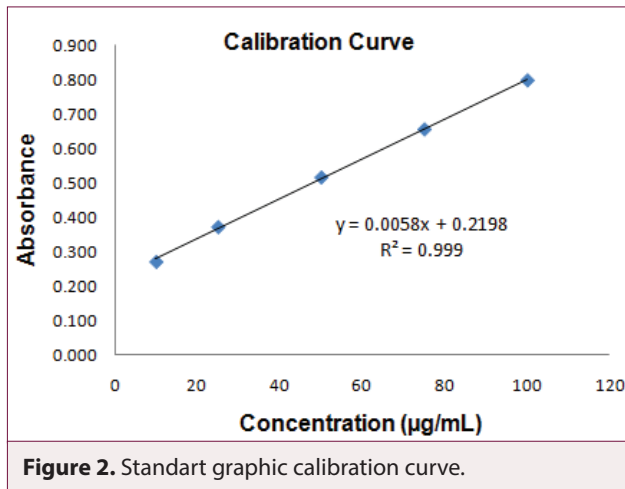
Spectrophotometric method

Methanol was used as blank solution in the study. α -Tocopherol's UV spectrum of in methanol showed maximum absorbance at 290 nm. The maximum absorbance of α -tocopherol was broader at low concentration. So, concentration of minimum quality control solution was 10 μ g/mL in the study.

Assay validation

Linearity, LOD and LOQ

For spectrophotometric determination, linearity ranges were 10-100 μ g/mL in methanol with a correlation coefficient (r) of 0.999 for α -tocopherol. The regression equation was found to be $y=0.0058x+0.2198$ for α -tocopherol. Standard graphic calibration curve and correlation coefficient (r) value were given in Figure 2. The statistical parameters of calibration curves were given in Table 1. The regression equation was calculated calibration curves along with the standard deviation of slope and intercept on the ordinate ($n=6$).



LOD and LOQ values of the α-tocopherol was determined using calibration standards. LOQ and LOD of the proposed method were 2.228 and 6.752 µg/mL for α-tocopherol, respectively. The linearity parameters of the method were presented in Table 1.

Parameters	α-tocopherol
λ (nm)	250-400
Maximum absorption (nm)	290
Linearity range (µg/mL)	10-100
Regression equation	y=0.0058x+0.2198
Standart deviation of slope	0.002
Standart deviation of intercept	0.090
Correlation coefficient (r)	0.999
LOD (µg/mL)	2.228
LOQ (µg/mL)	6.752

Precision and accuracy

Precision and accuracy of the proposed method was determined by analysing the quality control samples in the same day and on three different days at three different concentration (25, 50, 75 µg/mL) (n=6).

Precision of the method was expressed by relative standard deviation (RSD %). Interday and intraday precision values (RSD %) were found in the range of 0.876-1.308 and 0.566-1.349, respectively.

Accuracy of the method was expressed by mean percent recovery (R%). Interday and intraday accuracy values (R%) were found in the range of 99.563-102.425 and 100.927-102.368, respectively.

Intraday and interday precision were found to be less than 1.35% and accuracy values were found to be about 100% (Table 2). These results showed that the developed method was validated and reproducible with good precision and accuracy.

Analysis of commercial soft capsule

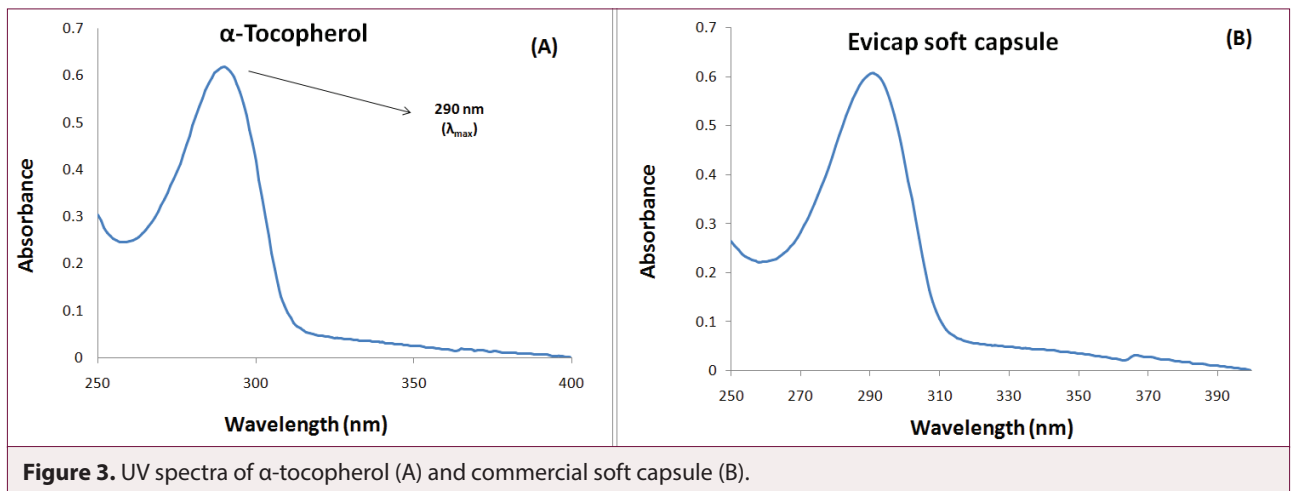
In this study, α-tocopherol in commercial soft capsule was analysed according to the validated method at three different concentration (25, 50, 75 µg/mL) (n=6). The mean recovery values was found between 100.084-103.920% range for the different concentrations of α-tocopherol. It was observed that the developed method was reproducible with good accuracy (Table 3) for soft capsule.

Added (µg/mL)	Found±SD	R (%)	RSD (%)
25	25.178±0.003	100.084	0.692
50	51.960±0.005	103.920	0.903
75	75.063±0.005	100.713	0.742

SD: Standart deviation. RSD: Relative standart deviation. R: Recovery

C (µg/mL)	Interday precision			Intraday precision			
	Found±SD	RSD (%)	R (%)	C (µg/mL)	Found±SD	R (%)	RSD (%)
25	24.891±0.003	1.308	100.889	25	25.293±0.002	100.927	1.349
50	51.213±0.004	0.707	102.425	50	51.184±0.004	102.368	0.771
75	75.667±0.009	0.876	99.563	75	75.695±0.009	101.172	0.566

C: Concentration, SD: Standart deviation. RSD: Relative standart deviation. R: Recovery



UV spectrum of α -tocopherol at the concentration 100 $\mu\text{g/mL}$ in methanol was given in Figure 3 (A). UV spectrum of commercial soft capsule containing α -tocopherol at the concentration 75 $\mu\text{g/mL}$ was given in Figure 3 (B).

The calculated content of α -tocopherol in capsule was about 100.084-103.920% (203.145 IU/capsule) of the labelled content (200 IU/capsule).

DISCUSSION

In literature, there are several different methods (18,20,27,28) reported for the quantitative determination of α -tocopherol in different samples such as natural plants (23), pharmaceutical preparations (24) and human plasma (20,21). Spectrophotometric and chromatographic (liquid, gas, high performance liquid chromatography etc.) methods are frequently used to determination of α -tocopherol (18,20,23,24). These methods, especially chromatographic methods require different experimental processes such as extraction and removal of excipients. Also, chemical reagent used in chromatographic methods are more expensive than others. Therefore, spectrophotometric methods that do not require these experimental procedures are cheaper and simpler than chromatographic methods.

According to the literature researches, it was observed that α -tocopherol determination studies were mostly done in biological fluids (27), natural plants (23), foods (18) and cosmetics (19). Although several researches for the determination of α -tocopherol in biological fluids, cosmetics etc have been reported, determination in pharmaceutical preparations is scarce.

In this study for the developed spectrometric method, the regression equation and correlation coefficient (r) were found to be $y=0.0058x+0.2198$ and 0.999 for α -tocopherol, respectively. LOD and LOQ values for the method were found to be 2.228 and 6.752 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Also precision and accuracy values of the developed spectrophotometric method were found to be less than 1.35% and about 100%, respectively. These results showed that the developed method validated for quantitative determination.

And also the calculated content of α -tocopherol in Evicap soft capsule was about 100.713-103.920% of the labelled content. These obtained results showed that a spectrophotometric method was developed and validated for the determination of α -tocopherol in commercial soft capsule formulation.

The results obtained showed that the developed and validated method is cheaper and simpler than the other methods in the literature such as chromatographic, voltammetric and spectroscopic methods (20,24,25). And also these results showed that the developed method precise and accurate for the quantitative determination.

CONCLUSION

In the present work a simple, precise, reproducible and accurate spectrophotometric method has been developed and validated for routine determination of α -tocopherol in commercial soft capsule formulation. The presented method can be applied directly and easily to the commercial pharmaceutical formulations of α -tocopherol. The obtained results showed that the proposed method might be an alternative determination method for routine analysis.

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

Peer-review: Externally peer-reviewed.

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

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

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

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

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - G.Ö.A.; Denetleme - G.Ö.A.; Gereçler - G.Ö.A.; Veri Toplanması ve/veya İşlenmesi - G.Ö.A.; Analiz ve/veya Yorum - G.Ö.A.; Literatür Taraması - G.Ö.A.; Yazan - G.Ö.A.; Eleştirel İnceleme - G.Ö.A.

Çıkar Çatışması: Yazar çıkar çatışması bildirmemiştir.

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

REFERENCES

- Litwack G. Vitamin E: Vitamins and Hormones. Vol. 76, Elsevier Inc. Elsevier; 2007. 2-60,531 p.
- Rucker RB, Suttie JW, McCormick DB. Handbook of Vitamins, 3rd Edition (Clinical Nutrition in Health and Disease, No. 3). Taylor&Francis; 2001. 153-175 p.
- Weber, Peter; Birringer, Marc; Blumberg, B. Jeffery; Eggersdorfer, Manfred; Frank J. Vitamin E in Human Health. Vitamin E in Human Health. Springer; 2019. [CrossRef]
- Praça FG, Viegas JSR, Peh HY, Garbin TN, Medina WSG, Bentley MVLB. Microemulsion co-delivering vitamin A and vitamin E as a new platform for topical treatment of acute skin inflammation. Mater Sci Eng C 2020; 110. [CrossRef]
- Muripiti V, Mujahid TY, Boddeda VHV, Tiwari S, Marepally SK, Patri SV, et al. Structure-activity relationship of serotonin derived tocopherol lipids. Int J Pharm 2019; 554: 134-48. [CrossRef]
- Palan PR, Woodall AL, Anderson PS, Mikhail MS. α -Tocopherol and α -tocopheryl quinone levels in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. Am J Obstet Gynecol 2004; 190(5): 1407-10. [CrossRef]
- Sato R, Helzlsouer KJ, Alberg AJ, Hoffman SC, Norkus EP, Comstock GW. Prospective study of carotenoids, tocopherols, and retinoid concentrations and the risk of breast cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2002; 11(5): 451-7.
- Fuller CJ, Jialal I. Effects of antioxidants and fatty acids on low-density-lipoprotein oxidation. Am J Clin Nutr 1994; 60(6): 1010-1013. [CrossRef]
- Mancini M, Parfitt VJ, Rubba P. Antioxidants in the Mediterranean diet. Can J Cardiol 1995; 11: 105-9.
- Saldanha RL, Cepeda EE, Poland RL. The effect of vitamin E prophylaxis on the incidence and severity of bronchopulmonary dysplasia. J Pediatr 1982; 101(1): 89-93. [CrossRef]
- Phelps DL, Rosenbaum AL, Isenberg SJ, Leake RD, Dorey FJ. Tocopherol efficacy and safety for preventing retinopathy of prematurity: a randomized, controlled, double-masked trial. Pediatrics 1987; 79(4): 489-500.
- Lu R, Groer C, Kleindl PA, Moulder KR, Huang A, Hunt JR, et al. Formulation and preclinical evaluation of a toll-like receptor 7/8 agonist as an anti-tumoral immunomodulator. J Control Release 2019; 306: 165-76. [CrossRef]
- Shanmugapriya K, Kim H, Kang HW. *In vitro* antitumor potential of astaxanthin nanoemulsion against cancer cells via mitochondrial mediated apoptosis. Int J Pharm 2019; 560:334-46. [CrossRef]
- Zhang X, Liang N, Gong X, Kawashima Y, Cui F, Sun S. Tumor-targeting micelles based on folic acid and α -tocopherol succinate conjugated hyaluronic acid for paclitaxel delivery. Colloids Surfaces B Biointerfaces 2019; 177: 11-8. [CrossRef]
- Zhang L, Zhang T, Chang M, Lu M, Liu R, Jin Q, et al. Effects of interaction between α -tocopherol, oryzanol, and phytosterol on the antiradical activity against DPPH radical. LWT 2019; 112: 108206. [CrossRef]
- Teixeira MC, Severino P, Andreani T, Boonme P, Santini A, Silva AM, et al. D- α -tocopherol nanoemulsions: Size properties, rheological behavior, surface tension, osmolarity and cytotoxicity. Saudi Pharm J 2017; 25(2): 231-5. [CrossRef]
- Scott ML. Vitamin E in Health and Disease of Poultry. Vol. 20, Vitamins and Hormones. Dekker; 1962. 621-632 p. [CrossRef]
- San Andrés MP, Otero J, Vera S. High performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of α -, γ - And δ -tocopherol in vegetable oils in presence of hexadecyltrimethylammonium bromide/n-propanol in mobile phase. Food Chem 2011; 126(3): 1470-4. [CrossRef]
- Aly N, Krishnaiah YSR, Zaghoul AA, Ibrahim K. Analysis of vitamin E in commercial cosmetic preparations by HPLC. J Cosmet Sci 2010; 61(5): 353-65.
- Demirkaya F, Kadioğlu Y. Simple GC-FID method development and validation for determination of α -tocopherol (vitamin E) in human plasma. J Biochem Biophys Methods 2007; 70(3): 363-8. [CrossRef]
- Semeraro A, Altieri I, Patriarca M, Menditto A. Evaluation of uncertainty of measurement from method validation data: An application to the simultaneous determination of retinol and α -tocopherol in human serum by HPLC. J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci 2009; 877(11-12): 1209-15. [CrossRef]
- Özkırmılı S, ÇAPAN G, Demiroğlu C. Determination of α -Tocopherol Concentration in Plasma Using High Performance Liquid Chromatography. Acta Pharm Turc 1988; 30: 161-5.
- Aoun E, Rima J, Chidiac G, Hanna K. High-performance liquid chromatographic and spectrofluorometric determination of α -tocopherol in a natural plant: Ferula hermonis (Zalooch root). J Food Compos Anal 2005; 18(7): 607-15. [CrossRef]
- Yılmaz B, Öztürk M, Kadioğlu Y. Comparison of two derivative spectrophotometric methods for the determination of α -tocopherol in pharmaceutical preparations. Farmaco 2004; 59(9): 723-7. [CrossRef]
- Poudel A, Gachumi G, Badea I, Bashi ZD, El-Anead A. The simultaneous quantification of phytosterols and tocopherols in liposomal formulations using validated atmospheric pressure chemical ionization- liquid chromatography -tandem mass spectrometry. J Pharm Biomed Anal 2020;183:113104. [CrossRef]
- Guidance for Industry Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology. 1996
- Zhang H, Quan L, Pei P, Lin Y, Feng C, Guan H, et al. Simultaneous determination of Vitamin A, 25-hydroxyl vitamin D3 α -tocopherol in small biological fluids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci 2018; 1079: 1-8. [CrossRef]
- Jaiswal PV, Ijeri VS, Srivastava AK. Voltammetric behavior of α -tocopherol and its determination using surfactant + ethanol + water and surfactant + acetonitrile + water mixed solvent systems. Anal Chim Acta 2001; 441(2): 201-6. [CrossRef]

Lime Scale Water in Domestic Boilers as the Main Toxic Factor in the Human Body

İnsan Vücudunda Ana Toksik Faktör Olarak Eysel Kazanlardaki Kireç Birikimi Su

Valdrin M. Beluli¹ , Kathelina Kristollari² , Aleksandër Kaso³ , Fatime Krasniqi² 

¹Department of Industrial Chemistry, Faculty of Nature Sciences, Tirana University, Tirana, Albania

²Department of Biotechnology, Faculty of Nature Sciences, Tirana University, Tirana, Albania

³Department of Biology, Faculty of Nature Sciences, Tirana University, Tirana, Albania

ORCID ID: V.M.B. 0000-0003-1234-6888; K.K. 0000-0003-1494-2819; A.K. 0000-0002-7753-6941; F.K. 0000-0002-3798-2998

Cite this article as: Beluli VM, Kristollari K, Kaso A, Krasniqi F. Lime Scale Water in Domestic Boilers as the Main Toxic Factor in the Human Body. Experimed 2020; 10(2): 77-83.

ABSTRACT

This research is based on the study of boiler water with a high content of waste inside boilers. After many years of use, a very toxic lime scale (LS) is formed in the boiler mixed with heavy elements, ions, and other molecules dangerous for human health. The high concentration of some heavy metals in domestic boilers is a problem in itself. During our study we created laboratory proof that inside domestic boilers contain extremely high concentrations of some heavy carcinogenic metals. Domestic boilers should have a simple system for cleaning the waste in the boiler that in our research contains heavy metals that can create profoundly serious problems in a person with normal metabolism. The chemical parameters analysed in the domestic boilers are: Cu (0.002-3.08) mg/L, Fe (0.001-0.97) mg/L, Cr⁶⁺ (0-0.31) mg/L, Al³⁺ (0.001-0.8<) mg/L, Ca²⁺ (56-200<) mg/dm³, Cl⁻ (12.3-45) mg/L, Cl₂ (0-2.2) mg/L, PO₄³⁻ (0.04-1.3) mg/L, NO₂-N (0.0006-2.9) mg/L, NH₃-N (0.001-0.5) mg/L. The high presence of heavy metals in water has recently been causing serious problems. Scientific research in the field of environmental toxicology has given us more and more answers to the questions of where many human health problems can come.

Keywords: Water, lime scale, boiler, heavy metals, toxicity, cancer

ÖZ

Bu araştırma kazanlardaki atık içeriği yüksek olan kazan suyunun incelenmesine dayanmaktadır. Uzun yıllar kullanımının ardından, kazan içinde ağır elementler, iyonlar ve insan sağlığı için tehlikeli diğer moleküllerle karışmış olarak oldukça toksik kireç pulu oluşmaktadır. Ev tipi kazanlarda bazı ağır metallerin yüksek konsantrasyonda bulunması başlı başına bir sorundur. Çalışmamız kapsamında, ev tipi kazanların son derece yüksek konsantrasyonlarda birtakım ağır kanserojen metaller içerdiğine dair laboratuvar bulgularını ortaya koyduk. Ev tipi kazanlar, kazandaki atıkları temizlemek için basit bir sisteme sahip olmalıdır; bu kazanlar, araştırmamıza göre, normal metabolizmaya sahip bir kişide çok ciddi sorunlar yaratabilecek ağır metaller içermektedir. Ev tipi kazanlarda analiz edilen kimyasal parametreler şunlardır: Cu (0,002-3,08) mg/L, Fe (0,001-0,97) mg/L, Cr⁶⁺ (0-0,31) mg/L, Al³⁺ (0,001-0,8<) mg/L, Ca²⁺ (56-200<) mg/dm³, Cl⁻ (12,3-45) mg/L, Cl₂ (0-2,2) mg/L, PO₄³⁻ (0,04-1,3) mg/L, NO₂-N (0,0006-2,9) mg/L, NH₃-N (0,001-0,5) mg/L. Suda yüksek miktardaki ağır metal mevcudiyeti son yıllarda ciddi sorunlara neden olmaktadır. Çevresel toksikoloji alanındaki bilimsel araştırmalar, birçok insan sağlığı sorununun nereden gelebileceğine dair sorulara giderek daha fazla yanıt verebilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Su, kireç birikimi, kazan, ağır metaller, toksite, kanser

INTRODUCTION

Heavy metals have often been presented as one of the biggest public health problems. The removal of heavy metals with the term carcinogen is often inevitable by not detecting the source of where we can get these metals. The aim of every scientific researcher of medical, environmental, and food toxicology is to detect the main carcinogenic sources

of inorganic or organic character. As toxicology researchers, we have found high amounts of heavy metals in home boilers calling it the main source of carcinogens in a home. Why? In most cases, we have seen that hot water can often be used in the kitchen for the preparation of food products or anything else and the absence of information on what this type of water can bring in contact with lime scale (LS) could cause serious problems. In metabolism and the lab-

Corresponding Author/Sorumlu Yazar: Valdrin M. Beluli **E-mail:** valdrin_beluli@hotmail.com

Submitted/Başvuru: 21.07.2020 **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 22.07.2020

Last Revision Received/Son Revizyon: 08.08.2020 **Accepted/Kabul:** 10.08.2020



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

oratory work is focused on what kind of carcinogenic metals may be in LS and what the consequences may be if our metabolism has contact with this type of water etc.

Heavy metals/metalloids are an important kind of pollutant that lead to a degradation of water quality. Trace metals in waters may originate from both natural and anthropogenic processes (1). Without information regarding physico-chemical parameters, water has often been the cause of many different diseases. According to this research, thermal devices contain very dangerous elements in LS that cause different diseases in people with normal metabolism. The combination of unit processes used in water treatment technological systems should ensure not only removal of pollutants present in normative values, but also guarantee water quality that should reduce the risk of secondary contamination during transport to the recipient (2). Chemical pollutants found in water boiler systems typically include calcium salts, magnesium, aluminium oxide, etc (3).

The toxicity of heavy metals has been documented throughout history by diagnosing the symptoms of heavy metal poisoning. Heavy metals pollution is a menace to our environment as they are the foremost contaminating agents of our food supply (4), also are well-known environmental pollutants due to their toxicity, persistence in the environment, and bio accumulative nature (5). Pollutants in LS boilers frequently present a major health risk including those with heavy metals with high potential for toxicity:

Iron can initiate cancer mainly by the process of oxidation of DNA molecules. This can sometimes result in cell death (6), or a spectrum of diseases with diverse clinical manifestations, ranging from anemia to iron overload, and possibly to neurodegenerative diseases (7).

Copper is widely distributed in nature and is an essential trace element for humans. Nonetheless, Cu (copper) shows some toxicological effects, damage to the renal tubules, brain, and other organs (8), high concentrations cause oxidative stress resulting in kidney, gastrointestinal tract, or liver damage (e.g., abdominal pain, cramps, nausea, diarrhea, and vomiting), which can be fatal (9), physiologic processes, such as angiogenesis; neurohormone homeostasis; and regulation of gene expression, brain development, pigmentation, and immune system functioning (10). However, copper toxicity has been reported in people who consume water containing high levels of copper as a result of stagnant water in copper-containing pipes and fixtures as well as copper alloys in water distribution systems and household plumbing that allow copper to leach into water (11,12).

Chromium is a mineral that humans require in trace amounts, although its mechanisms of action in the body and the amounts needed for optimal health are not well defined (13). The hexavalent chromium has been demonstrated to be associated with toxic parameters and classified as a human carcinogen and mutagen (14), particularly hexavalent chromium (Cr^{+6}) has been the

greatest concern and is categorized as a group human carcinogen by the "International Agency for Research on Cancer".

Aluminium showed adverse effects on the nervous system and resulted in memory loss, problems with balance and coordination (15).

Ammonia is present in groundwater very often. Its presence in water describes its formation as the result of the reduction of organic substances containing nitrogen, and deamination of amines, etc (16).

Nitrites in the water supply system can also be reached due to their frequent use as a corrosion inhibitor during industry water processing (17). In humans, nitrite can cause methemoglobinemia, which is a specific type of anemia. Furthermore, nitrite has been observed to cause several types of cancer in animals and may potentially do so in humans (18).

According to many public health researchers, high concentrations of calcium in water cause cardiovascular problems in humans (19).

MATERIAL AND METHOD

During in this research the following parameters have been analysed in boiler water: copper (Cu), iron (Fe), chromium (Cr^{+6}), aluminium (Al^{+3}), calcium (Ca^{+2}), chlorine (Cl^{-}), phosphate (PO_4^{-3}), ammonia (NH_3-N), nitrites (NO_2-N), and chlorine (Cl_2). Analytical methods and DR / 2010 HACH® spectrophotometry are used for the determination of these parameters in water LS inside the boilers. Spectrophotometer is very popular in water chemistry labs because it provides accurate results. We have described the general scientific form of LS in domestic boilers, see Figure 1.

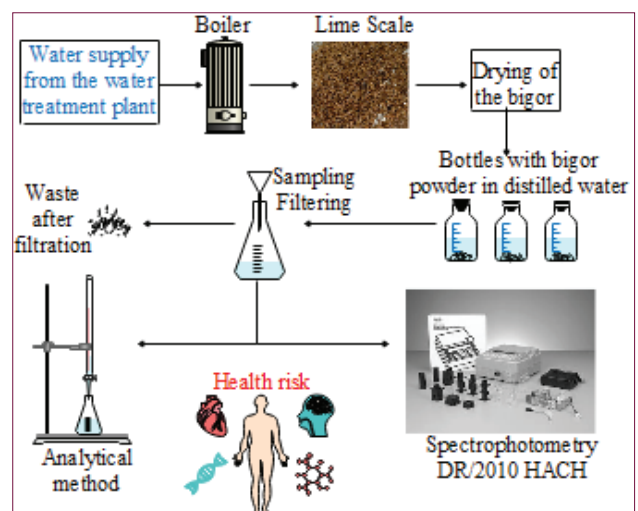


Figure 1. General description of the experimental study in high-volume domestic boilers water.



Figure 2. Sampling of LS in domestic boilers operating at temperatures (60-75)°C.

Mechanical sampling way in boilers of different volume

For the removal of the formed LS the mechanical method was used. Different tools can be used for the mechanical removal of LS. However, tools should be made of chrome as other metals can react chemically with the LS, see Figure 2. Mechanical actions during the cleaning operation may result in damage of some parts of the boiler, so cleaners should have good knowledge of the constructive properties of the appliance and deal with them with great care (20). It should be noted that most domestic boilers operate 24 h at a temperature of (60-75)°C and these boilers are supplied with municipal drinking water

Treatment of samples after taking from domestic boiler

After the mechanical cleaning of the boiler, the LS was carefully taken, placed in a dried chrome dish, and left drying for a few days. After drying, the LS was pressed in a very fine powder. This 200 g powder is placed with distilled water in a glass bottle with a volume of 2 L, which has stood for two weeks at a temperature of 4–5°C. Every day, three times a day, the glass bottle was shaken, so that the ions are as much in contact with distilled water as possible.

Chemical reagents

Phos Ver 3 reagent (HACH®), Ammonia Salicylate Reagent (HACH®), Ammonia Cyanurate Reagent (HACH®), ChromaVer

3 (HACH®), FerroMo Iron Reagent 1 (HACH®), FerroMo Iron Reagent 2 (HACH®), CuVer 1 (HACH®), DPD Total Chlorine (HACH®), AgNO₃ (c=0.01 mol/L), K₂CrO₄ (c=0.257 mol/L), EDTA (c=0.01 mol/L), NaOH (c=2 mol/L) and black murexide.

Analyzed method and toxicological study of heavy and essential metals

Use of the spectrophotometer for analytical analysis is one of the greatest advantages of analytical chemistry to detect essential metals and heavy metals that can cause serious problems in the human body. We, during the work in the laboratory have used powder fabricated for analysis by the company HACH® (Figure 3) to determine these heavy metals and the use of this experimental method enables us to have the most serious results for a scientific field like toxicology. This experimental part has enabled us to detect a domestic source of cancer such as water heating boilers and with the analyzed samples and the implementation of internationally known methods have managed to compile some very successful results for human health etc. Below we will describe the spectrophotometer (HACH® Model DR/2010) methods used in laboratory experiments:

PO₄⁻³ (Method 8048, λ=890 nm), NH₃-N (Method 8155, λ=655 nm), Cr⁺⁶ (Hexavalent Chromium, Method 8023, λ=540 nm), Fe (Method 8365, λ=590 nm). Cu (Copper 9 Bicn Method 8506,

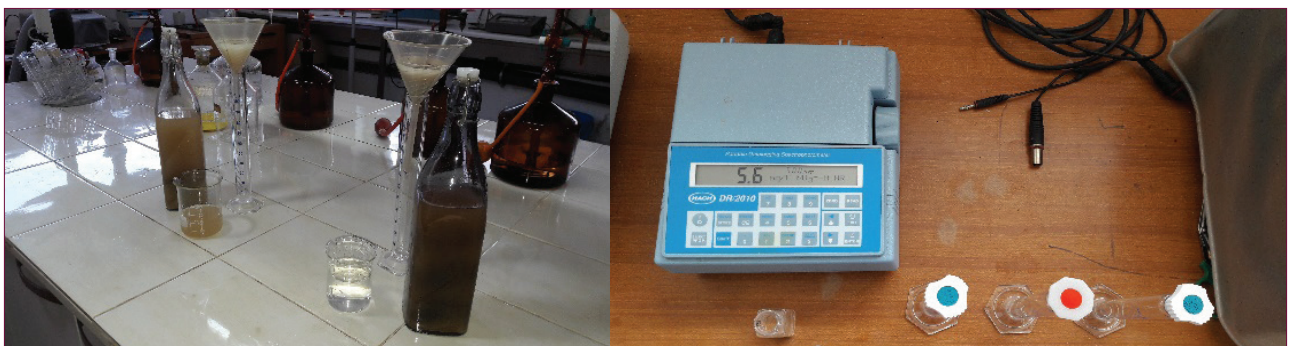


Figure 3. Analysis of chemical parameters in LS samples with HACH® Model DR/2010 spectrophotometer.

$\lambda=560$ nm). Cl_2 (Pocket Colorimeter II (HACH® Chlorine Test, Method 8167). Cl^- (Mercuric Thiocyanate Solution, Ferric Ion Solution, Method 8113, $\lambda=455$ nm), while determining calcium by trituration we used these reagents: 5 ml of buffer solution (in this issues NaOH ($c=\text{mol/L}$), black murexide indicator (black murexide, NaCl ($c=0.01$ mol/L), and then titrated with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ($c=0.01$ mol/L), 5 min after the addition of NaOH. The determination of Ca^{+2} was calculated by the following eq. (1): (17,21).

$$\text{Ca}^{+2} \text{ mg/L} = \frac{V_{\text{EDTA}} \cdot C_{\text{EDTA}} \cdot 56 \cdot 1000}{V_s} \quad (1)$$

where V_{EDTA} is the volume (ml) of the titre with EDTA, C_{EDTA} is the concentration of EDTA ($c = 0.01$ mol/L), and V_s is the volume of the sample used.

RESULTS AND DISCUSSION

During the research, important results were obtained which helped determine which boiler samples were in the accordance with World Health Organization (WHO). The concertations that were not in accordance with WHO were divided in two groups. For more information, read the discussion of the results for each chemical parameter.

Copper (Cu)

Mass concentration of copper in this research was in the range from (0.002 -3.08) mg/L. Copper is one of the most important metals in this scientific research because of its high presence in the LS of boilers. The concentrations of Cu in the samples were divided in two groups:

[i]. In the boiler samples $\text{SP}_1, \text{SP}_3, \text{SP}_4, \text{SP}_6, \text{SP}_7, \text{SP}_8, \text{SP}_9$ and SP_{10} , the concentration of Cu is (0.002-1.3) mg/L and that concentration is in line with WHO regulations (Table 1).

[ii]. In samples SP_2 to SP_5 , the concentrations of Cu (2.01–3.08) mg/L (Table 1) and Cu were not in line with the WHO allowed water regulation. The concertations of Cu in these samples contain a serious problem and open an important discussion for LS in domestic boilers.

Iron (Fe)

Iron in the samples SP_1 to SP_{10} were not all in the category of chemically pure iron water, compared to WHO (0.3 mg/L). The Fe concertation in the boiler samples range from (0.001-0.97) mg/L. Some samples contained a high score of Fe and were not in accordance with WHO regulations. We will divide them in two groups according to the WHO regulation:

[i]. In the boiler samples SP_4, SP_9 , and SP_{10} , the concentrations of Fe are from (0.001- 0.2) mg/L, which mean that these concentrations were in accordance with WHO (Table 1).

[ii]. In boiler samples $\text{SP}_1, \text{SP}_2, \text{SP}_3, \text{SP}_5, \text{SP}_6, \text{SP}_7$, and SP_8 the present concentration of Fe was from (0.33-0.97) mg/L, which meant that this concentration was higher than 0.2 mg/L and was not in line with WHO regulations (Table 1).

Calcium (Ca^{+2})

The concentration of Ca^{+2} in the boilers was very high and ranged from 56 mg/L to over 200 mg/L (Table 1). We divided the boiler samples in two groups, according to WHO regulation:

Table 1. Results of chemical parameters in water samples with LS of domestic boilers

Unit	Chemical parameters (mg/L)									
Samples (SP)	Cu	Fe	Cr^{+6}	Al^{+3}	Ca^{+2}	PO_4^{-3}	$\text{NO}_2\text{-N}$	$\text{NH}_3\text{-N}$	Cl_2	Cl^-
SP_1	0.29	0.46	0.05	0.001	>200	0.09	1	0.14	0.48	22.3
SP_2	3.08	0.97	0.31	>0.80	>200	0.71	2.9	0.41	2.2	20
SP_3	0.46	0.33	0.08	0.006	146	0.06	0.6	0.9	1.6	25
SP_4	0.1	0.2	0.004	0.09	56	0.04	0.8	0.04	1.4	45
SP_5	2.01	0.8	0.28	0.4	>200	0.64	3	0.7	1.1	12
SP_6	1.3	0.9	0.12	0.1	147	1.3	1.5	0.25	1.9	23
SP_7	0.9	0.51	0	0.001	59	0.08	0.9	0.5	0.56	14
SP_8	1.6	0.6	0.09	0.02	150	0.45	1.1	0.17	1.5	19
SP_9	0.002	0.001	0	0.0001	>200	0.045	0.0008	0.001	0	18
SP_{10}	0.003	0.003	0	0.0003	>200	0.056	0.0006	0.002	0	12.3
WHO reference values (mg/L) (22)	2	0.3	0.05	0.2	<200	0.2	0.5	0.5	0.2	<250

[i]. In the boiler samples SP₃, SP₄, SP₆, SP₇, and SP₈, the concentration of Ca in sample ranges between 56 mg/L and 150 mg/L and were within WHO regulations (Table 1).

[ii]. In the boiler samples SP₁, SP₂, SP₅, SP₉, and SP₁₀, the concentration of Ca⁺² was more than 200 mg/L and were not in accordance with WHO regulations (Table 1).

Hexavalent chromium (Cr⁺⁶)

The concentration of Cr⁺⁶ in the ten samples ranged from (0-0.31) mg/L. In our research, Cr⁺⁶ in some boiler samples were not within WHO allowed regulations. We divided them into two groups according to WHO regulations:

[i]. In the boiler samples SP₁, SP₄, SP₇, SP₉, and SP₁₀, the concentrations of Cr⁺⁶ in samples were within WHO regulations (Table 1).

[ii]. In boiler samples SP₂, SP₃, SP₅, SP₆, and SP₈, the concentrations of Cr⁺⁶ in samples were not in accordance with WHO regulations, the concentration of Cr⁺⁶ was 0.31 mg/L (Table 1).

Aluminium (Al⁺³)

Aluminium as a metal has often demonstrated negative effects on people with a normal metabolism, as cited above. Al⁺³ in our research in most analysed samples was not in accordance with WHO water conditions (Table 1). The concentration of Al⁺³ in boiler samples ranged from (0.0001 - 0.80) mg/L. We divided the samples into two groups according to WHO regulations:

[i]. The first group included samples of boilers SP₁, SP₃, SP₆, SP₇, SP₈, SP₉, and SP₁₀, in which Al⁺³ concentrations were in line with WHO (Table 1).

