



EXPERIMED

Volume/Cilt **10** Issue/Sayı **3** December/Aralık 2020

- » Female–Male Distribution in Autoantibody Detected by Immunofluorescence
Nuray Gürel-Polat, Nurhas Safran, Gaye Erten-Yurdağül
- » Cost Evaluation of Fetal Rhesus D Genotyping by Real-time PCR from cell-free Fetal DNA
Büşra Yaşa, Orhan Şahin, Selçuk Sözer Tokdemir
- » Betulinic Acid and its Anticancer Effects
Merve Nur Ataş, Arzu Ergen
- » Saliva as a Diagnostic Tool in Oral Diseases
Özlem Kart, Ayşen Yarat
- » Molecular Mechanism of General Anesthesia
Özge Köner, Sibel Temür, Turgay İsbir
- » Causes of Male Infertility
Münevver Serdaroğulları

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

Publication Type / Yayın Türü: Periodical / Yaygın Süreli

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

- 119** Female–Male Distribution in Autoantibody Detected by Immunofluorescence
Nuray Gürel-Polat, Nurhas Safran, Gaye Erten-Yurdagül
- 124** Cost Evaluation of Fetal Rhesus D Genotyping by Real-time PCR from cell-free Fetal DNA
Büşra Yaşa, Orhan Şahin, Selçuk Sözer Tokdemir

REVIEWS

- 128** Betulinic Acid and its Anticancer Effects
Merve Nur Ataş, Arzu Ergen
- 135** Saliva as a Diagnostic Tool in Oral Diseases
Özlem Kart, Ayşen Yarat
- 140** Molecular Mechanism of General Anesthesia
Özge Köner, Sibel Temür, Turgay İsbir
- 144** Causes of Male Infertility
Münevver Serdaroğulları

EXPERIMED

İÇİNDEKİLER

ORJİNAL ARAŞTIRMALAR

- 119** İmmünofloresan Yöntemi ile Belirlenen Otoantikorlarda Kadın/Erkek Dağılımı
Nuray Gürel-Polat, Nurhas Safran, Gaye Erten-Yurdagül
- 124** Hücre-dışı Fetal DNA'dan Gerçek-zamanlı PZR ile Fetal Rhesus D Tespitinin Maliyet Değerlendirmesi
Büşra Yaşa, Orhan Şahin, Selçuk Sözer Tokdemir
- ### DERLEMELER
- 128** Betülinik Asit ve Antikanser Etkileri
Merve Nur Ataş, Arzu Ergen
- 135** Ağız Hastalıklarında Tanı Aracı Olarak Tükürük
Özlem Kart, Ayşen Yarat
- 140** Genel Anesteziklerin Moleküler Mekanizması
Özge Köner, Sibel Temür, Turgay İsbir
- 144** Erkek İnfertilite Nedenleri
Münevver Serdaroğulları

İmmünfloresan Yöntemi ile Belirlenen Otoantikordlarda Kadın/Erkek Dağılımı

Female–Male Distribution in Autoantibody Detected by Immunofluorescence

Nuray Gürel-Polat¹ , Nurhas Safran¹ , Gaye Erten-Yurdağül² 

¹İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Viroloji ve Temel İmmünoloji Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

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

ORCID ID: N.G.P. 0000-0002-5513-575X; N.S. 0000-0002-0239-1151; G.E.Y. 0000-0002-5784-7785

Cite this article as: Gürel-Polat N, Safran N, Erten-Yurdağül G. İmmünfloresan yöntemi ile belirlenen otoantikordlarda kadın/erkek dağılımı. Experimed 2020; 10(3): 119-23.

ÖZ

Amaç: Otoimmün hastalıkların tanısında ve takibinde kullanılan otoantikordlardan olan anti-nükleer antikordların ve organ spesifik olmayan antikordların pozitiflik oranları, kadın/erkek hastalardaki dağılımını saptamaktır.

Gereç ve Yöntemler: Çalışmamızda retrospektif olarak 2016-2017 yılları arasında laboratuvarımıza başvuran hastaların serum örneklerinde immünfloresans (İFA) yöntemi ile çalışılan anti-nükleer antikord (ANA), anti-nötrofil sitoplazmik antikord (ANCA), anti-düz kas antikordları (ASMA), anti-karaciğer böbrek mikrozomal antikordları (anti-LKM1), anti-gastrik pariyetal hücre antikordları (anti-GPCA) ve anti-mitokondriyal antikordlar (AMA) gibi otoantikord değerleri taranmıştır. ANA, HEp-2 hücre soyu ile ASMA, AMA LKM-1 ve GPCA'ları sıçan karaciğer, böbrek, mide dokusunu içeren kombine preparatlar kullanılarak; ANCA ise etanol ile fikse edilmiş insan nötrofil preparatları substrat olarak kullanılmıştır. ANA için 1/80, ASMA, AMA, LKM-1, GPCA için serum sulandırımı 1/40; ANCA için ise 1/20 ve üzeri pozitif olarak kabul edilmiştir. Ek olarak, pozitif örneklerde patern özellikleri ve dilüsyon miktarları da değerlendirilmiştir.

Bulgular: İFA yöntemi ile çalışılmış 5378'si kadın, 3055'ü erkek (toplam 8433) hastanın serumlarında otoantikord test sonuçları incelenmiştir. ANA patern özelliği en yoğun olarak homojen tip başta olmak üzere benekli (speckled), granüler, sentromer, nükleolar, periferik ve nükleer tanecikler şeklindedir. Kadın hastaların pozitiflik değerleri erkek hastalara göre yüksek saptanmıştır.

Sonuç: Değerlendirmemiz sonucunda, kadın hasta sayısının fazla olduğu ve kadınlardaki pozitiflik oranlarının da erkek hastaların iki veya üç katı oranında olduğu gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antinükleer antikord, ANA, organ spesifik olmayan otoantikordlar, immünfloresans, İFA

ABSTRACT

Objective: This study determines the positivity rates and gender distribution of antinuclear and liver-specific autoantibodies that are considered important in the diagnosis and follow-up of auto-immune diseases.

Material and Method: We retrospectively screened autoantibodies, including antinuclear antibodies (ANA), antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA), anti-smooth muscle antibodies (ASMA), anti-liver kidney microsomal-1 antibodies (anti-LKM-1), anti-gastric parietal cell antibodies (anti-GPCA), and antimitochondrial antibodies (AMA) in serum samples of patients applied to our laboratory during 2015-2016 by immunofluorescence methodology. We used the Hep2 cell line for ANA, rat liver–kidney–stomach combined tissues for LKM-1, ASMA, GPCA and AMA, and ethanol fixed human granulocytes preparations for ANCA. Dilutions $\geq 1/80$ for ANA, $\geq 1/40$ for ASMA, AMA, LKM-1, GPCA, and $\geq 1/20$ for ANCA were positive. Positive samples were also evaluated for their staining patterns and dilutions.

Results: Autoantibody test results studied with immunofluorescence were screened in 8433 (5378 females and 3055 males) samples. The highest staining pattern observed for ANA was homogenous, followed by speckled, granular, centromere, nucleolar, peripheral, and nuclear speckled. Females exhibited a higher positivity rate than males.

Conclusion: The number and positivity rate of female patients were found to be two to three times higher than those of male patients.

Keywords: Antinuclear antibody, ANA, non-organ-specific autoantibody, immunofluorescence assay, İFA

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Nuray Gürel-Polat **E-posta:** nuray.gurelpolat@gmail.com

Başvuru/Submitted: 15.10.2020 **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 20.11.2020

Son Revizyon/Last Revision Received: 21.11.2020 **Kabul/Accepted:** 25.11.2020



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

GİRİŞ

Sistemik otoimmün hastalıklar bir veya birden çok sayıda otoantikor oluşumuyla ortaya çıkmaktadır. Hücre yüzeyi, nükleusu ya da sitoplazmada bulunan çeşitli bileşenlere karşı gelişen bu antikorlar, otoimmün hastalıkların (OİH) tanı ve izlenme sürecinde önemli rol oynamaktadır (1). Hücre nükleusuna karşı oluşan otoantikörlere anti-nükleer antikorlar (ANA) adı verilmektedir (2). ANA'ların serolojik olarak tanımlanması romatolojik hastalıklarda (3) olduğu kadar, viral (4,5), malign (6) ve organ-spesifik hastalıklarda (7) gibi birçok durumda da önem kazanmaktadır. Otoantikorların tanımlanması ve gösterilmesi, klinik tıp ve klinik immünolojinin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Sistemik ve organ-spesifik otoimmün hastalıkların tanısında otoantikor tayini için immünfloresans (İFA) metodu kullanılmaktadır. Günümüzde doku kesitleri ve HEp-2 hücreleri 100'den fazla otoantikorun tanımlanmasına olanak sağlamaktadır. İFA testi; zahmetli ve değerlendirilmesinin subjektif olması, hücre komponentlerinin boyanma kalıpları (patern) ile antijen tiplerinin kesin ayrımının yapılamaması gibi dezavantajlara sahip olmakla birlikte, maliyet açısından avantajlı konumdadır (8).

Anti-mitokondriyal (AMA) ve anti-karaciğer/böbrek/mikrozom antikorları (anti-LKM-1) ise otoimmün hepatit; anti-düz kas antikoru (ASMA-DKA) hepatit ve otoimmün hepatit serolojisinde önemli otoantikorlardır (9). Otoimmün anemi tanısında ise anti-gastrik pariyetal hücre antikorunun (anti-GPCA) önemi büyüktür (9).

Anti-nötrofil sitoplazmik antikorlar (ANCA), vaskülit ve Wegener granülomatoz hastalığının tanısında önemli rol oynayan antikorlardır. İnsan nötrofillerinin etanol ile fiksasyonu sonucu hazırlanan preparatlarda sitoplazmada bulunan enzimlere karşı oluşan otoantikorlar tespit edilmektedir. Boyanma özelliklerine göre periferik ANCA (p-ANCA) ve sitoplazmik ANCA (c-ANCA) olmak üzere iki tipi bulunmaktadır (10).

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada 2016 nisan - 2017 nisan aylarında İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Viroloji ve Temel İmmünoloji Bilim Dalı, İmmünoloji Laboratuvarına farklı klinik ve polikliniklerden başvuran, 18-75 yaşları arasındaki 8433 hastanın (5378 kadın, 3055 erkek) serum sonuçları retrospektif olarak taranmıştır. Kadın erkek oranı yaklaşık 2:1 dir. Otoantikorlardan ANA, HEp-2 hücre soyu (Euroimmün, Lübeck-Almanya) ile ASMA, AMA, LKM-1 ve GPCA'ları sıçan karaciğer, böbrek, mide dokusunu içeren kombine preparatlar (Euroimmün, Lübeck-Almanya) kullanılarak; ANCA ise etanol ile fikse edilmiş insan nötrofil (Euroimmun, Lübeck-Almanya) preparatlarının (Euroimmün, Lübeck-Almanya) substrat olarak kullanıldığı İFA yöntemi ile değerlendirilmiştir. ANA için 1/80, ASMA, AMA, LKM-1, GPCA için serum sulandırımı 1/40; ANCA için ise 1/20 ve üzeri pozitif olarak kabul edilmiştir. İFA yöntemi ile çalışılan testlerde serum örnekleri, fosfat tamponlu izotonik solüsyon (PBS) ile sulandırılmış ve lam üzerindeki kuyucuklara 50-70 µl konulup, oda ısısında nemli ortamda 30 dakika inkübe

edilmiştir. İnkübasyon sonrasında lamalar 5 dakika PBS içinde bekletilerek yıkanmıştır. Floresan işaretli anti-insan immünoglobülin G (IgG; Euroimmün, Lübeck-Almanya) ile tekrar inkübe edilmiştir. Lamlar yıkama işlemi tekrarlandıktan sonra kapatma solüsyonu (Gliserol içeren PBS) damlatılarak lamel ile kapatılmıştır. Hazırlanan örnekler floresan mikroskopunda (EuroStar II, Almanya) önce X20 sonra X40 objektifler ile değerlendirilerek boyanma kalıp özellikleri belirlenmiştir. Pozitif bulunan örneklerin ileri sulandırılmaları hazırlanarak titreleri saptanmıştır.

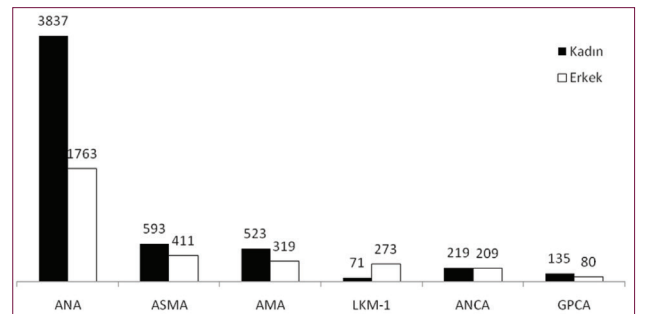
ANA pozitif örneklerin ileri seri dilüsyonları (1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560, 1:5120) yapılarak pozitiflik derecesi belirlenmiş; nükleer antijenlere karşı yeşil floresan ışığa veren otoantikorların farklı boyanma özelliği homojen, speckled (benekli), sentromer, nükleolar olarak ayrıca tanımlanmıştır.

ANCA, nükleus membranında görülen bant boyanması ile pANCA, sitoplazmadaki tanecikler şeklinde görülen boyanma ile cANCA olarak tanımlanmıştır. pANCA pozitifliğinin kesinliği formalin fikse nötrofiller ile hazırlanan preparatlarla tekrarlanarak boyanma özelliği takip edilmiştir.

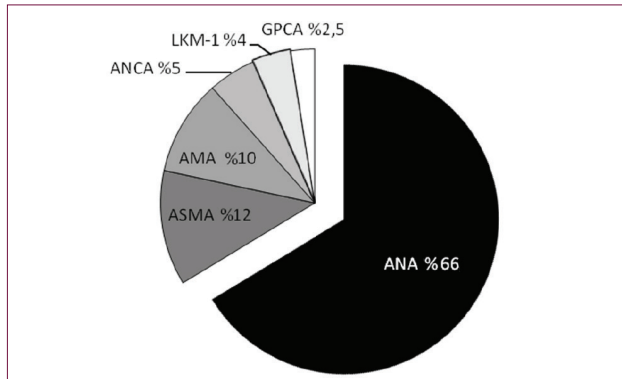
Kombine preparatlarda böbrek, karaciğer ve midede bulunan hücrelerin mitokondrilerinin boyanması ile gözlenen pozitiflik AMA değerlendirilmesinde kullanılmıştır. LKM-1 antikoru aynı preparatın karaciğer ve böbrek dokusundaki mikrozomların; ASMA midede bulunan kas lifleri muskularis mukosa ve kan damarlarının kas tabakasının verdiği floresans ile tanımlanmıştır. GPCA ise mide bez hücrelerinin boyanması ile değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Viroloji ve Temel İmmünoloji Bilim Dalı, İmmünoloji Laboratuvarı'na fakültemizin ve çevre hastanelerin çeşitli klinik ve polikliniklerinden gönderilen hasta serumlarında otoantikor düzeyleri retrospektif olarak taranmıştır. Çalışma kapsamında 5378 (%64) kadın ve 3055 (%36) erkek olmak üzere toplam 8433 hasta sonucu incelenmiştir. İncelenen antikorlar tek tek değerlendirildiğinde; ANA için 5600 (%66), ANCA için 428 (%5), AMA için 842 (%10), ASMA için 1004 (%12), GPCA için 215 (%2,5) ve LKM-1 için ise 344 (%4) örnek değerlendirilmiştir (Şekil 1, Şekil 2).



Şekil 1. Otoantikor analizlerinde saptanan pozitifliklerin cinsiyete göre dağılımları. ANA (Anti-nükleer antikor); ASMA (Anti-düz kas antikoru); AMA (Anti-mitokondriyal antikor); LKM-1 (Karaciğer böbrek mikrozom-1); ANCA (Anti-nötrofil sitoplazmik antikor); GPCA (Gastrik pariyetal hücre antikoru).



Şekil 2. Tüm otoantikor analiz sonuçlarında pozitiflik dağılımları. ANA (Anti-nükleer antikor); ASMA (Anti-düz kas antikor); AMA (Anti-mitokondriyal antikor); LKM-1 (Karaciğer böbrek mikrozom -1); ANCA (Anti-nötrofil sitoplazmik antikor); GPCA (Gastrik pariyetal hücre antikor).

Çalışmamızda tüm örneklerde %84 negatif, %16 pozitif sonuç elde edilmiştir. Taranan testler içinde negatiflik oranı erkeklerde %38 iken, pozitiflik oranı %29'dur. Kadınlarda %62 olan negatiflik değerine karşılık, %71 pozitif değer saptanmıştır. ANA incelemesinde 3837'si (%68,5) kadın, 1763'ü ise (%31,4) erkek

olgulardan oluşan toplam 5600 örnek incelenmiştir. Pozitif saptanma oranı kadınlarda %50,3 olarak saptanmıştır; bu oran erkeklerdeki pozitiflik oranının yaklaşık 3 katıdır. Pozitif örneklerde saptanan ANA patern özelliği de çeşitlilik göstermektedir. En yoğun görülen özellik homojen tipte olup, 417 kadın (%77) olguda gözlenmiştir. Bu oranı kadın olgularda 103 (%73,5) örneklerle benekli ve sırasıyla; granüler (%58,1), sentromer (%78,8), nükleolar (%74,5), nükleer tanecikler (%63) ve periferik (%85,1) paternlerin izlediği saptanmıştır. Erkek hastalarımızda 238 olguda elde edilen pozitiflik oranı %17,1 olarak bulunmuştur. Pozitif ANA patern özelliğinde homojen tip (%22,9) örnekler arasında ilk sırada saptanmıştır. Bunu benekli (%26,4), granüler (%41,8), nükleer tanecikler (%36,9), nükleolar (%25,4), sentromer (%21,1) ve periferik (%14,8) tipin izlediği gözlenmiştir (Tablo 1, Tablo 2).

ANCA testi 219 kadın ve 209 erkek olmak üzere toplam 428 olguda taranmıştır. ANCA pozitifliğinin toplam pozitif örnekler içindeki değeri %11,6'dır; bu pozitifliğin %2,1'i kadın, %0,1'i ise erkek örnekler ile elde edilmiştir, cinsiyet olarak kadınlardaki pozitiflik erkeklerde elde edilen oranın yirmi katıdır.

Otoimmün anemide önemli rol oynayan anti-GPCA toplam pozitiflik içinde kadınlarda %3,1 iken, erkeklerde %1 olarak saptanmıştır ve kadınlar erkeklerle göre üç katı fazla pozitiflik göstermektedir.

Tablo 1. Otoantikor analiz sonuçları.

		ANA (%)	ASMA (%)	AMA (%)	LKM-1 (%)	ANCA (%)	GPCA (%)
Negatif 7048 (84)	Kadın	3140 (56,07)	429 (42,72)	498 (59,14)	48 (13,9)	189 (44,5)	92 (42,79)
	Erkek	1525 (27,23)	290 (28,88)	311 (36,93)	271 (78,7)	189 (44,5)	66 (30,69)
Pozitif 1385 (16)	Kadın	697 (12,44)	164 (16,33)	25 (2,96)	23 (6,6)	30 (7)	43 (20)
	Erkek	238 (4,25)	121 (12,05)	8 (0,95)	2 (0,58)	20 (4,67)	14 (6,51)
Toplam		5600	1004	842	344	428	215

ANA: Anti-nükleer antikor; ASMA: Anti-düz kas antikor; AMA: Anti-mitokondriyal antikor; LKM-1: Karaciğer böbrek mikrozom -1; ANCA: Anti-nötrofil sitoplazmik antikor; GPCA: Gastrik pariyetal hücre antikor

Tablo 2. Anti-nükleer antikorun boyanma özelliklerinin cinsiyete göre dağılımı.

	Homojen (%)	Benekli (%)	Sentromer (%)	Nükleolar (%)	Periferik (%)	Granüler (%)	Nükleer Tanecikler (%)
Kadın	417 (77)	103 (73,5)	41 (78,8)	41 (74,5)	23 (85,1)	43 (58,1)	29 (63)
Erkek	124 (22,9)	37 (26,4)	11 (21,1)	14 (25,4)	4 (14,8)	31 (41,8)	17 (36,9)

Otoimmün hepatit (OİH) panelinde önemli rol oynayan ASMA pozitifliği, toplam pozitiflik içinde kadınlarda %11,8 iken erkeklerde %8,7 olup, anti-LKM-1 antikörlerinde ise kadınlarda (%1,6) erkeklerin (%0,1) 4 katı oranında daha yüksek gözlenmiştir. Aynı oran AMA için kadınlarda yaklaşık 4 kat daha yüksektir (kadınlarda %1,8, erkeklerde ise %0,5).

Çalışılan tüm otoantikörlerin kadınlarda pozitiflik ve negatiflik oranları erkeklere göre yüksek bulunmuştur. Bu bulgunun elde edilmesindeki ana nedenin otoimmün hastalıkların kadınlarda daha yüksek oranda görülmesi olduğu açıktır.

TARTIŞMA

ANA terimi DNA, ribonükleik asit (RNA) ve çeşitli proteinler ile RNP içeren hücre nükleuslarının bileşenleri ile reaksiyona giren antikörlerin çeşitliliğini ifade etmekte ve tarama testi olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu antikörler, konnektif doku ve romatizmal hastalığı olan, özellikle sistemik lupus eritematozus (SLE) hastalarında yüksek sıklıkta görülmektedir (11). Genellikle bütün SLE hastalarında (12); ve romatoid artrit, skleroderma ve dermatomyositis gibi diğer konnektif doku hastalığına (KDH) sahip hastalarda sıklıkla ANA pozitifliği bildirilmiştir (7). ANA, çeşitli yanıklar veya viral enfeksiyonlar (4,5) sonrasında görülebildiği gibi, bazı sağlıklı kişilerde özellikle yaşlı bireylerde de bulunabilmektedir. Sağlıklı kişilerin 1/3'ünde 1/40 dilüsyonda, 1/20'sinde ise 1/160 dilüsyonda (13); otoimmün veya inflamatuvar hastalığı olmayan 108 çocukta 1/20 serum dilüsyonuyla yapılan bir başka çalışmada ise %22 oranında (14) ANA pozitifliği bildirilmiş, ancak ANA ile birlikte dsDNA ve ENA pozitifliği gözlenmemiştir. Deane ve arkadaşlarına (15) ait 15 yıllık retrospektif çalışmada tüm sistemik romatoid hastalıklarda ANA düzeyi yüksek bulunmuştur, bazen de özel ANA spesifitesi ve özel romatoid hastalık arasındaki ilişki kaybedilmiştir. Bundan dolayı ANA'nın ayırımı ve tanımı klinisyenler için teşhisin onayı ve tedavinin takibinde destek bilgi açısından yardımcı olmaktadır (1). OİH genellikle kadınlarda daha sık görülmektedir (7,16). Yaptığımız çalışmada toplam olarak saptanan 933 ANA pozitif olgu 697 (%50,3) kadın hastalar ile 236 (%17,1) erkek hastadan elde edilmiştir. ANA çalışmasına alınan toplam 5600 olguda cinsiyete göre pozitiflik oranları kadınlarda %50,3 ile erkeklerin (%17,1) yaklaşık 3 katıdır. Bu oranın yakın değerler incelenen diğer otoantikörlerde gözlenmektedir (Tablo 1).

KDH'nın tanısında ANA pozitifliği yeterli olmayıp bu pozitifliğin paterninin ve titrasyonunun belirlenmesi gerekmektedir. Sağlıklı insanlarda bile ANA pozitifliği gözlenmesi nedeniyle, titrasyonun 1/160'dan büyük olması klinik açısından önemli kabul edilmektedir (17). Pozitif patern özelliği SLE'de en çok homojen, KDH hastalarında ise benekli şeklindedir. Ayrıca SLE'de dsDNA antikörleri da çok önemlidir ve spesifik bir test olup kesin tanı kriteridir (9,12). Tip 1 ve kriptojenik OİH'de yüksek oranda ANA otoantikörü pozitif görülmekte, bunu ASMA ve pANCA pozitifliği izlemektedir. Ancak dsDNA ve organ-spesifik otoantikörlerden anti-tiroid, anti-over ve anti-adrenal antikörleri negatif bulunmuştur (18).

ANA'ların nükleer ve sitoplazmik floresan boyanma özelliklerindeki çeşitlilik örneklerde varolan otoantikörlerin relatif miktarı ve tiplerine bağlı olarak görülmektedir. Floresans boyanma özelliklerine göre ANA pozitif analizi homojen, benekli, sentromer, nükleolar, periferik, granüler ve nükleer tanecikler şeklinde karakteristikler göstermektedir (1,19). Tablo 2'de floresans boyanma karakteristik değerleri görülmektedir.