[ii]. The second group included boiler samples SP₂ and SP₅, in which the concentrations of Al⁺³ were very high. In SP₅ the concentration was 0.4 mg/L and in SP₂ above 0.80 mg/L, which meant that these two samples were not in accordance with WHO.

Phosphates (PO₄⁻³)

Determination of phosphates (PO₄⁻³) in water was unavoidable to control the quality of water. In the analysed boiler samples, the concentration of PO₄⁻³ varied from (0.04 - 1.3) mg/L and most of the samples had high concentrations of PO₄⁻³. We divided the samples into two groups according to WHO regulations:

[i]. In boiler samples SP₁, SP₃, SP₄, SP₇, SP₉, and SP₁₀, the concentrations of PO₄⁻³ were in accordance with WHO, concentrations were from (0.045-0.09) mg/L (Table 1).

[ii]. In boiler samples SP₂, SP₅, and SP₈, the concentrations of PO₄⁻³ were not in line with WHO, the concentrations were from (0.45-0.71) mg/L (Table 1).

Nitrites (NO₂-N)

Spectrophotometers are increasingly preferable for nitrite (NO₂-N) determination, as the analytical method for nitrite determination cannot provide accurate results. In this research, the NO₂-N was divided in two groups according to WHO:

[i]. In the boiler samples SP₉ and SP₁₀, the concentrations of NO₂-N were from (0.006 - 0.008) mg/L, in which two boilers did not contain high levels of NO₂-N and were in accordance with WHO.

[ii]. The boiler samples SP₁, SP₂, SP₃, SP₄, SP₅, SP₆, SP₇, and SP₈ all contained high concentrations of NO₂-N. The NO₂-N concentration in these samples ranged from (0.6 -2.9) mg/L, which was not in line with WHO (Table 1).

Ammonia (NH₃-N)

From the environmental chemistry theories, it is known that NH₃-N presents a major problem in surface water and groundwater. In some analysed samples, NH₃-N was present in high levels and we divided them in two groups according to WHO:

[i]. In boiler samples SP₇, SP₉, and SP₁₀ did not contain a high concentration of NH₃-N. Concentrations ranged from (0.001-0.5) mg/L and these samples corresponded with the WHO water regulations (Table 1).

[ii]. In boiler samples SP₁, SP₂, SP₃, SP₄, SP₅, SP₆, and SP₈ were not in accordance with the WHO because they contained high concentrations of NH₃-N approximately 0.41 mg/L (Table 1).

Chlorides (Cl⁻)

In all boiler samples that were analysed, unlike all the other analysed chemical parameters, the chlorides were in agreement with WHO permissible values as their concentrations ranged from (12-45) mg/L (Table 1).

Chlorine (Cl₂)

The concentration of chlorine in these samples was very high compared to WHO's permissible values. The concentration of Cl₂ in the analysed samples in the boilers supplied with different water treatment plant so Cl₂ was deposited in the LS, specifically inside the domestic boiler, which means that Cl₂ is a major concern for health. It is known that disinfection of chlorinated water with gases can be made from (0.2-0.5) mg/L. In this scientific research of samples analyses, Cl₂ ranges is from (0-2.2) mg/L. Some samples that were not in accordance with WHO, were divided in two groups:

[i]. Sampling boilers SP₁, SP₉, and SP₁₀ did not contain high concentrations of Cl₂, which varied from (0-0.48) mg/L. These concentrations were within the WHO parameters (Table 1).

[ii]. In the samples of boilers SP₂, SP₃, SP₄, SP₅, SP₆, SP₇, and SP₈, contained high concentrations of Cl₂ from (0.56-2.2) mg/L. These concentrations of Cl₂ were not in accordance with WHO permissible values (Table 1).

CONCLUSION

We, as scientific researchers have been able to provide scientific proof in this research that domestic boilers today are very dangerous in the formation of LS. Domestic boilers with LS contain heavy metals with carcinogenic properties in the samples we studied and this research shows very serious problem especially in DNA damage and other problems in human health. The

chemical parameters with the highest concentration of toxicity in some samples in our research are: (Cu, Fe, Cr⁺⁶, Al⁺³, Ca⁺², PO₄⁻³, NO₂-N, NH₃-N, Cl₂) mg/L.

Cu as a heavy metal in our research was not in accordance with WHO, Cu concentrations were up to 3.08 mg/l. Fe as a heavy metal for the human body can often become toxic when the Fe concentration is not in accordance with WHO, in our study the concentrations of Fe reaches up to 0.97 mg/L. Cr⁺⁶ and is one of the most dangerous and toxic chemical parameters due to these high levels. In our scientific research, the concentration of Cr⁺⁶ is up to 0.31 mg/L and was not in condition with WHO. Al⁺³ as a frequent hazardous parameter in water is a concern, especially when the high concentration reaches more than 0.8 mg/L as in our research. Ca⁺² as an important chemical parameter in water sometimes causes health problems if Ca⁺² is high, especially when exceeding 200 mg/L which is unhealthy for normal human metabolism and in our research the concentration of Ca⁺² was not in accordance with WHO because the concentration of Ca⁺² was >200 mg/L. The high presence of Cl₂ in water with LS represents another health concern that may cause Cl₂. The concentration of Cl₂ in our research was 2.2 mg/L which means it was not in line with WHO. The concentration of PO₄⁻³ in our samples was approximately 1.3 mg/L so the concentration of PO₄⁻³ in our samples was so high and not in accordance with WHO. The high concentration of NO₂-N and NH₃-N in the water causes toxicity, the concentration of NO₂-N was 2.9 mg/L in our analyzed samples, this high concentration of NO₂-N was not in accordance with WHO but the concentration of NH₃-N at 0.5 mg/L, was in accordance with WHO. Water in contact with LS used in the kitchen for food or other forms can cause carcinogenic effects on the normal metabolism of humans.

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

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of study - V.M.B.; Data Acquisition - V.M.B.; Data Analysis/Interpretation - V.M.B.; Critical Revision of Manuscript - A.K; K.K.; Technical or Material Support - F.K.

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

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

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

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarımı - V.M.B.; Veri Toplama-V.M.B.; Veri Analizi/Yorumlama -V.M.B.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi - A.K; K.K.; Malzeme ve teknik destek - F.K.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

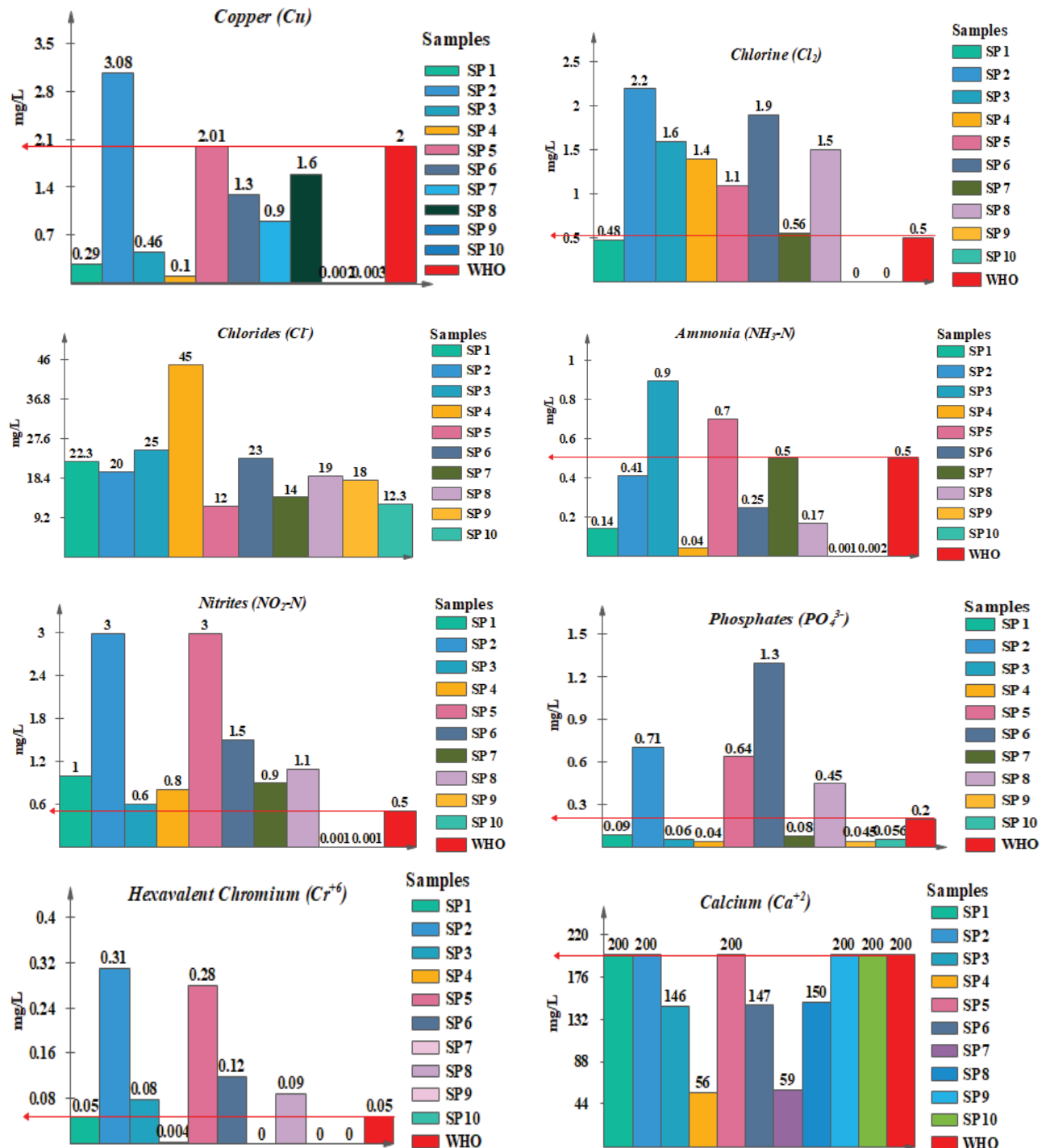
Financial Destek: Yazarlar bu çalışmada finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

REFERENCES

1. Wu J, Man Y, Sun G, Shang L. Occurrence and Health-Risk Assessment of Trace Metals in Raw and Boiled Drinking Water from Rural Areas of China. *Water* 2018; 10: 1-15. [CrossRef]
2. Domoń A, Papciak D, Tchórzewska-Cieślak B, Pietrucha-Urbanik B. Biostability of Tap Water - A Qualitative Analysis of Health Risk in the Example of Groundwater Treatment (Semi-Technical Scale). *Water* 2018; 10: 1-13. [CrossRef]
3. Daci N, Daci-Ajvazi M. Shkenca e Mjedisit. *Akademia e Shkencave të Kosovës. Prishtinë*; 2014. pp. 436, 475.
4. Kacholi DS, Sahu M. Levels and Health Risk Assessment of Heavy Metals in Soil, Water, and Vegetables of Dar es Salaam, Tanzania. *Journal of Chemistry* 2018; 1-9. [CrossRef]
5. Ali H, Khan E, Ilahi I. Environmental Chemistry and Ecotoxicology of Hazardous Heavy Metals: Environmental Persistence, Toxicity, and Bioaccumulation. *Journal of Chemistry* 2019; 1-14. [CrossRef]
6. Jose E, Dutra-De-Oliveira J, Marchini S, Lamounier J, Carlos A, Almeida N. Iron-Fortified Drinking Water Studies for the Prevention of Children's Anemia in Developing Countries. *Anemia* 2011; 1-5. [CrossRef]
7. Abbaspour N, Hurrell R, Kelishadi R. Review on iron and its importance for human health. *J Res Med Sci* 2014; 19: 164-74.
8. Gholivand M, Pourhossein A. Simultaneous Determination of Copper and Cadmium in Environmental Water and Tea Samples by Adsorptive Stripping Voltammetry. *Turkish Journal of Chemistry* 2011; 35: 839-846.
9. Chubaka CE, Whiley H, Edwards JW, Ross KE. Lead, Zinc, Copper, and Cadmium Content of Water from South Australian Rainwater Tanks, *Int. J. Environ. Res. Public* 2018; 15: 1-12. [CrossRef]
10. Collins JF. Copper. In: Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, Tucker KL, Ziegler TR, eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*. 11th ed. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins; 2014. pp. 206-16.
11. Institute of Medicine. Food and Nutrition Board. *Dietary Reference Intakes: Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*. Washington, DC: National Academy Press; 1998.
12. National Research Council Committee on Copper in Drinking Water. *Copper in Drinking Water*. Washington, DC: National Academies Press; 2000.
13. U.S. Department of Health & Human Services. National Institutes of Health. *Strengthening Knowledge and Understanding of Dietary Supplements. Chromium Dietary Supplement Fact Sheet*. <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Chromium-HealthProfessional/> (access:10.07.2020)
14. Beluli V, Mulliqi I. Heavy Metals as Main Polluting Factors in the Mirusha, Stanishor and Morava Rivers in Gjilan, Kosovo. *JOTCSA* 2019; 6: 89-96. [CrossRef]
15. Jaishankar M, Teseten T, Anbalagan N, Mathew B, Beeregowda KN. Toxicity, Mechanism and Health Effects of Some Heavy Metals, *Interdiscip. Toxicol* 2014; 7: 60-72. [CrossRef]
16. Beluli V. Assessment of Groundwaters' Quality with Depth of (8-60) m in the Arbëria Neighbourhood of Gjilan Municipality, Kosovo. *JOTCSA* 2019; 6: 419-28. [CrossRef]
17. Korça B. Analiza Kimike të Ujit. *Universiteti i Prishtinës "Hasan Prishtina"*, Prishtinë; 2013. p. 99, 100-101, 108, 110.
18. Rantanen PL, Mellin I, Keinänen-Toivola NM, Ahonen M, Vahala R. The Seasonality of Nitrite Concentrations in a Chloraminated Drinking Water Distribution System. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2018; 15: 1-17. [CrossRef]

19. U.S. Department of Health & Human Services. National Institutes of Health. Strengthening Knowledge and Understanding of Dietary Supplements. Calcium Fact Sheet. <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Calcium-Consumer/> (access:08.08.2020)
20. Agolli F. Teknologjia Kimike Inorganike, Universiteti i Prishtinës, Mitrovicë, 1983; pp. 67-8.
21. Beluli VM. Influence of Urbanization and Industries on the Pollution of Rivers of Gjiilan Municipality, Kosovo, Kem. Ind 2018; 67: 517-25. [CrossRef]
22. Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first addendum. Geneva: World Health Organization; 2017.

ANNEX A. Heavy metal concentration diagrams in the analysed samples



Are Stereotactic Body Radiotherapy and Zoledronic Acid Combination Additive or Synergistic in Bone Metastasis?

SBRT ve Zoledronik Asid Kombinasyonu Kemik Metastaz Tedavisinde Aditif veya Sinerjistik Etki Mi Yapar?

Yasemin Benderli Cihan¹ 

¹Department of Radiation Oncology, Kayseri Training and Research Hospital, Kayseri, Turkey

ORCID ID: Y.B.C. 0000-0001-9295-4917

Cite this article as: Benderli Cihan Y. Are stereotactic body radiotherapy and zoledronic acid combination additive or synergistic in bone metastasis? Experimed 2020; 10(2): 84-6.

ABSTRACT

Bone metastasis is an important cause of morbidity and mortality. In today's oncology practice, zoledronic acid (ZA) and Stereotactic Body Radiotherapy (SBRT) have been widely used in the treatment of bone metastases and in the treatment of bone pain reduction. Whether this combined therapy is additive or synergistic is not yet known. There are not enough studies on this subject yet. To better understand the effects of ZA and SBRT combination therapy, prospective studies including more patients are needed.

Keywords: Bone metastasis, SBRT, zoledronic acid

ÖZ

Kemik metastazı önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Günümüz onkoloji pratiğinde zoledronik asit ve stereotaktik vücut radyoterapisi (SBRT), kemik metastazlarının tedavisi ve kemik ağrıların azaltılması tedavisinde yaygın olarak kullanılmaya başlanılmıştır. Bu kombine tedavinin aditif veya sinerjistik etki yapıp yapmadığı henüz bilinmemektedir. Bu konuda henüz yeterli çalışma bulunmamaktadır. Zoledronik asit ve SBRT kombinasyon tedavisinin etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi için prospektif ve daha çok sayıda hastayı içeren çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Kemik metastazı, SBRT, zoledronik asit

INTRODUCTION

Bone metastasis is an important cause of morbidity and mortality. Treatment requires a multidisciplinary approach. Radiotherapy (RT) and bisphosphonates are important treatment options in reducing complications related to bone metastasis. Bisphosphonates are synthetic analogues of pyrophosphates, which facilitate the chelation of calcium ions, and act by inhibiting the mevalonate cycle of osteoclasts (1-3). In a meta-analysis of the efficacy of bisphosphonates in bone metastasis, it has been shown that bisphosphonates are associated with a 15% reduction in skeletal-related events compared with placebo, prolongation in the time to first bone-related event, and in pain and an increase in quality of life (1). In addition, the risk

of developing bone metastases during bisphosphonate treatment has been reported to be less (2).

Zoledronic Acid (ZA), the third generation and containing nitrogen, is the most effective preparation among bisphosphonates. ZA has effects on osteoclast activity as well as cytotoxic, apoptotic, immunomodulatory and antiangiogenic effects. ZA provides a transient decrease in circulating VEGF and bFGF levels, thereby inhibiting antiangiogenic activity and inhibition of bone invasion of tumor cells. It provides direct antitumor action by inhibiting the prenylation of Ras and Ras-related proteins. It also induces apoptosis by performing S-phase cell cycle arrest. ZA is widely used in hypercalcemia, multiple myeloma, bone metastases of tumors such as prostate, breast, and lung cancers associated with malignancy, and bone me-

Corresponding Author/Sorumlu Yazar: Yasemin Benderli Cihan **E-mail:** cihany@erciyes.edu.tr

Submitted/Başvuru: 22.06.2020 **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 10.08.2020

Last Revision Received/Son Revizyon: 11.08.2020 **Accepted/Kabul:** 11.08.2020



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

tabolism such as osteoporosis, osteopenia, Paget's disease, and osteogenesis imperfecta (2-5).

Direct and indirect antitumor effects of ZA supported by pre-clinical studies are shown. Some *in vitro* studies have demonstrated antiproliferative and cytostatic effects in myeloma, breast cancer, and prostate cancer cell lines (6,7). An AZURE (Adjuvant Zoledronic Acid to Reduce Recurrence) study showed a significant increase in a pathological complete response by addition of zoledronic acid to neoadjuvant chemotherapy in patients with locally advanced breast cancer (8). It has been reported that the number of skeletal related events decreases with the addition of bisphosphonates to standard treatment in patients with bone metastasis hormone refractory prostate cancer as in breast cancer patients (9). In all these preclinical and clinical studies, it seems likely that ZA will find its place as an effective agent not only in the treatment of complications, but also in the treatment of prostate, breast, and other cancers.

After ZA showed an additive and synergistic effect in the combination of chemotherapy, combination therapy with RT started to be investigated. Some clinical and preclinical studies have shown that ZA does not only reduce the risk of bone fracture and stimulate osteoclastic remodeling, but also increases immune response and radio sensitivity (3,4,10,11). However, there are limited numbers of clinical studies on this subject. In a phase 1 study planned by Pichon et al., they evaluated the tolerability and efficacy of a Stereotactic Body Radiotherapy (SBRT) and Zoledronate combination in non-compressive vertebral metastases. They applied the SBRT 3 x 9 Gy and zoledronate once a month for a year. Three patients had acute mucosal side effects. None of the patients had late neurological toxicity. They achieved control of the local disease in 94% of patients followed for an average of 19.2 months. As a result, the combination of Zoledronate and SBRT in the treatment of vertebral metastasis was well tolerated and reported that it reduced the rate of vertebral collapse, effectively reduced pain, and provided good local tumor control without late neurological side effects (10). Lu et al. examined the combination of radiofrequency ablation, 125I-seed, zoledronic acid or radiotherapy in patients with spinal metastasis percutaneous vertebroplasty. They emphasized that RT was the most effective way to relieve pain (11).

As a result, in today's oncology practice, zoledronic acid and SBRT have been widely used in the treatment of bone metastases and in the treatment of bone pain reduction. Whether this combined therapy is additive or synergistic is not yet known. There are not enough studies on this subject yet. To better understand the effects of ZA and SBRT combination therapy, prospective studies including more patients are needed.

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

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - Y.B.C.; Data Collection and/or Processing - Y.B.C.; Analysis and/or Interpretation - Y.B.C.; Literature Search - Y.B.C.; Writing - Y.B.C.; Critical Reviews - Y.B.C.

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

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

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

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - Y.B.C.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - Y.B.C.; Analiz ve/veya Yorum - Y.B.C.; Literatür Taraması - Y.B.C.; Yazan - Y.B.C.; Eleştirel İnceleme - Y.B.C.

Çıkar Çatışması: Yazar çıkar çatışması bildirmemiştir.

Finansal Destek: Yazar bu çalışmada finansal destek almadığını beyan etmiştir.

REFERENCES

1. Wong MH, Stockler MR, Pavlakis N. Bisphosphonates and other bone agents for breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 2:CD003474. [CrossRef]
2. O'Carrigan B, Wong MH, Willson ML, Stockler MR, Pavlakis N, Goodwin A. Bisphosphonates and other bone agents for breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2017; 30: CD003474. [CrossRef]
3. Sarhan D, Leijonhufvud C, Murray S, Witt K, Seitz C, Wallerius M, et al. Zoledronic acid inhibits NFAT and IL-2 signaling pathways in regulatory T cells and diminishes their suppressive function in patients with metastatic cancer. *Oncoimmunology* 2017; 14; 6(8): e1338238. [CrossRef]
4. Sato K, Kimura S, Segawa H, Yokota A, Matsumoto S, Kurado J, et al. Cytotoxic effects of gammadelta T cells expanded ex vivo by a third generation bisphosphonate for cancer immunotherapy. *Int J Cancer* 2005; 116(1): 94-9. [CrossRef]
5. Ferretti G, Fabi A, Carlini P, Papaldo P, Cordiali Fei P, Di Cosimo S, et al. Zoledronic-acid-induced circulating level modifications of angiogenic factors, metalloproteinases and proinflammatory cytokines in metastatic breast cancer patients. *Oncology* 2005; 69(1): 35-43. [CrossRef]
6. Dumon JC, Journe F, Kheddoumi N, Lagneaux L, Body JJ. Cytostatic and apoptotic effects of bisphosphonates on prostate cancer cells. *Eur Urol* 2004; 45: 521-8. [CrossRef]
7. Chuah C, Barnes DJ, Kwok M, Corcin A, Deininger MWN, Druker BJ, et al. Zoledronate inhibits proliferation and induces apoptosis of imatinib resistant chronic myeloid leukaemia cells. *Leukemia* 2005; 19(11): 1896-904. [CrossRef]
8. Winter MC, Thorpe HC, Burkinshaw R, Beevers SJ, Coleman RE. The addition of zoledronic acid to neoadjuvant chemotherapy may influence pathological response exploratory evidence for direct antitumour activity in breast cancer. *Cancer Res* 2009; 69. [CrossRef]

9. Saad F, Gleason DM, Murray R, Tchekmedyian S, Venner P, Lacombe L. Longterm efficiency of zoledronic acid for the prevention of skeletal complications in patients with metastatic hormone refractory prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 879-82. [\[CrossRef\]](#)
10. Du C, Wang Y, Li H, Huang Y, Jiang O, You Y, et al. Zoledronic acid augments the radiosensitivity of cancer cells through perturbing S- and M-phase cyclins and p21CIP1 expression. *Oncol Lett* 2017; 14(4): 4237-42. [\[CrossRef\]](#)
11. Pichon B, Campion L, Delpon G, Thillays F, Carrie C, Cellier P, et al. High-Dose Hypofractionated Radiation Therapy for Noncompressive Vertebral Metastases in Combination With Zoledronate: A Phase 1 Study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2016; 96(4): 840-7. [\[CrossRef\]](#)
12. Lu CW, Shao J, Wu YG, Wang C, Wu JH, Lv RX, et al. Which Combination Treatment Is Better for Spinal Metastasis, Percutaneous Vertebroplasty With Radiofrequency Ablation, 125I Seed, Zoledronic Acid, or Radiotherapy? *Am J Ther* 2019; 26(1): e38-e44. [\[CrossRef\]](#)

Solid-Organ Transplantasyonu Olan Hastalarda Kanser İmmünoterapisi

Cancer Immunotherapy in Solid Organ Transplanted Patients

Ali Abdi^{1,2} , Fatma Betül Öktelik^{1,2} , Mehtap Doğruel Biçer^{1,2} , Ali Osman Gürol^{1,2} 

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

²Istanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye

ORCID ID: A.A. 0000-0003-4373-5042; F.B.Ö. 0000-0002-7994-5618; M.D.B. 0000-0002-4354-2489; A.O.G. 0000-0001-6682-4289

Cite this article as: Abdi A, Öktelik FB, Doğruel Biçer M, Gürol AO. Solid-organ transplantasyonu olan hastalarda kanser immünoterapisi. Experimed 2020; 10(2): 87-96.

ÖZ

Solid organ transplantasyonu 20. yüzyılda deneysel bir yaklaşımdan ortaya çıkmış ve organ fonksiyon bozukluğu olan hastalar için yerleşik ve pratik bir kesin tedavi seçeneği haline gelmiştir. Terminal olarak kabul edilen veya bir hastanın yaşam kalitesinde önemli bir bozulma ile ilişkili hastalıklar için hayat kurtarıcı tedaviler sunmaktadır. Solid organ transplantasyonunun ilk günlerinden beri, solid transplant alıcılarının kanser geliştirme riskinin yüksek olduğu kabul edilmektedir. Toplumda sağlıklı bireylere göre karşılaştırıldığında akciğer, karaciğer, kalp veya böbrek nakli alıcıları çeşitli kanserler için daha fazla risk taşımaktadır. Kronik immünsüpresyon ve çevresel faktörler, alıcılarda kanser gelişiminde rol oynamaktadır. Ayrıca daha önce malignite öyküsü olması ve genetik yatkınlık önemli riskler arasındadır. Transplantasyon sonrası malignitelerin üç mekanizma ile geliştiği düşünülmektedir: *de novo* gelişim, donör ile ilgili bulaşma ve alıcının transplantasyon öncesi malignitesinin tekrarlanması. Bilinen risk faktörleri genetik, çevresel maruziyetler, onkojenik virüslerle enfeksiyonlardır. Ancak bu risklerin çoğu immünsüpresif ajanların rolüne odaklanmıştır. Bu ajanlar, immün gözetim sürecinin kaybını ve donör organın reddini önlemeyi hedefler. Hastaların ömür boyu immün sistemini baskılayıcı tedavi alma gereksinimi kanserin gelişiminde büyük rol oynamaktadır. Ayrıca, antikanser ajan alanı, transplantasyon alıcılarındaki kullanımla ilgili verilerin sınırlı olmasıyla birlikte, sürekli olarak genişletmekte ve gelişmektedir. Bu nedenle, bu derlemenin amacı, kanser gelişiminde immünsüpresyonun rolünü açıklamak ve transplant alıcılarının bakımı için kanser immünoterapi stratejilerini gözden geçirmektir.

Anahtar Kelimeler: Solid organ transplantasyonu, kanser, immünsüpresyon, immünoterapi

ABSTRACT

Solid-organ transplantation, which began as an experimental procedure in the 20th century, has become an established, definitive, and practicable treatment option for patients with organ dysfunction. However, since the pioneering days of solid organ transplantation, it has been recognized that transplant recipients have an elevated risk of developing cancer. When compared with healthy individuals, lung, liver, heart, and kidney transplant recipients are at a higher risk for various cancers. Both chronic immunosuppression and environmental factors are implicated in cancer development in the transplant recipients. A history of malignancy and genetic predisposition are additional risk factors. Post-transplant malignancies are thought to develop by three mechanisms: *de novo* development, donor-related transmission, and recurrence of a recipient's pre-transplant malignancy. Other known risk factors are environmental exposure, genetic predisposition, and infection with oncogenic viruses. It is worth noting that many of these risk factors are linked with the use of immunosuppression drugs. These agents play a huge role in the development of cancer through the loss of the immunosurveillance process and the requirement of patients to receive lifelong immunosuppressive therapy to prevent rejection of the donor organ. Even though the field of anticancer therapy is continually developing, there is limited data on the use of anticancer drugs in transplant recipients. Hence, this review attempts to explain the role of immunosuppression in cancer development and the cancer immunotherapy strategies to be adopted while caring for transplant recipients.

Keywords: Solid-organ transplantation, cancer, immunosuppression, immunotherapy

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Ali Osman Gürol **E-posta:** ogurol@istanbul.edu.tr

Başvuru/Submitted: 30.07.2020 **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 02.08.2020

Son Revizyon/Last Revision Received: 13.08.2020 **Kabul/Accepted:** 14.08.2020



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

GİRİŞ

Transplantasyon alıcılarında kardiyovasküler olaylar, enfeksiyonlar ve malignite en sık ölüm nedenleridir (1). ABD Organ Alım ve Nakil Ağı (U.S. Organ Procurement and Transplantation Network, OPTN) ve Birleşik Organ Paylaşımı Ağı (United Network for Organ Sharing, UNOS) hasta verilerine göre, transplantasyondan 5-10 yıl sonra transplantasyon sonrası malignitelerden kaynaklı ölüm, böbrek transplant alıcıları için %14,5, karaciğer transplant alıcıları için %18,7 ve kalp transplant alıcıları için %21,5'tir (1). Organ transplantasyonu ve kanser türlerindeki malignite insidansı, donör ve alıcıyla ilişkili faktörlere bağlı olarak değişebilir. Bu faktörler transplantasyonu yapılan organın kendisini, donör ve alıcıda önceden var olan maligniteleri ve immünsüpresif ajan tedavisinin tipini, yoğunluğunu ve süresini içerir (2).

Solid organ alıcıları için yaşam beklentileri ve bu hastalar için greft sağkalım oranları ileri immünsüpresif tedaviler nedeniyle yıllar içinde iyileşmekle birlikte, bu ilaçların kronik kullanımı ile transplantasyon sonrası malignite gelişenlerde önde gelen morbidite nedenlerinden biri haline gelmiştir. Transplantasyon alıcılarında karsinogenez riski, genel popülasyona göre önemli ölçüde daha yüksektir ve kanserler ileri bir aşamada ortaya çıkma eğilimindedir. Transplantasyon sonrası malignitelerin üç mekanizma ile geliştiği düşünülmektedir: *de novo* gelişimi, donör ile ilgili bulaşma ve alıcının transplantasyon öncesi malignitesinin tekrarlama. Melanom olmayan cilt kanseri, Kaposi sarkomu, transplant sonrası lenfoproliferatif bozukluk, anogenital kanser ve akciğer kanseri, *de novo* ortaya çıktığı düşünülen malignitelerdir. Ancak böbrek allogreftinde ortaya çıkan malign melanom ve kanserler genellikle donörle ilişkilidir. Hepatoselüler karsinomlar ve kolanjiyokarsinomlar karaciğer transplant alıcılarında tekrarlama eğilimindedir. Kronik immünosüpresyonun neden olduğu değiştirilmiş veya dengesiz bir bağışıklık sistemi, karsinogeneze önemli katkıda bulunan faktörlerden biri olarak kabul edilir. Onkogeneze için önerilen patojenik mekanizmalar arasında; neoplastik hücrelerin bozulmuş immün gözetimi, onkogenik virüslere karşı zayıf bağışıklık aktivitesi ve immünsüpresif ajanların doğrudan kanserojen etkileri yer alır. Görüntüleme, malignitesi olan hastalarda tarama, takip ve uzun süreli izlemede önemli bir rol oynar, çünkü temel görüntüleme özellikle zamanında teşhisler için yol gösterici olabilir. Transplant alıcılarında malignite ile ilişkili morbidite ve mortaliteyi artırabilecek yönetim stratejileri arasında risk faktörlerinin önlenmesi, immünsüpresif ajanların uygun modülasyonu, enfeksiyona bağlı malignitelere karşı profilaksi ve yoğun hedefli tarama programlarının kullanılması yer alır (3).

Tip 1 diyabet mellitus tedavisinde adacık transplantı umut verici bir yaklaşım olarak görülmektedir. Hiperglisemiyi azaltmak için pankreas adacık transplantının kimyasal olarak indüklenmiş diyabetli kemirgenlerde oldukça başarılı olduğu gösterilmiştir. Kullanılan kimyasal streptozotocin (STZ) adacıklarda beta hücre DNA'sını hasarlamak için kullanılmaktadır. Ayrıca bu kimyasal metastatik adacık tümörlerinde de beta hücrelerini öldürmek için uygulanmaktadır (4,5).

Doğal bağışıklık bozukluğuna yol açan immünsüpresif ajanların uzun süreli kullanımı, transplant alıcı karsinogeneze katkıda bulunan ana faktör olarak kabul edilmektedir (6). Kanserlere teşvik edebilen yaygın ajanlar siklosporin, takrolimus ve azatiyopindir. Melanom olmayan cilt kanserleri (Non-Melanoma Skin Cancers, NMSCs), non-Hodgkin lenfomalar, transplant sonrası lenfoproliferatif bozukluk (Post Transplant Lymphoproliferative Disorder, PTLD), Kaposi sarkomu ve anogenital kanserlerin, transplant alıcılarında en yüksek riskli maligniteler olduğu gösterilirken, kolorektal karsinom, akciğer kanseri, baş ve boyun kanseri, mesane kanseri, renal karsinom, testis kanseri ve melanomun ise orta derecede artış riski gösterdiği bildirilmektedir (7).

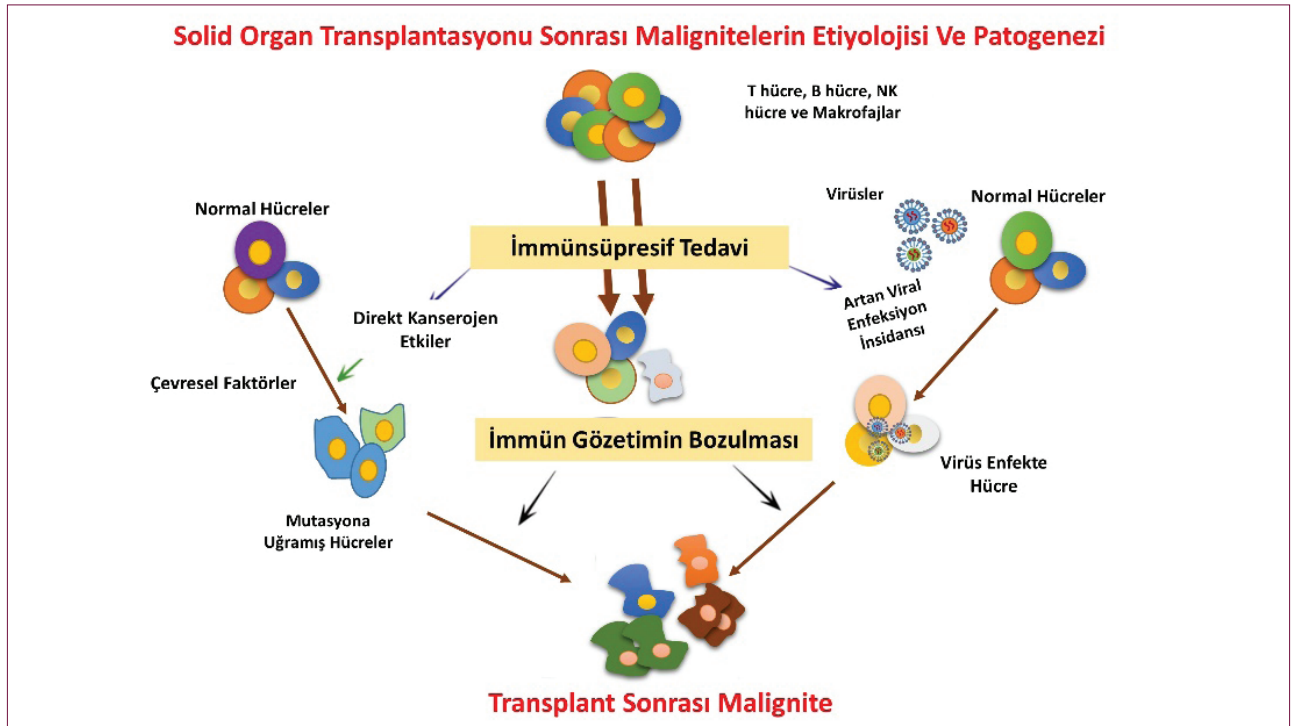
Bu bilgilerin ışığı altında derlenen bu derlemenin amacı, kanser gelişiminde immünsüpresyonun rolünü açıklamak ve transplant alıcılarının bakımı için kanser immünoterapi stratejileri sınıflarını gözden geçirmektir.