AMA sıklıkla primer bilier siroz ile ilişkili olarak tanımlanır. AMA'nın düşük titrasyonu kronik aktif hepatit ve kriptojenik siroz gibi diğer karaciğer hastalıklarında tanımlanmıştır. ASMA, kronik aktif hepatitli hastaların %70'inin serumlarında yüksek titrasyonlarda bulunur. Düşük ASMA titrasyonu viral enfeksiyonlar, maligniteler ve sağlıklı kişilerde bulunabilmektedir. GPCA ise pernisiyöz anemili hasta serumlarında %90 oranında gözlenmektedir. Diğer klinik ve laboratuvar bilgileri ile pozitif GPCA sonucu diğer megaloblastik anemilerden otoimmün pernisiyöz anemi ayırımında yardımcı olur. Yirmi yaşın altındaki normal popülasyonun %2'sinden daha azında tanımlanmasına rağmen GPCA'un insidansı 40 yaşın üzerindeki kadınlarda artış göstermekte ve 60 yaşın üstündeki normal popülasyonun %16 değerlerine kadar yükselmektedir (7). Wegener granülo-matozu, mikroskobik polianjitis, Churg-Strauss sendromu gibi nekrotizan vaskülitlerin, primer sklerozan kolanjit ve primer bilier sirozun teşhisinde ANCA testi kullanılmaktadır (20).

Tip1 otoimmün hepatit, ANA veya ASMA veya her ikisinin birlikte pozitifliği ile karakterizedir. Hasta popülasyonu %70 kadınlardan oluşmaktadır. Tip 2 otoimmün hepatit ise hasta serum örneklerinde karaciğer/böbrek mikrozomal tip 1 (LKM-1) antikörünün varlığı ile karakterizedir. Tip 2 otoimmün hepatit hastaları tip 1 hastalardan farklılıklar göstermektedir, bu hastalarda yüksek oranda örneğin tiroid, pariyetal hücre veya Langerhans adacıklarına karşı oluşan antikörler gibi organ-spesifik otoantikörler mevcuttur (21).

Hepatit C virüsü ile enfekte olan kişilerde romatoid faktör, ANA, kardiyolipin, tiroid ve LKM-1 otoantikörleri da gözlenmiştir (5,22). Antikora bağlı otoimmün karaciğer hastalıklarından biri olan primer bilier sirozda (PBC) AMA, primer sklerozan kolanjitde ise PANCA testleri önemlidir, PBC olgularında İFA incelemesi ile ANA nükleer tanecikler olarak tanımlanır (23).

Kamalı ve arkadaşları, 10 yıl süresince kliniklerine başvuran hastalara ait serolojik inceleme sonucunda %94 oranında ANA pozitifliğini göstermişler, ancak tüm hastalarda dsDNA otoantikörünün negatif olduğunu belirtmişlerdir (24).

KDH olgularıyla yapılan çalışmada ANA, dsDNA antikörlerinin pozitiflik oranı sırasıyla %96,5 ve %7,95 bulunmuştur (25). Yapılan bir başka retrospektif çalışmada ise ANA pozitifliği %28,2; ANA pozitif serumlardaki anti-ENA pozitifliği ise %60,5 olarak saptanmıştır (26).

Sonuç olarak, taramamız sonucunda ANA testinin oran olarak yüksek sayıda olduğu saptandı. ANA patern özelliğinin homojen tip başta olmak üzere diğer boyanma özelliklerinin izlediğini ve kadın hastalarda erkek hastalara göre oranlarının yüksek

olduğunu gözlemlendi. Çalıştığımız tüm otoantikörlerde bu oranın kadın hastalarda daha büyük oranda olduğunu literatüre paralel olarak gösterildi.

Etik Komite Onayı: Çalışmada 2016-2017 yıllarına ait örneklerde retrospektif tarama yapıldığından etik kurul onayı alınmamıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarımı - N.G.P., N.S., G.Y.Y.; Veri Toplama - N.G.P., N.S., G.Y.Y.; Veri Analizi/Yorumlama - N.G.P., N.S., G.Y.Y.; Literatür Tarama - N.G.P., N.S., G.Y.Y.; Yazım - N.G.P., N.S., G.Y.Y.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

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

Ethics Committee Approval: There was no ethics committee approval because of the samples belonging to the years 2016-2017 were retrospectively scanned in the study.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - N.G.P., N.S., G.Y.Y.; Data Collection and/or Processing - N.G.P., N.S., G.Y.Y.; Analysis and/or Interpretation N.G.P., N.S., G.Y.Y.; Literature Search - N.G.P., N.S., G.Y.Y.; Writing - N.G.P., N.S., G.Y.Y.

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

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

KAYNAKLAR

1. Cabiedes J, Núñez-Álvarez CA. Antinuclear antibodies. *Reumatol Clin* 2010; 6(4): 224-30. [CrossRef]
2. Tan EM, Chan EK, Sullivan KF, Rubin RL. Antinuclear antibodies (ANAs): diagnostically specific immune markers and clues toward the understanding of systemic autoimmunity. *Clin Immunol Immunopathol* 1988; 47(2): 121-41. [CrossRef]
3. Birtane M. Diagnostic role of anti-nuclear antibodies in rheumatic diseases. *Turk J Rheumatol* 2012; 27(2): 79-9. [CrossRef]
4. Zandman-Goddard G, Shoenfeld Y. HIV and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* 2002; 1: 329-37. [CrossRef]
5. Mc Murray RW, Elbourne K. Hepatitis C virus infection and autoimmunity. *Semin Arthritis Rheum* 1997; 26(4): 689-01. [CrossRef]
6. Torchilin VP, Iakoubov LZ, Estrov Z. Antinuclear autoantibodies as potential antineoplastic agents. *Trends Immunol* 2001; 22(8): 424-7. [CrossRef]
7. Shoenfeld Y, Zandman - Goddard G editors. *Autoimmune diseases- The enemy from within*. USA, Bio-Rad Laboratories. 1st ed. 2003.
8. Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburger HA. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. *American College of Pathologists. Arch Pathol Lab Med* 2000; 124(1): 71-1.
9. Bradwell AR, Stokes RP, Johnson GD editors. *Atlas of autoantibody patterns on tissues*. KNP Group Ltd, England 1997; (5): 27-51.
10. Csernok E. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies and pathogenesis of small vessel vasculitides. *Autoimmun Rev* 2003; 2(3): 158-64. [CrossRef]
11. Smeenk RJ. Antinuclear antibodies: cause of disease or caused by disease? *Rheumatology* 2000; 39(6): 581-4. [CrossRef]
12. Egner W. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. *J Clin Pathol* 2000; 53(6): 424-32. [CrossRef]
13. Tan EM, Feltkamp TE, Smolen JS, Butcher B, Dawkins R, Fritzler MJ, et al. Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. *Arthritis Rheum* 1997; 40(9): 1601-11. [CrossRef]
14. Cabral DA, Petty RE, Fung M, Malleson PN. Persistent antinuclear antibodies in children without identifiable inflammatory rheumatic or autoimmune disease. *Pediatrics* 1992; 89(3): 441-4.
15. Deane PM, Liard G, Siegel DM, Baum J. The outcome of children referred to a pediatric rheumatology clinic with a positive antinuclear antibody test but without an autoimmune disease. *Pediatrics* 1995; 95(6): 892-5.
16. Autoimmune disease in women- the facts. URL: [http:// www.aarda.org/women](http://www.aarda.org/women)
17. Yurttutan-Uyar N, Güngör Ö, Serteser M, Akyar I. Antinükleer antikor-hep-2 (ANA) testinin tarama titresi için pozitiflik değerinin belirlenmesi. *Turk Hij Den Biyol Derg* 2017; 74(1): 13-20. [CrossRef]
18. Zola H, Roberts-Thomson P, McEvoy R editors. *Diagnostic immunopathology. Laboratory practice and clinical application*. New York: Cambridge University Press 1995; (4): 62-112.
19. Peene I, Meheus L, Veys EM, De Keyser F. Detection and identification of antinuclear antibodies (ANA) in a large and consecutive cohort of serum samples referred for ANA testing. *Ann Rheum Dis* 2001; 60(12): 1131-6. [CrossRef]
20. Bradwell A R, Hughes R G, Harden E L editors. *Atlas of Hep-2 patterns*. Drapkins Co. UK. 2nd ed. 2003, p 116.
21. Bradwell A R, Stokes R P, Mead G P editors. *Advanced atlas of autoantibody patterns*. KNP Group Ltd, England. 1999; 29.
22. Zauli D, Cassani F, Bianchi FB. Auto-antibodies in hepatitis C. *Bio-med Pharmacother* 1999; 53(5-6): 234-41. [CrossRef]
23. Worman HJ, Courvalin JC. Antinuclear antibodies specific for primary biliary cirrhosis. *Autoimmun Rev* 2003; 2(4): 211-17. [CrossRef]
24. Kamalı S, Kasapoğlu E, Çeçle A, Sayarlıoğlu M, Öcal L, Gül A, İnanç M, Aral O, Koniçe M. Primer Sjögren sendromu 35 hastanın klinik ve laboratuvar özellikleri: İstanbul Tıp Fakültesi Romatoloji Bilim Dalı Tecrübesi. *İst Tıp Fak. Mecmuası* 2004; 67(2): 105-8.
25. Yılmaz Ö, Karaman M, Ergon MC, Bahar İH, Yuluğ N. Konnektif doku hastalıklarının tanısında antinükleer (ANA) ve anti-double stranded DNA (anti-dsDNA) antikörlerinin önemi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2005; 29(4): 287-90.
26. Yumuk Z, Çalışkan Ş, Gündeş S, Willke A. Anti-nükleer antikörlerin (ANA) araştırılması ve saptanmasında kullanılan teknikler. *Türk Microbiol Cem Dergisi* 2005; 35(1): 40-4.

Hücre-dışı Fetal DNA'dan Gerçek-zamanlı PZR ile Fetal Rhesus D Tespitinin Maliyet Değerlendirmesi

Cost Evaluation of Fetal Rhesus D Genotyping by Real-time PCR from cell-free Fetal DNA

Büşra Yaşa^{1,2} , Orhan Şahin³ , Selçuk Sözer Tokdemir¹ 

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

²İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik Doktora Programı, İstanbul, Türkiye

³Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ORCID ID: B.Y. 0000-0002-4967-6699; O.Ş. 0000-0002-7216-3816; S.S.T. 0000-0002-5035-4048

Cite this article as: Yaşa B, Şahin O, Tokdemir SS. Hücre-dışı fetal DNA'dan gerçek-zamanlı PZR ile fetal rhesus D tespitinin maliyet değerlendirmesi. Experimed 2020; 10(3): 124-7.

ÖZ

Maternal plazmadan hücre-dışı fetal DNA'nın (hdfDNA) tespitinde son yıllarda elde edilen başarılar, hamilelik süresince uygulanabilir, invazif olmayan tarama ve tanı testlerini destekleyen temel tekniklerin gelişmesine olanak sağlamıştır. Yakın zamanda yaptığımız bir çalışmada, invazif işlem gerektirmeden gebelerden alınan periferik kandan hücre-dışı DNA izole edilerek, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemiyle fetal Rhesus D (RhD) ve cinsiyet belirlenmesi gerçekleştirilmiştir. Bu ve benzeri çalışmalar neticesinde, kullanılan tekniğin fetal RhD tayininde yüksek doğruluk oranlarına sahip olduğu ve tanı amaçlı kullanıma uygun olduğu gösterilmiştir. Tanıda elde edilen bu başarı, özellikle RhD negatif (-) gebelere uygulanan işlemleri en aza indirilerek tedavide yol göstericidir. Bu bağlamda, sunduğumuz bu çalışmada Türkiye Cumhuriyeti, Sosyal Güvenlik Kurumu, Sağlık Uygulama Tebliği (SUT) verileri referans alınarak, günümüzde RhD (-) gebelere uygulanan ek izlem testlerin ve tedavinin oluşturduğu maliyet ile fetal *RHD* genotipleme sonucuna ortaya çıkan maliyetin kıyaslaması gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, böyle bir yaklaşımın hastalık tanı sürecine yapmış olduğu destek değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak, her RhD (-) gebe için, gerçek zamanlı PZR uygulanarak fetal *RHD* genotipleme ile hali hazırda kullanılan ek tetkik ve tedaviler kıyaslandığında, 523,19 TL (3,5 kat) daha az maliyetli olduğu gösterilmiştir. Bu testin, iş yoğunluğu, hastane maliyetleri ve hastaya uygulanan gereksiz tedavilerin azalması yönünde yenilikçi bir yöntem olduğu görülmektedir. Ayrıca, bu ve benzeri yaklaşımlar, erken tedavinin başlatılması ve gereksiz müdahale ve maliyetten kaçınılmasına olanak sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Hücre dışı fetal DNA, *RHD*, genotipleme, maliyet analizi

ABSTRACT

The detection of cell-free fetal DNA (cffDNA) from maternal plasma has enabled the development of essential prenatal diagnostic techniques supporting the non-invasive screening and diagnostic tests in recent years.