Etiyoloji ve Patogenez

Kronik immünsüpresyon, çevresel ve konakçı faktörlerin her biri transplant alıcı karsinogenezinde önemli bir rol oynamaktadır. Güneş ışığı, sigara, diyet ve alkol tüketimi gibi kanserojen maddelere maruz kalmak, karsinogeneze için risk faktörlerini teşvik edebilir. Diğer önemli risk faktörleri, alıcının ilerlemiş yaşını, kansere genetik yatkınlığını ve donör veya alıcıda malignite öyküsünü içerir. İmmünsüpresif ilaçların doğrudan onkogenik etkileri, neoplastik hücrelerin immün gözetiminde bozulma ve viral olarak indüklenen malignite insidansındaki artış da transplant alıcılarında gelişen malignitelerin patogenezindeki mekanizmalardır (Şekil 1) (8).

Birkaç farklı immünsüpresif ilaç türü vardır: biyolojik ajanlar (antitimosit globulin, basiliksımab), kortikosteroidler, antimetabolitler (azatiyoprin, mikofenolat mofetil), kalsinörin inhibitörleri (siklosporin, takrolimus) ve rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi [mTOR rapamisin (sirolimus), temsirolimus, everolimus]. Solid organ transplant alıcılarında yaygın olarak kullanılan immünsüpresif ilaçların malignite riski Tablo 1' de açıklanmaktadır (6).

İmmünsüpresyonun minimum seviyeye indirilmesi greft organ fonksiyonunun hala korunduğu durumlarda önerilmektedir. Sirolimus veya mikofenolat mofetil gibi anti-proliferatif bir etkiye sahip bir immünsüpresyon rejiminin değiştirilmesi, greft reddi insidansını azaltmaya ve maligniteyi geriletmeye yardımcı olabilir. Bununla birlikte, tedavinin genel başarısında anti-proliferatif aktiviteye sahip bir immünsüpresana geçmenin yararı bilinmemektedir. İmmünsüpresan ajanların yanı sıra cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi gibi diğer stratejiler de uygun tedaviler olarak kabul edilir. Hastaların kemoterapisi esnasında, nötropeni sepsisini en aza indirmek için immünsüpresyondaki azalma tedavinin gerekli bir bileşenidir. İmmünsüpresif tedaviyi azaltma yaklaşımının dikkatle kişiselleştirilmesi gerekir. Hastalığın doğasına, ve boyutuna ve alınan greft tipine, yaşam destekleyici (örn. kalp) veya yaşam desteksiz (örn. böbrek) greftlere bağlı olmalıdır. Genel olarak, spektrumu geniş malignite geliştirmeye ve kanser



Şekil 1. Solid organ transplantasyonu sonrası malignitelerin etiyojisi ve patogenezi. Kronik immünsüpresif tedavi, kanser hücrelerinin immüno-gözetimini bozar ve organ alıcılarında daha fazla malignite riski ile sonuçlanır. Ek olarak, seçilmiş immünsüpresif ilaçların doğrudan kanserojen etkileri, daha yüksek onkoviral enfeksiyon insidansı ile birleştiğinde, solid organ transplantasyonu sonrası malignitelerin patogenezi katkıda bulunur (8).

Tablo 1. Solid organ transplant alıcılarında immünsüpresif ilaçların kullanılmasından kaynaklanan malignite riskleri (6).

İlaç türü	Risk
Antimetabolitler Azatiyoprin Mikofenolat Mofetil	Azatiyoprin doğrudan kanserojen etki gösterirken, mikofenolat mofetil kullanımı azalmış kanser gelişme riski ile ilişkilidir.
Kalsinörin inhibitörleri Siklosporin Takrolimus	Doğrudan pro-onkojenik etki ve artan doz ile artan kanser riski
Kortikosteroidler Metilprednizolon Prednizon	Lenfoid hücrelerde doğrudan pro-onkojenik etki
Biyolojik ajanlar Lenfosit elimine eden antikorlar Antitimosit globulin Belatacept Ritüksimab İnterlökin-2 reseptör blokerleri Basiliksımab Daklizumab	Antitimosit globulin veya belatacept, artmış risk ile ilişkilidir. Erken Epstein-Barr virüsü güdümlü PTLD Ritüksimab PTLD'ye karşı koruyucu Pro-onkojenik potansiyel yok
mTOR inhibitörleri Sirolimus Everolimus	Malignite insidansını azaltan doğrudan antitümör aktivitesi

antikorlar, tümörler üzerindeki spesifik antijenleri hedefleyen moleküllerdir. Başlangıçta çeşitli malignitelerin tedavisi için geliştirilen monoklonal antikorlar, solid organ alıcılarında immünsüpresan ajanlar olarak da kullanılmıştır. Bu ajanların kullanımı, hastanın aşırı immünoşüpresyondan kaynaklanan enfeksiyon veya malignite riskini en aza indirmek için idame immünoşüpresyonu ile birlikte dengelenmelidir (13). Monoklonal antikorlar, transplantasyon öncesi, transplantasyon sırasında ve transplantasyon sonrasında uygulanabilir (Tablo 2).

Kanserlerin Onkolitik Virüs Tedavisi

Onkolitik virüsler (OV) normal hücelere zarar vermeden kanserli dokuları seçici olarak enfekte ve yok eden yeni bir anti-kanser terapötik ajan sınıfıdır. Hücresel bileşimler transplantasyonda kullanılmadan önce istenmeyen neoplastik hücreleri kaldırmak ve temizlemek (viroterapi) için kullanılabilir. Bu ön tedavi virüse karşı immün yanıt oluşturur, böylece hastayı muhtemelen bulaşıcı virüsler içeren transplant dokusunu aldıktan sonra gözlenebilecek virüs enfeksiyonlarından korur (14).

Epstein-Barr virüsü (EBV); Hodgkin hastalığı (HD), transplant sonrası lenfoproliferatif hastalıklar (lymphoproliferative disease, LPD), nazofaringeal ve mide karsinomları, düz kas tümörleri, İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü (Human Immunodeficiency Virus, HIV) ile ilişkili lenfomalar, T, B ve doğal öldürücü (Natural Killer, NK) hücre-lenfomaları dahil çeşitli epitel ve hematolojik maligniteler ile ilişkilendirilmiştir (15). Günümüzde konak immün yetmezliği EBV veya Kaposi sarkomu ile ilişkili herpes virusun (KSHV) neden olduğu transplant sonrası LPD'lere yönelik tedavi seçeneklerini sınırlamaktadır (16).

LPD'ler yaygın olarak immünsüpresyonu ciddi olan nakil hastalarında görülür ve EBV etyolojilerinde sıklıkla yer alır. LPD'lerin çoğunluğu greft verici lenfositlerden kaynaklanır; transplantasyondan önce allogreft örneklerinden potansiyel olarak tümörjenik EBV- veya KSHV ile enfekte olmuş hücrelerin seçici bir şekilde temizlenmesi yöntemi nakil sonrası LPD insidansının azaltılmasında önemli faydalar sağlayacaktır.

Bu nedenle kemik iliği veya solid organ transplant alıcıları için miksoma virüsü ile bağışıklamanın EBV ile ilişkili malignitelerin önlenmesinde faydalı olabileceği ileri sürülmüştür. Miksoma virüsü, Leporipoksvirüs cinsinde bir poxvirüstür. İmmün sistemi baskılanmış fare ksenotransplantasyon modeli kullanılarak transplant sonrası EBV ilişkili insan lenfomalarını önlemek için profilaktik bir strateji olarak miksoma virüsünün kullanımının etkili olduğu gösterilmiştir. Kemik iliği veya solid organ allogreftlerinin transplantasyonundan sonra EBV ilişkili LPD'lerin önlenmesi için potansiyel bir onkolitik tedavi olarak miksoma virüsünün geliştirilmesine destek sağlamaktadır (17). Herpes virüs (Talimogene laherparepvec, T-VEC) ilerlemiş melanom tedavisi için FDA tarafından onaylanmış olmasına rağmen, yeni bir kanser immünoterapisi formu olarak onkolitik viroterapide daha fazla gelişmeye ihtiyacı vardır.

OV'lerin etkinliğini en üst düzeye çıkarmak için, konağın immün yanıtını arttıran ve tümör hücrelerine etkili bir şekilde saldırmasını sağlayan sitokinlerle silahlandırmak uygun bir yaklaşım olabilir.

İnterlökin-12 (IL-12), hem doğal hem de adaptif anti-tümör yanıtını aktive eden güçlü bir sitokindir. Klinik öncesi tümör modellerinde IL-12 ekspresye eden OV'lerin dendritik hücreleri (DH), sitotoksik doğal öldürücü ve sitotoksik T hücrelerini aktive edip hedefe çekerek terapötik indeksi iyileştirdiği gösterilmiştir (18).

Başka bir klinik ön çalışma, intravenöz OV'lerin sistemik antitümör immünitenin gelişmesine ve bazı tümörlerin ortadan kaldırılmasına neden olabileceğini göstermiştir (19). Ayrıca, OV'lerin tümör dokularının yıkımı, doğal antiviral immün yanıtların uyarımı ve adaptif antitümör T-hücresi yanıtlarıyla ilişkili olduğu belirtilmiştir (20). Bazı araştırmalar anti-tümör etkileri daha da arttırmak için tümör hücrelerini etkili bir şekilde inhibe eden veya öldüren OV'ler aracılığıyla IL-15 (21), IL-12 (22), IL-4 (23) ve TRAIL (24) gibi immünomodülatör terapötik transgenleri kullanmıştır. Bu nedenle, immünomodülatör transgenleri kodlayan OV'ler yavaş yavaş kanser tedavisi alanında bir araştırma noktası haline gelmektedir. OV replikasyonu için gerekli olan gen bir tümöre spesifik promotörün veya enhancer'ın kontrolü altındadır (25). Son yıllarda, immün faktörleri serbest bırakarak tümör hücrelerinin doğrudan öldürülmesini sağlayan immünomodülatör genler viral genom içine eklenmiştir; ayrıca yeni bir yaklaşım haline gelen antitümör immünolojik reaksiyon optimize edilmiştir.

Onkolitik virüsler, TRAIL, interlökinler (IL-12, IL-4 ve IL-15), immün kontrol noktası inhibitörleri (anti-PD-1 antikoru), bağışıklık artırıcı uyarıcılar (OX40L ve GM-CSF), tümör baskılayıcılar (PTEN ve P53), E-cad ve Flt3L gibi antitümör ajanları iletmek için değişime uğratılabilir ve sistemli olarak kanser bölgelerine uygulanır. Burada OV'ler tümör hücrelerine girmek ve onları enfekte etmek için bazı reseptörlere bağlanırlar ve tümör lizisine neden olurlar. İmmün faktörlerle donanmış OV'ler T hücrelerini, NK hücrelerini ve makrofajları içeren immün hücreleri kanser bölgelerine toplayarak anti-kanser etkinliği artırabilirler. Aktive edilmiş immün hücreler spesifik sinyal yollarıyla tümör hücreleri apoptozunu indükleyen IFN- γ , TNF- α , IL-2 ve IL-6 dahil olmak üzere belirli antitümör sitokinleri salgılayabilirler (25). Örnek olarak, *in vitro* ve immünsüpresif bir ksenotransplant murin modelinde onkolitik miksoma virüsü (Myxoma Virus, MYXV) gibi virüsler insan kanserlerine (multiple miyelom, MM gibi) karşı güçlü bir anti-kanser etkinlik gösterip transplantasyon kaynaklı T hücrelerini daha etkili kanser öldürücüler haline getirebilmiştir. *Ex vivo* MYXV-kollu allojenik kemik iliği (Bone Marrow, BM) transplantasyonunun, önceden kalıntı MM'sini *in vivo* olarak önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur. Beklenmedik bir şekilde, hem nötrofillerin hem de donörden aktive edilmiş T hücrelerinin virüsle donanmış taşıyıcı hücreler olarak işlev gördüğü ve MYXV'nin önceden yüklenmiş hücrelerinin MM öldürmeyi arttırdığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar, rezidüel kanser için yeni bir terapötik paradigmayı göstermektedir, burada çok sayıda allotransplant lökosit sınıfı, greft-tümör etkilerini arttırmak için MYXV *ex vivo* tarafından silahlandırılabilir (26).

Kanserlerde T hücre tedavisi

Solid organ transplantasyonu, son dönem organ fonksiyon bozukluğu olan hastalar için tercih edilen tedavidir. Kısa vadeli sonuçlardaki gelişmelere rağmen, uzun süreli etkide immünsüpre-

resif ilaçların toksisitesi ve kronik redde bağlı artan morbidite/mortalite nedeniyle yetersizdir (27). Bu nedenle, transplantasyon komitesi allogreft tolerans başarısını elde etmek için yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesine odaklanmıştır. Allogrefti kabul etmesi için alıcının immün sistemi uzun süreli immünsüpresyon ihtiyacını ortadan kaldırarak yeniden eğitilebilir. Bu nedenle büyük umut vaat eden regülatör T (Treg) hücreleri ile immün düzenlenmeye odaklanılmıştır (28). Treg hücreleri, immün-regülatör nitelikleri ile tanımlanırlar. Tüm T lenfositleri sağ kalım ve çoğalmak için IL-2'ye ihtiyaç duyarlar. Treg hücreleri ise IL-2α reseptörü olan CD25 ekspresyonu ile ortamdaki IL-2 sitokinlerini tüketerek çevredeki T lenfositlerinin sağ kalımını engeller. Fare transplantasyon modellerinde transplant reddini kontrol etmek için yüksek Treg ve T hücre yüzdesi gerektirdiği göz önüne alındığında, insanlarda transplant reddini etkin bir şekilde kontrol etmek için milyarlarca Treg hücresine ihtiyaç olduğu tahmin edilmektedir (29).

Güçlü immünsüpresif ilaçlar karaciğer transplantasyonundan (Liver Transplantation, LT) sonra hasta sağ kalımını önemli ölçüde iyileştirmesine rağmen, uzun vadede yaşam boyu immünsüpresyon kullanımına bağlı yan etkiler nedeniyle yetersiz kalmaktadır. Örneğin normal aşı fonksiyonunun ve histolojinin immünsüpresif tedavi olmaksızın sürdürülmesi gibi operasyonel toleransı indüklemek gibi farklı stratejiler bu sorunu çözmek için uygulanmıştır, ancak sınırlı başarı elde edilmiştir. Canlı donör LT'de Treg hücre aracılı yeni bir hücre tedavisi kullanılarak 2016 tarihli bir pilot çalışmada tolerans indüklenmiştir. *Ex vivo* olarak oluşturulmuş Treg hücrelerin LT sonrası erişkin hastada adoptif transferi gerçekleştirilmiştir. Hücreler anti-CD80/86 monoklonal antikörlerin varlığında alıcı lenfositlerinin radyasyona maruz kalmış donör hücreleri ile 1-2 haftalık ko-kültüründen elde edilmiştir. İmmünsüpresif ajanlar 6. aydan itibaren 3 ayda bir azaltılmış ve 18. aydan sonra tamamen kesilmiştir. Sonuçlar, *ex vivo* olarak oluşturulmuş zenginleştirilmiş Treg hücreleri kullanılan tedavinin, immünolojik olmayan karaciğer hastalıkları olan canlı donör karaciğer alıcılarında ilaç minimizasyonu ve operasyonel tolerans indüksiyonu için güvenli ve etkili olduğunu doğrulamıştır (30).

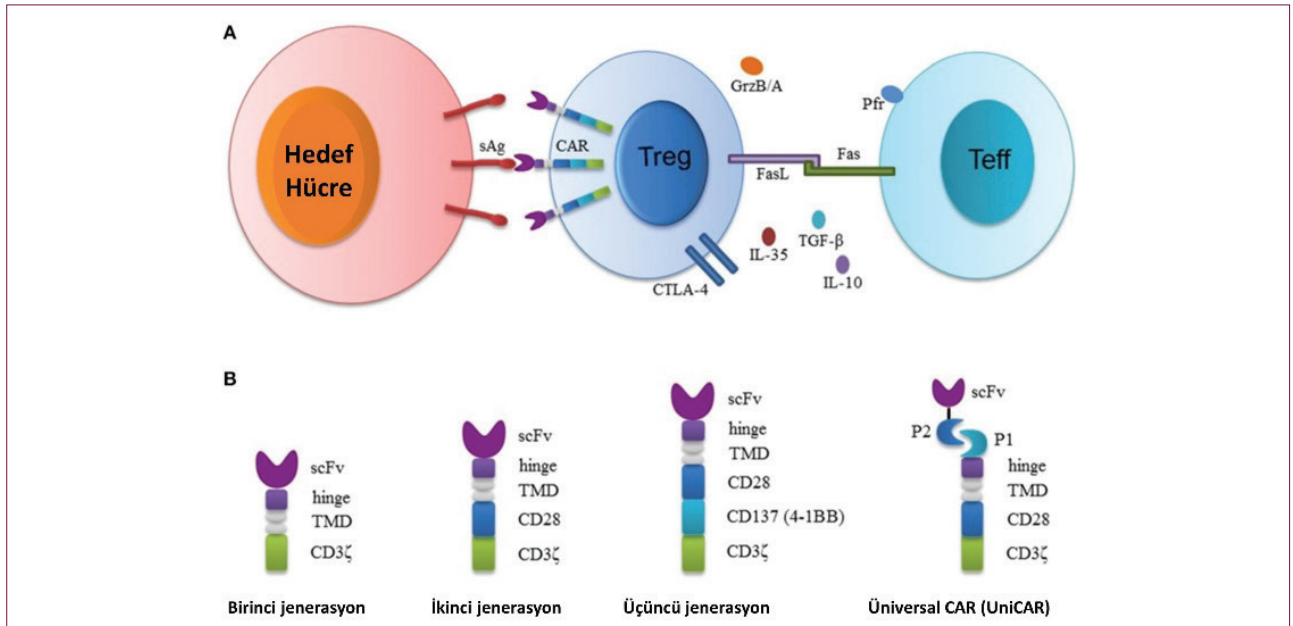
Dendritik hücreler (DH'ler) iyi donanımlı antijen sunucu hücrelerdir. Klasik işlevlerinin, istilacı organizmalara ve diğer antijenlere karşı (nakledilen organlar dahil) doğal ve edinsel bağışıklığın güçlü başlatıcıları olduğu düşünülmekle birlikte, DH'lerin immün yanıt oluşumuna ya da toleransa yönelmesinin belirlenmesinde merkezi ve önemli bir role sahip olduğuna dair kanıtlar ortaya çıkmıştır. DH'lerin bu işlevi, dikkat çekici esneklikleri ile beraber onları immün modülasyon için ilgi çekici terapötik hedefler haline getirmiştir. Transplantasyonda zararlı immünsüpresif ajanlara olan güvenin azalması nedeniyle, yakın zamanlarda yapılan birçok çalışmayla DH'lerin potansiyel olarak rejeksiyonu önlemesine ve antijene özgü bir şekilde immün reaktiviteyi baskılama yeteneklerine odaklanılmıştır. Deneysel stratejiler, DH'lerin *in vivo* hedeflemesinin yanı sıra daha sonra yeniden enfüzyonla (hücre tedavisi) regülatör (veya tolerojenik) DH'lerin *ex vivo* üretilmesini kapsamaktadır. DH'yi tolerojenik özelliklere yönelik "programlamak" için farklı yaklaşımlar arasında genetik (transgen yerleştirme), biyolojik (farklı kültür koşulları, anti-inf-

lamatuvar sitokin maruziyeti) ve farmakolojik manipülasyonlar yer alır. Kanıtlar, regülatör DH terapisinin potansiyelinin önemli ve yakın gelecekte organ transplantasyonunda değerlendirilmesi için ilgi çekici olduğunu ortaya koymuştur (31).

Son yıllarda kimerik antijen reseptörlerinin (Chimeric Antigen Receptor, CAR) T hücreleri üzerindeki regülasyonu, özellikle B hücre lenfomaları (CD20-CD19) gibi kanser hücre tedavisi alanında büyük umut vaat etmiştir. Bu durum Treg hücrelerinin de potansiyel kullanımının yolunu açmıştır. Çeşitli çalışmalar Treg hücrelerdeki CAR ekspresyonunun, greft-konakçı hastalığı (Xeno-Graft Versus Host Disease, xeno-GVHD) ve allo-greft rejeksiyonunun tedavisinde potansiyel olarak kullanılabileceğini göstermiştir (32, 33). İnsan deri ksenogreft transplantasyon modelinde, allojenik *periferik kan mononükleer hücrelerin (PKMH)* aktarılmasının neden olduğu alloimmün aracılı cilt hasarını hafifletmede poliklonal Treg hücrelere kıyasla adoptif CAR Treg hücreler daha etkili olmuştur. Majör doku uygunluk kompleksi (Major histocompatibility complex, MHC) ile sınırlı olmayacak şekilde tasarlanmış CAR-Treg hücreler (CAR-Tregs), özellikle transplantasyon ve otoimmünitede yaygın uygulama avantajına sahiptir. CAR'lar temel olarak tek zincirli değişken bir fragman (scFv, monoklonal antikorun bağlanma kısmı), hücre dışı bağlantı noktası, bir transmembran bölgesi ve hücre içi sinyal domainlerinden oluşur (Şekil 2) (35). Ayrıca, CAR-Treg hücreler IL-2'ye Treg hücrelerden daha az bağımlıdır. Dayanıklı fenotip fonksiyonlarını sürdürme ve hedef bölgelere göç etme özellikleri ile CAR-Treg hücreler poliklonal Treg hücrelerden daha güçlü/spesifik immünsüpresyon etkilerinden dolayı umut vaat edicidir (34,35). CAR ile modifiye T (CAR-T) hücreleri çoğunlukla kanser immünoterapileri için kullanılmaktadır. Tablo 3'te transplantasyondaki CAR-Treg tedavileri gösterilmiştir. MHC sınıf I molekülü yapısal olarak hemen hemen tüm nakledilen hücrelerin yüzeyinde eksprese edilir. Özellikle, HLA-A*02 beyaz donörlerde oldukça yaygındır (>%40) (36). HLA-A uyumsuzluğu genellikle transplantasyondan sonraki kötü sonuçlarla ilişkilidir. Bu nedenle HLA-A*02, transplantasyon toleransının indüklenmesinde antijene özgü Tregler üretmek için potansiyel bir hedef antijendir. Bununla birlikte, CAR-Treg hücrelerin klinikte kullanılmadan önce aşılması gereken bazı büyük engeller vardır. Anti-tümör CAR-T hücreleri ile yapılan tedavilerin sitokin "fırtınası" ve nöronal sitotoksositeye bağlı yan etkilere neden olduğu bilinmektedir. CAR-Treg hücrelerin bu reaksiyonları indükleyip indüklemeyeceği belirsizdir. Bu problemlerin çözülmesi hücre terapilerinin ticarileştirilmesinin yolunu açacaktır.

Solid Organ Transplantasyonunda Aşılmanın Yeri

Solid organ transplantasyonlu (SOT) kişiler arasında immünsüpresyon, altta yatan komorbiditeler, sağlık hizmetlerine maruz kalma, enfeksiyonların oluşumu, komplikasyon riskini artırır. Bazı enfeksiyonlar greft rejeksiyonu ve disfonksiyon riskinde artış ile ilişkilendirilmiştir. Sonuç olarak, transplantasyon sonrası enfeksiyonlar hastanın ve organın prognozunun önemli bir belirleyicisidir. Enfeksiyonu önlemek için yaygın olarak kullanılan müdahaleler arasında aşılama, antimikrobiyal profilaksi ve preemtif antimikrobiyal tedaviler yer alır. Birden fazla gözlemsel çalışma, son dönem böbrek yetmezliği (*End-stage renal*



Şekil 2. CAR ile modifiye regülatör T hücrelerinin (CAR-Tregs) yapısını ve bunların efektör T hücreleri üzerine baskılanma etkisini gösteren şematik diyagram. (A) Viral vektörlerle transdüksiyonlu Tregler, hedef hücrelerdeki yüzey antijenlerini tanıyan CAR'ları yüksek miktarda ifade eder. (B) Birinci jenerasyon (1. CAR), ikinci jenerasyon (2. CAR), üçüncü jenerasyon (3. CAR) ve genel CAR (UniCAR) yapıları sunulmaktadır (35). (Bu görsel *Frontiers in Immunology* dergisinden alınıp, uyarlanmıştır doi.org/10.3389/fimmu.2018.02359).

Tablo 3. Transplantasyon olgularında CAR-Treg tedavileri.

Transplantasyon	Antigen spesifikliği	Fonksiyonel Özellikler	Kaynak
GVHD	HLA-A*02	İnsan PBMC'leri ile aşılama sonrası ksenojenik GVHD'nin önlenmesinde poliklonal Treg'lerden daha üstün	(50)
Deri Transplant Rejeksiyonu	HLA-A*02	HLA-A2 pozitif PBMC'lerin ve cilt greftlerinin reddedilmesini tamamen önleme	(32)
Deri Transplant Rejeksiyonu	HLA-A*02	İnsan HLA-A2 pozitif cilt greftlerinin reddedilmesinin poliklonal Treg'lerden daha etkili bir şekilde engellenmesi	(51)

disease, ESRD) ve/veya son dönem karaciğer hastalığı (End-stage liver disease, ESLD) olan bireylerde SOT sonrası etkisiz hale getirilmiş ve öldürülmüş mikroorganizma içeren aşılama güvenliğini göstermiştir (37). Pediyatrik SOT popülasyonlarında canlı virüs aşılama (suçiçeği ve kızamık) uygulanmasının güvenli olduğuna dair bazı kanıtlar olmasına rağmen (38), mevcut yetişkin aşılama kılavuzları aşı viral süşundan hastalık gelişme riski nedeniyle transplantasyondan sonra canlı virüs aşılama kontrendike olduğunu işaret etmektedir. İmmün sistemi baskılanmış hastalarda canlı virüs aşılama yapılmasından sonra viral replikasyon gelişebilir (39).

Aşı ile önlenemez hastalıktan morbidite ve mortalite riskini azaltmak için, potansiyel yetişkin transplant alıcılarını takip eden doktorlar, hastaların aşılama durumunu izlemeli ve önerilen aşılama kılavuzlarındaki değişiklikleri takip etmelidir. Son zamanlarda yetişkinlerde kullanılmak üzere birkaç yeni aşı onaylanmış ve ayrıca grip, pnömokok ve boğmaca aşılama

kullanımı için öneriler güncellenmiştir. Hemodiyaliz alan ESRD hastalarında aşılama serolojik yanıtın azaldığı gösterilmiş hepatit B aşısı için bu tür hastalarda daha yüksek doz formülasyonları önerilmektedir (40).

Anogenital insan papilloma virüsü (Human Papilloma Virus, HPV) enfeksiyonu olan SOT alıcılarında servikal ve anogenital kanserler geliştirme riski önemli ölçüde artar. 2006 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde 9-26 yaş arası kadınlarda kullanılmak üzere dörtlü bir kapsid proteini HPV aşısı ruhsatlandırılmıştır ve bu aşının aynı yaşta kadın SOT adaylarına uygulanması önerilmektedir (41). İnfluenza enfeksiyonu olan immün sistemi baskılanmış hastalar, allogreft rejeksiyon riskini arttırmaktadır. (42). İnfluenza aşısının güvenli olduğu ve SOT alıcılarında yeterli antikor yanıtını sağladığı gösterilmiştir (37).

Çoğu yetişkin transplantasyon adayı kızamık, kabakulak ve kızamıkçığa karşı bağışiktir; bununla birlikte, kızamık ve kı-

zamıkçık canlı zayıflatılmış aşılardan, serolojik testlerle bağışık olmayan yetişkinlerde transplantasyondan önce kızamık, kabakulak ve kızamıkçık (MMR) aşılama tamamlamak gerekmektedir. Ayrıca, suçiçeğinin immün sistemi baskılanmış konakçılarda ciddi hastalığa neden olduğu bilinmektedir (43). Suçiçeği aşısı, güvenliği ve etkinliği iyi olan pediatrik böbrek transplant adaylarında araştırılmıştır. Böbrek transplantlı naif suçiçeği/zoster hastalarında şiddetli suçiçeği gelişme riski vardır ve bu durum mevcut bağışıklama ile etkili bir şekilde önlenemez (44). SOT sonrası yetişkinlerde suçiçeği aşısının kullanılmasından önce daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

SONUÇ

Genel popülasyon ile karşılaştırıldığında böbrek, karaciğer, kalp veya akciğer transplantasyonu bireylerde enfeksiyonla ilişkili/ilişkisiz çeşitli kanserlere yakalanma riski daha yüksektir. Bazı maligniteler onkojenik virüslerin immünojenik kontrolünün kaybından kaynaklanır, ancak diğerlerinin bilinen enfeksiyonlarla ilgisi yoktur. Kronik bağışıklık bozukluğu/iltihaplanma, altta yatan tıbbi durumlar veya immünespresif ajanlar tarafından ilaç toksisitesi bazı kanserlerin gelişimini tetikleyebilmektedir. Transplantasyon adayları arasında geniş bir yere sahip olan maligniteler için yüksek risk, uzun süreli sağkalımdaki iyileşmelerle birlikte, kanserin önlenmesi ve tedavisine yönelik yaklaşımların daha da geliştirilmesini teşvik etmelidir. Bu popülasyonda ortaya çıkan tümörlerin hastaların immünespresyonundan etkilenip etkilenmediğini anlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Son olarak, önceden transplantasyon yapılmış kanser hastalarında optimal tedavi rejimlerini tanımlamak için ek çalışmalara ihtiyaç vardır. SOT'larda inhibitör kontrol noktaları, aşılama, T hücre tedavisi ve onkolitik virüs ile ilgili olarak kanser immünoterapisinin kullanılması umut vaat etmektedir. Gelecekteki çalışmalar, kanser immünoterapi sorunları için klinik çalışmaların fikir birliğini içermelidir. Aşılama beklentilerine ve modalite risklerine dayanarak SOT'lu hastalarda kanser tedavisinin performansı dikkate alınarak tedavi önerilmeli ve sonuçları birbirleri ile entegre edilmelidir.

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

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - A.A., F.B.Ö., M.D.B., A.O.G.; Denetleme - A.A., F.B.Ö., M.D.B., A.O.G.; Gereçler - A.A., F.B.Ö., M.D.B., A.O.G.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - A.A., F.B.Ö., M.D.B., A.O.G.; Analiz ve/veya Yorum - A.A., F.B.Ö., M.D.B., A.O.G.; Literatür Taraması - A.A., F.B.Ö., M.D.B., A.O.G.; Yazan - A.A., F.B.Ö., M.D.B., A.O.G.; Eleştirel İnceleme - A.A., F.B.Ö., M.D.B., A.O.G.

Teşekkür: Yardım ve önerileri için Prof. Dr. Gaye Erten Yurdagül, Doç. Dr. Suzan Çınar ve Prof. Dr. Günnur Deniz'e teşekkür ederiz.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemiştir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışmada finansal destek alınmadığını beyan etmiştir.

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

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - A.A., F.B.Ö., M.D.B., A.O.G.; Supervision - A.A., F.B.Ö., M.D.B., A.O.G.; Materials A.A., F.B.Ö., M.D.B., A.O.G.; Data Collection and/or Processing - A.A., F.B.Ö., M.D.B., A.O.G.; Analysis and/or Interpretation - A.A., F.B.Ö., M.D.B., A.O.G.; Literature Search - A.A., F.B.Ö., M.D.B., A.O.G.; Writing - A.A., F.B.Ö., M.D.B., A.O.G.; Critical Reviews - A.A., F.B.Ö., M.D.B., A.O.G.

Acknowledgements: Thanks to Prof. Dr. Gaye Erten Yurdagül, Assoc. Prof. Dr. Suzan Çınar and Prof. Dr. Günnur Deniz for their help and suggestions.

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

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

KAYNAKLAR

- Chapman JR, Webster AC, Wong G. Cancer in the transplant recipient. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2013; 3(7): a015677. [CrossRef]
- Campistol JM, Cuervas-Mons V, Manito N, Almenar L, Arias M, Casafont F, et al. New concepts and best practices for management of pre- and post-transplantation cancer. *Transplantation Reviews* 2012; 26(4): 261-79. [CrossRef]
- Katabathina VS, Menias CO, Tammisetti VS, Lubner MG, Kielar A, Shaaban A, et al. Malignancy after Solid Organ Transplantation: Comprehensive Imaging Review. *Radiographics: a review publication of the Radiological Society of North America, Inc* 2016; 36(5): 1390-407. [CrossRef]
- Gürol AO, Okten-Kursun A, Kasapoglu P, Suzergoz F, Kucuksezer UC, Cevik A, et al. The synergistic effect of omega3 and Vit D3 on glycemia and TNF-alpha in islet transplantation. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2016; 62(1): 90-8.
- Khatrı R, Hussmann B, Rawat D, Gürol AO, Linn T. Intraportal Transplantation of Pancreatic Islets in Mouse Model. *J Vis Exp* 2018(135). [CrossRef]
- Gutierrez-Dalmau A, Campistol JM. Immunosuppressive therapy and malignancy in organ transplant recipients. *Drugs* 2007; 67(8): 1167-98. [CrossRef]
- Acuna SA, Huang JW, Scott AL, Micic S, Daly C, Brezden-Masley C, et al. Cancer Screening Recommendations for Solid Organ Transplant Recipients: A Systematic Review of Clinical Practice Guidelines. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2017; 17(1): 103-14. [CrossRef]
- Rama I, Grinyó JM. Malignancy after renal transplantation: the role of immunosuppression. *Nature Reviews Nephrology* 2010; 6(9): 511. [CrossRef]
- Rezaei N, Aalaei-Andabili SH, Amini N, Delavari F, Keshavarz-Fathi M, Kaufman HL. Introduction on cancer immunology and immunotherapy. *Cancer immunology: Springer*; 2020. p. 1-9. [CrossRef]

10. Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, Powderly JD, Picus J, Sharfman WH, et al. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2010; 28(19): 3167-75. [\[CrossRef\]](#)
11. Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *New England Journal of Medicine* 2015; 372(4): 320-30. [\[CrossRef\]](#)
12. Kittai AS, Oldham H, Cetnar J, Taylor M. Immune checkpoint inhibitors in organ transplant patients. *Journal of Immunotherapy* 2017; 40(7): 277-81. [\[CrossRef\]](#)
13. Pilch NA, Meadows HB, Alloway RR. Monoclonal Antibodies in Solid Organ Transplantation. In: Crommelin DJA, Sindelar RD, Meibohm B, editors. *Pharmaceutical Biotechnology: Fundamentals and Applications*. New York, NY: Springer New York; 2013. p. 375-91.
14. Morris D, Thompson B, Coffey M. Combination of transplantation and oncolytic virus treatment. *Google Patents*; 2005.
15. Young LS, Rickinson AB. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nature Reviews Cancer* 2004; 4(10): 757-68. [\[CrossRef\]](#)
16. Dharnidharka VR, Webster AC, Martinez OM, Preiksaitis JK, Leblond V, Choquet S. Post-transplant lymphoproliferative disorders. *Nature Reviews Disease Primer* 2016; 2(1): 1-20. [\[CrossRef\]](#)
17. Kim M, Rahman MM, Cogle CR, McFadden G. Prevention of EBV lymphoma development by oncolytic myxoma virus in a murine xenograft model of post-transplant lymphoproliferative disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2015; 462(4): 283-7. [\[CrossRef\]](#)
18. Alkayyal AA, Mahmoud AB, Auer RC. Interleukin-12-expressing oncolytic virus: A promising strategy for cancer immunotherapy. *Journal of Taibah University Medical Sciences* 2016; 11(3): 187-93. [\[CrossRef\]](#)
19. Moesta AK, Cooke K, Piasecki J, Mitchell P, Rottman JB, Fitzgerald K, et al. Local Delivery of OncoVEXmGM-CSF Generates Systemic Antitumor Immune Responses Enhanced by Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein Blockade. *Clinical Cancer Research* 2017; 23(20): 6190-202. [\[CrossRef\]](#)
20. Martikainen M, Essand M. Virus-based immunotherapy of glioblastoma. *Cancers* 2019; 11(2): 186. [\[CrossRef\]](#)
21. Yan Y, Xu H, Wang J, Wu X, Wen W, Liang Y, et al. Inhibition of breast cancer cells by targeting E2F-1 gene and expressing IL15 oncolytic adenovirus. *Bioscience Reports* 2019; 39(7). [\[CrossRef\]](#)
22. Patel DM, Foreman PM, Nabors LB, Riley KO, Gillespie GY, Markert JM. Design of a phase I clinical trial to evaluate M032, a genetically engineered HSV-1 expressing IL-12, in patients with recurrent/progressive glioblastoma multiforme, anaplastic astrocytoma, or gliosarcoma. *Human Gene Therapy Clinical Development* 2016; 27(2): 69-78. [\[CrossRef\]](#)
23. Post DE, Sandberg EM, Kyle MM, Devi NS, Brat DJ, Xu Z, et al. Targeted Cancer Gene Therapy Using a Hypoxia Inducible Factor-Dependent Oncolytic Adenovirus Armed with Interleukin-4. *Cancer Research* 2007; 67(14): 6872-81. [\[CrossRef\]](#)
24. Oh E, Hong J, Kwon O-J, Yun C-O. A hypoxia-and telomerase-responsive oncolytic adenovirus expressing secreted trimeric TRAIL triggers tumour-specific apoptosis and promotes viral dispersion in TRAIL-resistant glioblastoma. *Scientific Reports* 2018; 8(1): 1-13. [\[CrossRef\]](#)
25. Zhang Q, Liu F. Advances and potential pitfalls of oncolytic viruses expressing immunomodulatory transgene therapy for malignant gliomas. *Cell Death & Disease* 2020; 11(6): 1-11. [\[CrossRef\]](#)
26. Lilly CL, Villa NY, Lemos de Matos A, Ali HM, Dhillon J-KS, Hofland T, et al. Ex Vivo Oncolytic Virotherapy with Myxoma Virus Arms Multiple Allogeneic Bone Marrow Transplant Leukocytes to Enhance Graft versus Tumor. *Molecular Therapy - Oncolytics* 2017; 4: 31-40. [\[CrossRef\]](#)
27. Katabathina V, Menias CO, Pickhardt P, Lubner M, Prasad SR. Complications of immunosuppressive therapy in solid organ transplantation. *Radiologic Clinics* 2016; 54(2): 303-19. [\[CrossRef\]](#)
28. Safinia N, Grageda N, Scottà C, Thirkell S, Fry LJ, Vaikunthanathan T, et al. Cell Therapy in Organ Transplantation: Our Experience on the Clinical Translation of Regulatory T Cells. *Front Immunol* 2018; 9: 354. [\[CrossRef\]](#)
29. Tang Q, Lee K. Regulatory T-cell therapy for transplantation: how many cells do we need? *Current Opinion in Organ Transplantation* 2012; 17(4): 349-54. [\[CrossRef\]](#)
30. Todo S, Yamashita K, Goto R, Zaitzu M, Nagatsu A, Oura T, et al. A pilot study of operational tolerance with a regulatory T-cell-based cell therapy in living donor liver transplantation. *Hepatology* 2016; 64(2): 632-43. [\[CrossRef\]](#)
31. McCurry KR, Colvin BL, Zahorchak AF, Thomson AW. Regulatory dendritic cell therapy in organ transplantation. *Transplant International*. 2006; 19(7): 525-38. [\[CrossRef\]](#)
32. Noyan F, Zimmermann K, Hardtke-Wolenski M, Knoefel A, Schulde E, Geffers R, et al. Prevention of allograft rejection by use of regulatory T cells with an MHC-specific chimeric antigen receptor. *American Journal of Transplantation* 2017; 17(4): 917-30. [\[CrossRef\]](#)
33. Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, Terenzi A, Castellino F, Bonifacio E, et al. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 2011; 117(14): 3921-8. [\[CrossRef\]](#)
34. Boardman D, Maher J, Lechler R, Smyth L, Lombardi G. Antigen-specificity using chimeric antigen receptors: the future of regulatory T-cell therapy? *Biochemical Society Transactions* 2016; 44(2): 342-8. [\[CrossRef\]](#)
35. Zhang Q, Lu W, Liang C-L, Chen Y, Liu H, Qiu F, et al. Chimeric Antigen Receptor (CAR) Treg: A Promising Approach to Inducing Immunological Tolerance. *Front Immunol* 2018; 9: 2359. [\[CrossRef\]](#)
36. Burt C, Cryer C, Fuggle S, Little AM, Dyer P. HLA-A,-B,-DR allele group frequencies in 7007 kidney transplant list patients in 27 UK centres. *International Journal of Immunogenetics* 2013; 40(3): 209-15. [\[CrossRef\]](#)
37. Magnani G, Falchetti E, Pollini G, Reggiani LB, Grigioni F, Coccolo F, et al. Safety and efficacy of two types of influenza vaccination in heart transplant recipients: a prospective randomised controlled study. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 2005; 24(5): 588-92. [\[CrossRef\]](#)
38. Khan S, Erlichman J, Rand EB. Live virus immunization after orthotopic liver transplantation. *Pediatric Transplantation* 2006; 10(1): 78-82. [\[CrossRef\]](#)
39. Madruga JV, Cahn P, Grinsztejn B, Haubrich R, Lalezari J, Mills A, et al. Efficacy and safety of TMC125 (etravirine) in treatment-experienced HIV-1-infected patients in DUET-1: 24-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet* 2007; 370(9581): 29-38. [\[CrossRef\]](#)
40. Control CfD, Prevention. HIV/AIDS Surveillance Report: Cases of HIV infection and AIDS in the United States, 2004. *HIV/AIDS Surveillance Report* 2004; 14.
41. Markowitz L. Centers for Disease Control and Prevention (CDC); Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP): Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 2007; 56: 1-24. [\[CrossRef\]](#)

42. Gabriel R, Selwyn S, Brown D, Crossland J, Loughridge LW, Morgan N, et al. Virus infections and acute renal transplant rejection. *Nephron* 1976; 16(4): 282-6. [\[CrossRef\]](#)
43. Fenton K, Lowndes C. Recent trends in the epidemiology of sexually transmitted infections in the European Union. *Sexually Transmitted Infections* 2004; 80(4): 255-63. [\[CrossRef\]](#)
44. Broyer M, Tete MJ, Guest G, Gagnadoux MF, Rouzioux C. Varicella and zoster in children after kidney transplantation: long-term results of vaccination. *Pediatrics* 1997; 99(1): 35-9. [\[CrossRef\]](#)
45. Hanaway MJ, Woodle ES, Mulgaonkar S, Peddi VR, Kaufman DB, First MR, et al. Alemtuzumab induction in renal transplantation. *New England Journal of Medicine* 2011; 364(20): 1909-19. [\[CrossRef\]](#)
46. McCurry KR, Iacono A, Zeevi A, Yousem S, Girnita A, Husain S, et al. Early outcomes in human lung transplantation with Thymoglobulin or Campath-1H for recipient pretreatment followed by post-transplant tacrolimus near-monotherapy. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2005; 130(2): 528-37. [\[CrossRef\]](#)
47. Rosenberg PB, Vriesendorp AE, Drazner MH, Dries DL, Kaiser PA, Hynan LS, et al. Induction therapy with basiliximab allows delayed initiation of cyclosporine and preserves renal function after cardiac transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 2005; 24(9): 1327-31. [\[CrossRef\]](#)
48. Ferguson R, Grinyo J, Vincenti F, Kaufman D, Woodle E, Marder B, et al. Immunosuppression with belatacept-based, corticosteroid-avoiding regimens in *de novo* kidney transplant recipients. *American Journal of Transplantation* 2011; 11(1): 66-76. [\[CrossRef\]](#)
49. McKeage K. Eculizumab. *Drugs* 2011; 71(17): 2327-45. [\[CrossRef\]](#)
50. MacDonald KG, Hoeppli RE, Huang Q, Gillies J, Luciani DS, Orban PC, et al. Alloantigen-specific regulatory T cells generated with a chimeric antigen receptor. *The Journal of clinical investigation* 2016; 126(4): 1413-24. [\[CrossRef\]](#)
51. Boardman DA, Philippeos C, Fruhwirth GO, Ibrahim MA, Hannen RF, Cooper D, et al. Expression of a chimeric antigen receptor specific for donor HLA class I enhances the potency of human regulatory T cells in preventing human skin transplant rejection. *American Journal of Transplantation* 2017; 17(4): 931-43. [\[CrossRef\]](#)

Gıda Kaynaklı İmmünomodülatörler

Nutritional Immunomodulators

Farhad Kohansal Koshksaray^{1*} , Mustafa Murat Özbalak^{2*} , İlker İnanç Balkan^{3*} ,
Gaye Erten Yurdagül^{1*} 

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

²Istanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

³Istanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

*: Tüm yazarlar, isim sırasından bağımsız, makalenin yazımı ve hazırlanmasına eşit katkıda bulunmuştur.

ORCID ID: F.K.K. 0000-0003-2700-9534; M.M.Ö. 0000-0002-3040-4052; İ.İ.B. 0000-0002-8977-5931; G.E.Y. 0000-0002-5784-7785

Cite this article as: Koshksaray FK, Özbalak MM, Balkan İİ, Erten Yurdagül G. Gıda kaynaklı immünomodülatörler. Experimed 2020; 10(2): 97-111.

ÖZ

“Gıdanız ilacınız, ilacınız gıdanız olsun aforizması beslenmenin tıptaki merkezi rolüne atıfta bulunur. Patogenezi son yıllarda anlaşılan bir çok hastalığın beslenme ve mikrobiyota ile ilişkisinin çarpıcı şekilde ortaya konması ile adeta bir “beslenme rönesansı”nın kapısı aralanmıştır. İnsan, bir kez daha; “*yediğinden ibaret*”tir. **Gıdalar;** bağırsak bağışıklık sisteminin oral tolerans, salgısal IgA, lokal lenfoid odaklar, regülatör hücrel immünite ve kommensal mikrobiyomun çeşitliliği gibi kendine özgü özellikleri ile bütünlü-şebildikleri ölçüde **“fonksiyonel”** hale gelmektedir. Doğru seçilmiş probiyotik, prebiyotik ve sinbiyotikler ile güçlü immünomodülatör etkiler elde edilebilmektedir. **Hayvansal proteinler ve bitki kaynaklı peptidlerin** de immünomodülatör etkileri bulunmaktadır. Yatan hastalarda buğday proteini (gluten) kaynaklı glutamin takviyesi yapıldığında nozokomiyal enfeksiyon oranlarında ve mekanik ventilasyon gereken gün sayısında düşüş sağlandığı görülmüştür. **Vitaminlerden;** A vitamininin mukozal epitelyal bütünlüğün korunması ve enfeksiyon etkenlerine karşı güçlü nötrofil yanıtında önemli katkıları vardır. B12 vitamini güçlü immünomodülatör etki göstermekte, özellikle CD8⁺ T lenfosit sayılarında ve NK hücre aktivitesinde artışa katkıda bulunmaktadır. Vitamin C önemli bir antioksidandır. D vitamini, hücre proliferasyon ve diferansiyasyonunu uyarak doğal immün yanıtı güçlendirmektedir. Mutfağımızda yer bulan zerdeçal, sarımsak, havuç, patlıcan, kivi, bal gibi pek çok gıda ve gıda bileşeninin gerek doğal gerekse edinsel bağışıklık üzerindeki düzenleyici etkileri; anti-kanser, anti-enflamatuvar, anti-oksidan beslenme kürlerine dayanak oluşturmakta; **gıdamız ilacımız olmaya devam etmektedir.**

Anahtar Kelimeler: Gıda, immünomodülatör, probiyotik, prebiyotik, vitamin, mineral

ABSTRACT

“Let food be thy medicine and let medicine be thy food.” This aphorism refers to the pivotal role played by nutrition in medicine. The door of a “nutrition renaissance” has been opened with the striking disclosure of the relationship between nutrition and microbiota in the pathogenesis of many diseases, which has been better understood in the recent years. A person, once again, is “what he/she eats.” Foods become “functional” after their integration into the unique features of the intestinal immune system, such as oral tolerance, secretory Immunoglobulin A, local lymphoid foci, regulator cellular immunity, and diversity of commensal microbiome. It is possible to achieve strong immunomodulatory effects through an appropriate selection of probiotics, prebiotics, and synbiotics. Animal proteins and plant-derived peptides also exert immunomodulatory effects. It has been reported that the use of glutamine supplements from wheat protein (gluten) in patients helps in lowering the nosocomial infection rate and the duration of mechanical ventilation. Vitamin A contributes immensely in maintaining the mucosal epithelial integrity and aids in strengthening the neutrophil response to infectious agents. Vitamin B12 has a strong immunomodulatory effect and facilitates the increase in CD8⁺ T lymphocyte count and natural killer cell activity. Vitamin C has well-defined antioxidant efficacy. Vitamin D strengthens the innate immune response by stimulating cell proliferation and differentiation. The regulatory effects of many foods and food ingredients such as turmeric, garlic, carrot, eggplant, kiwi, and honey in our kitchen on both innate and adaptive immunity serve as the foundation for anticancer, anti-inflammatory, and antioxidant nutrition therapies. Thus, *our food continues to be our medicine.*

Keywords: Food, immunomodulator, probiotic, vitamin, mineral

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Mustafa Murat Özbalak **E-posta:** mozbalak@istanbul.edu.tr

Başvuru/Submitted: 22.07.2020 **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 03.08.2020

Son Revizyon/Last Revision Received: 13.08.2020 **Kabul/Accepted:** 13.08.2020



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

GİRİŞ

“Gıdanız ilacınız, ilacınız gıdanız olsun (Let food be thy medicine and let medicine be thy food.)”. Hipokrat (MÖ 400)’a atfedilen bu aforizmanın ona veya takipçilerine ait olup olmadığı kesin değildir. Ancak kesin olan şudur ki beslenme, tarih boyunca koruyucu ve tedavi edici tıbbın merkezinde yer almıştır (1). Modern farmakolojinin hızlı ilerleyişi ile tedavi edici tıpta gıdaların önemi ikinci planda kalmış olsa da son yıllarda patogenezi anlaşılan birçok hastalığın beslenme ve mikrobiyota ile ilişkisi çarpıcı şekilde ortaya konmuş, adeta bir “beslenme rönesansı”nın kapısı aralanmıştır. İnsan, bir kez daha; “yediğinden ibaret”tir.

Sağlığın korunmasında aktif ve dengeli çalışan bağışıklık sistemi son derece önemlidir. Bağışıklığın dengede tutulması için ilaca gerek duymaksızın günlük beslenme içinde yer verilen ve vücutta bazı biyoaktif bileşenler yoluyla bağışıklık fonksiyonlarını düzenleyici etki gösteren gıdalara **“fonksiyonel gıda”** adı verilmektedir. Meyveler, sebzeler, tahıllar, et, balık, süt ürünleri gibi tüm gıda kategorilerinin hepsi fonksiyonel gıda içerir (2).

Hastalıkların etiyolojilerinin genetik, epigenetik ve diğer etmenlerle kişiden kişiye değiştiği gittikçe daha açık hale gelmektedir. Farklı gıda bileşenlerinin ve egzersizin farklı kişilerin bağışıklık sistemi üzerinde farklı özgül etkiler oluşturduğu söylenebilir (3). Bu bileşenlerin bazıları bağışıklık tepkilerini artırıp enfeksiyona karşı yanıtta katkıda bulunurken, bazıları düzenleyici etki ile alerji ve iltihabi baskılar. Fonksiyonel gıda bileşenlerinin bağışıklık sistemi üzerindeki etkilerine bağırsak bağışıklık sistemi ve mikrobiyotası aracılık etmektedir.

Bu derlemede, probiyotikler, prebiyotikler, proteinler, peptitler, vitaminler, mineraller dahil olmak üzere çeşitli fonksiyonel gıda bileşenlerinin immünomodülatör etkilerini özetlemeyi amaçladık.

BAĞIRSAK BAĞIŞIKLIK SİSTEMİ

Vücudun en büyük ve en dinamik immünolojik ekosistemi bağırsakta bulunur. Bağırsak bağışıklık sistemi bağırsakla ilişkili lenfoid doku (GALT) ve diğer hücrelerden oluşmaktadır (4). İnce bağırsakta, özellikle ileumda, villus ile kaplı mukoza epitel hücrelerinin altında, lamina propria içine yerleştirilmiş “Peyer plakları” adı verilen sekonder lenfoid yapılar vardır. Peyer plaklarında, dalak ve lenf düğümlerinde olduğu gibi B hücrelerinden zengin lenfoid foliküller, daha az oranda CD4⁺ T hücreleri, dendritik hücre ve makrofaj bulunmaktadır. Plazma hücreleri ve bellek B hücreleri tarafından antikor üretimi bu bölgede gerçekleştirilmektedir. Peyer plaklarının üzerini mikrovillileri olmayan M (membranöz) hücreleri örter. M hücreleri pinositik aktivite ile bağırsak lümenindeki antijenleri lenfoid foliküllere iletir (5). Bağırsakta sadece patojenik bakterilerden değil, aynı zamanda gıda ve komensal bakterilerden de çeşitli antijenler vardır. Bağırsak bağışıklık sisteminin bazı ayırt edici özellikleri bulunmaktadır:

1) Oral Tolerans: Protein yapıda antijenin ağızdan alınması halinde mukozal immün sistemde bulunan T hücrelerin aktive

olmak yerine antijeni kabullenip yanıtız (anerjik) kalmasıdır (6). Gıda alerjisinin bu mekanizma ile engellendiği kabul edilir. Oral tolerans, antijene özgü T hücrelerinin klonal delesyonu ve Foxp3⁺ regülatör T hücrelerinin (Treg’lerin) dendritik hücreler tarafından indüksiyonu ile ortaya çıkmaktadır (7).

2) Salgısal IgA (slgA): IgA, bağırsakta en çok üretilen immüno-globülinidir. IgA’nın salgısal bileşeni, immüno-globülinin bağırsak lümeninde proteolitik enzimler tarafından parçalanmasını engeller. Böylece, slgA patojen mikroorganizma ve toksinlerin yayılmasını, invazyonunu önler, bağırsak mikrobiyotasını kontrol eder. Bağırsak dendritik hücreleri IL-6, retinaldehid dehidrojenaz (RALDH) ve nitrik oksit (NO) üreterek (8), bağırsak epitel hücreleri ise IL-6 ve TGF- β üreterek IgA izotipinin sürekliliğine katkıda bulunur (9).

3) Bağırsak mikrobiyotası: İnsanlarda ve diğer memelilerde, doğumdan kısa süre sonra, özellikle vajinal doğum ve emzirme sürecinin katkısı ile, başlangıçta steril kabul edilen bağırsak lümeninde simbiyotik bakteriler çoğalmaya başlayarak bağırsak florasını oluşturur. İnsan bağırsağında yaklaşık bin türden, yüzlerce trilyon bakteri bulunur. Yaklaşık 60 trilyon somatik hücreden oluşan insan vücudu, bu sayıdan çok daha fazla ‘kendinden olmayan’ bakteri hücrelerine ev sahipliği yapmaktadır. *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* ve *Proteobacteria*’nın baskın olduğu bakteri florasının hacmi ve bileşimi, anne sütü ve diyet gibi faktörlerden güçlü şekilde etkilenmektedir (10). Birçok çalışma, bağırsak simbiyotik bakterilerinin aslında misafir değil ev sahibi olduğunu, GALT dahil bağırsak dokusunun oluşumunda önemli rollere sahip olduğunu göstermiştir. Örneğin, bağırsağında simbiyotik bakteri bulunmayan (germ-free) farelerde, Peyer plaklarının sayı ve boyutunun diğer (normal) farelerden küçük olduğu belirlenmiştir. Dahası, salgısal IgA üretimi, normal farelere kıyasla germ-free farelerde genellikle daha düşüktür (11). Ayrıca, oral tolerans mekanizması da yine germ-free farelerde normal farelere göre daha düşük seviyede uyarılabilir (12).

1) PROBIYOTİKLERİN İMMÜNOMODÜLATÖR ETKİLERİ

Dünya Sağlık Örgütü’ne göre probiyotikler; “oral yoldan yeterli miktarda alındığında sağlığa faydalı etkileri olan canlı mikroorganizmalar”dır. Alerjik hastalık, kolit, romatoid artrit, kolorektal kanser, çeşitli enflamatuvar hastalıklar, depresyon, anksiyete gibi birbirinden farklı hastalıklara karşı immünomodülatör aktivite gösterirler (13).

Probiyotik olarak en sık kullanılan mikroorganizmalar laktik asit bakterileri grubu (*Lactobacillus*, *Enterococcus*, vb.) ve *Bifidobacterium* cinsine aittir, *Escherichia coli* veya *Saccharomyces* gibi mantarlar daha az kullanılır (14). Probiyotikler ve metabolitleri, bağırsakta anti-enflamatuvar ve pro-enflamatuvar yanıtın dengelenmesine katkıda bulunur. Doğal ve özgül bağışıklık hücreleri ile bağırsak mikrobiyotası arasındaki iletişim (çapraz konuşma), bağışıklık toleransı ve enflamasyon arasındaki dengeyi kontrol eder.

1.a. Probiyotikler ve doğal bağışıklık sistemi

Dendritik hücre (DH) ve epitel hücreleri, doğal bağışıklıkta öne çıkan hücreler olarak genellikle bağırsak mikropları ve metabolik ürünleri ile en erken temasa geçen hücrelerdir.

1.a.1. Probiyotikler ve DH: Bağırsak DH'leri GALT'ta, bağırsak lamina propriası içine dağılmış şekilde bulunurlar (15). Antijen sensörü işlevi gören DH'ler, mikroplarla temas ettiğinde, taşıdıkları Toll benzeri reseptörler ve C-tipi lektin reseptörleri ile mikrobiyal ligandları bağlar. Bu bağlanma, DH'lerin fenotiplerinde ve salgıladıkları sitokinlerinde değişikliklere yol açan farklı sinyal yollarını aktive eder (15). *Bifidobacterium infantis* 35624; lamina propriada CD103⁺ DH'lerin sayısını artırarak aktivitesini modüle edebilen probiyotiklere bir örnektir. Bu mekanizma retinoik aside bağımlıdır ve dekstran sülfat sodyum ile indüklenen kolitin şiddetinin azalmasına katkıda bulunur (16). *Lactobacillus rhamnosus* gibi bazı probiyotikler, DH'lerde demir-oksijenazı indükleyebilir, DH'lerin DH-SIGN ve TLR-2 reseptörlerinin bağlanma yanıtını düzenleyebilir (17). DH'lerin immüno-regülasyonu ayrıca bakteri hücre duvarı bileşenleri ile de ilişkilidir. Probiyotikler bağırsaktaki bakteri popülasyonlarını organize ederek DH'lerin uyarılmasını düzenleyebilir. Örneğin, kapsüler polisakarit A, plazmasitoid DH'lerin TLR-2'si ile etkileşime girerek proenflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu sınırlar ve fare kolit modelinde, CD4⁺ T hücreleri tarafından antienflamatuvar yanıtı aracılık eden IL-10 salgılanmasını uyandırır (18).

1.a.2. Probiyotikler ve epitel hücreleri: Epitel hücreleri, bir mukozal bariyer oluşturarak konağı patojenik mikroorganizmalardan ve toksik ajanlardan korur. Bağırsak lümeni içeriği ile epitel hücreleri, lamina propria ve Peyer plaklarında bulunan bağışıklık hücreleri arasında karmaşık bir ilişki vardır (19). Probiyotikler; gerek besin maddeleri ve epitel hücresi üzerindeki bağlanma bölgeleri için patojen bakterilerle rekabet ederek gerekse diğer yollarla immün-regülasyona katkıda bulunarak mukoza hasarını önlemektedir. Örneğin, *Bifidobacterium infantis* 35624 kökeni, Treg aktivasyonuna katkıda bulunarak ve Peyer plaklarında makrofaj enflamatuvar protein-1a (MIP-1a) ve MIP-1b salgılanmasını azaltarak Salmonella enfeksiyon hasarına karşı koruma sağlamaktadır (20,21). Ek olarak, probiyotik bakteriler, insanda β-defensin-2 gibi antimikrobiyal peptitleri indükleyerek mukozal bariyer savunmalarını güçlendirmektedir. *Lactobacillus casei* Shirota kökeninin kolonik bağırsak hücrelerinde hBD-2 mRNA ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (19). Bazı *Bifidobacterium* kökenleri bağırsak epitel hücrelerinde otofaji yanıtını düzenleyebilmekte, *Lactobacillus rhamnosus* kökenleri ise bağırsak epitel hücrelerinde Muc2 gen ekspresyonunu artırarak lokal savunmada son derece önemli olan mukusun ana bileşeni olan müsinin salgılanmasına yol açmaktadır (22). Bağırsak duvarına hasar veren enfeksiyonlarından sonra (Ör. *C. difficile* koliti) *Lactobacillus rhamnosus* L34 ve *Lactobacillus casei* L39 gibi probiyotikler epitelyum hücrelerinden IL-8, TNF-α gibi pro-enflamatuvar sitokinlerin salınımını azaltarak doku onarımına katkıda bulunmaktadır. Ülseratif kolitin etkilerinin azaltılmasında da probiyotiklerin rolü gösterilmiştir (23).

1.b. Probiyotikler ve edinsel bağışıklık sistemi

1.b.1. Probiyotikler ve T lenfositleri: Probiyotiklerin, alerji veya kolit gibi bazı hastalıklara karşı yararlı etkileri, Treg hücrelerin sayılarını artırma yetenekleri ile ilişkilidir (24). *Bifidobacterium longum*, sıçanlarda, Treg hücrelerin oranını artırarak ve Foxp3 geninde bir kaç CpG bölgesinde demetilasyona yol açmak suretiyle Treg hücrelerin uzun süreli ekspresyonunu sağlayarak kolorektal kolitin iyileşmesine katkıda bulunmaktadır (25,26). Benzer şekilde, sağlıklı insanlarda *B. infantis* 35624 kökeni içeren probiyotik tüketiminden sonra, Foxp3⁺ Treg'lerin artan aktivitesi sonucu sedef hastalığı veya ülseratif kolit hastalarında proenflamatuvar sitokin düzeyleri azalmaktadır (27). Probiyotikler, kısa zincirli yağ asitleri (KZYA) gibi metabolitleriyle periferik Treg hücre miktarı ve fonksiyonlarının düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır (28). KZYA'dan bütirat, Treg hücrelerinin ekstrasitolitik üretimini uyarmaktadır (29). KZYA; kolondaki Foxp3⁺ Treg hücrelerin üzerinde bulunan G-protein-bağılı 43 reseptörünü (GPR43) epigenetik modifikasyonlar ile aktive ederek kolit ve alerjik hastalıklarda iyileşmeye katkıda bulunur (30,31).

Enflamatuvar bağırsak hastalıkları patogenezinde rol oynayan Th17 kaynaklı sitokinler, *Bifidobacterium breve*, *B. longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *B. longum subsp. infantis* ve *L. gasseri* A5 tarafından azaltılmaktadır. Ayrıca *B. breve* ve *L. rhamnosus* GG, Th17 hücrelerin genişlemesinden, stabilizasyonundan ve şartlandırılmasından sorumlu IL-23'ü azaltmaktadır (32). Çeşitli *Lactobacilli* ve *Bifidobacterium* türlerinin Th17 üretimini aşağı yönlü regüle ettiği bilinmektedir (32).

1.b.2. Probiyotikler ve B lenfositleri: Probiyotikler, Peyer plaklarında ve lamina propriada IgA üreten hücre sayısını artırmakta ve slgA üretimini indüklemektedir (33). B lenfositler, spesifik antikorları salgılamaktan sorumlu olmaları ve humoral yanıtta ana role sahip olmalarına rağmen, otoimmün ve bulaşıcı hastalıklar sırasında IL-10 üretmekle ilgili negatif olarak düzenleyebilirler (34). *Clostridium butyricum*, spesifik immünoterapi ile kombinasyon halinde, özellikle astımlı hastalara verildiğinde antijene özgü B hücrelerini, regülatör B hücrelerine (Breg) dönüştürebilmektedir (35). Probiyotikler, aşıya verilen immün yanıtı da güçlendirebilmektedir. *Bifidobacterium longum* bv *infantis* CCUG 52486 kökeninin grip aşısı vd. aşılarla yanıt olarak IgG üreten bellek B hücrelerinin sayısını artırması buna en güzel örnektir (36).

2) PREBİYOTİKLERİN İMMÜNOMODÜLATÖR ETKİLERİ

Prebiyotikler "sağlığa yararlı komensal bağırsak mikrobiyotası tarafından seçici olarak kullanılan substrat" olarak tarif edilmektedir (37). Fonksiyonel gıda bileşenleri olan prebiyotikler esas olarak fruktooligosakkaritler (FOS), oligosakkarit (OSC), galaktooligosakkaritler (GOS), ksilooligosakkaritler (XOS) ve manooligosakkaritler (MOS) gibi karbonhidratları içerirler (38). Prebiyotikler, bağırsak mikrobiyal popülasyonunun dengesini değiştirerek veya KZYA gibi anti-enflamatuvar etkili metabolitlerin üretimine katkıda bulunarak bağışıklık yanıtını düzenlemektedir (39).

Prebiyotikler, mide ve ince bağırsaktan emilmeden kolona ulaşıp kolon florasında bulunan *Lactobacilli* ve *Bifidobacteria* gibi yararlı mikrobiyal popülasyona besin kaynağı olabilen fonksiyonel gıdalardır (40). İnsan anne sütünü, GOS ve FOS ile takviye edilmiş süt tozu formülleri ile karşılaştırdığımızda prebiyotiklerin bağırsakta %20 daha yüksek *Bifidobacterium* seviyeleri oluşturduğu görülmektedir (41). Bir prebiyotik olan inülin, yaşlı insanların kolon florasında *Bifidobacterium* düzeylerini artırmaktadır. Benzer şekilde çeşitli araştırmalar FOS ve GOS'un bifidojenik etkilerini göstermektedir (42).

Prebiyotikler ayrıca, patojen bakterilerin miktarını da azaltabilir; sığır sütü oligosakkaritleri ve süt yağı globül membranı (MFGM)-bağlantılı glikokonjugatlar, enteropatojenik bakterilerin ve enterotoksinlerin yapışmasına karşı önleyici özelliklere sahiptir (43). Ayrıca insan sütü oligosakkaritleri, kültürlenmiş epitel hücrelerine enteropatojenik *Escherichia coli* kökenlerinin bağlanmasını önemli ölçüde azaltır (44).

Gastrointestinal kanalda lipopolisakkaritler gibi patojenle ilişkili moleküler patenler enterositler ve bağırsıklık hücreleriyle etkileşime girerek spesifik sitokin üretimini aktive ederken mikrobiyom popülasyonunda dengenin faydalı mikroplara doğru kayması, özellikle bağırsak hücrelerinin sitokin ekspresyonunu modüle etmekte, bağırsıklık sistemini olumlu yönde etkilemektedir (45). *B. fragilis* kapsüler polisakkarit A bileşeni, Foxp3⁺ Treg hücrelerinin anti-enflamatuvar etkili IL-10 üretimini uyarır. Ayrıca Treg hücreleri, NOD2 reseptörlerini içeren *B. fragilis* dış zarı tarafından da uyarılır. Bu tür aktivasyonlar bağırsakta mukozal enflamasyonun baskılanmasına katkıda bulunmaktadır (46,47).

2.a. Prebiyotiklerin doğrudan immünomodülatör etkileri

Prebiyotikler bağırsıklık sistemi üzerinde doğrudan etki gösterebilmektedir. Sindirilemeyen oligosakkaritler (OSC) doğrudan konak mukozasındaki sinyalleri düzenleyerek bağırsak epitel hücrelerinin patojene bağlı mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) ve nükleer faktör kappa B (NF-kB)'ya karşı duyarlılığını azaltmakta, bağırsak mikrobiyotasında modifikasyona yol açmadan bağırsıklık yanıtını regüle etmektedir (48). $\beta 2 \rightarrow 1$ fruktanlar da Peyer plaklarında Th1 hücrelerin yanı sıra CD11b-CD103⁻ DH'ler ile Treg hücre popülasyonunun artmasına katkıda bulunmaktadır. Ayrıca, prebiyotik karbonhidratlar; nötrofil, monosit, makrofaj ve özel bir T hücre alt grubu (timus, dalak ve ince bağırsakta bulunan) üzerinde eksprese edilen dektin-1 gibi karbonhidrat reseptörleri ile de doğrudan etkileşime girmektedir. Bu reseptörler mantar ve bitki kaynaklı çeşitli beta-1,3 ve beta-1,6 bağlı glukanları polimerizasyon derecelerine göre tanıyabilme yeteneğine sahiptir. Ayrıca *in vitro* olarak, NK hücreleri de spesifik lektin reseptörlerine bağlanan niger-oligosakkaritler gibi OSC'ler tarafından doğrudan aktive edilmektedir (49).

2.b. Prebiyotikler ve sitokin modülasyonu

Bir prebiyotik olan inülinin serum veya dışkıda IgG ve IgA seviyelerini modüle edebildiğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır. FOS / inülin, oligofruktoz / inülin ve polidekstroz gibi prebiyo-

tikler ise IFN-gamma, IL-1 β ve IL-10 gibi sitokinlerin ekspresyonlarında değişikliğe yol açabilmektedir (50).

Yaşlı kişilerde galakto-oligosakkarit karışımları IL-10, IL-8, NK hücre aktivitesi ve CRP düzeyini artırırken IL-1 β düzeyini düşürmektedir (51). İnsan periferik kan monositlerinde, FOS ve inülinin TNF- α , IL-1 β ve IL-10 düzeylerini artırdığı ancak IL-8 düzeyini değiştirmediği gösterilmiştir (52). İnülin, keçi sütü oligosakkaritleri ve GOS, IEC18 hücrelerinde MCP1'i ve makrofaj enflamatuvar protein 2 (MIP2) salgısını artırmaktadır (48). Oligo kitosan, LPS ile uyarılmış hücrelerde NF-kB yolağının aktivasyonunu inhibe ederek NO, TNF- α ve IL-1 β salınımını azaltmaktadır (53). Polidekstroz ile zenginleştirilmiş bebek mamalarının ise süt emen domuz yavrularında TNF- α , IL-1 β ve IL-8 ekspresyonunu azalttığı belirlenmiştir (54).