We performed a non-invasive real-time polymerase chain reaction (PCR) using cell-free DNA isolated from the peripheral blood of pregnant women to determine fetal Rhesus D (RhD) and sex. Consistent with the findings of similar studies, our results revealed high accuracy rates of PCR in determining fetal RhD, making it suitable for diagnostic use, thereby indicating its effectiveness as a guide in treating and especially in minimizing the procedures applied to pregnant women who are RhD negative.

This study compared the cost incurred between follow-up testing and treatment of RhD (-) pregnant women and the fetal *RHD* genotyping based on Health Implementation Notification (SUT) data of the Social Security Administration of the Republic of Turkey. Additionally, the role of PCR to the diagnostic process was evaluated.

Our results showed that fetal *RHD* genotyping costs 523.19 TL (3.5 times) less for each RhD (-) pregnant women compared with the current additional tests and treatments. PCR with cffDNA is an innovative method that minimizes workload, hospital costs, and unnecessary tests and treatment. In addition, this method allows an early initiation of treatment and avoidance of unnecessary intervention and cost.

Keywords: Fetal cell-free DNA, *RHD*, genotyping, cost analysis

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Selçuk Sözer Tokdemir **E-posta:** ssozer@istanbul.edu.tr

Başvuru/Submitted: 10.11.2020 **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 19.11.2020

Son Revizyon/Last Revision Received: 23.11.2020 **Kabul/Accepted:** 23.11.2020



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

GİRİŞ

Eritroblastosis Fetalis, gebelerde annenin Rhesus (Rh) faktör negatif (-), fetüsün ise Rh pozitif (+) olduğu durumlarda gerçekleşir. Fetal eritrositler anne dolaşımında belli bir oranın üzerinde bulunduğu, RhD antijenine karşı oluşan maternal IgG antikorlar, fetüse geçerek Rhesus hemolitik hastalığına neden olur. Bu durum, fetüs için yüksek morbidite ve mortalite oluşturur (1). Fetal hemolizin önlenmesi için, anti-RhD immüno globulin ile prenatal ve postnatal profilaksinin rutin kullanımı, RhD (-) kadınların alloimmünizasyonunu önemli ölçüde azaltmaktadır (2-4). RhD genotipinin prenatal dönemde tespiti, Rhesus hemolitik hastalığının erken dönemde belirlenmesinde önemli bir yer tutmaktadır (5). Son on yıllık dönemde doğum öncesi RhD (+) fetüsün belirlenmesi amacıyla oluşturulmuş olan farklı stratejilerde önemli ilerlemeler görülmüştür. Lo ve arkadaşları tarafından 1997'de gebe plazmasında keşfedilen hücre-dışı fetal DNA (hdfDNA) ile RhD'nin prenatal dönemde belirlenmesi anti-D profilaksisine ihtiyaç duyulmayan fetüslerin invaziv olmayan yöntemle tespiti için kullanılmıştır (6,7). 2016'da yapılan geniş çapta bir metaanaliz çalışmasında, RHD genotiplemesinin tanısal doğruluğu ve klinik etkililiği gösterilmiştir. Bu çalışma sonucu RHD genotiplemesi için %0,34 yanlış negatif oran ve %3,86 yanlış pozitif oran tespit edilmiştir. Bu ve benzeri sonuçlar neticesinde artık birçok ülkede, maternal plazma veya serumdan, dolaşımdaki hdfDNA'yı kullanarak fetal RhD durum tespiti rutin olarak kullanılmaktadır (8,9). Ayrıca erken tanı anti-D kullanımında hassas davranılmasını da sağlayacaktır (10).

Yakın zamanda yaptığımız bir çalışmada invaziv olmayan yöntem ile maternal kandan elde edilen hdfDNA ve hatta eksozom ile gerçek-zamanlı PZR yöntemi kullanarak fetal RHD ve SRY genotiplemesinin başarılı olduğu gösterildi. Bu yöntemin her hasta için uygulanabilir ve güvenilir olduğu tarafımızdan tespit edildi (11). Ülkemizde, prenatal tanıda kullanılan yöntemler sırasında karşılaşılan tanı zorluğu ve bu kaotik süreçte hastaya yansıyan maddi ve manevi zorluklar dikkati çekmektedir.

Bu çalışmada, fetüsün RhD (+) olma şüphesiyle hemen hemen her RhD (-) gebeye uygulanan ek testler ve tedavinin hastaya yansıyan maddi yönü ile gerçek zamanlı PZR tekniği ile fetal RHD genotiplemesi yapılmasının maliyet analizini gerçekleştirildi. Uygulanılan bu yöntem, yaklaşık 3,5 kat daha az bir maliyet ile RhD uyumsuzluğunun tanıdaki başarısını arttırmakta ve gereksiz profilaksi uygulanmasının önüne geçilebilmektedir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Örneklerin Toplanması ve Hücre Dışı Fetal DNA İzolasyonu Gerçek Zamanlı PZR Analizi ve Değerlendirmesi

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışma İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 08.12.2017 tarihli 20 no'lu toplantısındaki onay ile başlamıştır ve İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri 29083 nolu proje ile desteklenmiştir. Bu retrospektif çalışmaya, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Okmeydanı Eğitim ve

Araştırma Hastanesi'nin Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğine başvuran, RhD uyumsuzluğu bulunup gebelik haftası 9 ila 40 hafta arası olan RhD (-) gönüllü gebeler, onam formu alınarak dâhil edilmiştir. Gerçekleştirilen hücre-dışı DNA izolasyon ve gerçek zamanlı PZR protokolleri önceki çalışmamızda açıklanmıştır (11).

Maaliyet Analizi

Türkiye Cumhuriyeti, Sosyal Güvenlik Kurumunun, devlet hastaneleri için kullandığı ücretlendirme sistemi *Sağlık Uygulama Tebliği (SUT 2020)* verileri referans alınarak maliyet ve ekonomik değerlendirme yapılmıştır. SUT verilerine göre RhD (-) gebelere yapılan ek test kodlarının ücretleri ile RHD genotiplemesi için girilen SUT kodlarının ücretlerinin kıyaslanması yapılmıştır. RhD (-) gebeye uygulanan maliyet kalemleri; jinekolojik muayene, yabancı antikor taraması (indirect Coombs), 1 flakon anti-D uygulaması, fetal ultrasonografi (USG) ve fetal orta serebral arter doppler ultrasonografi, (MCA Doppler) uygulamaları olduğu belirlenmiştir (Tablo 1). Ücretlendirmesi belirtilen kodlara göre yapılabilecek gebeye başına maliyet hesaplanmıştır.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Her yıl çok sayıda gebeyi etkileyerek fetal ve neonatal sonuçları olabilen kan uyumsuzluğunun, erken teşhis ve tanı ile ortaya çıkabilecek komplikasyonların engellenmesi ve risk altındaki fetüsün invaziv olmayan takibine imkân sağlayan yeni yaklaşımların geliştirilmesi, bu alandaki araştırmaların temelini oluşturmaktadır. Günümüzde RhD (-) bir gebenin izlenmesinde uygulanan yaklaşım şu şekildedir. Gebelere 12-16 hafta arası gebe takip sisteminde uygulanan rutin testlere ek olarak serolojik temelli test olan indirekt Coombs testi yapılmaktadır. Uygulanan bu test sonucuna göre tedaviye yön verilmektedir. İndirekt Coombs testi negatif ise, gebeye 28. haftada anti-D profilaksisi uygulanmaktadır (12). Eğer indirekt Coombs testi pozitif ise, testten elde edilen titreye göre tedaviye yön verilmektedir. Eğer titre, 1/32'den yüksek ise, bebeğin ultrasonografik bulguları değerlendirilmeye alınır. Ultrasonografi sonucuna göre fetal MCA doppler ile bebeğin sistolik basınç değeri fetüsün anemiden etkilenip etkilenmediğini belirlemede yardımcı olur. Yüksek etkilenme sonucu fetüsün durumuna göre kordosentez önerilir. Ancak, anneye önceki gebeliğinde yapılan anti-D kaynaklı yalancı indirekt Coombs pozitifliğine sebebiyet verebilir. Yalancı pozitiflik durumunda yapılacak olan tüm bu işlemler anne ve fetüs için yıpratıcı olmaktadır. İnvaziv olmayan yöntem ile maternal kandan elde edilen hdfDNA ile gerçek-zamanlı PZR yöntemi kullanarak fetal RHD genotipleme başarısı tarafımızdan ve farklı gruplar tarafından tespit edilmiştir (11,13-15).

Çalışmamızda, maliyet analizi gerçekleştirilmiştir. Halen kullanılan yaklaşım ile yenilikçi bir yaklaşım olan fetal RHD genotipleme sonucu hastaya yansıyan ücretler kıyaslanmıştır. Tablo 1'de RhD (-) gebelere uygulanan ek işlemler ve bunların maliyet analizi gösterilmiştir. Maliyet analizinde SGK'nın Devlet hastaneleri için kullandığı ücretlendirme sistemi olan Sağlık Uygulama Tebliği (SUT 2020) temel alınmıştır. Bu sisteme göre RhD (-) gebeye uygulanan girişimlerin toplam maliyeti 733,19 TL olarak hesaplanmıştır. RhD (-) gebede fetal RHD durumunun

belirlenmesi için uygulanan bu yönteminin karşılığı olan 1-5 çift gen analiz işlemin maliyeti ise 210 TL olarak belirlenmiştir.

Tablo 1. Sosyal Güvenlik Kurumu Sağlık Uygulama Tebliği (SUT 2020) Verilerine Göre Test Ücretleri.	
RhD (-) Gebelere Yapılan Ek Testler	Ücretler (₺)
Jinekolojik Gebe Muayenesi	50,00
Yabancı Antibody Taraması (Indirect Coombs)	10,00
1 Flakon Anti-D	607,76
USG	30,25
MCA Doppler	35,18
Toplam	733,19
Fetal RHD Genotiplemesi	
1-5 Çift Baz RT-PCR Uygulaması	210,00
Toplam	210,00

İki farklı yaklaşım arasındaki ücret farkı her bir hasta için 523,19 TL olduğu gösterilmiştir.

Maliyet avantajı açısından öne çıkan gerçek zamanlı PZR yöntemi aynı zamandan uygulanabilirlik olarak da en kolay ve ucuz yöntemlerden bir tanesidir. Son dönemlerde daha hassas olması bakımından tanı alanında kendine hızlı yer edinen yeni nesil dizileme tekniğine göre pratikliği, sarf malzeme alanında ki çeşitliliği, teknik eleman yeterliliği ve uygulanabilirliği yönüyle kısa sürede etkinliğini gösterecektir. Çeşitli ülkelerde, RHD genotiplemesinin maliyet açısından yapılan değerlendirmelerinde de uygulanan bu tekniğin maliyetinin çok daha düşük olduğu gösterilmiştir (16,17). Tüm bunlara ek olarak, hastanelerin gereksiz hasta iş yükünü ve invaziv bir girişim olan kordosentez uygulamasıyla oluşabilecek komplikasyon riskini (18) ortadan kaldırmaktadır. İnvazif olmayan fetal RhD genotipleme metodu kullanılarak fetüsün RhD durumunun erken belirlenmesi, RhD (-) gebelerde izlenecek gözlem ve müdahale yönetimini önemli ölçüde değiştirilmesine neden olacaktır (16,19). Uygun anti-D profilaksi sağlamak için testin tüm RhD (-) gebeler için sistematik bir şekilde kullanılması, gereksiz uygulanacak işlemler toplamında kişi başına 523,19 TL bir kazanç sağlayacaktır. Maliyetler farklı stratejilerle azaltılabilir de, elde ettiğimiz sonuç bu ve benzeri güncel tanı yaklaşımlarının etkin bir maliyet düşürme stratejisi olduğunu göstermektedir. Yapmış olduğumuz önceki çalışmada, Türkiye'de RhD (-) gebeden doğan RhD (-) bebek oranının %10 olduğu tespit edildi (11). Bu gebelerin gereksiz anti-D gibi kan ürünü almalarının önüne geçilmesi ve yanlış kullanımın önüne geçilmesini sağlayacaktır.

Sonuç olarak, invazif olmayan fetal RHD genotiplemesi için uygulanan bu yöntem ile tedavi seyri ve başarıyı kolaylaştırma yanında, gebeye gereksiz tedavi uygulama yapılmasını ve oluşan ek maliyeti azaltacağı öngörülmektedir.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik kurul onayı, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından verilmiştir (08.12.2017/20).

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarımı - B.Y., O.Ş., S.S.T.; Veri Toplama - B.Y., O.Ş., S.S.T.; Veri Analizi/Yorumlama - B.Y., O.Ş., S.S.T.; Literatür tarama - B.Y., O.Ş., S.S.T.; Yazım - B.Y., O.Ş., S.S.T.; Eleştirel inceleme - B.Y., O.Ş., S.S.T.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 29083.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the Istanbul University Faculty of Medicine Clinical Research Ethics Committee (08.12.2017/20).