2.c. Prebiyotik olarak polifenoller

Polifenoller, bitkiler tarafından üretilen ve yine bitkilerin ultraviyole ışığa ve reaktif oksijen türlerine karşı korunmasında görev alan bileşiklerdir (55). Tanım olarak basitçe "fenolik halkalar içeren çok büyük bir bileşik grubu" olarak tarif edilse de polifenollerin yapıları, kökenleri ve işlevleri arasında büyük farklılıklar bulunmaktadır (56). Polifenollerin anti-oksidan özellikleri iyi bilinmektedir. Bununla birlikte *in vitro* yüksek düzeyde antioksidan etkinlik gösteren pek çok bileşik bu etkiyi *in vivo* koşullarda gösterememektedir (57). Bu ikilemin sebebi büyük olasılıkla, kompleks yapıdaki polifenol zincirlerinin bağırsaktan emilememesi nedeniyle biyoyararlanımlarının düşük olmasıdır (58). Bu büyük bileşikler sindirilmeden kolona ilerler ve orada bakteriler tarafından parçalanarak sindirime hazır hale gelir (59). Polifenollerin etki gösterebilmesi için emilmeleri şart değildir, zaten prebiyotikleri parçalamak için gerekli mekanizma her bakteride de bulunmamaktadır. Polifenoller, kolonda prebiyotik benzeri etki göstererek belirli bakterilerin çoğalmasına katkıda bulunmaktadır. Kırmızı şarapta bulunan polifenoller, hem sıçanlarda hem de insanlarda *Bifidobacterium*, *Bacteroides* ve *Lactobacillus* oranını artırmaktadır (81, 82). Polifenoller, faydalı bakterilerin miktarını artırmakla kalmayıp patojen bakterilerin çoğalmasına da engel olmaktadır. Çayda ve şarapta bulunan polifenoller *Helicobacter pylori* popülasyonunun çoğalmasını önlemekte, zeytin yağından ekstrakte edilen polifenoller ise bakterilerin verdiği zararı önlemektedir (60). Polifenoller ayrıca TLR-4 blokajı yoluyla (61) IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi enflamatuvar mediyatörlerin salınımını azaltarak anti-enflamatuvar etki göstermektedir (62).

2.d. Sinbiyotiklerin immünomodülatör etkileri

Prebiyotikler, bağırsaktaki etki sürelerinin artırılması amacıyla prebiyotiklerle kombine edilmiş ve böylece "sinbiyotikler" geliştirilmiştir. Sinbiyotik preparatlarda, sıklıkla *Lactobacilli*, *Bifidobacteria spp.*, *S. boulardii*, *B. coagulans* gibi prebiyotik kökenler ile birlikte prebiyotik olarak en çok FOS, GOS ve XOS inülin tercih edilmektedir. Örneğin, ülseratif kolitide kullanılan *Bifidobacterium longum* ve inülin-oligofruktoz kombinasyonu, hastalık aktivasyonu sırasında düzeyi artan insan beta defansin 2, 3 ve 4'ün mRNA seviyelerini düşürmektedir. Ayrıca bu kombinasyonun kullanımı ile TNF- α seviyesi azalmakta, IL-1 α düzeyi ise sağ-

lıklılık dokulardaki konsantrasyonlara geri dönmektedir (63). Sağlıklı gönüllülere *Bifidobacterium animalis* ile kombine şekilde ksilo-oligosakkarit verildiğinde, NKT hücreleri üzerinde CD16 / CD56 ekspresyonu ve B hücreleri üzerinde CD19 ekspresyonu azalmaktadır (64).

Sonuç olarak, doğru seçilmiş probiyotik, prebiyotik ve sinbiyotikler ile güçlü immünomodülatör etki elde edilebilmektedir. Bir çok çalışmada, probiyotik ve prebiyotiklerin pro-enflamatuvar ve anti-enflamatuvar yanıtlar üzerindeki modülatör etkileri nedeniyle enflamasyon aracılı bir çok hastalığın (ülseratif kolit, alerjik astım, dermatit, kanser) kontrol altına alınmasında kullanılabileceği gösterilmiştir. Bununla birlikte, diyetle alınan tüm gıda bileşenleri ile fonksiyonel gıdalar (probiyotikler, prebiyotikler, mineraller, vitaminler) arasındaki dinamiğin doğru şekilde oluşturulması çok önemlidir. Epigenetik faktörler ve işlevsel mikrobiyomun katkısı ile probiyotikler ve prebiyotikler tarafından etkin bir sinyalizasyon ağı kurulabilmekte ve bu ağ, hücre-hücre iletişimi yoluyla sistemik enflamatuvar yanıtın kontrolüne katılabilmektedir.

3) PROTEİNLERİN İMMÜNOMODÜLATÖR ETKİLERİ

İnsan vücudunda bulunan yaklaşık 100 bin farklı proteinin yaşamın devamında sayısız rolleri bulunur. Gıda proteinlerinin türevleri olan peptid fraksiyonları ise fonksiyonel gıda bileşeni olarak, antimikrobiyal, kan basıncını düzenleyici (anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibisyonu ile), kolesterol düşürücü, antitrombotik ve antioksidan etkilere sahiptir (65). Günümüzde süt proteinleri başta olmak üzere hayvansal proteinler ve bitki kaynaklı peptidlerle ilişkili çok sayıda çalışma bulunmakla birlikte bu peptidlerin potansiyel immünomodülatör etkileri görece daha az araştırılmış konular arasındadır (66).

Gıda kaynaklı peptidlerin pro- ve anti-enflamatuvar sitokinler üzerine etki ederek, immün sistemi baskılayabileceği veya harekete geçirebileceği gösterilmiştir (66). Bu etki, antikor sentezini uyarmak, T ve B lenfositler üzerine etki etmek, NK hücreleri ve makrofajların fagositoz aktivitesini düzenlemek suretiyle gerçekleşebilmektedir (67). Bu bölümde; süt ürünleri, hayvansal gıdalar, deniz ürünleri ve bitkisel proteinlerle ilgili çalışmalarda elde edilen bazı verilere yer verilecektir.

3.a. Hayvansal proteinlerden elde edilen immünomodülatör peptidler

Hayvansal gıdalar, yaşamımızda önemli yer tutar. Hayvansal proteinlerin immünite üzerindeki etkileri, dönem dönem araştırmacıların ilgisini çekmiş, özellikle süt ürünü kaynaklı proteinler daha fazla araştırılmıştır.

3.a.1.Süt proteinleri: Kazein ve peynir altı (whey) proteini gibi süt proteinleri, immünomodülatör peptidlerin öncülleri olarak tanımlanmışlardır (68). Mürin splenosit hücre kültüründe, whey proteinlerinin hidroliz sonrası kankavalin A ile muamele edildiklerinde IL-2 ve interferon gamma (IFN-gamma) düzeyinde artış görülmesi, asidik veya nötral peptid fraksiyonlarının splenosit proliferasyonunu uyarmasına bağlanmıştır (69). Ancak bir başka *in vitro* çalışmada, whey protein

varlığında fare dalağında izole edilen lenfositlerin büyüme hızında artış gözlenmiş, fakat tripsin ve kimotripsin ile enzimatik hidroliz durumunda bu etkinin azaldığı bildirilmiştir (70). Benzer şekilde ss-laktoglobülin ile fare dalak hücreleri proliferere olurken, hidroliz ile bu etki azalmaktadır (71). Kazeinin laktobasiller tarafından proteolize uğraması, farklı immün yanıtlara yol açabilmektedir. Kazein proteinlerinin fraksiyonlarını analiz eden bir çalışmada, α_1 fraksiyonunu lenfosit proliferasyonunu baskılayan, ss ve K fraksiyonları proliferasyonu uyarmıştır. Sindirim enzimleri ile hidroliz öncesi *Lactobacillus rhamnosus*'dan elde edilen enzimler ile hidroliz uygulanması durumunda immünsüpresif etki gözlenmiş ve lenfositlerden IL-4 salınımı azalmıştır (72). *Lactobacillus helveticus* ile fermente olan sütü takiben oluşan immünomodülatör peptidler, bağırsak ilişkili lenfoid dokudan ve bronş ilişkili lenfoid dokudan IgA salınımını artırabilmektedir (73). Aynı çalışmada fermente sütün non-proteolitik L. helveticus ile farelerde oral uygulaması da periton makrofajlarının aktivasyonu ve fibrosarkomda gerilemeyi beraberinde getirmiştir (73). Bu sonuç, sütün fermentasyonu ile ortaya çıkan peptidlerin de immünomodülatör etkiden sorumlu olabileceğine işaret etmektedir. Yapılan bir diğer çalışmada ise α_1 s-kazeinin Thr-Thr-Met-Pro-Leu-Tyr sekansının antikor yapımını, fagositik aktiviteyi, NK hücrelerin olgunlaşmasını ve lenfosit çoğalmasını artırdığı, farelerde IgA üretimini artırdığı gösterilmiştir (74). Literatürde kazeinin IgA salınımını artırıcı, makrofaj aktivasyonunu artırıcı ve lenfosit fonksiyonlarını etkileyici niteliklerini gösteren çalışmalar mevcuttur. Elde edilecek immünomodülatör etki, proteinin sindirim enzimleri ile hidrolize olup olmadığına, probiyotikler ile fermente olup olmadığına, probiyotiklerin içerdiği proteolitik enzimlere ve konaktaki mevcut immün duruma göre değişiklik göstermektedir.

3.a.2.Yumurta proteinleri: Yumurta proteinlerinden ovalbüminin ısı ile denatürasyonu neticesinde (Ör. haşlanmış yumurta) CD4⁺ T hücrelerde sitokin sentezini artırabildiği, IL-12, IL-17 ve IL-10 sentezini artırıp IL-4 sentezini azalttığı gösterilmiştir (75). Ovalbümin türevi olan peptidler, makrofajlarda fagositik aktiviteyi artırmakta, aynı zamanda MAPK ve NF- κ B üzerine etki etmektedir (76). Ovalbümin dışında ovotransferrin, ovomüsin, sistatin, lizozim, fosvitin, Ig Y (Yolk İmmüoglobülin) gibi yumurta proteinlerinin de immünomodülatör etkileri mevcuttur. Bu proteinlerin hem pro- hem de anti-enflamatuvar sitokinleri stimüle edebildikleri gösterilmiş, ancak insanlarda fizyolojik enzimler arasındaki farklılıklar nedeniyle insan çalışmaları yapılması gerekliliği vurgulanmıştır (76).

3.a.3. Deniz ürünleri: Deniz ürünleri de önemli bir biyoaktif kaynak oluşturmaktadır ve immünomodülatör peptidler içermektedir (66). Bu konuda 2006 yılında yapılmış önemli bir çalışmada, ticari olarak piyasada olan bir balık proteini konsantrasyonunun immün etkisi irdelenmiştir (77). Balık protein konsantrasyonu, maya ile 24 saatlik fermantasyon ile hazırlanmıştır. Farelere bu ürünün değişik konsantrasyonları 2, 5 veya 7 gün sürelerle oral yoldan uygulanmış ve her beslenme periyodu sonunda bağırsakların histolojik incelemesi yapılarak peritoneal makrofaj aktivasyonu ve IgA salgısı konusunda sonuçlar

bildirilmiştir. Peritoneal makrofajlarda aktivitenin arttığı, hem bağırsak hem de bronş ilişkili lenfoid dokuda IgA salgısının yanı sıra IL-4, IL-6, IL-10, IFN-gamma ve TNF-α ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir. IFN-gamma ve TNF-α gibi pro-enflamatuvar sitokinlerde artışa karşın, normal intestinal dokuda herhangi bir enflamasyon bulgusu gözlenmezken 0.3 mg/ml dozunda 7 aralıklı gün balık proteini konsantresi verildiğinde peritoneal makrofajların aktivitesinin arttığı gözlenmiştir (77). Asya'da üretilen rohu balığı yumurtasının tripsin ve alkalaz ile muamele edildiğinde bağırsak mukozal immünitelerinde aktiviteyi artırdığı, tripsin hidrolizatları ile dalak CD4⁺ ve CD8⁺ lenfosit sayılarını artırdığı gösterilmiştir (78). Pasifik istiridyesi ekstraktlarının, HIV ile enfekte kişilerde IL-2 indüksiyonu ile CD4⁺ T hücre sayısında artışa katkıda bulunduğu bildirilmiş, ancak bu etki edinsel immün yetmezlik (AIDS) aşamasındaki olgularda gösterilememiştir (79).

3.b. Bitkisel ürünlerden elde edilen immünomodülatör peptidler

3.b.1. Gluten içeren baklagiller: Bitkisel proteinler ülkemiz için önemli besin kaynakları arasındadır. Ancak immünomodülatör etkileri ile ilgili araştırmalar kısıtlıdır. Buğday ve diğer baklagillerde bulunan proteinlerin yaklaşık %80'ini gluten oluşturmaktadır (66). Buğday gluteninde amino asitlerin %40'ını glutamil rezidüleri oluşturmaktadır. Bu özelliği ile buğday doğal bir glutamin kaynağıdır. Bağırsak ve immün sistemin hızlı bölünen hücrelerin glutamine daha fazla ihtiyacı vardır (80). Glutamin; periferik mononükleer hücrelerden TNFα salınımını azaltırken ısı şok protein (HSP) 72 salınımını artırarak, enflamatuvar süreci düzenlemektedir (81). Sağlıklı gönüllülerde yapılmış bir çalışmada günlük 3 gr gluten hidrozilatı tüketen grupta NK hücre aktivitesinin anlamlı ölçüde arttığı gösterilmiştir (80). Enteral yolla verilen glutamin; travma hastalarında CD14⁺ monositlerde HLA-DR ekspresyonunun artması ve immün fonksiyonların iyileşmesine katkıda bulunmuştur (82). Kritik hastalarla ilgili çalışmaların dahil edildiği bir metaanalizde ise, yatan hastalarda glutamin takviyesi yapıldığında nozokomiyal enfeksiyon oranlarında ve mekanik ventilasyona ihtiyaç duyulan gün sayısında düşüş sağlandığı (orta dereceli kanıt düzeyi) sonucuna ulaşılmıştır (83).

3.b.2.Lizin içeren baklagiller: Bir başka baklagil olan nohutun ise lizin içeriği yüksektir. *In vitro* çalışmalarda, Caco-2 kolon tümörü hücre serisi ile THP-1 insan monositik hücre serisi kültüre edilip intestinal mekanizmanın taklit edildiği modellerde, lizin etkisi ile insan monositik hücre serisinin proliferasyonunda %66 artış sağlamıştır (84).

3.b.3.Soya proteini: Soya, yüksek protein içeriği ile dünya genelinde yaygın tüketilen bir proteindir. Alkalaz ile muamele edilen soya proteininin, fare dalağında lenfositlerin proliferasyonuna ve periton makrofajlarının aktivasyonuna yol açtığı bildirilmiştir (85). Transplant sonrası lenfoma hastalarına ait periferik NK hücrelerinin bir soya peptidi olan lunasin ile uyarıldığı bir *in vitro* çalışmada ise lunasin ile uyarılan hücrelerin anti-tümör sitotoksik aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (86).

4) VİTAMİNLERİN İMMÜNOMODÜLATÖR ETKİLERİ

4.a. A vitamini: Anti-enfektif vitamin olarak da tanınan A vitamininin hem doğal hem de edinsel bağışıklıkta rolü vardır (87). Retinol, epitelyal bütünlüğün korunmasında rol oynamaktadır. Eksikliğinde skuamöz metaplazi, epitelyal yapıda ve sekretuar fonksiyonlarda bozulma görülebilmektedir (88). All trans retinoik asidin (atRA), T hücre stimüle edici ajanlar ile beraber uygulandığında T hücre proliferasyonunu 1.8 kat artırdığı, retinoblastoma geninin fosforilasyonunu artırarak hücre çevrimini aktive ettiği, IL-2 sekresyonunu artırdığı gösterilmiştir (89). Ayrıca timositlerin apoptoz regülasyonunda, T hücre aracılı ve antikor aracılı immün yanıtta ve kemik iliği homeostazının sağlanmasında etkili olduğu gösterilmiştir (90). A vitamini; bağırsakta bulunan CD169⁺ makrofajların gelişiminde rol oynar, anti-enflamatuvar etkisi bulunan M2 makrofajların çoğalmasında katkıda bulunur (91). atRA, nötrofillerin çekirdeğinde bulunan retinoik asid reseptörüne bağlanarak nötrofil diferansiyasyonunu uyarır ve mTOR sinyal yolağının aktive olması sonucunda tümör hücrelerinin etkin bir şekilde öldürülmesini sağlar (92). atRA'nın IFN-gamma düzeyini azaltarak ve IL-5 sekresyonunu artırarak NK T hücrenin erken diferansiyasyonunu uyardığını, dendritik hücreleri ve doğal lenfoid hücreleri de etkilediğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (90). A vitamini; nötrofil diferansiyasyonunu uyarma fonksiyonu ile klinik hematolojide akut promiyelositik lösemi hastalarında remisyona indüksiyonu ve konsolidasyon tedavilerinde kullanılmaktadır (93).

4.b. B vitamini kompleksi: Metilkobalamin (B12), B vitamin kompleksi içinde en kuvvetli immünomodülatör etkiye sahip bir mikrobessindir (94). B12 vitamini eksikliğine bağlı megaloblastik anemisi bulunan hastaların kemik iliği örneklerinde yapılan incelemelerde apoptoz mekanizmasında bozulma olduğu gözlenmiştir (95). Bu biyolojik etkinin immünojenik yansımaları da mevcuttur. B12 vitamini eksikliği olan olgularda yapılmış bir çalışmada, eksiklik olan olgularda lenfositlerin, özellikle CD8⁺ lenfositlerin, mutlak sayısında azalma ve CD4/CD8 oranında artış olduğu bildirilmiştir. B12 vitamini replasmanı sonrasında CD8⁺ (ve diğer) lenfosit sayılarında artışın yanı sıra NK hücre aktivitesinde de anlamlı artış olduğu gözlenmiştir (96). Ayrıca *in vitro* çalışmalarda B12 vitaminin anti-enflamatuvar etkileri gösterilmiş, ödem ve granülom oluşumunu azalttığı bildirilmiştir (97).

4.c. C vitamini: Nötrofillerde yüksek konsantrasyonda bulunan C vitamini, fagositik fonksiyonlarda öneme sahiptir (87). Vitamin C önemli bir antioksidandır ve hücre içinde süperoksit anyonu ile hidrojen peroksit üretimini azaltır. Vitamin C uygulanması ile hücrelerin fagositik aktivitesinde düzelme olduğu, pro-enflamatuvar IL-1ss ve TNF-α salınımını *in vitro* azalttığı bildirilmiştir (98). Başka bir çalışmada C vitamininin doz bağımlı olarak lipopolisakkarid tarafından uyarılmış IL-6 ve TNF-α üreten monosit sayısını, aynı zamanda IL-2 üreten lenfosit sayısını azalttığı gösterilmiştir (99). Bu özellikleri ile C vitamininin doz bağımlı olarak enflamatuvar sitokinleri baskıladığı, nötrofil fonksiyonlarını ise olumlu etkilediği çıkarımı yapılabilmektedir.

4.d. D vitamini: D vitamini, hem doğal hem özgül immünite üzerinde etkili, hem vitamin hem de hormon özelliği bulunan bir moleküldür (100). D vitamini reseptörünün makrofaj, DH, T ve B hücrelerin yüzeylerinde bulunduğu gösterilmiştir (101). Doğal immün yanıtı, hücre proliferasyonunu ve diferansiyasyonunu uyarak artırdığı bildirilmiştir (102). Doğal bağışıklığa olan etkisini Toll-like reseptörler (TLR) üzerinde göstermektedir. Zaman ve doz bağımlı olarak insan monositlerinde TLR2 ve TLR4 protein ekspresyonunu ve mRNA üretimini baskılamakta ve enflamasyonu azaltmaktadır (103). İnsan hepatit C ile enfekte hepatositlerde IFN-ss'yı artırarak doğal antiviral yanıtı uyardığı gösterilmiştir (104). Edinsel immün yanıtta ise pro-enflamatuvar IL-1, TNF- α , IFN-gamma sekresyonu inhibisyonu ile Th1 hücrelerini baskılamakta (105), Th2 hücrelerden IL-4 ve IL-10 gibi anti-enflamatuvar sitokin salınımını artırdığı bildirilmiştir (106). D vitamini eksikliği ise enflamatuvar stres, enfeksiyon riskinde artış ve otoimmün hastalık sıklığında artış ile ilişkilendirilmiştir (100).

4.e. E vitamini: E vitamini, immün sistemin mikroorganizmalara karşı direncinde, kanser hücrelerine karşı reaksiyonunda ve transplante dokuya karşı yanıtta rol almaktadır (107). Yaş ile beraber T hücre fonksiyonları azalmaktayken, E vitamini özellikle naif T hücrelerdeki yaşlanma sürecini tersine çevirebilmektedir (108). Çeşitli çalışmalarda T hücre diferansiyasyonunu artırdığı ve Th hücre fonksiyonunu artırdığı, hayvan deneylerinde uzun süreli kullanımda ise T hücre fonksiyonunda iyileşme sağladığı gösterilmiştir (108). İleri evre kolorektal kanser tanılı 12 hastaya 2 hafta boyunca günlük 750 mg E vitamini verildiğinde CD4/CD8 oranında artış, Th1 fonksiyonlarında, IL-2 ve IFN-gamma üretiminde artış gözlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak ve Th1 hücrelerin kansere karşı bağışıklıktaki rolü göz önüne alınarak E vitamininin, kanseri önlemede kullanılabileceği yorumu yapılmıştır (109). Aynı zamanda bu vitaminin IL-2 üretimi aracılığı ile NK aktivitesi, nötrofil kemotaksisi ve fagositozda artış sağlamak suretiyle doğal bağışık yanıtı da güçlendirdiği gösterilmiştir (108).

5) MİNERALLERİN İMMÜNOMODÜLATÖR ETKİLERİ

5.a. Çinko: Çinko (Zn), temel hücre fonksiyonları için gerekli bir eser elementtir (100). İmmün sistemin normal fonksiyonu için çinko gerekiyken, çok miktarda alınmasının olumsuz etkisi vardır. Eksikliğinde timüs atrofi, Th1 ve 2 miktarında dengesizlik, naif B hücrelerde azalma, Treg hücrelerde azalma ve Th17 hücrelerde artış gözlenebilmektedir (110). Doğal immünitede epitelyal membran bütünlüğü açısından gereklidir. Çinko homeostazı, Zn transport proteinleri ve metalloproteinler ile sağlanmaktadır. Çinko, hücre içinde bir sinyal molekülü olarak davranırken immün yanıtın oluşmasına da katkıda bulunur (111). Çinko eksikliğinde kompleman sistemi, NK hücre sitotoksitesi, nötrofillerin fagositik aktivitesi, monosit ve makrofaj kemotaksisinde sorunlar ortaya çıkmaktadır (112).

5.b. Bakır: Bakır da (çinko gibi) Cu-Zn-süperoksit dismutaz enziminin kofaktörüdür (100). Nötrofil ve monositlerde hidrojen peroksit üretimini katalize eder ve makrofaj yanıtına katkıda bulunur (113). Eksikliğinde fagositik hücrelerin gelişiminde bo-

zulma gözlenir. Lökositlerin mikrobisidal etkinliğinde azalma, miyeloid hücre üretiminde aksamalar gözlenmektedir (113).

5.c. Demir: Demir, T hücrelerin gelişiminde ve reaktif oksijen radikalleri oluşumunda önemli role sahiptir (100). Eksikliğinde nötrofil sayısında azalma gözlenmekle birlikte fazlalığında ise toksisiteye ve bazı patojenlerin etkisinin artmasına yol açabilir (114). Demir eksikliği olan farelerde lipopolisakkarid uyarısına karşı TNF- α , IFN-ss artışı ve TLR4 sinyal yolunda bozulma görülmektedir (115). TLR2 ve TLR4, makrofajlarda MyD88 ve TRIF sinyal yolları aracılığı ile hepsidin ekspresyonunu düzenler (116). Makrofajlarda hepsidin birikimi, pro-enflamatuvar sitokin salınımını artırır (100). Ayrıca demir mitokondriyal reaktif oksijen radikallerini artırarak, lipopolisakkaride karşı enflamatuvar yanıtı artırır (117). Enfeksiyöz süreçlerde demir takviyesi önerilmez.

5.d. Alüminyum: Alüminyum, aşılara karşı immün yanıtın artırılması amacıyla adjuvan olarak kullanılan bir elementtir. Alüminyumun adjuvan olarak kullanıldığı aşılarda, NLRP3 enflamazomunu aktive ederek IL-1ss sekresyonunu artırmak ve lokal doku hasarı oluşturmak suretiyle immün aktivasyonu sağlamaktadır (118). Alüminyum ayrıca kompleman kaskadında membran atak kompleksinin oluşumunda da rol almaktadır (119).

5.e. İyot: Vücutta tiroid hormon sentezinde kullanılan iyotun, normal metabolizmamızı sürdürebilmemizde hayati önemi haizdir. Hipo- ve hiper-tiroidizm durumunda NK hücre aktivitesinde bozulmalar bildirilmiştir (120). Ayrıca *in vitro* ortamda myeloperoksidaz aktivitesinde rol oynamaktadır ve fagositik hücrelerde fagositozun aktivasyonunda, B lenfositlerde ise Ig G sentezi uyarımında rol oynar (121). Sıçanlarda yapılan çalışmalarda ise makrofajlarda artmış iyot konsantrasyonunun, antijen sunma aktivitesinde artış ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (122).

5.f. Magnezyum: Hüresel metabolik reaksiyonlarda önemli bir rolü mevcuttur. Laboratuvar hayvanlarında kronik eksikliğinde timus atrofi geliştiği, immün yanıtın bozulduğu ve malinite-nin arttığı bildirilmiştir. Ayrıca kalsiyum ile birlikte mast hücre degranülasyonunda, dolayısıyla anafilaktik şok mekanizmasında rol oynamaktadır (123,124).

5.g. Selenyum: Antioksidan etkinliği olan ve vücudun bağışıklık savunmasını destekleyen, önemli bir eser elementtir (125). Glutasyon peroksidazın önemli bir parçasıdır ve hüresel oksidasyon ürünlerinin temizlenmesinde önemlidir (126). Eksikliğinde lenfositlerin mitojenlere yanıtı bozulur, makrofajların kemotaksisinde aksamalar gözlenir ve redoks sisteminin işle-memesine bağlı olarak antijen tanıma fonksiyonlarında bozukluklar gözlenir (127). Otoimmün tiroid hastalıklarına yol açtığını gösterir çalışmalar mevcuttur (122).

6) FONKSİYONEL GIDALARIN İMMÜNOMODÜLATÖR ETKİLERİ

Bağışıklık düzenleyici etkileri bulunan çok sayıda fonksiyonel gıda tanımlanmıştır. Bunlardan, günlük hayatımızda daha sık yer bulan on iki grup gıda ve gıda bileşeninin immünomodülatör etkileri Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. Günlük kullanımda fonksiyonel gıdalar ve immünomodülatör etkileri

Gıdalar	İmmünomodülatör Etki	Etki Mekanizması	Kaynaklar
6.a. Çörek otu (<i>Nigella sativa</i>)	Çörek otu yağı, alerjik hastalıkların semptomlarını iyileştirmede etkili.	COX ve 5-lipoksigenaz yollarını inhibe ederek lökotrien ve tromboksan yapımını inhibe eder. Mast hücrelerinden histamin salınımını inhibe eder.	(128)
6.b. Zerdeçal (<i>Curcuma longa</i>)	Anjiyogenezi düzenleyerek tümör büyümesini ve metastazı sınırlar, diyabetik retinopati ve romatoid artrit olumlu etki yapar Güçlü anti-oksidan etki gösterir Anti-enflamatuvar etkilidir	PPAR- γ (<i>peroxisome proliferator - activated receptor -γ</i>) aktivasyonunu artırır (up-regulation) Tümörleri baskılayan anti-apoptoz genlerini aşağı yönde düzenler (down-regulation) TNF- <i>alfa</i> salınımını baskılayarak sepsis gelişimine karşı etki gösterir	(129,130)
6.c. Sarımsak (<i>Allium sativum</i>)	Anti-enflamatuvar Anti-oksidan Anti-kanser, anti-proliferatif etki Anti-alerjik ve alerjen Kardiyoprotektif etki Obezite ve insülin direncine karşı koruyucu etki	Sitokin sekresyonunu düzenler immünoglobulin üretimini uyarır makrofaj aktivasyonu ve fagositozu uyarır IL-10 üretimini artırarak TNF- <i>alfa</i> ve diğer pro-enflamatuvar sitokin yanıtını düzenler CD8 lenfositlerinin sitotoksik aktivitesini artırır $\gamma\delta$ -T popülasyonunu çoğaltır NK hücrelerinin sayısını ve aktivitesini modüle eder CD40 gibi kostimülatör moleküllerin ekspresyonunu artırarak dendritik hücre olgunlaşmasına katkıda bulunur Reaktif oksijen türlerini temizleyerek ve süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi hücresele antioksidan enzimleri artırarak antioksidan etki gösterir Kanser hücrelerinde apoptozu indükler IgE ile bağlanan protein ve karbonhidrat rezidüleri nedeniyle çapraz alerjiye yol açar İnsan preadipositlerinde IL-6 ve MCP-1, -2 salgılanmasını azaltır	(131)
6.d. Bal, polen, arı sütü, propolis	Anti-mikrobiyal, anti-oksidan, anti-enflamatuvar, anti-kanser, anti-alerjen immünomodülatör	Balın bileşiminde bulunan flavonoidler (özellikle kuersetin) antiproliferatif etki gösterir Tümör nekroz faktör- <i>alfanın</i> (TNF- α) uyarılması, hücre çoğalmasının engellenmesi, apoptozun uyarılması ve hücre döngüsünün engellenmesi Propoliste bulunan krizin ve kampferol: anti-alerjik etki gösterir	(132)
6.e. Kırmızı Soğan (<i>Allium cepa</i> Linn)	İçeriğinde bulunan yoğun flavonoidlerle; Anti-oksidan, İmmünomodülatör Anti-kanser özelliklere sahiptir	Kırmızı soğan, toplam aktif içeriğinin %60'ını oluşturan flavonoller (kaempferol, kuersetin, kuersetin dimerleri, trimerleri ve diğer kuersetin glikozidleri) ile anti-oksidan, hepatoprotektif, anti-kanser, anti-mikrobiyal, anti-stres etkilere sahiptir	(133)
6.f. Patlıcan (<i>Solanum melongena</i>)	Anti-oksidan ve anti-enflamatuvar (siğiller, yanıklar ve stomatit, artrit ve gastrit gibi birçok enflamatuvar hastalıkta etkili)	Patlıcan sapında bulunan heksan, diklorometan, etil asetat, butanol; kabuğunda bulunan kafeik asit, kinik asit, sinamik asit ve klorojenik asit dahil fenoller ile nasunin ve kuersetin gibi flavonoidler oksidatif stresi ve anjiyogenezi önler	(134)

6.g. Havuç (<i>Daucus carota L</i>), Kereviz (<i>Apium graveolenz</i>) Kişniş (<i>Coriandrum sativum</i>), Rezene (<i>Foeniculum vulgare</i>) Maydanoz (<i>Petroselinum crispum</i>) Kapari (<i>Capparis spinosa</i>)	Hücrel immünitenin düzenlenmesine katkıda bulunur: Lenfosit aktivasyonunu ve interferon-gamma salınımını artırır	CD8 T lenfosit proliferasyonu ve aktivasyonunu artırır	(135)
6.h. Kivi (<i>Actinidia deliciosa</i>)	Doğal bağışıklık: İçerdiği C vitamini, karotenoidler, polifenoller ve diyet lifi ile bağırsağın mukozal savunmasını güçlendirir Adaptif bağışıklık: CD8 ⁺ CD25 ⁺ T hücrelerini "gençleştirir" γδ-T lenfositlerinin aktivasyonunu artırır	Kısa zincirli yağ asitlerinin üretimini artırmak için bir fermantasyon substratı olarak hareket ederek defensin üretimini dolaylı olarak uyarır ve bu da kolon epitel hücrelerinden antimikrobiyal peptitlerin üretimini uyarır	(136,137)
6.i. Soya fasülyesi (<i>Glycine max</i>)	Anti-enflamatuvar, anti-oksidan, anti-mutajenik, anti-karsinojen	Yapısındaki izoflavonlar, saponinler ve antosiyaninler gibi bileşenleri aracılığıyla bağışıklık modülasyonunda rol oynar	(138)
6.j. Pirinç, buğday	Hububat, <i>in vitro</i> olarak CD141 monositlerinden IL-10 üretimini belirgin belirgin şekilde artırarak doğal bağışıklığı uyarır	Tahılların IL-10 üretimini uyarıcı etkisine yapılarındaki LPS benzeri bileşenlerin yol açtığı düşünülmektedir	(139)
6.k. Mantar	Mantar proteinleri mitojen ve immünomodülatör etki göstererek fagositleri, splenositleri, timositleri uyarır	Albatrellus confluens cinsi mantarın etken maddesi olan "Grifolin", tümör hücre hatlarında Kaspaz-8, 9, 3 aktivitesini artırarak apoptoz yolağını uyarmakta, anti-tümör etki göstermektedir	(140)
6.l. Yeşil çay (<i>Camellia sinensis</i>)	Yeşil çay ekstresi, içerdiği flavonoidler ile anti-enflamatuvar immünomodülatör etkiye sahiptir	T hücrelerinin proliferasyonunu, Th1 ve Th2'ye farklılaşmasını, IFN-gamma üretimini, makrofaj aktivasyonunu, CD4 ⁺ hücre aktivasyonunu, IL-8 ve IL-17 ve 17A üretimini artırır	(141)
6.m. Aloe vera	Anti-enflamatuvar etki Anti-astmatik etki Anti-tümör etki Anti-allerjik etki (özellikle lokal/topikal)	Siklooksijenaz yolağını inhibe ederek arasıdonik asitten prostaglandin E2 üretimini azaltır Mast hücrelerine kalsiyum girişini durdurarak antijen-antikor aracılı histamin ve lökotrien salınımını inhibe eder Aloe veranın bir polisakkarit fraksiyonu, benzopirenin primer sıçan hepatositlerine bağlanmasını önleyerek potansiyel olarak kanseri başlatan benzopiren-DNA eklentilerinin oluşumunu önlemektedir	(142,143)

SONUÇ

Gıdalar; bağırsak bağırsıklık sisteminin oral tolerans, salgısal IgA, lokal lenfoid odaklar, regülatör hücrel immünite ve kommensal mikrobiyomun çeşitliliği gibi kendine özgü özellikleri ile bütünleşebildikleri ölçüde **"fonksiyonel"** hale gelmektedir. Doğru seçilmiş probiyotik, prebiyotik ve sinbiyotikler ile güçlü immünomodülatör etkiler elde edilebilmektedir. Probiyotik ve prebiyotikler pro-enflamatuvar ve anti-enflamatuvar yanıt üzerindeki modülatör etkileri nedeniyle enflamasyon aracılı bir çok hastalığın (ülseratif kolit, alerjik astım, dermatit, kanser) kontrol altına alınmasında kullanılabilir. **Probiyotikler,** Ig G üreten bellek B hücrelerini artırarak aşya verilen immün yanıtı da güçlendirebilmektedir. **Prebiyotikler,** mide ve ince bağırsaktan emilmeden kolona ulaşarak kolon florasında bulunan *Lactobacilli* ve *Bifidobacteria* gibi yararlı mikrobiyal popülasyon için besin kaynağı olmakta, KZYA gibi anti-enflamatuvar etkili metabolitlerin üretimine katkıda bulunarak bağırsak bağırsıklığını düzenleyen Treg hücrelerinin sayı ve aktivitesini artırmaktadır. Probiyotikler, bağırsaktaki etki sürelerinin artırılması amacıyla prebiyotiklerle kombine edilmiş ve böylece **"sinbiyotikler"** geliştirilmiştir.

Hayvansal proteinler ve bitki kaynaklı peptidlerin de immünomodülatör etkileri bulunmaktadır. Kazein ve whey proteini gibi süt proteinleri, immünomodülatör peptidlerin öncülleri olarak tanımlanmışlardır. Buğday ve diğer baklagillerde bulunan proteinlerin yaklaşık %80'ini gluten, gluten yapısında ise amino asitlerin %40'unu glutamil rezidüleri oluşturur. Yatan hastalarda glutamin takviyesi yapıldığında nozokomiyal enfeksiyon oranlarında ve mekanik ventilasyona ihtiyaç duyulan gün sayısında düşüş sağlandığı görülmüştür.

Vitaminlerden; A vitamininin mukozal epitelyal bütünlüğün korunması ve enfeksiyon etkenlerine karşı güçlü nötrofil yanıtında önemli katkıları vardır. B12 vitamini güçlü immünomodülatör etki göstermekte, özellikle CD8⁺ lenfosit sayılarında ve NK hücre aktivitesinde artışa katkıda bulunmaktadır. Vitamin C önemli bir antioksidandır. Vitamin C uygulanması ile hücrelerin fagositik aktivitesinde düzelleme olduğu, pro-enflamatuvar IL-1ss ve TNF- α salınımının azaldığı bildirilmiştir. D vitamininin, hücre proliferasyon ve diferansiyasyonunu uyararak doğal immün yanıtı güçlendirdiği bildirilmiştir. D vitamini eksikliğinde enflamatuvar stres, enfeksiyon riskinde ve otoimmün hastalık sıklığında artış görülmektedir. E vitamini özellikle naif T hücrelerdeki yaşlanma sürecini tersine çevirebilmektedir. E vitamininin, kanseri önlemede kullanılabileceği yorumu yapılmıştır. **Minerallerden;** çinko, hücre içinde bir sinyal molekülü olarak davranırken immün yanıtın oluşmasına da katkıda bulunur. Çinko eksikliğinde kompleman sistemi, NK hücre sitotoksitesi, nötrofillerin fagositik aktivitesi, monosit ve makrofaj kemotaksisinde sorunlar ortaya çıkmaktadır. Bakır eksikliğinde fagositik hücrelerin gelişiminde bozulma, lökositlerin mikrobisidal etkinliğinde azalma, miyeloid hücre üretiminde aksamalar gözlenmektedir.

Sonuç olarak; beslenme ile bağırsıklık arasındaki ilişkiyi inceleyen her araştırma bir kez daha Hipokrat'ı haklı çıkarmakta, **güdamız ilacımız olmaya devam etmektedir.**

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

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - İ.İ.B., G.E.Y., Supervision - İ.İ.B., G.E.Y.; Materials - F.K.K., M.M.Ö., İ.İ.B., G.E.Y.; Data Collection and/or Processing - F.K.K., M.M.Ö., İ.İ.B., G.E.Y.; Analysis and/or Interpretation - F.K.K., M.M.Ö., İ.İ.B., G.E.Y.; Literature Search - F.K.K., M.M.Ö., İ.İ.B., G.E.Y.; Writing - F.K.K., M.M.Ö., İ.İ.B., G.E.Y.; Critical Reviews - F.K.K., M.M.Ö., İ.İ.B., G.E.Y.

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

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

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

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fkir - İ.İ.B., G.E.Y., Denetleme - İ.İ.B., G.E.Y.; Gereçler - F.K.K., M.M.Ö., İ.İ.B., G.E.Y.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - F.K.K., M.M.Ö., İ.İ.B., G.E.Y.; Analiz ve/veya Yorum - F.K.K., M.M.Ö., İ.İ.B., G.E.Y.; Literatür Taraması - F.K.K., M.M.Ö., İ.İ.B., G.E.Y.; Yazan - F.K.K., M.M.Ö., İ.İ.B., G.E.Y.; Eleştirel İnceleme - F.K.K., M.M.Ö., İ.İ.B., G.E.Y.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemiştir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışmada finansal destek alınmadığını beyan etmiştir.

REFERENCES

- Georgiou NA, Garssen J, Witkamp RF. Pharma-nutrition interface: the gap is narrowing. *European Journal of Pharmacology* 2011; 651(1-3): 1-8. [CrossRef]
- TF. M. Functional Food - A Review. *European Academic Research* 2016(6): 5695-702.
- Salman F, Erten G, Unal M, Kiran B, Salman S, Deniz G, et al. Effect of acute maximal exercise on lymphocyte subgroups in type 1 diabetes. *Acta Physiol Hung* 2008; 95(1): 77-86. [CrossRef]
- Suzuki K, Kawamoto S, Maruya M, Fagarasan S. GALT: organization and dynamics leading to IgA synthesis. *Advances in immunology* 2010; 107: 153-85. [CrossRef]
- Hekim N, Ş. A. Bağırsıklık Bilimi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2017.
- Rezende RM, Weiner HL. History and mechanisms of oral tolerance. *Seminars in Immunology* 2017; 30: 3-11. [CrossRef]
- Shiokawa A, Kotaki R, Takano T, Nakajima-Adachi H, Hachimura S. Mesenteric lymph node CD11b(-) CD103(+) PD-L1(High) dendritic cells highly induce regulatory T cells. *Immunology* 2017; 152(1): 52-64. [CrossRef]
- Sato A, Hashiguchi M, Toda E, Iwasaki A, Hachimura S, Kaminogawa S. CD11b+ Peyer's patch dendritic cells secrete IL-6 and induce IgA secretion from naive B cells. *Journal of Immunology* 2003; 171(7): 3684-90. [CrossRef]
- Goodrich ME, McGee DW. Preferential enhancement of B cell IgA secretion by intestinal epithelial cell-derived cytokines and interleukin-2. *Immunological Investigations* 1999; 28(1): 67-75. [CrossRef]

10. Hattori M, Taylor TD. The human intestinal microbiome: a new frontier of human biology. *DNA research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes* 2009; 16(1): 1-12. [\[CrossRef\]](#)
11. Yanagibashi T, Hosono A, Oyama A, Tsuda M, Suzuki A, Hachimura S, et al. IgA production in the large intestine is modulated by a different mechanism than in the small intestine: *Bacteroides acidifaciens* promotes IgA production in the large intestine by inducing germinal center formation and increasing the number of IgA+ B cells. *Immunobiology* 2013; 218(4): 645-51. [\[CrossRef\]](#)
12. Sudo N, Sawamura S, Tanaka K, Aiba Y, Kubo C, Koga Y. The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *Journal of Immunology* 1997; 159(4): 1739-45.
13. Kang HJ, Im SH. Probiotics as an Immune Modulator. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 2015; 61(Suppl): S103-5. [\[CrossRef\]](#)
14. Saad N, Delattre C, Urdaci M, Schmitter JM, P.Bressollier. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT - Food Science and Technology* 2013; 50(1): 1-16. [\[CrossRef\]](#)
15. Schiavi E, Smolinska S, O'Mahony L. Intestinal dendritic cells. *Current Opinion in Gastroenterology* 2015; 31(2): 98-103. [\[CrossRef\]](#)
16. Konieczna P, Ferstl R, Ziegler M, Frei R, Nehrbass D, Lauener RP, et al. Immunomodulation by *Bifidobacterium infantis* 35624 in the murine lamina propria requires retinoic acid-dependent and independent mechanisms. *PloS One* 2013; 8(5): e62617. [\[CrossRef\]](#)
17. Wong TH, Chen HA, Gau RJ, Yen JH, Suen JL. Heme Oxygenase-1-Expressing Dendritic Cells Promote Foxp3+ Regulatory T Cell Differentiation and Induce Less Severe Airway Inflammation in Murine Models. *PloS One* 2016; 11(12): e0168919. [\[CrossRef\]](#)
18. Dasgupta S, Erturk-Hasdemir D, Ochoa-Reparaz J, Reinecker HC, Kasper DL. Plasmacytoid dendritic cells mediate anti-inflammatory responses to a gut commensal molecule via both innate and adaptive mechanisms. *Cell Host & Microbe* 2014; 15(4): 413-23. [\[CrossRef\]](#)
19. Habil N, Abate W, Beal J, Foey AD. Heat-killed probiotic bacteria differentially regulate colonic epithelial cell production of human beta-defensin-2: dependence on inflammatory cytokines. *Beneficial Microbes* 2014; 5(4): 483-95. [\[CrossRef\]](#)
20. Hemaiswarya S, Raja R, Ravikumar R, IS C. Mechanism of action of probiotics. *Braz Arch Biol Technol* 2013; 56: 113-9. [\[CrossRef\]](#)
21. Scully P, Macsharry J, O'Mahony D, Lyons A, O'Brien F, Murphy S, et al. *Bifidobacterium infantis* suppression of Peyer's patch MIP-1alpha and MIP-1beta secretion during *Salmonella* infection correlates with increased local CD4+CD25+ T cell numbers. *Cellular Immunology* 2013; 281(2): 134-40. [\[CrossRef\]](#)
22. Lin R, Jiang Y, Zhao XY, Guan Y, Qian W, Fu XC, et al. Four types of *Bifidobacteria* trigger autophagy response in intestinal epithelial cells. *Journal of Digestive Diseases* 2014; 15(11): 597-605. [\[CrossRef\]](#)
23. Elian SD, Souza EL, Vieira AT, Teixeira MM, Arantes RM, Nicoli JR, et al. *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* BB-02 attenuates acute murine experimental model of inflammatory bowel disease. *Beneficial Microbes* 2015; 6(3): 277-86. [\[CrossRef\]](#)
24. Kim HJ, Kim YJ, Lee SH, Yu J, Jeong SK, Hong SJ. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* on allergic march model by suppressing Th2, Th17, and TSLP responses via CD4(+)/CD25(+)/Foxp3(+) Tregs. *Clinical Immunology* 2014; 153(1): 178-86. [\[CrossRef\]](#)
25. Zhang M, Zhang S, Hua Z, X Z. Long-term use of *Bifidobacterium longum* alleviates colorectal colitis in rats by regulating inflammatory cytokines and Treg cells. *Erciyes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi* 2017(10): 7543-52.
26. Zhang M, Zhou L, Zhang S, Yang Y, Xu L, Hua Z, et al. *Bifidobacterium longum* affects the methylation level of forkhead box P3 promoter in 2, 4, 6-trinitrobenzenesulphonic acid induced colitis in rats. *Microbial Pathogenesis* 2017; 110: 426-30. [\[CrossRef\]](#)
27. Konieczna P, Schiavi E, Ziegler M, Groeger D, Healy S, Grant R, et al. Human dendritic cell DC-SIGN and TLR-2 mediate complementary immune regulatory activities in response to *Lactobacillus rhamnosus* JB-1. *PloS One* 2015; 10(3): e0120261. [\[CrossRef\]](#)
28. Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, Nagano Y, Nishikawa H, et al. Treg induction by a rationally selected mixture of *Clostridia* strains from the human microbiota. *Nature* 2013; 500(7461): 232-6. [\[CrossRef\]](#)
29. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 2013; 504(7480): 446-50. [\[CrossRef\]](#)
30. Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikiy S, van der Veeken J, deRoos P, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* 2013; 504(7480): 451-5. [\[CrossRef\]](#)
31. Milligan G, Ulven T, Murdoch H, Hudson BD. G-protein-coupled receptors for free fatty acids: nutritional and therapeutic targets. *The British Journal of Nutrition* 2014; 111(Suppl 1): S3-7. [\[CrossRef\]](#)
32. Owaga E, Hsieh RH, Mugendi B, Masuku S, Shih CK, Chang JS. Th17 Cells as Potential Probiotic Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 2015; 16(9): 20841-58. [\[CrossRef\]](#)
33. Sakai F, Hosoya T, Ono-Ohmachi A, Ukibe K, Ogawa A, Moriya T, et al. *Lactobacillus gasserii* SBT2055 induces TGF-beta expression in dendritic cells and activates TLR2 signal to produce IgA in the small intestine. *PloS One* 2014; 9(8): e105370. [\[CrossRef\]](#)
34. Rosser EC, Oleinika K, Tonon S, Doyle R, Bosma A, Carter NA, et al. Regulatory B cells are induced by gut microbiota-driven interleukin-1beta and interleukin-6 production. *Nature Medicine* 2014; 20(11): 1334-9. [\[CrossRef\]](#)
35. Liao HY, Tao L, Zhao J, Qin J, Zeng GC, Cai SW, et al. *Clostridium butyricum* in combination with specific immunotherapy converts antigen-specific B cells to regulatory B cells in asthmatic patients. *Scientific Reports* 2016; 6: 20481. [\[CrossRef\]](#)
36. Enani SM, Childs CE, Przemaska A, Maidens C, Dong H, Rowland I, et al. Effects of a novel probiotic, *Bifidobacterium longum* bv. *infantis* CCUG 52486 with prebiotic on the B-cell response to influenza vaccination. *Proceedings of the Nutrition Society* 2014(73): E9. [\[CrossRef\]](#)
37. Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature reviews Gastroenterology & Hepatology* 2017; 14(8): 491-502. [\[CrossRef\]](#)
38. Shokryazdan P, Faseleh Jahromi M, Navidshad B, Liang JB. Effects of prebiotics on immune system and cytokine expression. *Medical Microbiology and Immunology* 2017; 206(1): 1-9. [\[CrossRef\]](#)
39. Dwivedi M, Kumar P, Laddha NC, Kemp EH. Induction of regulatory T cells: A role for probiotics and prebiotics to suppress autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* 2016; 15(4): 379-92. [\[CrossRef\]](#)
40. Bindels LB, Delzenne NM, Cani PD, Walter J. Towards a more comprehensive concept for prebiotics. *Nature reviews Gastroenterology & Hepatology* 2015; 12(5): 303-10. [\[CrossRef\]](#)
41. Oozeer R, van Limpt K, Ludwig T, Ben Amor K, Martin R, Wind RD, et al. Intestinal microbiology in early life: specific prebiotics can have similar functionalities as human-milk oligosaccharides. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2013; 98(2): 561S-71S. [\[CrossRef\]](#)

42. Voreades N, Kozil A, Weir TL. Diet and the development of the human intestinal microbiome. *Frontiers in Microbiology* 2014; 5: 494. [CrossRef]
43. Douellou T, Montel MC, Thevenot Sergentet D. Invited review: Anti-adhesive properties of bovine oligosaccharides and bovine milk fat globule membrane-associated glycoconjugates against bacterial food enteropathogens. *Journal of Dairy Science* 2017; 100(5): 3348-59. [CrossRef]
44. Manthey CF, Autran CA, Eckmann L, Bode L. Human milk oligosaccharides protect against enteropathogenic *Escherichia coli* attachment *in vitro* and EPEC colonization in suckling mice. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2014; 58(2): 165-8. [CrossRef]
45. Honda K, Littman DR. The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature* 2016; 535(7610): 75-84. [CrossRef]
46. Chu H, Khosravi A, Kusumawardhani IP, Kwon AH, Vasconcelos AC, Cunha LD, et al. Gene-microbiota interactions contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Science* 2016; 352(6289): 1116-20. [CrossRef]
47. Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nature Reviews Microbiology* 2016; 14(1): 20-32. [CrossRef]
48. Wu RY, Maattanen P, Napper S, Scruten E, Li B, Koike Y, et al. Non-digestible oligosaccharides directly regulate host kinome to modulate host inflammatory responses without alterations in the gut microbiota. *Microbiome* 2017; 5(1): 135. [CrossRef]
49. Seifert S, Watzl B. Inulin and oligofructose: review of experimental data on immune modulation. *The Journal of Nutrition* 2007; 137(11 Suppl): 2563S-7S. [CrossRef]
50. Vogt L, Meyer D, Pullens G, Faas M, Smelt M, Venema K, et al. Immunological properties of inulin-type fructans. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2015; 55(3): 414-36. [CrossRef]
51. Vulevic J, Drakoularakou A, Yaqoob P, Tzortzis G, Gibson GR. Modulation of the fecal microflora profile and immune function by a novel trans-galactooligosaccharide mixture (B-GOS) in healthy elderly volunteers. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2008; 88(5): 1438-46.
52. Capitan-Canadas F, Ortega-Gonzalez M, Guadix E, Zarzuelo A, Suarez MD, de Medina FS, et al. Prebiotic oligosaccharides directly modulate proinflammatory cytokine production in monocytes via activation of TLR4. *Molecular Nutrition & Food Research* 2014; 58(5): 1098-110. [CrossRef]
53. Zhu J, Zhang Y, Wu G, Xiao Z, Zhou H, Yu X. Inhibitory effects of oligochitosan on TNF-alpha, IL-1beta and nitric oxide production in lipopolysaccharide-induced RAW264.7 cells. *Molecular Medicine Reports* 2015; 11(1): 729-33. [CrossRef]
54. Herfel TM, Jacobi SK, Lin X, Fellner V, Walker DC, Jouni ZE, et al. Polydextrose enrichment of infant formula demonstrates prebiotic characteristics by altering intestinal microbiota, organic acid concentrations, and cytokine expression in suckling piglets. *The Journal Of Nutrition* 2011; 141(12): 2139-45. [CrossRef]
55. Agati G, Brunetti C, Di Ferdinando M, Ferrini F, Pollastri S, Tattini M. Functional roles of flavonoids in photoprotection: new evidence, lessons from the past. *Plant Physiology and Biochemistry : PPB* 2013; 72: 35-45. [CrossRef]
56. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2010; 2(12): 1231-46. [CrossRef]
57. Mao X, Gu C, Chen D, Yu B, He J. Oxidative stress-induced diseases and tea polyphenols. *Oncotarget* 2017; 8(46): 81649-61. [CrossRef]
58. Scholz S, Williamson G. Interactions affecting the bioavailability of dietary polyphenols *in vivo*. *International journal for vitamin and nutrition research Internationale Zeitschrift für Vitamin- und Ernährungsforschung Journal International de Vitaminologie et de Nutrition* 2007; 77(3): 224-35. [CrossRef]
59. de Ferrars RM, Czank C, Zhang Q, Botting NP, Kroon PA, Cassidy A, et al. The pharmacokinetics of anthocyanins and their metabolites in humans. *British Journal of Pharmacology* 2014; 171(13): 3268-82. [CrossRef]
60. Ruggiero P, Tombola F, Rossi G, Pancotto L, Lauretti L, Del Giudice G, et al. Polyphenols reduce gastritis induced by *Helicobacter pylori* infection or VacA toxin administration in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2006; 50(7): 2550-2. [CrossRef]
61. Huang S, Zhao L, Kim K, Lee DS, Hwang DH. Inhibition of Nod2 signaling and target gene expression by curcumin. *Molecular Pharmacology* 2008; 74(1): 274-81. [CrossRef]
62. Olivera A, Moore TW, Hu F, Brown AP, Sun A, Liotta DC, et al. Inhibition of the NF-kappaB signaling pathway by the curcumin analog, 3,5-Bis(2-pyridinylmethylidene)-4-piperidone (EF31): anti-inflammatory and anti-cancer properties. *International Immunopharmacology* 2012; 12(2): 368-77. [CrossRef]
63. Derikx LA, Dieleman LA, Hoentjen F. Probiotics and prebiotics in ulcerative colitis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2016; 30(1): 55-71. [CrossRef]
64. Childs CE, Roytio H, Alhoniemi E, Fekete AA, Forssten SD, Hudjec N, et al. Xylo-oligosaccharides alone or in synbiotic combination with *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* induce bifidogenesis and modulate markers of immune function in healthy adults: a double-blind, placebo-controlled, randomised, factorial crossover study. *The British Journal of Nutrition* 2014; 111(11): 1945-56. [CrossRef]
65. Hartmann R, Meisel H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology* 2007; 18(2): 163-9. [CrossRef]
66. Santiago-Lopez L, Hernandez-Mendoza A, Vallejo-Cordoba B, Mata-Haro V, Gonzalez-Cordova AF. Food-derived immunomodulatory peptides. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2016; 96(11): 3631-41. [CrossRef]
67. Wagar LE, Champagne CP, Buckley ND, Raymond Y, Green-Johnson JM. Immunomodulatory properties of fermented soy and dairy milks prepared with lactic acid bacteria. *Journal of Food Science* 2009(74): M423-M30. [CrossRef]
68. Meisel H. Biochemical properties of peptides encrypted in bovine milk proteins. *Current Medicinal Chemistry* 2005; 12(16): 1905-19. [CrossRef]
69. Saint-Sauveur D, Gauthier SF, Boutin Y, A M. Immunomodulating properties of a whey protein isolate, its enzymatic digest and peptide fractions. *International Dairy Journal* 2008(18): 260-70. [CrossRef]
70. Jang A, Jo C, Kang K-S, ML. Antimicrobial and human cancer cell cytotoxic effect of synthetic angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides. *Food Chemistry* 2008(107): 327-36. [CrossRef]
71. Jacquot A, Gauthier SF, Drouin R, YB. Proliferative effects of synthetic peptides from beta-lactoglobulin and alpha-lactalbumin on murine splenocytes. *International Dairy Journal* 2010(20): 514-21. [CrossRef]
72. Sutas Y, Soppi E, Korhonen H, Syvaaja EL, Saxelin M, Rokka T, et al. Suppression of lymphocyte proliferation *in vitro* by bovine caseins hydrolyzed with *Lactobacillus casei* GG-derived enzymes. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1996; 98(1): 216-24. [CrossRef]

73. Matar C, Valdez JC, Medina M, Rachid M, Perdigon G. Immunomodulating effects of milks fermented by *Lactobacillus helveticus* and its non-proteolytic variant. *The Journal of Dairy Research* 2001; 68(4): 601-9. [\[CrossRef\]](#)
74. Jolles P, Fiat A-M, Migliore-Samour D, Douet L, J C. Peptides from milk proteins implicated in antithrombosis and immunomodulation. *New Perspectives in Infant Nutrition: Symposium Antwerp*. New York, NY: Thieme Medical Publishers; 1992. p. 160-72.
75. Rupa P, L. Schnarr, Mine Y. Effect of heat denaturation of egg white proteins ovalbumin and ovomucoid on CD4+ T cell cytokine production and human mast cell histamine production. *Journal of Functional Foods* 2015(18): 28-34. [\[CrossRef\]](#)
76. Lee JH, Paik HD. Anticancer and immunomodulatory activity of egg proteins and peptides: a review. *Poultry Science* 2019; 98(12): 6505-16. [\[CrossRef\]](#)
77. Duarte J, Vinderola G, Ritz B, Perdigon G, Matar C. Immunomodulating capacity of commercial fish protein hydrolysate for diet supplementation. *Immunobiology* 2006; 211(5): 341-50. [\[CrossRef\]](#)
78. Chalamaiah M, Jyothirmayi T, Diwan PV, Dinesh Kumar B. Anti-proliferative, ACE-inhibitory and functional properties of protein hydrolysates from rohu (*Labeo rohita*) roe (egg) prepared by gastrointestinal proteases. *Journal of Food Science and Technology* 2015; 52(12): 8300-7. [\[CrossRef\]](#)
79. Achour A, Lachgar A, Astgen A, Chams V, Bizzini B, Tapiero H, et al. Potentialization of IL-2 effects on immune cells by oyster extract (JCOE) in normal and HIV-infected individuals. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 1997; 51(10): 427-9. [\[CrossRef\]](#)
80. Horiguchi N, Horiguchi H, Suzuki Y. Effect of wheat gluten hydrolysate on the immune system in healthy human subjects. *Bio-science, Biotechnology, and Biochemistry* 2005; 69(12): 2445-9. [\[CrossRef\]](#)
81. Wischmeyer PE, Riehm J, Singleton KD, Ren H, Musch MW, Kahana M, et al. Glutamine attenuates tumor necrosis factor- α release and enhances heat shock protein 72 in human peripheral blood mononuclear cells. *Nutrition* 2003; 19(1): 1-6. [\[CrossRef\]](#)
82. Boelens PG, Houdijk AP, Fonk JC, Nijveldt RJ, Ferwerda CC, Von Blomberg-Van Der Flier BM, et al. Glutamine-enriched enteral nutrition increases HLA-DR expression on monocytes of trauma patients. *The Journal of Nutrition* 2002; 132(9): 2580-6. [\[CrossRef\]](#)
83. Tao KM, Li XQ, Yang LQ, Yu WF, Lu ZJ, Sun YM, et al. Glutamine supplementation for critically ill adults. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 2014(9): CD010050. [\[CrossRef\]](#)
84. Girón-Calle J, Alaiz M, J V. Effect of chickpea protein hydrolysates on cell proliferation and *in vitro* bioavailability. *Food Research International* 2010; 43(5). [\[CrossRef\]](#)
85. Kong X, Guo M, Hua Y, Cao D, Zhang C. Enzymatic preparation of immunomodulating hydrolysates from soy proteins. *Bioresource Technology* 2008; 99(18): 8873-9. [\[CrossRef\]](#)
86. Chang HC, Lewis D, Tung CY, Han L, Henriquez SM, Voiles L, et al. Soy peptide lunasin in cytokine immunotherapy for lymphoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy* : CII 2014; 63(3): 283-95. [\[CrossRef\]](#)
87. Mahima, Ingle AM, Verma AK, Tiwari R, Karthik K, Chakraborty S, et al. Immunomodulators in day to day life: a review. *Pakistan Journal of Biological Sciences : PJBs* 2013; 16(17): 826-43. [\[CrossRef\]](#)
88. Quadro L, Gamble MV, Vogel S, Lima AA, Piantedosi R, Moore SR, et al. Retinol and retinol-binding protein: gut integrity and circulating immunoglobulins. *The Journal of Infectious Diseases* 2000; 182(Suppl 1): S97-S102. [\[CrossRef\]](#)
89. Ertesvag A, Engedal N, Naderi S, Blomhoff HK. Retinoic acid stimulates the cell cycle machinery in normal T cells: involvement of retinoic acid receptor-mediated IL-2 secretion. *Journal of Immunology* 2002; 169(10): 5555-63. [\[CrossRef\]](#)
90. Huang Z, Liu Y, Qi G, Brand D, Zheng SG. Role of Vitamin A in the Immune System. *Journal of Clinical Medicine* 2018; 7(9). [\[CrossRef\]](#)
91. Pereira WF, Ribeiro-Gomes FL, Guillermo LV, Vellozo NS, Montalva F, Dosreis GA, et al. Myeloid-derived suppressor cells help protective immunity to *Leishmania major* infection despite suppressed T cell responses. *Journal of Leukocyte Biology* 2011; 90(6): 1191-7. [\[CrossRef\]](#)
92. Shrestha S, Kim SY, Yun YJ, Kim JK, Lee JM, Shin M, et al. Retinoic acid induces hypersegmentation and enhances cytotoxicity of neutrophils against cancer cells. *Immunology Letters* 2017; 182: 24-9. [\[CrossRef\]](#)
93. Fenaux P, Chastang C, Chevret S, Sanz M, Dombret H, Archimbaud E, et al. A randomized comparison of all transretinoic acid (ATRA) followed by chemotherapy and ATRA plus chemotherapy and the role of maintenance therapy in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *The European APL Group. Blood* 1999; 94(4): 1192-200. [\[CrossRef\]](#)
94. Sakane T, Takada S, Kotani H, Tsunematsu T. Effects of methyl-B12 on the *in vitro* immune functions of human T lymphocytes. *Journal of Clinical Immunology* 1982; 2(2): 101-9. [\[CrossRef\]](#)
95. Ingram CF, Davidoff AN, Marais E, Sherman GG, Mendelow BV. Evaluation of DNA analysis for evidence of apoptosis in megaloblastic anaemia. *British Journal of Haematology* 1997; 96(3): 576-83. [\[CrossRef\]](#)
96. Tamura J, Kubota K, Murakami H, Sawamura M, Matsushima T, Tamura T, et al. Immunomodulation by vitamin B12: augmentation of CD8+ T lymphocytes and natural killer (NK) cell activity in vitamin B12-deficient patients by methyl-B12 treatment. *Clinical and Experimental Immunology* 1999; 116(1): 28-32. [\[CrossRef\]](#)
97. Hosseinzadeh H, Moallem SA, Moshiri M, Sarnavazi MS, Etemad L. Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of cyanocobalamin (vitamin B12) against acute and chronic pain and inflammation in mice. *Arzneimittel-Forschung* 2012; 62(7): 324-9. [\[CrossRef\]](#)
98. Guerra BA, Bolin AP, Otton R. Carbonyl stress and a combination of astaxanthin/vitamin C induce biochemical changes in human neutrophils. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 2012; 26(7): 1181-90. [\[CrossRef\]](#)
99. Hartel C, Strunk T, Bucsky P, Schultz C. Effects of vitamin C on intracytoplasmic cytokine production in human whole blood monocytes and lymphocytes. *Cytokine* 2004; 27(4-5): 101-6. [\[CrossRef\]](#)
100. El-Zayat SR, Sibaii H, FA. M. Micronutrients and many important factors that affect the physiological functions of toll-like receptors. *Bulletin of the National Research Centre* 2019; 43: 123. [\[CrossRef\]](#)
101. Korf H, Decallonne B, Mathieu C. Vitamin D for infections. *Current opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity* 2014; 21(6): 431-6. [\[CrossRef\]](#)
102. Myszka M, Klinger M. [The immunomodulatory role of Vitamin D]. *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej* 2014; 68: 865-78. [\[CrossRef\]](#)
103. Sadeghi K, Wessner B, Laggner U, Ploder M, Tamandl D, Friedl J, et al. Vitamin D3 down-regulates monocyte TLR expression and triggers hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular patterns. *European Journal of Immunology* 2006; 36(2): 361-70. [\[CrossRef\]](#)
104. Gal-Tanamy M, Bachmetov L, Ravid A, Koren R, Erman A, Tur-Kaspa R, et al. Vitamin D: an innate antiviral agent suppressing hepatitis C virus in human hepatocytes. *Hepatology* 2011; 54(5): 1570-9. [\[CrossRef\]](#)

105. Battault S, Whiting SJ, Peltier SL, Sadrin S, Gerber G, Maixent JM. Vitamin D metabolism, functions and needs: from science to health claims. *European Journal of Nutrition* 2013; 52(2): 429-41. [\[CrossRef\]](#)
106. Pettengill MA, van Haren SD, Levy O. Soluble mediators regulating immunity in early life. *Frontiers in Immunology* 2014; 5: 457. [\[CrossRef\]](#)
107. Pekmezci D. Vitamin E and immunity. *Vitamins and Hormones* 2011; 86: 179-215. [\[CrossRef\]](#)
108. Wu D, Meydani SN. Age-associated changes in immune and inflammatory responses: impact of vitamin E intervention. *Journal of Leukocyte Biology* 2008; 84(4): 900-14. [\[CrossRef\]](#)
109. Malmberg KJ, Lenkei R, Petersson M, Ohlum T, Ichihara F, Glime-lius B, et al. A short-term dietary supplementation of high doses of vitamin E increases T helper 1 cytokine production in patients with advanced colorectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2002; 8(6): 1772-8.
110. Wessels I, Maywald M, Rink L. Zinc as a Gatekeeper of Immune Function. *Nutrients* 2017; 9(12). [\[CrossRef\]](#)
111. Hojyo S, Fukada T. Roles of Zinc Signaling in the Immune System. *Journal of Immunology Research* 2016; 2016: 6762343. [\[CrossRef\]](#)
112. Gammoh NZ, Rink L. Zinc in Infection and Inflammation. *Nutrients* 2017; 9(6). [\[CrossRef\]](#)
113. Veldhuis NA, Valova VA, Gaeth AP, Palstra N, Hannan KM, Michell BJ, et al. Phosphorylation regulates copper-responsive trafficking of the Menkes copper transporting P-type ATPase. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2009; 41(12): 2403-12. [\[CrossRef\]](#)
114. Katona P, Katona-Apte J. The interaction between nutrition and infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2008; 46(10): 1582-8. [\[CrossRef\]](#)
115. Albiger B, Sandgren A, Katsuragi H, Meyer-Hoffert U, Beiter K, Wartha F, et al. Myeloid differentiation factor 88-dependent signalling controls bacterial growth during colonization and systemic pneumococcal disease in mice. *Cellular Microbiology* 2005; 7(11): 1603-15. [\[CrossRef\]](#)
116. Balounova J, Vavrochova T, Benesova M, Ballek O, Kolar M, Filipp D. Toll-like receptors expressed on embryonic macrophages couple inflammatory signals to iron metabolism during early ontogenesis. *European Journal of Immunology* 2014; 44(5): 1491-502. [\[CrossRef\]](#)
117. Hoelt K, Bloch DB, Graw JA, Malhotra R, Ichinose F, Bagchi A. Iron Loading Exaggerates the Inflammatory Response to the Toll-like Receptor 4 Ligand Lipopolysaccharide by Altering Mitochondrial Homeostasis. *Anesthesiology* 2017; 127(1): 121-35. [\[CrossRef\]](#)
118. Wang C, Zhang R, Wei X, Lv M, Jiang Z. Metalloimmunology: The metal ion-controlled immunity. *Advances in Immunology* 2020; 145: 187-241. [\[CrossRef\]](#)
119. Guven E, Duus K, Laursen I, Hojrup P, Houen G. Aluminum hydroxide adjuvant differentially activates the three complement pathways with major involvement of the alternative pathway. *PLoS One* 2013; 8(9): e74445. [\[CrossRef\]](#)
120. Wenzel BE, Chow A, Baur R, Schleusener H, Wall JR. Natural killer cell activity in patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. *Thyroid* 1998; 8(11): 1019-22. [\[CrossRef\]](#)
121. Venturi S, Donati FM, Venturi A, Venturi M, Grossi L, Guidi A. Role of iodine in evolution and carcinogenesis of thyroid, breast and stomach. *Adv Clin Path* 2000; 4(1): 11-7.
122. Zhao SJ, Sun FJ, Tian EJ, Chen ZP. [The effects of iodine/selenium on the function of antigen presentation of peritoneal macrophages in rats]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 2008; 42(7): 485-8.
123. Sampson HA. Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1999; 103(5 Pt 1): 717-28. [\[CrossRef\]](#)
124. Ashkenazy Y, Moshonov S, Fischer G, Feigel D, Caspi A, Kusniec F, et al. Magnesium-deficient diet aggravates anaphylactic shock and promotes cardiac myolysis in guinea pigs. *Magn Trace El* 1990; 9(5): 283-8.
125. Puertollano MA, Puertollano E, de Cienfuegos GA, de Pablo MA. Dietary antioxidants: immunity and host defense. *Curr Top Med Chem* 2011; 11(14): 1752-66. [\[CrossRef\]](#)
126. Huang Z, Rose AH, Hoffmann PR. The role of selenium in inflammation and immunity: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2012; 16(7): 705-43. [\[CrossRef\]](#)
127. Ren F, Chen X, Hesketh J, Gan F, Huang K. Selenium promotes T-cell response to TCR-stimulation and ConA, but not PHA in primary porcine splenocytes. *PLoS One* 2012; 7(4): e35375. [\[CrossRef\]](#)
128. Buyukozturk S, Gelincik A, Ozseker F, Genc S, Savran FO, Kiran B, et al. Nigella sativa (black seed) oil does not affect the T-helper 1 and T-helper 2 type cytokine production from splenic mononuclear cells in allergen sensitized mice. *J Ethnopharmacol* 2005; 100(3): 295-8. [\[CrossRef\]](#)
129. Jacob A, Wu R, Zhou M, Wang P. Mechanism of the Anti-inflammatory Effect of Curcumin: PPAR-gamma Activation. *PPAR Research* 2007; 2007: 89369. [\[CrossRef\]](#)
130. Al-Suhaimi EA, Al-Riziza NA, Al-Essa RA. Physiological and therapeutic roles of ginger and turmeric on endocrine functions. *The American journal of Chinese Medicine* 2011; 39(2): 215-31. [\[CrossRef\]](#)
131. Arreola R, Quintero-Fabian S, Lopez-Roa RI, Flores-Gutierrez EO, Reyes-Grajeda JP, Carrera-Quintanar L, et al. Immunomodulation and anti-inflammatory effects of garlic compounds. *Journal of Immunology Research* 2015; 2015: 401630. [\[CrossRef\]](#)
132. Onbaşı D, Çelik GY, Kahraman S, MK. Apiterapi ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri Erciyes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi 2019; 16(1): 49-56. [\[CrossRef\]](#)
133. Elberry AA, Mufti S, Al-Maghrabi J, Abdel Sattar E, Ghareib SA, Mosli HA, et al. Immunomodulatory effect of red onion (*Allium cepa* Linn) scale extract on experimentally induced atypical prostatic hyperplasia in Wistar rats. *Mediators of Inflammation* 2014; 2014: 640746. [\[CrossRef\]](#)
134. Im K, Lee JY, Byeon H, Hwang KW, Kang W, Whang WK, et al. *In Vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of the ethanol extract of eggplant (*Solanum melongena*) stalks in macrophage RAW 264.7 cells. *Food and Agricultural Immunology* 2016; 27(6): 758-71. [\[CrossRef\]](#)
135. Cherng JM, Chiang W, LC. C. Immunomodulatory activities of common vegetables and spices of Umbelliferae and its related coumarins and flavonoids. *Food Chemistry* 2008; 106(3): 944-50. [\[CrossRef\]](#)
136. Skinner MA, Bentley-Hewitt K, Rosendale D, Naoko S, Pernthaner A. Effects of kiwifruit on innate and adaptive immunity and symptoms of upper respiratory tract infections. *Advances in Food and Nutrition Research* 2013; 68: 301-20. [\[CrossRef\]](#)
137. Iwasawa H, Morita E, Ueda H, MY. Influence of kiwi fruit on immunity and its anti-oxidant effects in mice. *Food Science and Technology Research* 2010(16): 135-42. [\[CrossRef\]](#)
138. Tezuka H, Imai S. Immunomodulatory Effects of Soybeans and Processed Soy Food Compounds. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture* 2015; 7(2): 92-9. [\[CrossRef\]](#)
139. Yamazaki K, Murray JA, Kita H. Innate immunomodulatory effects of cereal grains through induction of IL-10. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2008; 121(1): 172-8 e3. [\[CrossRef\]](#)

140. Ye M, Liu JK, Lu ZX, Zhao Y, Liu SF, Li LL, et al. Grifolin, a potential antitumor natural product from the mushroom *Albatrellus confluens*, inhibits tumor cell growth by inducing apoptosis *in vitro*. *FEBS Letters* 2005; 579(16): 3437-43. [\[CrossRef\]](#)
141. Rahayu RP, Prasetyo RA, Purwanto DA, Kresnoadi U, Iskandar RPD, Rubianto M. The immunomodulatory effect of green tea (*Camellia sinensis*) leaves extract on immunocompromised Wistar rats infected by *Candida albicans*. *Veterinary World* 2018; 11(6): 765-70. [\[CrossRef\]](#)
142. Surjushe A, Vasani R, Saple DG. Aloe vera: a short review. *Indian Journal of Dermatology* 2008; 53(4): 163-6. [\[CrossRef\]](#)
143. Kim HS, Kacew S, Lee BM. *In vitro* chemopreventive effects of plant polysaccharides (*Aloe barbadensis miller*, *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum* and *Coriolus versicolor*). *Carcinogenesis* 1999; 20(8): 1637-40. [\[CrossRef\]](#)

COVID-19'da Antikor Bağımlı İmmünpatoloji, Monoklonal Antikorlar ve Mutasyonlar

Antibody-depent Immunopathology, Monoclonal Antibodies and Mutations in COVID-19

Bülent Çakal¹ 

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

ORCID ID: B.Ç. 0000-0002-1254-844X

Cite this article as: Çakal, B. COVID-19'da antikor bağımlı İmmünpatoloji, monoklonal antikorlar ve mutasyonlar. Experimed 2020; 10(2): 112-8.