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - B.Y., O.Ş., S.S.T.; Data Collection - B.Y., O.Ş., S.S.T.; Data Analysis and/or Interpretation - B.Y., O.Ş., S.S.T.; Literature Search - B.Y., O.Ş., S.S.T.; Writing - B.Y., O.Ş., S.S.T.; Critical Reviews - B.Y., O.Ş., S.S.T.

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

Financial Disclosure: This work was supported by the Scientific Research Projects Unit of Istanbul University. Project No: 29083.

KAYNAKLAR

1. Fasano RM. Hemolytic disease of the fetus and newborn in the molecular era. Seminars in Fetal and Neonatal Medicine 2016; 21(1): 28-34. [CrossRef]
2. Kumar S, Regan F. Management of pregnancies with RhD alloimmunisation. British Medical Journal 2005; 330(7502): 1255-8. [CrossRef]
3. de Haas M, Thurik FF, Koelewijn JM, van der Schoot CE. Haemolytic disease of the fetus and newborn. Vox Sanguinis 2015; 109(2): 99-113. [CrossRef]
4. Boggione CT, Luján Brajovich ME, Mattaloni SM, Di Mónaco RA, García Borrás SE, Biondi CS, et al. Genotyping approach for non-invasive foetal RHD detection in an admixed population. Blood Transfus 2017; 15(1): 66-73.
5. Smits-Wintjens VEJ, Walther FJ, Lopriore E. Rhesus haemolytic disease of the newborn: Postnatal management, associated morbidity and long-term outcome. Semin Fetal Neonatal Med 2008; 13(4): 265-71. [CrossRef]
6. Lo YMD, Bowell PJ, Selinger M, Mackenzie IZ, Chamberlain P, Gilmer MDG, et al. Prenatal determination of fetal RhD status by analysis of peripheral blood of rhesus negative mothers. The Lancet 1993; 341(8853): 1147-8. [CrossRef]
7. Dovč-Drnovšek T, Klemenc P, Toplak N, Blejec T, Bricl I, Rožman P. Reliable determination of fetal RhD status by RHD genotyping from maternal plasma. Transfus Med Hemotherapy 2013; 40(1): 37-43. [CrossRef]

8. Benachi A, Delahaye S, Leticee N, Jouannic JM, Ville Y, Costa JM. Impact of non-invasive fetal RhD genotyping on management costs of rhesus-D negative patients: Results of a French pilot study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2012; 162(1): 28-32. [\[CrossRef\]](#)
9. González-González C, Garcia-Hoyos M, Trujillo-Tiebas MJ, Lorda-Sanchez I, Rodríguez De Alba M, Infantes F, et al. Application of fetal DNA detection in maternal plasma: A prenatal diagnosis unit experience. In: *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2005; 53(3): 307-14. [\[CrossRef\]](#)
10. Yang H, Llewellyn A, Walker R, Harden M, Saramago P, Griffin S, et al. High-throughput, non-invasive prenatal testing for fetal rhesus D status in RhD-negative women: A systematic review and meta-analysis. *BMC Medicine* 2019; 22(13): 1-172. [\[CrossRef\]](#)
11. Yaşa B, Şahin O, Öcüt E, Seven M, Sözer S. Assessment of Fetal Rhesus D and Gender with Cell-Free DNA and Exosomes from Maternal Blood. *Reprod Sci* 2020; doi: 10.1007/s43032-020-00321-4 [\[CrossRef\]](#)
12. Lambertino JRM, Villegas SMG. Rh Alloimmunization in pregnancy womens, A look to diagnosis and therapeutic approach. *Ginecol Obstet Mex* 2014; 82(11): 744-54.
13. Clausen FB, Barrett AN, Akkøk CA, Armstrong-Fisher S, Bergström KD, Boggione CT, et al. Noninvasive fetal RHD genotyping to guide targeted anti-D prophylaxis-an external quality assessment workshop. *Vox Sang* 2019; 114(4): 386-393. [\[CrossRef\]](#)
14. Schmidt LC, Cabral ACV, Faria MA, Monken F, Tarazona-Santos E, Martins ML. Noninvasive fetal RHD genotyping from maternal plasma in an admixed Brazilian population. *Genet Mol Res* 2014; 13(1): 799-805. [\[CrossRef\]](#)
15. Macher HC, Noguero P, Medrano-Campillo P, Garrido-Mirquez MR, Rubio-Calvo A, Carmona-González M, et al. Standardization non-invasive fetal RHD and SRY determination into clinical routine using a new multiplex RT-PCR assay for fetal cell-free DNA in pregnant women plasma: Results in clinical benefits and cost saving. *Clin Chim Acta* 2012; 413(3-4): 490-4. [\[CrossRef\]](#)
16. Sparks TN, Caughey AB. How should costs and cost-effectiveness be considered in prenatal genetic testing? *Seminars in Perinatology* 2018; 42(5): 275-282. [\[CrossRef\]](#)
17. Darlington M, Carbonne B, Mailloux A, Brossard Y, Levy-Mozziconacci A, Cortey A, et al. Effectiveness and costs of non-invasive foetal RHD genotyping in rhesus-D negative mothers: A French multicentric two-arm study of 850 women. *BMC Pregnancy Childbirth* 2018; 18(1): 496. [\[CrossRef\]](#)
18. Sherwood K, Weimer ET. Characteristics, properties, and potential applications of circulating cell-free dna in clinical diagnostics: a focus on transplantation. *Journal of Immunological Methods* 2018; 463: 27-38. [\[CrossRef\]](#)
19. Kostenko E, Chantraine F, Vandeweyer K, Schmid M, Lefevre A, Hertz D, et al. Clinical and Economic Impact of Adopting Noninvasive Prenatal Testing as a Primary Screening Method for Fetal Aneuploidies in the General Pregnancy Population. *Fetal Diagn Ther* 2019; 45(6): 413-423. [\[CrossRef\]](#)

Betülinik Asit ve Antikanser Etkileri

Betulinic Acid and its Anticancer Effects

Merve Nur Ataş¹ , Arzu Ergen¹ 

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

ORCID ID: M.N.A. 0000-0001-5045-5095; A.E. 0000-0001-5736-8453

Cite this article as: Ataş MN, Ergen A. Betülinik asit ve antikanser etkileri. Experimed 2020; 10(3): 128-34.

ÖZ

Son yıllarda, bitkilerin yapısında doğal olarak bulunan bileşiklere duyulan ilgi giderek artmaktadır. Bu bileşiklerin sağladıkları faydalar nedeniyle günlük kullanımın yanı sıra kanser tedavisinde terapötik olarak kullanılmasına yönelik çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalar, güncel kanser tedavilerinde kullanılan kemoterapötiklerin ortaya çıkardığı yan etkiler nedeniyle doğal kaynaklı ve apoptozu uyaraabilen kemoterapötiklerin geliştirilmesini amaçlamaktadır. Bu bileşiklerden biri olan betülinik asit, lupan tipi pentasiklik triterpenoid olup çeşitli ağaçların kabuklarında bulunan bir sekonder metabolittir. Betülinik asit, antiviral ve antiinflamatuar etkiler gibi biyolojik aktivitelerin yanı sıra güçlü bir antikanser aktiviteye sahiptir. Bu antikanser aktivitesini, mitokondriyal apoptozu teşvik ederek, hücre siklusunu ve anjiyogenezi düzenleyerek ve kanser gelişimi için önemli birçok yolağı aktive veya inaktive ederek gerçekleştirir. Betülinik asit gibi doğrudan mitokondriyi etkileyen moleküller, tedavi sürecinde oluşabilecek ilaç direncini engellemek için büyük umut vaad etmektedir. Ayrıca betülinik asidin kanser hücrelerini doğrudan etkileyip sağlıklı hücrelere karşı toksik etkisinin olmaması geliştirilmekte olan kemoterapi stratejilerinde onu potansiyel antikanser molekül haline getirmektedir.

Bu derlemede, betülinik asidin yapısal ve biyolojik özellikleri ile çeşitli kanser türlerindeki antikanser etkilerinin tartışılması amaçlanmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Betülinik asit, kanser, apoptoz

GİRİŞ

Kanser, onkogenlerin aktivasyonu, tümör baskılayıcıların inaktivasyonu, epigenetik modifikasyonlar, kontrolsüz hücre büyümesi ve metastaz ile karakterize, dünya üzerinde insidansı ve mortalitesi giderek artmakta olan genetik bir hastalıktır (1,2). Kanseri etkileyen bu faktörlerin çoğu, kanser araştırmalarındaki tanı, prognostik ve tümöral belirteç ile, tedavi yaklaşımlarının oluşturulması için yol gösterici olmuştur.

ABSTRACT

In recent years, interest in naturally occurring compounds in plants has been increasing. Due to the benefits of these compounds, various studies have been carried out for their therapeutic use in cancer treatment as well as in daily use. These studies have aimed to develop chemotherapeutics that are natural and can stimulate apoptosis due to the side effects of chemotherapeutics used in current cancer treatments. One of these compounds, betulinic acid, is lupane-type pentacyclic triterpenoid, a secondary metabolite found in the bark of various trees. Betulinic acid has strong anticancer properties as well as antiviral and anti-inflammatory effects. It performs its anticancer functions by promoting the mitochondrial apoptosis, regulating cell cycle and angiogenesis, and activating or deactivating many pathways which are important for cancer development. Molecules that directly affect mitochondria such as betulinic acid, hold great promise in preventing drug resistance that may occur in the treatment process. In addition, the fact that betulinic acid directly affects cancer cells and has no toxic effect on healthy cells makes it a potential anticancer molecule in developing chemotherapy strategies.

This review aims to discuss the structural and biological properties of betulinic acid and the anticancer effects in various cancer types.

Keywords: Betulinic acid, cancer, apoptosis

Uzun yıllar boyunca geliştirilen tedaviler tümör ilerlemesinin, nüksünün ve mortalitenin azaltılması amacı ile geliştirilmiş sitotoksik kemoterapiye dayanmaktadır. Bu kemoterapiler, tüm mitotik hücreleri hedef aldığından kanser hücrelerinin yanında bazı normal doku hücrelerine de zarar verebilmektedir (3). Son yıllarda kanser vakalarındaki artış ve mevcut kemoterapilerin yan etkileri, normal hücreler üzerinde zararlı etkisi olmayan, sadece kanser hücrelerinde toksik etki gösteren yeni ilaçların araştırılmasına yol açmıştır (4).

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Arzu Ergen **E-posta:** aergen@istanbul.edu.tr

Başvuru/Submitted: 27.08.2020 **Kabul/Accepted:** 28.09.2020



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

Etkili antikanser ajanlar geliştirmek için önemli bir strateji, bitkilerin, biyolojik olarak uyumlu ve daha az toksik etkileri olan ve bu nedenle potansiyel antikanser ajan haline gelen sekonder metabolitleri olmuştur. Sekonder metabolitler, çoğunlukla bir organizma tarafından üretilen ve büyümesi ve gelişmesi için gerekli olmayan, stres ve savunma yanıtı olarak üretildiği düşünülen küçük organik moleküllerdir (5). Bitkilerin yapısında bulunan sekonder metabolitler başlıca; fenolikler, alkaloidler, flavonoidler ve terpenoidlerdir (6).

Bitkiler tarafından üretilen sekonder metabolitler arasında yaklaşık 40.000 üyesi ile en büyük ve en çeşitli kimyasal sınıfta temsil eden terpenoidler, polimerik izopren türevleridir ve mevalonik asit yolağı ile asetattan sentezlenir (7). Bu bileşikler yapısındaki karbon ve izopren birimlerinin sayısına bağlı olarak monoterpenoidler, diterpenoidler ve triterpenoidler olarak sınıflandırılmaktadır.

Triterpenoid grubunun bir üyesi olan betülinik asit, yapısında pentasiklik izopren birimleri bulunan lupan alt tipi bir bileşiktir. Başlıca *Betula sp.*, *Betulaceae* bitkilerinin kabuklarından elde edilirken, *Platanus acerifolia*, *Euphorbiaceae Vochysia divergen*, *Ficus pandurata*, *Pterospermum heterophyllum* ve *Vitex negundo* gibi bitkilerin kabukları ve yaprakları da betülinik asit için kaynak oluşturur (8). Betülinik asidin antiinflamatuvar, antianjiyogenik, antiviral ve immünmodülatör etkilerinin yanında güçlü antikanser aktivitesi bulunur (9). Betülinik asidin antikanser aktivitesini, çeşitli kanser türlerinde yapılan çalışmalarda apoptozu tetikleyerek gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Apoptozun mitokondri yolağını hedeflemek kanser hücrelerinin yaşam stratejilerinden biridir. Betülinik asit ve türevlerinin, pro-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin ve kaspazların aktivasyonları ile apoptozun mitokondriyal yolunu aktive etmenin yanında, hücre siklusunu ve anjiyogenezi düzenleyerek potansiyel antikanser etki sergilediği bilinmektedir (10,11).