ÖZ

Şiddetli akut solunum sendromu ilişkili bir koronavirusun (SARS-CoV-2) etiyolojik etken olduğu koronavirus 19 hastalığı (COVID-19) pandemisi mevcut ve olası sonuçları ile tüm dünyayı etkisi altına almıştır. COVID-19 ile mücadelede ve SARS-CoV-2 enfeksiyonun önlenmesinde aşı dizaynı ve potansiyel terapötiklerin veya hedeflerin belirlenmesi önceliklidir. Viral enfeksiyonlara karşı oluşan humoral immün yanıt patojenlerin temizlenmesi ve yeniden bulaşmadan korunmak için kritik öneme sahiptir. Buna karşın özellikle düşük afiniteli antikorlar, antikor bağımlı alevlenme (ADE) olarak bilinen immün patolojilere neden olabilirler. ADE özellikle aşı tasarımı için önemli sıkıntılara neden olabilir. Nötralizan etkinliğe sahip insan monoklonal antikorları SARS-CoV-2 enfeksiyonunun tedavisinde alternatif bir seçenek oluşturmaktadır. Dolayısıyla SARS-CoV-2 enfeksiyonunun tedavisindeki terapötik monoklonal antikorları tanımlamaya yönelik araştırmalar halen devam etmektedir. Viral mutasyonların tanımlanması ve dinamiğinin anlaşılması salgının seyri ve kontrolü için kritik öneme sahiptir. RNA virüslerinin polimeraz enzimlerinin hata düzeltme aktivitesinin eksik olması nedeniyle SARS-CoV-2'nin de diğer RNA virüslerine benzer olarak mutasyon oranlarının DNA virüslerine göre daha yüksek olması beklenir. Buna karşın pandemi sürecinde meydana gelen viral mutasyonların yönünü ve etkilerini öngörmek zordur. Bu derlemede ADE, monoklonal antikorlar ve mutasyonların COVID-19 pandemisi üzerine olası etkilerine yönelik bilimsel verilerin irdelenmesi amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Koronavirüs, SARS-CoV-2, COVID-19, antikor bağımlı alevlenme, monoklonal antikor, viral mutasyonlar, doğal seleksiyon

ABSTRACT

The Coronavirus disease 19 (COVID-19) pandemic which is the etiological agent of a severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV-2) has influenced the whole world with the current and possible results. In order to intervene on COVID-19 and to prevent the SARS-CoV-2 infection, a vaccine design and identification of potential therapeutics and/or targets are a priority. The humoral immune responses to viral infections have critical importance for the clearance of pathogens and also to protect from reinfections. However, particularly low affinity antibodies can cause an immune pathology known as antibody-dependent enhancement (ADE). ADE can cause important adversity especially for vaccine designs. Human monoclonal antibody with neutralizing activity is an alternative option in the treatment of the SARS-CoV-2 infection. So, research is ongoing to identify therapeutic monoclonal antibodies in the treatment of the SARS-CoV-2 infection. Identification and understanding of the dynamics of viral mutations is of critical importance to the course and control of the outbreak. Due to the lack of error correction activity of RNA virus polymerases, similar to other RNA viruses of SARS-CoV-2 is expected to have higher mutation rates than DNA viruses. For all the direction and effects of viral mutations occurring during the pandemic are difficult to predict. This review aimed to examine scientific data about ADE, monoclonal antibodies and the possible effects of mutations on the course of the COVID-19 pandemic.

Keywords: Coronavirus, SARS-CoV-2, COVID-19, antibody-dependent enhancement, monoclonal antibodies, viral mutations, natural selection

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Bülent Çakal **E-posta:** bulentcakal@yahoo.com

Başvuru/Submitted: 27.05.2020 **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 13.07.2020

Son Revizyon/Last Revision Received: 21.07.2020 **Kabul/Accepted:** 06.08.2020



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

GİRİŞ

Virüslerin etiyolojik etkeni olduğu enfeksiyon hastalıklarından korunma ve virüslerin eliminasyonunda antikorlar ve antikor aracılı immünite, birey ve toplum sağlığının korunması açısından yaşamsal öneme sahiptir. Akut viral solunum yolu enfeksiyonları ile ilişkili patolojiler virüs ve/veya immün yanıtlara bağlı olarak gelişebilmektedir. COVID-19'da yetersiz doğal immün yanıtlar ile abartılı adaptif immün yanıtların, hastalığın klinik seyri ve sonuçları üzerinde belirleyici olduğu anlaşılmaktadır.

Antikor yanıtlarının niceliği ve niteliği, ilişkili oldukları efektör immün fonksiyonlar ve sonuçları üzerinde belirleyici etkinliğe sahiptir. Yüksek afiniteli antikorlar spesifik viral epitoplara tanınarak uygun nötralizasyon sağlayabilirler. Nötralizan antikorlar *in vitro* düzeyde viral giriş, füzyon ya da virion'un hücre dışına salınımını bloke etme kapasiteleriyle tanımlanırlar. *In vivo* düzeyde ise nötralizan antikorlar aracısız olarak fonksiyonel olabilirler. SARS-CoV-2 insan anjiyotensin dönüştürücü enzim 2'yi (human angiotensin-converting enzyme 2; hACE2) hücre girişi için fonksiyonel bir reseptör olarak kullanır. Koronavirüslerin spike proteinleri (S) virüsün konak hücreye girişine aracılık eden reseptör tanıma ve membran füzyonunu içeren iki kritik fonksiyona sahiptir. Spike proteini reseptör bağlayan alt birim (S1) ve membran füzyonu ile ilişkili alt birim (S2)'den oluşur. SARS-CoV-2'nin spike proteininin reseptör bağlanma domeninde (RBD) yer alan spesifik nötralizan antikorlar, konak hücre yüzeyinde yer alan ACE2 aracılı viral bağlanmayı nötralize edebilir. Benzer şekilde S2 protein ilişkili viral füzyon da S2 içerisinde yer alan heptad tekrar 2 domainini (HR2) hedef alan nötralizan antikorlar tarafından da viral giriş bloke edilebilir. Nötralizan antikorlar ayrıca kompleman komponentleri, fagositler ve doğal öldürücü (Natural killer; NK) hücreler gibi immün sistemin diğer hücrel bileşenleri ile etkileşebilmektedir. NK hücreleri enfekte hücreler üzerindeki viral protein komplekslerini Ig'nin Fc domainine karşı yüzeylerindeki taşıdıkları Fc reseptörler (Fc receptors; FcRs) gama (Fc.Rs) aracılığıyla tanıyarak, antikor bağımlı sitotoksizite oluştururlar. Miyeloid hücreler de antikorlar ile opsonize olan hücreleri tanımak için bu etkileşimi kullanarak, antikor bağımlı hücrel fagositozis geliştirirler. Gerek NK hücreleri aracılı antikor bağımlı sitotoksizite gerekse miyeloid hücreler aracılı antikor bağımlı hücrel fagositoz antiviral hücrel immünitenin efektör fonksiyonlarını oluşturur. Dolayısıyla bu efektör yanıtlar fagositlerin eşliğinde antikor ilişkili immünite aracılığıyla patojenin eliminasyonuna katkıda bulunabilir. Buna karşın nadiren de olsa patojene spesifik antikorlar, antikor bağımlı alevlenme (ADE) olarak da bilinen bir olağan dışılık sonucunda patolojilere yol açabilirler (1-6).

SARS-CoV-2 enfeksiyonunun klinik seyri ve sonuçları enfekte bireyin düzelmesine imkan veren asemptomatik, hafif ve orta şiddetli enfeksiyondan, ani ve hızlı gelişen yoğun enflamasyon ve sitokin fırtınası ile karakterize, pulmoner tromboz ve bunun sonucu enfekte bireyin ölümüne kadar uzanan geniş bir yelpazede değişkenlik gösterebilmektedir. COVID-19'un patogenezinde humoral immün yanıtların rolü henüz net değildir. SARS-CoV-2 ile enfekte bireylerde virüse karşı gelişen spesifik antikor

düzeylerinin hastalığın klinik şiddeti ile orantılı olmasına karşın klinik sonuçları ile orantılı olmaması, nötralizan antikorların tek başına hastalık şiddetini azaltma ve viral eliminasyondan daha ziyade enfeksiyona karşı koruyucu nitelikte olabileceğine işaret etmektedir (7,8).

ADE ilişkili immünpatojiler ve sonuçları, şiddetli dengue virüs (DENV) enfeksiyonunun immünpatogenezini açıklamak için uzun süredir hipotez edilmekte ve ayrıca insan immün yetmezlik virüsü (Human immunodeficiency virus; HIV), influenza ve Ebola virüsü de içeren diğer virüsler için de rapor edilmektedir (9-12). Dengue virüs serotiplerinden biriyle primer enfeksiyon, kişiyi heterolog DENV serotipiyle sekonder enfeksiyon oluşması halinde hastalığın daha şiddetli geçmesine duyarlı hale getirebilmektedir. Duyarlı bireylere kimerik dört değerli canlı rekombinant dengue aşısı uygulanması sonrası hastane başvuru oranında artışın varlığı, dengue'ye karşı orta düzeyde maternal antikorlara sahip infantlarda hastalık riskinin artışına dair bulguların, dengue patogenezinde antikorların rolünü destekleyen önemli kanıtlar olduğu öne sürülmektedir (13-16). Benzer mekanizma kedilerde ölümle sonuçlanabilen hastalığa sebep olan feline infectious peritonitis virüs olarak adlandırılan koronaviruslar ile enfekte seronegatif ve seropozitif yavru kedilerde de tanımlanmıştır (17). Infantlarda endemik hCoV ilişkili en yüksek alt solunum yolu enfeksiyon yükü %7,8; 6 aya kadarki dönemde %1,5; 2-5 yaş arasında ise sifıra yakın aralığında olmasına karşın, üst solunum yolu enfeksiyon yükünün yaş aralığının benzer olması, alt solunum sisteminde maternal koruyucu immünitenin orta düzeylere düşmesi sonrası yüksek hastalık yükü ve bu durumun antikor sirkülasyonunun olmadığı üst solunum yollarında gözlemlenmemesine ilişkin verilerin de hCoV enfeksiyonlarında ADE olasılığını destekler nitelikte olabileceği belirtilmiştir (18).

SARS-CoV enfeksiyonlarında ADE, monosit, makrofaj ve B hücreleri gibi farklı immün hücreler üzerinde eksprese edilen FcRs ile ilişkilidir. Önceden var olan SARS-CoV'e spesifik antikorlar FcR eksprese eden hücrelere viral girişi olanaklı hale getirebilmektedir. Kısaca önceden var olan antikorların Fab domainler aracılığıyla yeni enfeksiyon etkeni olan virüsün antijenik epitoplarına, Fc domainleri aracılığıyla da FcR eksprese eden hücrelere bağlanması sonucu oluşan etkileşim zinciri enfeksiyon etkeni olan yeni virüsün FcR eksprese eden hücrelere girişini ve bu hücreleri enfekte etmesini olanaklı kılabilir. Nihayetinde bu süreç ACE2 ekspresyonu, endozomal pH ve proteazlardan bağımsız olup, ACE2 dışında hücre içine FcR ilişkili viral girişi ifade etmektedir (19,20).

ADE'nin enfekte konakta SARS-CoV'in yayılımına olanak tanıdığına dair henüz net bir kanıt yoktur. Gerçekte ADE aracılı makrofaj enfeksiyonu, viral replikasyon ve sentez edilen yeni virionun hücre dışına salınımı ile karakterize viral biyogenez ile sonuçlanmaz. Bununla birlikte virüs-antikor immün komplekslerinin birlikteliği, enflamasyonu ve FcRs eşliğinde miyeloid hücrelerin aktivasyonu aracılığıyla doku hasarını teşvik edebilir. Bu şekilde endozom içine ulaşan virüs, RNA'ya duyarlı Toll benzeri reseptörler (Toll-like receptors; TLRs) TLR3, TLR7 ve

TLR8 tarafından tanınır. Makrofajlara ADE aracılı SARS-CoV girişi, TNF ve IL-6 sentezinin artışı indükler. SARS-CoV ile enfekte farelerde ADE'nin IL-10 ve TGF β gibi anti-enflamatuvar sitokin düzeylerinde azalma, CCL2 ve CCL3 gibi pro-enflamatuvar kemokin düzeylerinin ise artışı ile ilişkili olabildiği gösterilmiştir. Dolayısıyla SARS-CoV'ların orijinal boyutlarına sahip spike proteinini kodlayan modifiye aşı virüsü Ankara (modified vaccinia Ankara; MVA) ile insan dışı primatların immünizasyonunun alveoler makrofajların aktivasyonunu teşvik ederek, akut akciğer hasarına neden olabildiği gösterilmiştir (19-23).

Bir antikorun nötralizasyon kapasitesi ve konağı koruma kapasitesi ya da ADE'ye ve akut enflamasyona neden olup olmayaacağı, antikorun spesifitesi, konsantrasyonu, afinitesi ve izotipi gibi çoklu faktörler tarafından belirlenir. Bu açıdan SARS-CoV S ve nükleokapsid (nucleocapsid; N) proteinini kodlayan viral vektör aşılı aracılığıyla anti-S IgG ve anti-N IgG immünizasyonu teşvik edilen farelerde gerçekleştirilen yeniden bulaşma modeli çalışmalarında, viral N proteine karşı bağışıklık kazanan farelerde pro-enflamatuvar sitokinlerin sekresyonu sonucu akciğerlere nötrofil ve eozonofil infiltrasyonunun artışı ile karakterize daha şiddetli akciğer patolojilerinin geliştiği gözlemlenmiştir. Benzer olarak insan dışı primatlarda gerçekleştirilen yeniden bulaşma çalışmalarında da viral spike proteininin RBD ve HR2 epitoplarına karşı oluşan antikorların koruyucu etkinliğinin daha iyi olduğu, buna karşın spike proteininin diğer epitoplarına karşı gerçekleştirilen immünizasyonun ise ADE'yi indükleyebildiği gösterilmiştir (22,24,25).

In vitro deneysel veriler FcRs eksprese eden hücreler için ADE'nin daha çok, düşük antikor konsantrasyonu varlığında gerçekleştiği, yüksek antikor konsantrasyonunun ise SARS-CoV'lerin konak hücre içine girişini nötralize edebilme kapasitesini artırdığı, dolayısıyla yüksek afiniteli antikorların ADE'den ziyade virüsün reseptöre bağlanmasını bloke etme eğiliminde olduğuna işaret etmektedir. Bu açıdan hem ACE2 hem de Fc γ RII eksprese eden insan pnömosit hücre hatlarında yapılan bir çalışmada hastalardan elde edilen anti-SARS-CoV serumu 1/100-2000 dilüsyonda deney ortamına eklendiğinde, virüsün indüklediği apoptozis ve enfektivitenin arttığı, buna karşın deney ortamına daha yüksek konsantrasyonlarda serum eklendiğinde ise nötralizasyon varlığının gözlemlendiği rapor edilmiştir (20,21).

Antikorların efektör fonksiyonları izotipleri tarafından kontrol edilir. Bu açıdan IgM'in kompleman aktivasyonu üzerinden pro-enflamatuvar yanıtları aktive edebildiği, IgG alt sınıflarının ise bağlandığı farklı FcR'leri aracılığıyla immün yanıtlar üzerinde düzenleyici etkilere sahip olduğu kabul edilir. Fc γ R'lerinin çoğunun sinyal iletimi tirozin bazlı immün reseptör aktivasyon motifi (immunoreceptor tyrosine-based activation motif; ITAM) aracılığıyla gerçekleşmesine karşın Fc γ RIIb ise sitoplazmik kuyruğu üzerinde anti-enflamatuvar yanıtlar ile ilişkili tirozin bazlı immün reseptör inhibisyon motifi (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif; ITIM) içerir. Fc γ RI ve Fc γ RIIIa içermeyen Fc γ RIIa ve Fc γ RIIb'nin ektopik ekspresyonunun SARS-CoV enfeksiyonunda ADE'yi indükleyebildiği, Fc γ RIIIa allel polimorfizminin SARS patolojileri ile ilişkili olabildiği, bu açıdan IgG1

ve IgG2 bağlayan Fc γ RIIIa izoformlarının sadece IgG2 bağlayan izoformlarına göre daha şiddetli hastalık gelişmesi ile ilişkili olabildiği rapor edilmiştir (20).

SARS-CoV-2'ye karşı uygun koruyucu antikor yanıtlarının oluşturulması amacıyla aşı ve adjuvanların tanımlanması kritik önem taşımaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda inaktive SARS-CoV virüsü ile farelerin, S protein kodlayan MVA ile rhesus macaques cinsi maymunların ve S proteini kodlayan DNA aşılı ile farelerin immunizasyonunun, genellikle düşük nitelik ve nicelikteki antikor sentezine neden olarak, ADE ve çeşitli düzeylerde eozinofil aracılı immunopatolojileri indükleyebildikleri rapor edilmiştir (23,26). Ayrıca aşılardan güvenliği ve etkinliğinin değerlendirilmesinde konağın yaşı da önem taşımaktadır. Bu açıdan yaşlı farelerde iki aşamalı inaktive SARS-CoV aşı uygulamasının nötralizan antikor yanıtlarını indüklemeye başarısız olduğu gösterilmiştir. Alüminyum türevi adjuvanlar içeren iki aşamalı inaktive SARS-CoV aşılı yaşlı farelerde yüksek titrelerde antikor yanıtlarını indüklemesine karşın, Th2 (tip 2 yardımcı T; T helper 2) tip immün yanıtlar ile ilişkili IgG2 yerine eozonofil ve akciğer patolojileri oluşmasına katkıda bulunabilme potansiyeli taşıyan IgG1 tipindeki yanıtların oluşmasına neden olabildiği de saptanmıştır (26). Bunun aksine fare çalışmaları spike protein RBD'ni içindeki spesifik epitoplara karşı antikor yanıtını hedef alan fraksiyonlarının veya peptid aşılının koruyucu antikor yanıtlarının gelişiminde daha uygun olabildiği gösterilmiştir (4). Ayrıca canlı-atenüe SARS-CoV aşılının da yaşlı farelerde koruyucu immün yanıtları indükleyebildiği gösterilmiştir (27). SARS-CoV RBD'sini kodlayan rekombinant Adeno-ilişkili virüs aşılının intranazal uygulanmasının intramusküler uygulamalara oranla akciğerlerde daha yüksek titrelerde IgA yanıtını indükleyebildiği ve akciğer patolojilerini azaltabildiği rapor edilmiştir (4).

Bununla birlikte henüz viral enfeksiyonunun şiddetinin kaynağının antikor veya T hücre ilişkili immün ya da konak faktörleri ile ilişkili olup olmadığını ayıracak herhangi bir klinik yada laboratuvar parametresi mevcut değildir. Virüs ve konak immün hücreler ile immün hücrelerin kendi arasındaki etkileşimleri türe özgü olması da *in vitro* ve deney hayvanları kullanılarak gerçekleştirilen bilimsel çalışma verilerinin insan ADE ilişkili immünopatolojilere uyarlanmasını sınırlayabilmektedir. Niyahetinde geçirilmiş enfeksiyon, aşı veya pasif transfer yolu ile edinilen, patojene spesifik antikorların, virüse ve enfekte bireyin immünolojik ve genetik faktörlerine bağlı olarak, enfekte kişide hastalığın şiddetlenmesi olarak tanımlanan ADE'ye ilişkin klinik verileri henüz kısıtlıdır (28).

Tüm dünyada SARS-CoV-2'ye yönelik immünizasyon sağlanması amacıyla nükleik asit, viral vektör ve fraksiyonel aday aşılardan oluşan çok yönlü, çok merkezli çalışmalar, preklinik ve klinik deneme aşamalarında sürdürülmektedir. Ancak COVID-19'lu hastalarda SARS-CoV-2 N ve S proteinlerine karşı oluşan yüksek titreli IgM ve IgG sınıfı antikor yanıtlarının bazı hastalarda zararlı etkilerinin olabileceğini yönünde değerlendirmeler de bulunmaktadır (29,30). Buna karşın orta şiddetli seyreden COVID-19 sonrası iyileşme saptanan hastaların %70'inde ölçüle-

bilir düzeyde nötralizan antikor yanıtlarının varlığı ve bunların özelliklerinin belirlenmesi aşı hazırlanmasına yönelik çalışmalara katkı sağlayacaktır (31). Dolayısıyla SARS-CoV-2'ye yönelik aday aşılarda güvenlik değerlendirmesi kapsamında ADE'nin de dikkate alınması gerektiği ve ayrıca güvenilir ve efektif nötralizasyon kapasiteleri nedeniyle monoklonal antikor üretiminin de alternatif bir seçenek olabileceği belirtilmektedir (6).

Özellikle virüs ile temas sonrası şiddetli hastalık riski yüksek olan bireylere, hastalık şiddetinin azaltılması veya tedavisi amacıyla profilaktik antikor (monoklonal) uygulamalarının Ebola veya SARS-CoV enfeksiyonlarında da deneyimlendiği üzere güvenli ve etkili olabilmesi nedeniyle, COVID-19 için de nötralizan etkili monoklonal antikorların tespitine yönelik yoğun araştırmalar mevcuttur (32-35).

SARS-CoV-2 yüzey spike proteini virüsün ACE2 reseptörü aracılığıyla hücreye tutunması ve sonrası membran füzyonu aracılığıyla hücreye girişine aracılık eden, hücre ve doku tropizmi ile enfeksiyonun oluşması ve seyrinde kritik belirleyici olan majör antijendir. Dolayısıyla SARS-CoV'lerin spike proteinleri aşılama, antiviral stratejiler, terapötik antikorlar ve tanı için temel hedeflerden birini teşkil etmektedir. Spike proteini konak hücre reseptörüne bağlanmadan sorumlu S1 ve konak hücre membranlarının füzyonundan sorumlu S2 olmak üzere iki alt birimden oluşur. S1'de N-terminal domain (S1-NTD) ve C-terminal domain (S1-CTD) olmak üzere iki önemli domain içerir. S1 domainlerinden biri ya da ikisi potansiyel olarak reseptörleri bağlar ve reseptör bağlayan domaini (RBD) olarak işlev görür (1,36). SARS-CoV-2 ve SARS-CoV'in S proteinleri arasında filogenetik açıdan nükleotid ve aminoasit düzeyinde sırasıyla yaklaşık %73 ve %77 oranında sekans benzerliği içerdiği rapor edilmiştir. Dolayısıyla iki virüs arasındaki yüksek derecedeki sekans benzerliği evrimsel süreç içerisinde iyi korunmuş ve henüz tespit edilememiş çapraz reaktif epitopların var olma olasılığını artırır (37,38).

SARS-CoV ve SARS-CoV-2 RBD'leri arasında yüksek yapısal benzerliğe rağmen, SARS-CoV RBD ile çapraz reaksiyon veren üç monoklonal antikorun (mAbs S230, m396, 80R) SARS-CoV-2 RBD ile bağlanma reaksiyonu vermediği, dolayısıyla iki virüsün RBD'leri arasındaki çapraz antikor yanıtlarının sınırlı olabileceği vurgulanmıştır (39). Geçirdiği SARS-CoV enfeksiyonu sonrası iyileşen bir hastanın konvelesan serumundan CR3022 olarak adlandırılan, İmmünglobulin (Ig) ağır zincirleri V, D, J (variable, diversity, joining) bölgeleri (IGHV, IGHD ve IGHJ) sırasıyla germ-line IGHV5-51, IGHD3-10 ve IGHJ6 genleri tarafından, buna karşın hafif zincir V ve J bölgeleri ise IGKV4-1 ve IGKJ2 genleri tarafından kodlanan, SARS-CoV'ün RBD'nini hedef alan bir nötralizan antikor elde edilmiştir (40). Gerçekleştirilen IgG blast analizlerinde CR3022 IGHV'nin nükleotid sekans düzeyinde germ-line sekansdaki 8 aa değişikliği ile sonuçlanan %3,1 oranında somatik mutasyon, buna karşın CR3022 IGKV'nin nükleotid sekans düzeyinde germ-line sekansdaki 3 aa değişikliği ile sonuçlanan %1,3 oranında somatik mutasyon içerdiği gösterilmiştir (41). Ayrıca CR0322'nin SARS-CoV-2'nin RBD bölgesine bağlanabildiğinin de gösterilmesi çapraz reaksiyon veren epitopun varlığına işaret etmektedir (42).

SARS-CoV-2'nin RBD ile CR0322'nin kristal yapısının tanımlanmasına yönelik bir çalışmada; CR0322'nin RBD ile etkileşim için hem IgG'nin ağır ve hafif zincirlerini hem de 6 adet ek tanımlayıcı bölgeyi kullandığı belirlenmiştir. 11 aa somatik mutasyondan 5'nin CR0322 tarafından tanınan paratop bölgesinde olmasının ise antikorun afinite olgunlaşmasına işaret ettiği belirtilmiştir. Ayrıca CR0322 tarafından tanınan 28 epitopun 24'ünün (%86) SARS-CoV-2 ve SARS-CoV epitopları arasında korunmuş olduğu da belirlenmiştir. Dolayısıyla bu yüksek sekans benzerliğinin çapraz reaktiviteyi açıkladığı, fakat değişime uğrayan epitoplar nedeniyle, CR0322 Fab domaininin SARS-CoV RBD'ne bağlanma afinitesinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir (38). 372. aa pozisyonunda SARS-CoV'nin Treonin (Thr), SARS-CoV-2'nin ise Alanin (Ala) içermesi nedeniyle SARS-CoV'in N370 pozisyonunda oluşan, ek bir N-glikozilasyon alanının CR0322'nin epitopa bağlanma afinitesinde artışa neden olduğu, dolayısıyla bu verilerin SARS-CoV ve SARS-CoV-2 RBD bölgeleri arasındaki antijenik farklılıkların bir kısmının N370 pozisyonundaki N-glikozilasyondan kaynaklanmış olabileceği bildirilmiştir (43). Bu amaçla yapılan mikronötralizasyon deneylerinde, CR022'nin SARS-CoV'i nötralize edebilmesine karşın daha yüksek konsantrasyonlarda dahi SARS-CoV-2'yi nötralize edemediği gösterilmiştir (38). Yine sekans verileri baz alınarak yapılan modelleme çalışmalarında CR022'nin ACE'ye bağlanma uyumunun düşük olduğu, bu açıdan CR022'nin nötralizasyon mekanizmasının reseptör bağlanma blokajından bağımsız olduğu, RBD'ne bağlanmak için ACE2 ile rekabete girmediği, dolayısıyla CR022'nin RBD'yi hedef alan diğer monoklonal antikorlarla birlikte sinerjik etkiye sahip olabileceği belirtilmiştir (40). CR022'nin SARS-CoV-2'nin S protein RBD'ninin açık ve kapalı konformasyonel formlarına karşı afinitesinin farklılık gösterebildiği, ayrıca RBD'nin N terminal bölgesi ile zayıf uyum gösterdiği belirlenmiştir. Buna karşın CR022'nin yapılan ELISA çalışmalarında SARS-CoV-2 ile etkileşebileceği, dolayısıyla SARS-CoV ve SARS-CoV-2 arasında iyi korunmuş benzer kriptomatik epitopların olabileceği belirtilmiştir. Nihayetinde CR022'nin SARS-CoV-2'ye karşı *in-vitro* nötralizasyon kapasitesinin düşük olmasına karşın *in-vivo* nötralizasyon etkinliğinin olabileceği öngörülmüştür (38).

Benzer şekilde 2003 yılı SARS-CoV salgınında enfekte bireylerden viral S proteinine karşı nötralizan etkinliği tanımlanan, S303, S304, S309 ve S315 olarak adlandırılan antikorlardan özellikle S309'un taksonomik olarak *sarbecovirus* alt cinsi içerisinde yer alan SARS-CoV'lerin spike protein RBD'deki korunmuş epitoplara karşı potansiyel nötralizasyon etkinliği gösterilmiştir (44). Çin'in Wuhan bölgesinde SARS-CoV-2 ile enfeksiyon sonrası iyileşen iki bireyin B hücrelerinden elde edilerek, *in vitro* SARS-CoV-2 spike protein RBD'ne karşı potent nötralizan etkinliği belirlenen, COV2-2196 ve COV2-2381 olarak adlandırılan iki monoklonal antikorun gerek transgenik farelere gerekse rhesus macaques cinsi primatlara pasif transferinin SARS-CoV-2 enfeksiyonuna karşı deney hayvanlarını koruduğu gösterilmiştir (45). Sonuç olarak korunmuş epitopların tespitinin daha kapsayıcı koronavirus aşılarda geliştirilmesi ve sonraki olası koronavirus salgınlarına karşı çapraz koruyucu antikorların eldesi için yararlı olabileceği belirtilmektedir.

Replikasyon DNA veya RNA içeren genetik materyalin sentezlenmesi amacıyla gerçekleştirilen, dolayısıyla türlerin veya canlılığın devamlılığını sağlayan en temel biyolojik süreçtir. Sentez temel olarak çok sayıdaki ek faktörler haricinde mevcut DNA ya da RNA'nın kalıp/şablon olarak kullanılması ve polimeraz enzimleri aracılığıyla gerçekleşir. Çevresel faktörler doğal seçim baskısı ile kalıp olarak kullanılan bir önceki genetik materyal ve polimeraz enzimi, sentezin biyolojik ve genetik mahiyeti ya da sonuçlarının ve/veya etkilerinin belirlenmesinde kritik rol oynarlar. Replikasyon viral biyogenезin en kritik ve en özgün aşamasıdır. Viral replikasyon amacıyla genel olarak (HIV ve HBV gibi istisnalar hariç) DNA virüsleri DNA polimeraz, RNA virüsleri ise RNA polimeraz enzimini kullanır. Sentezin hızı ve dinamiği virüse ve enfekte ettiği organizmaya göre değişir. RNA polimeraz enzimi hata düzeltme fonksiyonu DNA polimeraz enzimine göre yaklaşık 10^5 kat daha düşüktür. Bu nedenle doğası gereği RNA virüslerinde RNA sentezinin her bir döngüsünde yeni sentezlenen RNA üzerinde, kalıp olarak kullanılan RNA'dan farklı olabilen, nükleotid değişiklikleri (mutasyon) meydana gelebilmektedir. Bu açıdan RNA virüslerinde oluşan mutasyonlar doğal biyolojik sürecin bir sonucu olarak kabul edilir. Dolayısıyla viral genomda virüsün bulaştırıcılığını ve virülansını artıran yönde spontan gelişebilen mutasyonlar meydana gelebilir. Buna karşın bu mutasyonların olumlu ya da olumsuz yönde virolojik ve klinik açıdan, hastalığın seyri, şiddeti ve sonuçları üzerindeki potansiyel etkileri birçok viral ve çevresel faktörün karşılıklı etkileşimiyle şekillenir. Bu faktörlerden en önemlisi ve belirleyici olan ise doğal seçimli baskıdır. Oluşan mutasyonların sürdürülebilir olması için virüslerin seçimli bir baskı altında kalması ve viral genomun da buna imkan ve destek sağlaması gerekir.