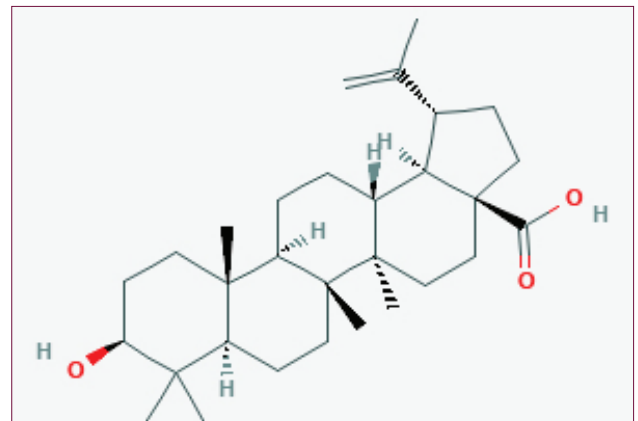
Bu derlemede, betülinik asidin biyokimyasal özellikleri, antikanser aktivitesi, hücreler üzerindeki etki mekanizması, mev-

cut durumda ve gelecekteki kanser tedavi seçeneklerine olası katkıları çeşitli kanser türlerinde yapılan güncel çalışmalar ile birlikte tartışılmıştır.

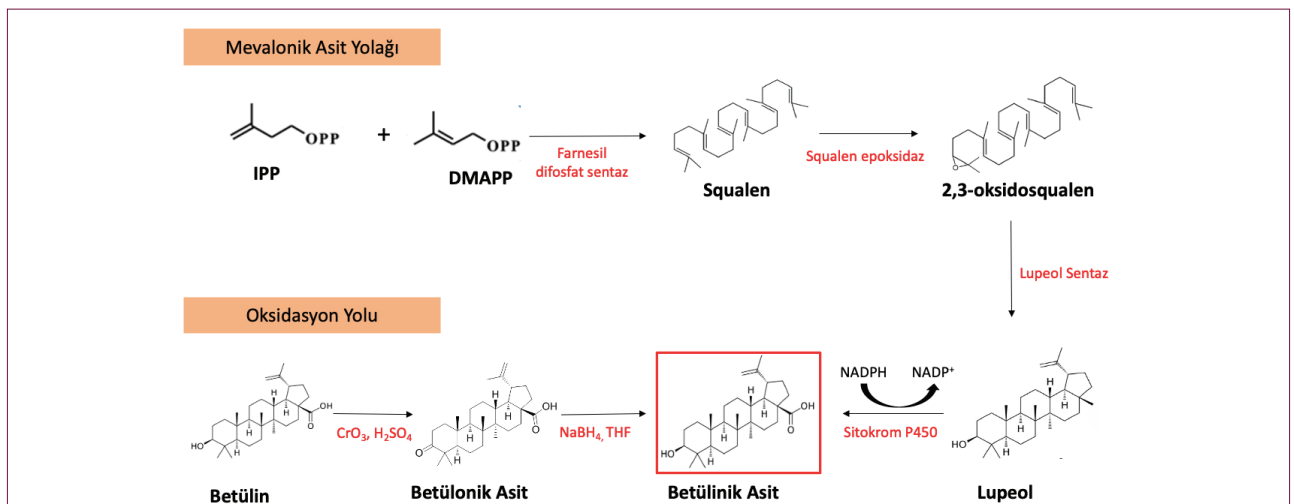
Betülinik Asidin Yapısı ve Sentezi

Sahip oldukları çeşitli biyolojik aktiviteler nedeniyle önemli bir terpenoid grubu olan triterpenoidler, 30 karbonlu, altı izopren birimine sahip bileşiklerdir ve yapılarındaki izopren birimleri asiklik (mono) veya polisiklik (mono, bi, tri, tetra, penta) yapıda bulunabilir. Bu bileşikler karmaşıklıklarına göre sentezlendikleri bitkilerin farklı bölgelerinde, farklı formlarda bulunabilirler (12).

Betülinik asit (3β-hidroksi-lup-20(29)-en-28-oik asit), temel olarak geleneksel tıpta yüzyıllardır kullanılan huş ağacından (*Betula sp*) ve *Ziziphus*, *Syzygium*, *Paeonia* cinslerinin çeşitli türlerinden izole edilebilen lupan tipi pentasiklik triterpenoid sınıfının bir üyesidir (Şekil 1) (13).



Şekil 1. Betülinik asidin kimyasal yapısı (13. kaynaktan uyarlanmıştır).



Şekil 2. Betülinik asidin sentez yolları (50. kaynaktan uyarlanmıştır).

Bitkiler, triterpenoid sentezinde gerekli olan öncül bileşenleri üretmek için mevalonik asit (MVA) yolağını tercih ederler. Betülinik asidin biyosentezi, tüm terpenoidlerin öncülleri olan ve mevalonik asit yolağından sentez edilen izopentenil difosfat (IPP) ve dimetil allil difosfat (DMAPP) molekülleri ile başlar. Bu biyosentezde iki önemli basamak bulunur: 1. Bitkilerde triterpenoidlerin ve steroidlerin ortak öncüsü olan 2,3-oksidoskualen molekülünün oksidoskualen sıklazlar tarafından halkasal forma dönüşmesi ile lupeol sentezi; 2. Lupeol sentezlendikten sonra sitokrom P450 enzimleri ile C28 pozisyonundan oksidasyonu ile betülinik asit bileşiğinin oluşturulmasıdır (14,15) (Şekil 2).

Betülinik asit çok sayıda bitkinin içeriğinde bulunmasına rağmen ekstraksiyonda elde edilen betülinik asit oranı düşüktür (%3-4). Bu nedenle ekstraksiyon verimliliğini arttırmak için yarı-sentetik bir üretim şekli olarak, yine pentasiklik triterpenoid bir bileşik olan ve bitki kabuklarında betülinik aside kıyasla daha yüksek miktarda bulunan (%22-30) betülin'den oksidasyon yoluyla betülinik asit üretimi sağlanabilmektedir. Diğer bir üretim şekli olarak mayalardan mikrobiyal fermentasyon yolu kullanılmaktadır (8).

Betülinik Asidin Etki Mekanizması

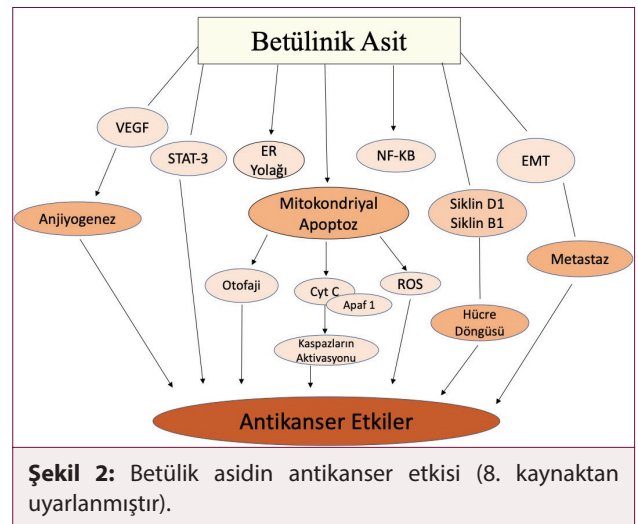
Uzun yıllar bitkilerden elde edilen bileşikler, antikanser terapilerinin önemli bir kaynağı olarak ön plana çıkmışlardır ve kemoterapiye kıyasla düşük toksisite nedeniyle kanserin önlenmesi ve tedavisinde hayati bir rol oynamıştır. Bitki kaynaklı potansiyel antikanser ilaçların kanser hücreleri üzerinde çeşitli etki mekanizmaları bulunur. Bu mekanizmalar, çoğunlukla intrinsik, ekstrinsik, kaspaz ve / veya p53'e bağımlı veya bağımsız apoptotik hücre ölümü olmakla birlikte apoptotik olmayan hücre ölümü mekanizmalarını da içermektedir (16).

Intrinsik apoptoz yolağı, mitokondriyal yolak olarak bilinir ve hücre içerisinde meydana gelen DNA hasarı veya hücrel stres cevap olarak aktive olur. Bu yolağın aktivasyonu, dış mitokondri membranının permeabilizasyonu (MOMP) ile mitokondri membran potansiyelinin kaybolması ile başlar, mitokondriden sitokrom c ve apoptotik proteinlerin salınımı ve kaspazların aktivasyonu ile sonuçlanır. Hücrelerde, mitokondri membranlarının geçirgenliği, ölüm ve sağkalım arasındaki sınırı belirleyen faktördür (17). Diğer yandan mitokondri, hücrede biyoenerjetik metabolizmasının düzenlendiği ana merkezdir. Kanser hücrelerinin çeşitli stres koşulları altında metabolizmalarını modüle etmelerini sağlayarak, metastaz kapasitesinin elde edilmesi ve kemoterapötik ilaçlara direnç geliştirilmesi de dahil olmak üzere kanser gelişimi ve ilerlemesinin önemli belirleyicileri olarak ortaya çıkan hücre içi sinyal merkezinin kilit noktası mitokondridir. Bu nedenle, kanser hücrelerinin mevcut kemoterapilere karşı geliştirdiği direnç mekanizmalarının önüne geçilmesi ve mitokondri membran geçirgenliğini doğrudan etkileyerek hücre ölümünü tetikleyen ajanlar geliştirilmesi kemoterapi stratejilerinin nihai hedefidir (18).

Apoptozun indüksiyonu yolu ile kanser hücrelerinin hedeflenmesi, tedavi seçenekleri açısından etkili bir yöntemdir. Mevcut kemoterapiler çoğunlukla, hücrel stresin veya p53'ün aktif-

leştirilmesi yolu ile intrinsik apoptoz yolağının indüklenmesi veya ölüm reseptörleri ile ekstrinsik apoptoz yolağının indüklenmesini hedefler. Betülinik asit, mevcut kemoterapi ajanlarından farklı olarak kanser hücrelerinde doğrudan mitokondri membran potansiyelini etkileyebilen potansiyel antikanser bileşiklerden biridir (10). Mitokondri membran geçirgenliğini etkileyerek sitokrom C, Smac ve apoptoz indükleyici faktör (AIF) proteinlerinin sitozole salınmasına neden olur. Salınan bu proteinler sırasıyla kaspaz-9, kaspaz-3 ve kaspaz-7'nin aktivasyonuna yol açarak DNA fragmentasyonuna ve sonunda hücrenin apoptozuna neden olur (11). Bununla birlikte çeşitli çalışmalarla betülinik asidin farklı kanser türlerinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu ve pro-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin ekspresyonlarını arttırarak mitokondriyal apoptozu desteklediği görülmüştür (19,20). Ayrıca betülinik asit, ana etki mekanizması mitokondriyal etkilemek olsa da tümör nekroz faktörü-ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) ile birlikte FADD seviyelerinin ve p53 aktivitesinin artışına neden olarak ekstrinsik apoptoz yolağını da uyarabilmektedir (21).

Apoptotik hücre ölüm mekanizmalarını doğrudan uyarabilmesinin yanında betülinik asit, kanser gelişiminde etkili ve dolaylı olarak apoptozu neden olabilen hücrel yolaklar üzerinde düzenleyici etki göstermektedir (Şekil 3). Bu bağlamda, NF-κB'nin nukleusa transloke olmasını sağlayan proteinin aktivasyonunu baskılayarak (22) ve STAT3 proteininin negatif regülatörü olan proteinin ekspresyonunu arttırarak bu iki yolağın inhibisyonuna sebep olduğu görülmüştür (23). Bununla birlikte siklin D1 ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) (24) ekspresyonlarını baskılayarak hücre siklusunu ve anjiyogenezi düzenlediği ve metastatik süreçleri yönlendiren moleküller olan matriks metalloproteinazların (25) ekspresyonlarını azaltarak kanser metastazını baskıladığı bildirilmiştir.



Şekil 2: Betülinik asidin antikanser etkisi (8. kaynaktan uyarlanmıştır).

Betülinik Asidin Antikanser Etkileri

Bitkilerden elde edilen doğal bileşikler sağladıkları yararlar nedeniyle yüzyıllardır kullanılmaktadır. İyileştirici özellikleri nedeniyle bu bileşiklerin potansiyel terapötik özellikleri üzerine yapılan kapsamlı çalışmalar, bu bileşiklerden birçoğunun

kanser tedavisinde kullanılabilecek güçlü antikanser etkilere sahip olduğu ortaya koymuştur. Benzer şekilde, betülinik asit ve türevlerinin antikanser etkileri, çeşitli kanser türlerindeki hücre soylarında, primer tümör kültürlerinde ve tümör ksenograft modellerinde *in vivo* ve *in vitro* olarak kapsamlı bir şekilde incelenmiştir.

Birçok çalışma, betülinik asidin kanser hücrelerine etki ettiğini ancak sağlıklı hücreler üzerinde toksik etki göstermediğini bildirmiştir. Betülinik asidin bu seçici toksisite özelliği ilk olarak Pisha ve ark. tarafından 1995 yılında melanoma hücre soylarında yapılan bir çalışmada gösterilmiştir. Çalışmada, betülinik asidin melanoma hücrelerinin canlılığını ve melanoma fare modellerinde tümör büyümesini azalttığı gözlemlenmiştir (26). Betülinik asidin hücrelerdeki apoptotik etki mekanizmalarına yönelik Fulda S. ve ark. yaptıkları çalışmalar ile birlikte, betülinik asidin nöroblastoma hücrelerinde aşırı ROS üretimine, mitokondriyal membran potansiyelinin kaybına neden olduğunu ve bunu takiben mitokondriden sitokrom C ve AIF salınımını uyararak mitokondriyal apoptozu tetiklediği belirlenmiştir (27,28). Bu çalışmalardan yola çıkılarak sonraki yıllarda betülinik asidin kolon, prostat, serviks, renal kanser, akciğer ve lösemi gibi diğer pek çok kanser türlerindeki hücre toksisitesi ve kanser gelişiminde etkili yollar ve süreçler üzerindeki olası etkilerinin incelendiği birçok çalışma yapılmış ve bu çalışmalar günümüzde de devam etmektedir.

Geleneksel etnofarmakolojide sıkça kullanılan *Alstonia scholaris* bitkisinin yapraklarından izole edilen 13 farklı triterpenoid ve sterollerin arasından betülinik asidin, A549 akciğer adenokarsinoma hücrelerinin canlılığını azaltarak anti-proliferatif aktiviteye sahip majör bileşenlerden biri olduğu bulunmuştur (29). Akciğer adenokarsinoma hücre soylarında yapılan diğer bir çalışmada, akciğer kanserinde sıklıkla mutasyonu gözlenen endotelial büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) tirozin kinaz inhibitörleri (TKI) Gefitinib ve Erlotinib'e dirençli H1975 ve EGFR mutant TKI duyarlı HCC827 hücre soylarında betülinik asidin, EGFR-TKI ile kombine tedavisi sonucu H1975 hücrelerinin canlılığını azalttığı, apoptotik hücre oranını arttırdığı ve hücre döngüsü ilişkili proteinlerin ekspresyonunu azalttığı gözlemlenmiştir. Ek olarak, otofaji ilişkili proteinlerin ekspresyonlarını arttırıp mitokondriyal membran potansiyelinin kaybına yol açmıştır (30). Son yıllarda ilaç etkinliğinin iyileştirilmesinde nanopartikül teknolojisi sıklıkla kullanılmaktadır. Zhao ve ark. bir çalışmada akciğer kanseri hücre soylarında betülinik asit nanopartikülü uygulanması sonrası, hücrelerde kolesterol homeostazında görevli, bazı tümör hücrelerinde yüksek seviyelerde bulunan ve hücre sağlığı ile ilişkili olduğu gösterilen ATP bağlayıcı kaset taşıyıcı G1 (ABCG1) seviyelerinin önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Aynı zamanda betülinik asit nanopartikülünün hücrelerde migrasyonu ve invazyonu inhibe ettiği ve p21, p53 ve c-Myc seviyelerini azalttığı gözlemlenmiştir (31). Nanopartikül teknolojisine yönelik yapılan diğer bir çalışmada, betülinik asit içeren poli laktik ko-glikolik asit (PLGA) nanopartikülü hepatosellüler karsinoma rat modelinde tek başına betülinik asit uygulamasına kıyasla, kaspaz-3 ve kaspaz-9, pro-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin ve i-NOS ve e-NOS seviyelerinde daha fazla ar-

tışa neden olmuştur. Ayrıca, sıçanlarda karsinojenik koşullarda ortaya çıkan karaciğer hasarı nedeniyle artmış trigliserit, total kolesterol, düşük dansiteli lipoprotein (LDL), çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) ve azalmış yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) seviyeleri betülinik asit PLGA nanopartikülü tedavisi ile normal düzeylere gelmiştir (32).

Kanser hücrelerinin geliştirdiği ilaç dirençlerine yönelik olarak betülinik asidin, androjen reseptörü antagonisti direnci sıklıkla gözlenen prostat kanserinde androjen reseptör proteinini seviyelerini azaltmış ve multiple deubikuitinaz aktivitesini baskılayarak prostat kanseri hücrelerini seçici olarak hücre canlılığını azalttığı belirlenmiştir (33). Bununla birlikte betülinik asit, hipoksik koşullara maruz bırakılmış PC-3 prostat kanseri hücrelerinde artmış HIF-1 α ekspresyonunu ve hücrelerde HIF-1 α artışına bağlı olarak artış gösteren STAT3 ekspresyonunu azaltmıştır. Ayrıca HIF-1 α ve STAT3'ün hipoksik koşullarda cevap olarak aktive olan VEGF'nin promotör bölgesine bağlanmasını engelleyerek anti-anjiyogenik etki gösterdiği belirlenmiştir (34).

Mesua ferrea bitkisinin kabuğundan elde edilen ve aralarında betülinik asidin bulunduğu biyoaktif alt fraksiyonu, HCT116 kolorektal karsinoma hücrelerinde kaspaz-9, 3 ve 7 seviyelerinin artmasına, hücrelerin invazyonu ve migrasyonunu azaltarak metastatik kapasitelerinin baskılanmasına neden olmuştur. Ek olarak, kanser gelişiminde etkili yollar ve moleküller olan Wnt, HIF-1 α ve MAPK/ERK yolağının aşağı regülasyonuna neden olurken, p53 ve TGF- β 'yi yukarı regüle etmiştir (35). Benzer şekilde, yine kolorektal adenokarsinoma HT-29 hücrelerinin dahil olduğu bir çalışmada betülinik asit, bu hücrelerde Bcl-2 ve siklin D1 ekspresyonlarını azaltıp Bax ekspresyonlarını arttırarak antikanser etki göstermiştir (36).

Melanoma hücrelerinde yapılan bir çalışmada betülinik asit, hücrelerde apoptotik hücre ölümünü tetiklemiş, mitokondriyal membran potansiyelinin depolarizasyonunu sağlamıştır. Ayrıca, betülinik asit ROS üretimi ile bağlantılı olarak pro-apoptotik mitojen aktive protein kinaz (MAPK) proteinleri p38 ve JNK'nın fosforilasyonunu uyarmıştır (37).

Zeng ve ark. meme kanseri hücrelerinde betülinik asidin anti-metastatik etkileri üzerine yaptıkları bir çalışmada, metastatik sürecin majör molekülleri olan matris metalloproteinazların (MMP-2, MMP-9) ekspresyonlarını azaltırken MMP-2 inhibitörü olan TIMP-2 ekspresyonlarını arttırmıştır. Bu veriler, farklı dozlarda betülinik asit uygulaması sonrası hücrelerin azalan migrasyon ve invazyon seviyeleri ile paralellik göstermiştir. Ek olarak, tümör taşıyan fare modelinde betülinik asit tümör büyümesini ve tümörün akciğer metastazını azaltmıştır. Yapılan immünohistokimyasal analizlerde matris metalloproteinazlar, Ki67 ve STAT3 seviyelerinde azalma görülmüştür. Betülinik asidin fare modellerinde toksik etki gösterip göstermediğini belirlemek amacıyla yapılan hematolojik ve serum biyokimya analizlerinde ise patolojik bir değişime rastlanmamıştır (38).

Kanser hücrelerinin değiştirilmiş metabolizmalarının hedeflenmesinin tümör büyümesi ve metastazının baskılanması için faydalı bir strateji olduğu düşünülmektedir. Bununla bağlantılı

olarak, meme kanseri hücrelerinde betülinik asit, endoplazmik retikulumda hücre stresin sensörü olan glikoz ilişkili protein 78 (GRP78) aracılığı ile laktat dehidrogenaz (LDH) ve pirüvat dehidrogenaz kinaz 1 (PDK1) gibi glikolitik proteinlerin seviyelerini azaltmıştır. Ayrıca betülinik asit tedavisine yanıt olarak, kanser hücrelerindeki birikimi metastatik ve metabolik değişimlere yol açan β -katenin ve c-Myc protein seviyelerinde azalma gözlemlenmiştir (39). Farklı bir çalışmada betülinik asit, triple negatif meme kanseri hücreleri, mikrovasküler endotel hücreler ile birlikte kültürlendiğinde VEGF ve temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ekspresyonlarını azaltmış, farklı dozlarda uygulandığında TNF- α , TLR4, NF- κ B1, IL-6, HIF-1 α , STAT3 ve i-NOS gibi inflamatuvar faktörlerin ve p21, p27, siklinD1, CDK-2 ve CDK-6 gibi hücre döngüsü ilişkili genlerin ekspresyonlarını azaltarak anti-inflamatuvar ve anti-anjiyogenik etki göstermiştir (40).

Betülinik asit, antikanser etkilerini hücre sağ kalım ile ilişkili farklı yollar üzerinden de gösterebilmektedir. Bu doğrultuda, Xu ve ark. servikal kanseri (HeLa) hücrelerinde yaptıkları bir çalışmaya göre, betülinik asit, doz ve zamana bağlı olarak fosfotidil inozitol 3 kinaz (PI3K) alt birimleri p110 α ve p85 seviyelerini ve PI3K'nin akış ağağında bulunan Akt'nin Ser473 ve Thr308 kalıntılarında fosforilasyonunu baskılayarak PI3K/Akt yolağı üzerinde inhibitör etki göstermiştir. Betülinik asit etkisi ile artan ROS üretiminin PI3K/Akt inhibisyonu üzerindeki doğrudan etkisini belirlemek amacı ile bir ROS antagonisti olan glutatyon ile birlikte uygulandığında, betülinik asidin yolak üzerindeki inhibitör etkisinin ve kaspaz-9 ve Bad üzerindeki stimülatör etkisinin ortadan kalktığı görülmüştür. Bu sonuçlar, ROS üretiminin betülinik asidin aracılık ettiği apoptoz sürecinde önemli bir faktör olduğunu desteklemiştir (41). Hepatosellüler karsinoma hücrelerinde yapılan bir çalışmada ise, betülinik asit pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonlarını arttırmasının yanında, Bcl-1, LC3B-II ekspresyonlarını arttırarak diğer bir hücre ölüm şekli olan otofajiyi aktive etmiştir. Diğer yandan otofajik proteinler ile eş zamanlı olarak PI3K, Akt ve mTOR proteinlerinin fosforilasyonunda azalma gözlenmesi, betülinik asidin PI3K/Akt/mTOR yolağını baskılayarak otofaji ve apoptotik hücre ölümünü uyardığını göstermektedir (42).

Diğer bir çalışmada, hipoksik koşullar altında inkübe edilen HeLa hücrelerinde gözlenen HIF-1 α birikimi, artan dozlarda betülinik asit uygulaması sonrası hücrelerde proteozom aktivitesinin artışı takiben azalma göstermiştir. Bu azalma ile birlikte, hipoksik koşullarda HIF-1 α 'nın hedef genleri olan VEGF, GLUT1, Hekzokinaz (HK) ve PDK1 ekspresyonlarında da azalma gözlenmiştir (43). Bununla birlikte farklı bir çalışmada, betülinik asit, akut miyeloid lösemi hücrelerinde aril hidrokarbon reseptörünün (AHR), promotörünün demetilasyonu yoluyla AHR gen ekspresyonunu önemli ölçüde arttırmıştır. Bu artış, AHR'nin aril hidrokarbon reseptörü nüklear translokatorünün (ARNT) HIF-1 α ile etkileşimini rekabetçi bir şekilde inhibisyonuna ve bu sayede HIF-1 α yolağının ve VEGF üretiminin baskılanmasına neden olmuştur (44).

Over kanseri hücrelerinde son yıllarda yapılan bir çalışmada, betülinik asidin tümör hücrelerinde metastazın başlangıcı ola-

rak kabul edilen, epitelyal karakterdeki hücrelerinin epitel özelliklerini kaybedip hareketli mezenkimal karakter kazandığı bir süreç olan epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) ile ilişkili proteinlerin seviyeleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Buna göre betülinik asit, mezenkimal protein N-kaderin ekspresyonunu azaltıp epitelyal protein olan E-kaderin ekspresyonunu arttırarak anti-metastatik etki göstermiştir (45). Benzer şekilde renal hücreli karsinoma hücre soylarında betülinik asit, MMP-2, MMP-9 ve mezenkimal protein Vimentin seviyelerini azaltırken E-kaderin ve TIMP-2 seviyelerinde artışa neden olmuştur (46).