Virüslerin evrilmesi üzerinde doğal seçiminin rolü kolaylıkla öngörülemeyebilir. Bu durum yeni ortaya çıkan viral salgınların yönü ve dinamiğinin belirlenmesine yönelik yaklaşımlarda spekülasyonlara neden olabilir. Bu açıdan salgınlar sırasında virüsü daha virülant hale getirebilecek mutasyonların oluşacağı yaygın bir öngörü olmasına karşın bunu destekleyen herhangi bir bilimsel veri ve kanıt yoktur. Keza virülansın evrimi ve süreci henüz çok az bilinen son derece komplike ve karmaşık bilimsel arka plana sahiptir. Mutasyonların evrimsel süreç içerisinde virüsün patojenite ve virülansını artırıcı ya da azaltıcı yönde etkileri olabilir. Dolayısıyla evrilme sürecini belirleyen faktör ve kuvvetlerin ne ve nasıl etkili olabileceği bugün için öngörülmesi oldukça zor olması nedeniyle virülansın izleyebileceği seyir hakkında tahmin veya öngörülerde bulunmak çok güç ve füzuli olabilir. Nihayetinde salgınlar sırasında mutasyonlar meydana gelebilir ama bunun epidemiyolojik etkilerini ölçmek zordur (46).

2002-2003 SARS-CoV epidemisinin başlangıç ve sonlanma safhasında ORF8'de önemli delesyonların saptandığı, viral genomda nötral mutasyon oranının salgın süresince stabil kaldığı, sekansın kodlama yapan özellikle S gen bölgesindeki aa mutasyon oranının ise başlangıçta yüksek olmasına karşın salgının ortası ve sonlarına doğru yavaşlayarak stabil kaldığı, spike proteininin pozitif seçimli baskıya güçlü bir başlangıç yanıtı verdiği ve bu değişimlerin salgının seyrini yönlendirdiğine dair veriler, virüsün konağın seçimli baskısını direnci ve insana adaptasyonu-

nuna işaret ettiği yönünde değerlendirilmiştir. Bu açıdan SARS-CoV-2'nin de benzer şekilde bir adaptasyon süreci geçirmiş olabileceği, fakat bu adaptasyonların daha fazla ölüm anlamına gelmesinin olası olmayacağı ifade edilmektedir (46-48).

SARS-CoV-2 spike proteini aşılama, antiviral stratejiler, terapötik antikorlar ve tanı için temel hedeflerden birini teşkil etmesine ek olarak viral spike proteininde oluşacak mutasyonların salgının seyrini değiştirme potansiyelleri ve yine spike proteinini hedef alan olası bir aşının immünizasyonunu etkileme potansiyelleri nedeniyle izlemi ve tanınması kritik önem taşımaktadır. Bu amaçla pandemi süresince izole edilen ve GISAID (Global Initiative on Sharing All Influenza Data) üzerinden paylaşılan viral genomu ait sekans verileri baz alınarak, SARS-CoV-2 genomlarındaki rekombinasyonları ve mutasyonları saptamaya yönelik gerçekleştirilen retrospektif çalışmalarda; viral spike proteinini kodlayan gende D614G, S943P, L5F, L8V/W, H49Y, Y145H/del, Q239K, V367F, G476S, V483A, V615I/F, A831V, D839Y/N/E, S943P, P1263L ve füzyon peptid üzerinde 937-943 aa pozisyonlarında kümelenen mutasyonlar saptandığı rapor edilmiştir. Bu mutasyonlardan özellikle 614. aa pozisyonunda saptanan D614G yönündeki mutasyonun, virüsün bulaşma düzeyinin ve hastalık şiddetinin artışı yönünde etkilerinin olabileceği öngörülmektedir. Viral spike protein RBD'deki bazı aa varyasyonlarının viral enfektivitede azalmaya neden olabileceği, buna karşın A475V, L452R, V483A ve F490L'yi içeren varyantların ise nötralizan antikorlara dirençli olabileceği, bununla birlikte bu viral varyantların yaygın olmadığı da rapor edilmiştir. Ayrıca yapılan *in-vitro* deneysel çalışmalarda viral spike proteindeki N-glikolizasyon alanlarındaki delesyonları içeren bazı varyasyonların viral enfektivitenin azalmasına neden olabileceği, bununla varyasyonlardan N234Q'nun nötralizan antikorlara direnç (immün kaçış) ile N165Q'nun ise nötralizan antikorlara daha duyarlı olması ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir. Bunlarla birlikte, henüz belirtilen mutasyonların olası immünolojik ve hastalık seyri üzerindeki patolojik etkilerinin belirlenmesine yönelik fonksiyonel analizler gerçekleştirilmiş değildir. Bilindiği üzere viral genomda saptanan herhangi bir mutasyonun olası virolojik ve patolojik etkileri ancak virüsün fonksiyonel analizlerinin yapılarak konfirme edilmesi ile ortaya konabilir (49,50).

Bu derlemenin kapsamı dışında olmakla birlikte, geliştirilme aşamasında olan COVID-19 aşılı için potansiyel risklerden biri de aşı ilişkili solunum yolu hastalığının şiddetlenmesi (vaccine-associated enhanced respiratory disease; VAERD) sendromudur. Aşılama aracılığıyla edinilen antikorlar ADE'ye neden olması dışında, VAERD'ye de neden olabilmektedir. VAERD aşılama sonrası spesifik antijenik epitoplara karşı nötralizan kapasitesi zayıf antikor yanıtları ile ilişkilidir. Nötralizasyon kapasitesi düşük olmasına karşın özellikle yüksek viral yük varlığında, antikorların viral epitoplara ile oluşturduğu immün kompleksler ve kompleman aktivasyonu enflamatuvar sitokin yanıtlarının indüklenmesine neden olarak VAERD'e neden olabilmektedirler. VAERD ayrıca aşının T_H1 yönündeki immün yanıtlardan ziyade T_H2 yönündeki immün yanıtların indüklenmesi sonrası gelişen, T_H2 ilişkili sitokin yanıtları ve alerjik enflamasyon ile ilişkili olabilmektedir (51).

COVID-19'un immünpatogenezi ile ilişkili bilimsel veri ve bilgiler henüz sınırlıdır. Mevcut bilimsel ve klinik veriler COVID-19'da bağışık yanıtının virüs, enfekte birey ve çevresel faktörlerin karşılıklı etkileşimi ile şekillendiği, enfeksiyonun klinik seyri ve sonuçlarının hastaların çoğunda enfeksiyonunun kontrol altına alınmasına imkan verebilen immün yanıtlardan oluştuğu bildirilmektedir. Ancak özellikle kronik inflamasyon ve immün yetmezlik gibi komorbiditelerin eşlik ettiği çok yaşlı kişilerde ise immün fonksiyon bozukluğu ve/veya yetersizliği sonucu ani ve hızla gelişen yoğun inflamasyon, sitokin ve kemokin fırtınası ile karakterize olan pulmoner tromboz ile sonuçlanabilen oldukça geniş bir yelpazeyi içerebilmektedir (52).

SONUÇ

Sonuç olarak,

- virüse spesifik antikorlar enfeksiyonun kontrolünde önemli rol oynamasına karşın nadiren de olsa ADE ilişkili olumsuz sonuçları olabildiği,
- özellikle aşı tasarımları ve antikor tedavileri için ADE ve VAERD olasılığının dikkate alınması gerektiği,
- nötralizan etkinliğe sahip olan monoklonal antikorların SARS-CoV-2 enfeksiyonunun tedavisinde potansiyel alternatif bir seçenek oluşturduğu,
- COVID-19 salgını ile mücadelede viral genomdaki mutasyon ve/veya varyasyonların yakından izleniminin gerekli ve yararlı olduğu,
- mutasyonların virüsün olası zararlı etkilerini gösteren bir endikatör olmaktan ziyade yeni salgınların anlaşılmasına yardımcı olduğu,
- gerçekte mutasyonların virüslerin yaşam döngülerinin doğal bir parçası olduğu ve salgınların seyrini olumsuz yönde değiştirebilecek etkilerinin ise nadir ve sınırlı olduğu öngörülebilir.

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

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - B.Ç.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - B.Ç.; Analiz ve/veya Yorum - B.Ç.; Literatür Taraması - B.Ç.; Yazan - B.Ç.; Eleştirel İnceleme - B.Ç.

Çıkar Çatışması: Yazar çıkar çatışması bildirmemiştir.

Finansal Destek: Yazar bu çalışmada finansal destek almadığını beyan etmiştir.

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

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - B.Ç.; Data Collection and/or Processing - B.Ç.; Analysis and/or Interpretation - B.Ç.; Literature Search - B.Ç.; Writing - B.Ç.; Critical Reviews - B.Ç.

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

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

KAYNAKLAR

1. Li F. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annu Rev Virol* 2016; 29;3(1): 237-26. [CrossRef]
2. Tortorici MA, Veeseleer D. Structural insights into coronavirus entry. *Adv Virus Res* 2019; 105: 93-116. [CrossRef]
3. Walls AC, Tortorici MA, Snijder J, Xiong X, Bosch B-J, Rey FA, et al. Tectonic conformational changes of a coronavirus spike glycoprotein promote membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017; 114: 11157-62. [CrossRef]
4. Du L, He Y, Zhou Y, Liu, Zheng B-J, Jiang S. The spike protein of SARS-CoV-2 a target for vaccine and therapeutic development. *Nat Rev Microbiol* 2020; 18: 226-36. [CrossRef]
5. Yasui F, Kohara M, Kitabatake M, Nishiwaki T, Fujii H, Tateno C, et al. Phagocytic cells contribute to the antibody-mediated elimination of pulmonary-infected SARS coronavirus. *Virology* 2014; 454:157-68. [CrossRef]
6. Iwasaki A, Yang Y. The potential danger of suboptimal antibody responses in COVID-19. *Nat Rev Immunol* 2020; 20: 339-41. [CrossRef]
7. Zohar T, Alter G. Dissecting antibody-mediated protection against SARS-CoV-2. *Nature Review Immunology* 2020; 20: 393-5. [CrossRef]
8. Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, Wang X, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clin Infect Dis* 2020; doi: 10.1093/cid/ciaa344. [CrossRef]
9. Peiris JSM, Chu CM, Cheng VCC, Chan KS, Hung IFN, Poon LLM, et al. Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *Lancet* 2003; 361: 1767v72. [CrossRef]
10. Ho M-S, Wei-Ju C, Chen H-Y, Lin S-F, Wang M-C, Di J, et al. Neutralizing antibody response and SARS severity. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1730-7. [CrossRef]
11. Robinson WE Jr, Montefiori DC, Mitchell WM. Antibody-dependent enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Lancet* 1988; 8589: 790-4. [CrossRef]
12. Takada A, Feldmann H, Ksiazek TG, Kawaoka Y. Antibody-dependent enhancement of Ebola virus infection. *J Virol* 2003; 77: 7539-44. [CrossRef]
13. Wilder-Smith A, Ooi EE, Horstick O, Wills B. Dengue. *Lancet* 2019; 393: 350-63. [CrossRef]
14. Halstead SB, O'Rourke EJ. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med* 1977; 146: 201-17. [CrossRef]
15. Sridhar S, Luedtke A, Langevin E, Zhu M, Bonaparte M, Machabert T, et al. Effect of Dengue Serostatus on Dengue Vaccine Safety and Efficacy. *N Engl J Med* 2018; 379(4): 327-40. [CrossRef]
16. Kliks SC, Nimmanitya S, Nisalak A, Burke DS. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *Am J Trop Med Hyg* 1988; 38: 411-4119. [CrossRef]
17. Weiss RC, Scott FW. Antibody-mediated enhancement of disease in feline infectious peritonitis: comparisons with dengue hemorrhagic fever. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1981; 4: 175-89. [CrossRef]
18. Talbot HK, Shepherd BE, Crowe Jr JE, Griffin MR, Edwards KM, Podsiad AM, et al. The pediatric burden of human coronaviruses evaluated for twenty years. *Pediatr Infect Dis J* 2009; 28(8): 682-7. [CrossRef]

19. Wang S-F, Tseng S-P, Yen C-H, Yang J-Y, Tsao C-H, Shen C-W, et al. Antibody- dependent SARS coronavirus infection is mediated by antibodies against spike proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2014; 451: 208-14. [\[CrossRef\]](#)
20. Jaume M, Yip MS, Cheung CY, Leung HL, Li PH, Kien F, Dutry I, et al. Anti- severe acute respiratory syndrome coronavirus spike antibodies trigger infection of human immune cells via a pH- and cysteine protease- independent FcγR pathway. *J Virol* 2011; 85: 10582-97. [\[CrossRef\]](#)
21. Yip MS, Leung HL, Li PH, Cheung CY, Dutry I, Li D, et al. Antibody-dependent enhancement of SARS coronavirus infection and its role in the pathogenesis of SARS. *Hong Kong Med J* 2016; 22: 25-31.
22. Yasui F, Kai H, Kitabatake M, Inoue S, Yoneda M, Yokochi S, et al. Prior immunization with severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus (SARS- CoV) nucleocapsid protein causes severe pneumonia in mice infected with SARS-CoV. *J Immunol* 2008; 181: 6337-48. [\[CrossRef\]](#)
23. Liu L, Wei Q, Lin Q, Fang J, Wang H, Kwok H, et al. Anti-spike IgG causes severe acute lung injury by skewing macrophage responses during acute SARS-CoV infection. *JCI Insight* 2019; 4(4): e123158. [\[CrossRef\]](#)
24. Wang, Q, Zhang L, Kuwahara K, Li L, Liu Z, Li T, et al. Immunodominant SARS coronavirus epitopes in humans elicited both enhancing and neutralizing effects on infection in non- human primates. *ACS Infect Dis* 2016;2:361-76. [\[CrossRef\]](#)
25. WanY, Shang J, Sun S, Tai W, Chen J, Geng Q, et al. Molecular Mechanism for Antibody-Dependent Enhancement of Coronavirus Entry. *Journal of Virology* 2020; 94: e02015-19. [\[CrossRef\]](#)
26. Bolles M, Deming D, Long K, Agnihothram S, Whitmore A, Ferris M, et al. A double- inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus vaccine provides incomplete protection in mice and induces increased eosinophilic proinflammatory pulmonary response upon challenge. *J Virol* 2011; 85: 12201-15. [\[CrossRef\]](#)
27. Graham RL, Becker MM, Eckerle LD, Bolles M, Denison MR, Baric RS. A live, impaired- fidelity coronavirus vaccine protects in an aged, immunocompromised mouse model of lethal disease. *Nat Med* 2012; 18: 1820-6. [\[CrossRef\]](#)
28. Arvin AM, Fink K, Schmid MA, Cathcart A, Spreafico R, Havenar-Daughton C. A perspective on potential antibodydependent enhancement of SARS-CoV-2. *Nature* 2020; doi.org/10.1038/s41586-020-2538-8. [\[CrossRef\]](#)
29. Tan W, Lu Y, Zhang J, Wang J, Dan Y, Tan Z, He X, et al. Viral kinetics and antibody responses in patients with COVID-19. Preprint at medRxiv 2020; <https://doi.org/10.1101/2020.03.24.20042382>. [\[CrossRef\]](#)
30. Jiang H-w, Li Y, Zhang H-n, Wang W, Men D, Yang X, et al. Global profiling of SARS-CoV-2 specific IgG/IgM responses of convalescents using a proteome microarray. Preprint at medRxiv 2020;<https://doi.org/10.1101/2020.03.20.20039495>. [\[CrossRef\]](#)
31. Wu F, Wang A, Liu M, Wang Q, Chen J, Xia S, et al. Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in a COVID-19 recovered patient cohort and their implications. Preprint at medRxiv 2020; doi.org/10.1101/2020.03.30.20047365. [\[CrossRef\]](#)
32. Corti D, Misasi J, Mulangu S, Stanley DA, Kanekiyo M, Wollen S, et al. Protective monotherapy against lethal Ebola virus infection by a potently neutralizing antibody. *Science* 2016; 351: 1339-42. [\[CrossRef\]](#)
33. Levine MM. Monoclonal Antibody Therapy for Ebola Virus Disease. *N Engl J Med* 2019; 38: 2365-6. [\[CrossRef\]](#)
34. Traggiai E, Becker S, Subbarao K, Kolesnikova L, Uematsu Y, Gismondo MR, et al. An efficient method to make human monoclonal antibodies from Emory B cells: patent neutralization of SARS coronavirus. *Nat Med* 2004;10: 87-5. [\[CrossRef\]](#)
35. Rockx B, Donaldson E, Frieman M, Sheahan T, Corti D, Lanzavecchia A, et al. Escape from human monoclonal antibody neutralization affects *in vitro* and *in vivo* fitness of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Infect Dis* 2010; 20: 946-55. [\[CrossRef\]](#)
36. Tortorici MA, Walls AC, Lang Y, Wang C, Li Z, Koerhuis D, Veesler D, et al. Structural basis for human coronavirus attachment to sialic acid receptors. *Nat Struct Mol Biol* 2019; 26: 481-9. [\[CrossRef\]](#)
37. ZhouP, Yang X-L, Wang X-G, Hu B, Zhang L, Zhang W, et. al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 2020; 579: 270-3. [\[CrossRef\]](#)
38. Meng Y, Nicholas C.W, Xueyong Z, Chang-Chun DL, Ray TYS, Huibin L, Chris KPM, Ian AW. A highly conserved cryptic epitope in the receptor-binding domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Science* 2020; 368: 630-3. [\[CrossRef\]](#)
39. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, et. al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* 2020; 367: 1260-3. [\[CrossRef\]](#)
40. ter Meulen J, van den Brink EN, Poon LLM, Marissen WE, Leung CS, Cox F. Human monoclonal antibody combination against SARS coronavirus: Synergy and coverage of escape mutants. *PLOS Med* 2006; 3: e237. [\[CrossRef\]](#)
41. Ye J, Ma N, Madden TL, Ostell JM. IgBLAST: An immunoglobulin variable domain sequence analysis tool. *Nucleic Acids Res* 2013; 41: 34-40. [\[CrossRef\]](#)
42. Tian X, Li C, Huang A, Xia S, Lu S, Shi Z, Lu L, et al. patent binding of 2019 novel coronavirus spike protein by a SARS coronavirusspecific human monoclonal antibody. *Emerg. Microbes Infect* 2020; 9: 382-5. [\[CrossRef\]](#)
43. Watanabe Y, Berndsen ZT, Raghwan J, Seabright GE, Allen JD, McLellan JS, et al. Vulnerabilities in coronavirus glycan shields despite extensive glycosylation. *bioRxiv* 2020. [\[CrossRef\]](#)
44. Pinto D, Park Y-J, Beltramello M, Walls AC, Tortorici MA, et al. Structural and functional analysis of a patent sarbecovirus neutralizing antibody. *bioRxiv* 2020. [\[CrossRef\]](#)
45. Zost SJ, Gilchuk P, Case JB, Binshtein E, Chen RE, Nkolola JP, et al. Potently neutralizing and protective human antibodies against SARS-CoV-2. *Nature* 2020; doi.org/10.1038/s41586-020-2548-6. [\[CrossRef\]](#)
46. Grubaugh ND, Petrone ME, Holmes EC. We shouldn't worry when a virus mutates during disease outbreaks. *Nature* 2020; 5: 529-30. [\[CrossRef\]](#)
47. The Chinese SARS Molecular Epidemiology Consortium. Molecular Evolution of the SARS Coronavirus During the Course of the SARS Epidemic in China. *Science* 2004; 303: 1666-9. [\[CrossRef\]](#)
48. Zhu Y, Liu M, Zhao W, Zhang J, Zhang X, Wang K, et al. Isolation of virus from a SARS patient and genome-wide analysis of genetic mutations related to pathogenesis and epidemiology from 47 SARS-CoV isolates. *Virus Genes* 2005; 30(1): 93-102. [\[CrossRef\]](#)
49. Korber B, Fischer WM, Gnanakaran S, Yoon H, Theiler J, Abfalterer W, et al. Spike mutation pipeline reveals the emergence of a more transmissible form of SARS-CoV-2. *bioRxiv* 2020; doi:10.1101/2020.04.29.069054. [\[CrossRef\]](#)
50. Li Q, Wu J, Nie J, Zhang L, Hao H, Liu S, et al. The impact of mutations in SARS-CoV-2 spike on viral infectivity and antigenicity. *Cell* 2020; doi.org/10.1016/j.cell. [\[CrossRef\]](#)
51. Polack FP. Atypical Measles and Enhanced Respiratory Syncytial Virus Disease (ERD) Made Simple. *Pediatr Res* 2007; 62(1): 111-5. [\[CrossRef\]](#)
52. Sokolowska M, Lukaszik Z, Agache I, Akdis CA, Akdis D, Akdis M, et al. Immunology of COVID-19: mechanisms, clinical outcome, diagnostics and perspectives - a report of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI). *Allergy* 2020; doi: 10.1111/all.14462. [\[CrossRef\]](#)

EXPERIMED

AIMS AND SCOPE

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Editor in Chief: Prof. Bedia Çakmakoğlu

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

Phone: +90 212 414 2000-33305

Fax: +90 212 532 4171

E-mail: bedia@istanbul.edu.tr

Publisher: İstanbul University Press

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

Phone: +90 212 440 0000

EXPERIMED

AMAÇ VE KAPSAM

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

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

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

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

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

Derginin tüm masrafları İstanbul Üniversitesi tarafından karşılanmaktadır.

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

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

Baş Editör: Prof. Dr. Bedia Çakmakoğlu

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

Telefon: 0212 414 2000-33305

Faks: 0212 532 4171

E-posta: bedia@istanbul.edu.tr

Yayıncı: İstanbul Üniversitesi Yayınevi

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

Telefon: 0212 440 0000

EXPERIMED

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Context

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

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

Editorial Policy

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

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

Peer-Review Policy

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

Ethical Principles

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

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

Plagiarism

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

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

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

Authorship

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

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

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

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

EXPERIMED

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

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

Conflict of Interest

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

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

Copyright and Licensing

Authors publishing with Experimed retain the copyright to their work, licensing it under the Creative Commons Attribution-Non-Commercial 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.

Disclaimer

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

MANUSCRIPT PREPARATION

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

Manuscripts can only be submitted through the journal's online manuscript submission and evaluation system, available at http://experimed.istanbul.edu.tr/en/_. Manuscripts submitted via any other medium will not be evaluated.

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

Authors are required to submit the following:

- Copyright Agreement Form,
- ICMJE Potential Conflict of Interest Disclosure Form (should be filled in by all contributing authors)

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

Preparation of the Manuscript

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

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

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

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

EXPERIMED

end of the abstract. The keywords should be listed in full without abbreviations. The keywords should be selected from the National Library of Medicine, Medical Subject Headings database (<https://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>).

Manuscript Types

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

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

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

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

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

Case Reports: There is limited space for case reports in the journal and reports on rare cases or conditions that constitute challenges in diagnosis and treatment, those offering new therapies or revealing knowledge not included in the literature, and interesting

and educative case reports are accepted for publication. The text should include Introduction, Case Presentation, Discussion, and Conclusion subheadings. Please check Table 1 for the limitations for Case Reports.

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

Tables

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

Figures and Figure Legends

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

Table 1. Limitations for each manuscript type

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

EXPERIMED

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

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

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

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

References

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

Journal Article: Rankovic A, Rancic N, Jovanovic M, Ivanović M, Gajović O, Lazić Z, et al. Impact of imaging diagnostics on the budget – Are we spending too much? *Vojnosanit Pregl* 2013; 70: 709-11.

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

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

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

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

Scientific or Technical Report: Cusick M, Chew EY, Hoogwerf B, Agrón E, Wu L, Lindley A, et al. Early Treatment Diabetic Retinopathy

Study Research Group. Risk factors for renal replacement therapy in the Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS), Early Treatment Diabetic Retinopathy Study *Kidney Int*: 2004. Report No: 26.

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

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

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

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

REVISIONS

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

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

Editor in Chief: Prof. Bedia Çakmakoğlu
Address: İstanbul University, Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine, Vakıf Gureba Avenue, 34093, Çapa, Fatih, İstanbul, Turkey
Phone: +90 212 414 2000-33305
Fax: +90 212 532 4171
E-mail: bedia@istanbul.edu.tr

Publisher: İstanbul University Press
Address: İstanbul University Central Campus,
34452 Beyazıt, Fatih / İstanbul - Turkey
Phone: +90 212 440 0000

EXPERIMED

YAZARLARA BİLGİ

İçerik

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

Experimed, temel ve klinik tıp bilimlerinin tüm alanlarında orijinal araştırma, olgu sunumu, derleme ve editöre mektup türlerinde makaleler yayınlamaktadır.

Yayın Politikası

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

Özgünlük, yüksek bilimsel kalite ve atif potansiyeli bir makalenin yayına kabulü için en önemli kriterlerdir. Gönderilen yazıların daha önce başka bir elektronik ya da basılı dergide, kitapta veya farklı bir mecrada sunulmamış ya da yayınlanmamış olması gerekir. Daha önce başka bir dergiye gönderilen ancak yayına kabul edilmeyen yazılar hakkında dergi önceden bilgilendirilmelidir. Bu yazıların eski hakem raporlarının Yayın Kuruluna gönderilmesi değerlendirme sürecinin hızlanmasını sağlayacaktır. Toplantılarda sunulan çalışmalar için, sunum yapılan organizasyonun tam adı, tarihi, şehri ve ülkesi belirtilmelidir.

Değerlendirme Süreci

Experimed'e gönderilen tüm makaleler çift-kör hakem değerlendirme sürecinden geçmektedir. Tarafsız değerlendirme sürecini sağlamak için her makale alanlarında uzman en az iki dış-bağımsız hakem tarafından değerlendirilir. Dergi Yayın Kurulu üyeleri tarafından gönderilecek makalelerin değerlendirme süreçleri, davet edilecek dış bağımsız editörler tarafından yönetilecektir. Bütün makalelerin karar verme süreçlerinde nihai karar yetkisi Baş Editör'dedir.

Etik İlkeler

Klinik ve deneysel çalışmalar, ilaç araştırmaları ve bazı olgu sunumları için World Medical Association Declaration of Helsinki "Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects", (amended in October 2013, www.wma.net) çerçevesinde hazırlanmış Etik Komisyon raporu gerekmektedir. Gerekli görülmesi halinde Etik Komisyon raporu veya eşdeğeri olan resmi bir yazı yazarlardan talep edilebilir. İnsanlar üzerinde yapılmış deneysel çalışmaların sonuçlarını bildiren yazılarda, çalışmanın yapıldığı kişilere uygulanan prosedürlerin niteliği tümüyle açıklandıktan sonra, onaylarının alındığına ilişkin bir açıklamaya metin içinde yer verilmelidir. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda ise ağır, acı ve rahatsızlık verilmemesi için yapılmış olanlar açık olarak makalede belirtilmelidir. Hasta onamları, Etik Kurul raporun alındığı kurumun adı, onay belgesinin numara-

sı ve tarihi ana metin dosyasında yer alan Yöntemler başlığı altında yazılmalıdır. Hastaların kimliklerinin gizliliğini korumak yazarların sorumluluğundadır. Hastaların kimliğini açığa çıkarabilecek fotoğraflar için hastadan ya da yasal temsilcilerinden alınan imzalı izinlerin de gönderilmesi gereklidir.

Dergiye gönderilen makaleler, hakem değerlendirme sürecinde ya da yayına hazırlık aşamasında herhangi bir noktada bir benzerlik tespit yazılımı (CrossCheck, iThenticate) tarafından taranmaktadır. Cümleler ve ifadeler yazar olarak size ait olsa dahi, metnin daha önce yayınlanan verilerle kabul edilemez bir benzerliği olmalıdır.

Başkalarının önceki çalışmalarını (veya kendi çalışmalarınızı) tartışırken, lütfen materyali her durumda doğru bir şekilde alıntılarınızdan emin olunuz.

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

Yazarlık

Yazar olarak listelenen herkesin ICMJE (www.icmje.org) tarafından önerilen yazarlık kriterlerini karşılaması gerekmektedir. ICMJE, yazarların aşağıdaki 4 kriteri karşılamasını önermektedir:

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

Bir yazar, çalışmada katkı sağladığı kısımların sorumluluğunu almasına ek olarak, diğer yazarların çalışmanın hangi kısımlarından sorumlu olduğunu da teşhis edebilmelidir. Ayrıca, yazarlar birbirlerinin katkılarının bütünlüğüne güven duymalıdır.

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

Yazarlık haklarına uygun hareket etmek ve hayalet ya da lütuf yazarlığının önlenmesini sağlamak amacıyla sorumlu yazarlar makale yükleme sürecinde <http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/> adresinden erişilebilen Yazar Katkı Formu'nu imzalamalı ve taranmış versiyonunu yazıyla birlikte göndermelidir. Yayın Kurulu'nun gönderilen bir makalede "lütuf yazarlık" olduğundan şüphelenmesi durumunda söz konusu makale değerlendirme yapılmaksızın reddedilecektir. Makale gönderimi kapsamında; sorumlu yazar makale gönderim ve

EXPERIMED

değerlendirme süreçleri boyunca yazarlık ile ilgili tüm sorumluluğu kabul ettiğini bildiren kısa bir ön yazı göndermelidir.

Çıkar Çatışması

Experimed; gönderilen makalelerin değerlendirme sürecine dahil olan yazarların ve bireylerin, potansiyel çıkar çatışmasına ya da önyargıya yol açabilecek finansal, kurumsal ve diğer ilişkiler dahil mevcut ya da potansiyel çıkar çatışmalarını beyan etmelerini talep ve teşvik eder.

Bir çalışma için bir birey ya da kurumdan alınan her türlü finansal destek ya da diğer destekler Yayın Kurulu'na beyan edilmeli ve potansiyel çıkar çatışmalarını beyan etmek amacıyla ICMJE Potansiyel Çıkar Çatışmaları Formu katkı sağlayan tüm yazarlar tarafından ayrı ayrı doldurulmalıdır. Editörler, yazarlar ve hakemler ile ilgili potansiyel çıkar çatışması vakaları derginin Yayın Kurulu tarafından COPE ve ICMJE rehberleri kapsamında çözülmektedir.

Derginin Yayın Kurulu, itiraz ve şikayet vakalarını, COPE rehberleri kapsamında işleme almaktadır. Yazarlar, itiraz ve şikayetleri için doğrudan Editöryel Ofis ile temasa geçebilirler. İhtiyaç duyulduğunda Yayın Kurulu'nun kendi içinde çözemediği konular için tarafsız bir temsilci atanmaktadır. İtiraz ve şikayetler için karar verme süreçlerinde nihai kararı Baş Editör verecektir.

Telif ve Lisans

Yazarlar Experimed 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 kullanımı 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.

Yazarlar, basılı ya da elektronik formatta yer alan resimler, tablolar ya da diğer her türlü içerik dahil daha önce yayınlanmış içeriği kullanırken telif hakkı sahibinden izin almalıdırlar. Bu konudaki yasal, mali ve cezai sorumluluk yazarlara aittir.

Sorumluluk Reddi

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

MAKALE HAZIRLAMA

Makaleler, ICMJE-Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals (updated in December 2015 - <http://www.icmje.org/icmje-recommendations.pdf>) ile uyumlu olarak hazırlanmalıdır. Randomize çalışmalar CONSORT, gözlemsel çalışmalar STROBE, 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 <http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/> adresinde yer alan derginin online makale yükleme ve değerlendirme sistemi üzerinden gönderilebilir. Diğer mecralardan gönderilen makaleler değerlendirilmeye alınmayacaktır.

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

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

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

- Makalenin başlığını ve 50 karakteri geçmeyen kısa başlığını,
- Yazarların isimlerini, kurumlarını, ORCID numaralarını ve eğitim derecelerini,
- Finansal destek bilgisi ve diğer destek kaynakları hakkında detaylı bilgiyi,
- Sorumlu yazarın ismi, adresi, telefonu (cep telefonu dahil ve e-posta adresini),
- Makale hazırlama sürecine katkıda bulunan ama yazarlık kriterlerini karşılamayan bireylerle ilgili bilgileri içermelidir.

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

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

Makale Türleri

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

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

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

Editöryel Yorum: Dergide yayınlanan bir araştırmanın, o konunun uzmanı olan veya üst düzeyde değerlendirme yapan bir hakemi ta-

EXPERIMED

rafından kısaca yorumlanması amacını taşımaktadır. Yazarları, dergi tarafından seçilip davet edilir. Özet, anahtar sözcük, tablo, şekil, resim ve diğer görseller kullanılmaz.

Derleme: Yazının konusunda birikimi olan ve bu birikimleri uluslararası literatüre yayın ve atıf sayısı olarak yansımış uzmanlar tarafından hazırlanmış yazılar değerlendirmeye alınır. Yazarları dergi tarafından da davet edilebilir. Bir bilgi ya da konunun klinikte kullanılması için vardığı son düzeyi anlatan, tartışan, değerlendiren ve gelecekte yapılacak olan çalışmalara yön veren bir formatta hazırlanmalıdır. Ana metin "Giriş", "Klinik ve Araştırma Etkileri" ve "Sonuç" bölümlerini içermelidir. Derleme türündeki yazılarla ilgili kısıtlamalar için lütfen Tablo 1'i inceleyiniz.

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

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

Tablolar

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

Resim ve Resim Altyazıları

Resimler, grafikler ve fotoğraflar (TIFF ya da JPEG formatında) ayrı

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

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

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

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

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

Kaynaklar

Atıf yapılırken en son ve en güncel yayınlar tercih edilmelidir. Kaynakların doğruluğundan yazarlar sorumludur. Kaynaklar Vancouver referans stiline uygun olarak hazırlanmalıdır. Atıf yapılan erken çevrimiçi makalelerin DOI numaraları mutlaka sağlanmalıdır. 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" konulmalıdır. Ana metinde kaynaklara atıf yapılırken parantez içinde Arabik numaralar kullanılmalıdır. Farklı yayın türleri için kaynak stilleri aşağıdaki örneklerde sunulmuştur:

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

Tablo 1. Makale türleri için kısıtlamalar

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

EXPERIMED

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

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

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

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

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

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

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

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

Elektronik formatta yayınlanan yazı: Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. Emerg Infect Dis (serial online) 1995

Jan-Mar (cited 1996 June 5): 1(1): (24 screens). Available from: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/cid.htm>.

REVİZYONLAR

Yazarlar makalelerinin revizyon dosyalarını gönderirken, ana metin üzerinde yaptıkları değişiklikleri işaretlemeli, ek olarak, hakemler tarafından öne sürülen önerilerle ilgili notlarını "Hakemlere Cevap" dosyasında göndermelidir. Hakemlere Cevap dosyasında her hake-min yorumunun ardından yazarın cevabı gelmeli ve değişikliklerin yapıldığı satır numaraları da ayrıca belirtilmelidir. Revize makaleler karar mektubunu takip eden 30 gün içerisinde dergiye gönderilmelidir. Makalenin revize versiyonu belirtilen süre içerisinde yüklenmezse, revizyon seçeneği iptal olabilir. Yazarların revizyon için ek süreye ihtiyaç duymaları durumunda uzatma taleplerini ilk 30 gün sona ermeden dergiye iletmeleri gerekmektedir.

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

Baş Editör: Prof. Dr. Bedia Çakmakçoğlu

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

Telefon: 0212 414 2000-33305

Faks: 0212 532 4171

E-posta: bedia@istanbul.edu.tr

Yayıncı: İstanbul Üniversitesi Yayınevi

Adres: İstanbul Üniversitesi Merkez Kampüsü,

34452 Beyazıt, Fatih / İstanbul - Türkiye

Telefon: 0212 440 0000