Bir BCR-ABL tirozin kinaz inhibitörü olarak kullanılan imatinib Kronik miyeloid lösemi tedavisinde kullanılmaktadır. Histon deasetilazlar (HDAC) hücre proliferasyonu, farklılaşma ve apoptoz gibi hücre fonksiyonlarda rol oynar ve İmatinib dirençli lösemilerde aşırı ekspresyonları görülür. Kronik miyeloid lösemi hücreleri K562 ve imatinib dirençli K562R hücrelerinin kullanıldığı ve imatinib ve betülinik asidin birlikte uygulandığı bir çalışmada betülinik asit, imatinib dirençli hücrelerdeki HDAC ekspresyonunu posttranskripsiyonel seviyede azaltarak hücrelerin imatinibe duyarlılığını arttırmıştır (47).

Oral skuamöz hücreli karsinoma (OSCC) için etkili tedavilerden biri de hücre döngüsünü baskılayan, apoptotik hücre ölümünü arttıran ve tümör büyümesini azaltan radyoterapilerdir. Ancak OSCC vakalarında radyoterapi direnci yaygın olarak gözlenir. NF- κ B ve STAT3 yollarının yanında spesifik protein 1 (Sp1)'in; PTEN tümör baskılayıcı proteinin ekspresyonunu bastırarak radyoterapi direncinde etkili olduğu bilinmektedir. Bu bilgilerden yola çıkılarak radyoterapi direnci gösteren OSCC hücrelerinde yapılan bir çalışmaya göre betülinik asit, Sp1 ekspresyonunu azalıp ve dolayısıyla PTEN ekspresyonunun artmasına sebep olarak hücrelerdeki radyoterapi direncini ortadan kaldırmıştır (48).

Betülinik asit ve türevlerinin kanser de dahil birçok hastalığın tedavisinde ve önlenmesindeki yüksek potansiyeli bir çok çalışma ile aydınlatılmış olmasına rağmen bu konu ile ilgili yapılmış sınırlı sayıda klinik çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle betülinik asidin uygulanabilecek tedavilerdeki gerçek etkinliği, tolere edilebilirliği ve güvenliği yeterince açık değildir (49).

SONUÇ

Kanser, tüm dünyada görülme sıklığı ve mortalitesi hızla artan, yaşam tarzı ve genetik faktörlerin etkili olduğu bir hastalıktır. Kanser oluşumunda ve gelişiminde, çevresel faktörler mutasyonlar ve farklı hücre yolaklarının etkileşimleri gibi çeşitli patolojik faktörler etkilidir. Bu faktörlerin çeşitliliği, kanser tedavisini standart olmaktan uzaklaştırmakta ve dahası hastalık sürecinde dinamikleşen faktörler mevcut tedavileri de etkisiz hale getirmektedir. Bu nedenle kanser tedavilerinde yeni yaklaşımlar oluşturmaya yönelik çalışmalara duyulan ihtiyaç sürekli hale gelmiştir. Bu çalışmalar neticesinde geliştirilen yeni tedavi ajanları, hedefe yönelik tedavi stratejileri ve ilaç kombinasyonları, gelişen klinik teknolojiler ile birlikte önemli bir başarı göstermiştir. Bununla birlikte, kimyasal ve sentetik ilaçların etkisizliği veya yan etkileri son yıllarda terapötik yaklaşımlar için

doğal bileşiklerin kullanılmasını gündeme getirmiştir. Bitkilerden elde edilen bileşiklerin kansere karşı terapötik etkilerinin incelenmesine yönelik çeşitli araştırmalar yapılmaktadır. Bu bağlamda, betülinik asit ve türevlerinin birçok kanser türünde seçici toksisite göstermesi, farklı yolak ve moleküller üzerinde etki göstermesi ve doğrudan mitokondriyi hedeflemesi, özellikle tedaviye dirençli ve agresif kanser türlerinde yararlı olabilecek sonuçlardır.

Bu derlemede özetlenen çalışmalar dikkate alındığında, betülinik asidin kanser tedavilerinde daha etkili kullanılabilmesi için moleküler mekanizmalarının daha iyi aydınlatılması, etkili ilaç iletim sistemlerinin geliştirilmesi ve biyoyararlanımının artırılmasına yönelik yeni çalışmalara ihtiyaç duyulduğu görülmektedir.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

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

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

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

Peer-review: Externally peer-reviewed.

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

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

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018; 68: 394-424. [CrossRef]
2. de Castro Sant' Anna C, Junior AGF, Soares P, Tuji F, Paschoal E, Chaves LC, et al. Molecular biology as a tool for the treatment of cancer. *Clin Exp Med* 2018; 18: 457-64. [CrossRef]
3. Francia R, Monaco A, Saggese M, Iaccarino G, Crisci S, Frigeri F, et al. Pharmacological profile and Pharmacogenomics of anti-cancer drugs used for targeted therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2018; 18(5): 499-511.
4. Lichota A, Gwozdinski K. Anticancer activity of natural compounds from plant and marine environment. *Int J Mol Sci* 2018; 19(11): 3533. [CrossRef]
5. Delgoda R, Murray JE. Evolutionary Perspectives on the Role of Plant Secondary Metabolites. In: Badal S, Delgoda R, editors. *Pharmacognosy*, Academic Press, 2017. p. 93-100. [CrossRef]
6. Kabera JN, Semana E, Mussa AR, He X. Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. *J Pharm Pharmacol* 2014; 2: 377-92.
7. Tholl D. Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2015; 148: 63-106. [CrossRef]
8. Zhang X, Hu J, Chen Y. Betulinic acid and the pharmacological effects of tumor suppression. *Mol Med Rep* 2016; 14: 4489-95. [CrossRef]
9. Csuk R. Betulinic acid and its derivatives: A patent review (2008-2013). *Expert Opin Ther Pat* 2014; 24: 913-23. [CrossRef]
10. Kumar P, Bhaduria AS, Singh AK, Saha S. Betulinic acid as apoptosis activator: Molecular mechanisms, mathematical modeling and chemical modifications. *Life Sci* 2018; 209: 24-33. [CrossRef]
11. Fulda S, Kroemer G. Targeting mitochondrial apoptosis by betulinic acid in human cancers. *Drug Discov Today* 2009; 14: 885-90. [CrossRef]
12. Cháirez-Ramírez M, Moreno-Jiménez M, González-Laredo R, Gallegos-Infante J, Rocha-Guzmán N. Lupane-type triterpenes and their anti-cancer activities against most common malignant tumors: A review. *EXCLI J* 2016; 15: 758-71.
13. Ríos J, Máñez S. New Pharmacological Opportunities for Betulinic Acid. *Planta Med* 2018; 84: 8-19. [CrossRef]
14. An T, Zha W, Zi J. Biotechnological production of betulinic acid and derivatives and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 2020; 104: 3339-48. [CrossRef]
15. Hordyjewska A, Ostapiuk A, Horecka A, Kurzepa J. Betulin and betulinic acid: triterpenoids derivatives with a powerful biological potential. *Phytochem Rev* 2019; 18: 929-51. [CrossRef]
16. Gali-Muhtasib H, Hmadi R, Kareh M, Tohme R, Darwiche N. Cell death mechanisms of plant-derived anticancer drugs: Beyond apoptosis. *Apoptosis* 2015; 20: 1531-62. [CrossRef]
17. Debatin K-M. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53: 153-9. [CrossRef]
18. Zhang X, Zhang S, Zhu S, Chen S, Han J, Gao K, et al. Identification of mitochondria-targeting anticancer compounds by an in vitro strategy. *Anal Chem* 2014; 86: 5232-7. [CrossRef]
19. Lee D, Lee SR, Kang KS, Ko Y, Pang C, Yamabe N, et al. Betulinic Acid Suppresses Ovarian Cancer Cell Proliferation through Induction of Apoptosis. *Biomolecules* 2019; 9: 257. [CrossRef]
20. Wang X, Lu X, Zhu R, Zhang K, Li S, Chen Z, et al. Betulinic Acid Induces Apoptosis in Differentiated PC12 Cells Via ROS-Mediated Mitochondrial Pathway. *Neurochem Res* 2017; 42: 1130-40. [CrossRef]
21. Xu Y, Li J, Li Q-J, Feng Y-L, Pan F. Betulinic acid promotes TRAIL function on liver cancer progression inhibition through p53/Caspase-3 signaling activation. *Biomed Pharmacother* 2017; 88: 349-58. [CrossRef]
22. Shankar E, Zhang A, Franco D, Gupta S. Betulinic Acid-Mediated Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells Involves p53 and Nuclear Factor-Kappa B (NF-κB) Pathways. *Molecules* 2017; 22. [CrossRef]
23. Pandey MK, Sung B, Aggarwal BB. Betulinic acid suppresses STAT3 activation pathway through induction of protein tyrosine phosphatase SHP-1 in human multiple myeloma cells. *Int J Cancer* 2010; 127: 282-92. [CrossRef]
24. Chintharlapalli S, Papineni S, Ramaiah SK, Safe S. Betulinic acid inhibits prostate cancer growth through inhibition of specificity protein transcription factors. *Cancer Res* 2007; 67: 2816-23. [CrossRef]
25. Zeng A, Hua H, Liu L, Zhao J. Betulinic acid induces apoptosis and inhibits metastasis of human colorectal cancer cells in vitro and in vivo. *Bioorg Med Chem* 2019; 27(12): 2546-52. [CrossRef]
26. Pisha E, Chai H, Lee IS, Chagwedera TE, Farnsworth NR, Cordell GA, et al. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nat Med* 1995; 1: 1046-51. [CrossRef]

27. Fulda S, Friesen C, Los M, Scaffidi C, Mier W, Benedict M, et al. Betulinic Acid Triggers CD95 (APO-1/Fas)- and p53-independent Apoptosis via Activation of Caspases in Neuroectodermal Tumors. *Cancer Res* 1997; 57(21): 4956-64.
28. Fulda S, Scaffidi C, Susin SA, Krammer PH, Kroemer G, Peter ME, et al. Activation of mitochondria and release of mitochondrial apoptogenic factors by betulinic acid. *J Biol Chem* 1998; 273: 33942-8. [\[CrossRef\]](#)
29. Wang CM, Yeh KL, Tsai SJ, Jhan YL, Chou CH. Anti-proliferative activity of triterpenoids and sterols isolated from *Alstonia scholaris* against non-small-cell lung carcinoma cells. *Molecules* 2017; 22(12): 2119. [\[CrossRef\]](#)
30. Ko JL, Lin CH, Chen HC, Hung WH, Chien PJ, Chang HY, et al. Effects and mechanisms of betulinic acid on improving EGFR TKI-resistance of lung cancer cells. *Environ Toxicol* 2018; 33: 1153-9. [\[CrossRef\]](#)
31. Zhao H, Mu X, Zhang X, You Q. Lung cancer inhibition by betulinic acid nanoparticles via adenosine 5'-Triphosphate (ATP)-binding cassette transporter G1 gene downregulation. *Med Sci Monit* 2020; 26: e922092-1.
32. Kumar P, Gautam AK, Kumar U, Bhadauria AS, Singh AK, Kumar D, et al. Mechanistic exploration of the activities of poly(lactic-co-glycolic acid)-loaded nanoparticles of betulinic acid against hepatocellular carcinoma at cellular and molecular levels. *Arch Physiol Biochem* 2020; 1-13. [\[CrossRef\]](#)
33. De las Pozas A, Reiner T, De Cesare V, Trost M, Perez-Stable C. Inhibiting Multiple Deubiquitinases to Reduce Androgen Receptor Expression in Prostate Cancer Cells. *Sci Rep* 2018; 8: 13146. [\[CrossRef\]](#)
34. Shin J, Lee HJ, Jung DB, Jung JH, Lee HJ, Lee EO, et al. Suppression of STAT3 and HIF-1 Alpha mediates Anti-Angiogenic activity of Betulinic acid in Hypoxic PC-3 prostate cancer cells. *PLoS One* 2011; 6(6): e21492. [\[CrossRef\]](#)
35. Asif M, Shafaei A, Abdul Majid AS, Ezzat MO, Dahham SS, Ahamed MBK, et al. *Mesua ferrea* stem bark extract induces apoptosis and inhibits metastasis in human colorectal carcinoma HCT 116 cells, through modulation of multiple cell signalling pathways. *Chin J Nat Med* 2017; 15: 505-14. [\[CrossRef\]](#)
36. Rzeski W, Stepulak A, Szymański M, Sifringer M, Kaczor J, Wejksza K, et al. Betulinic acid decreases expression of bcl-2 and cyclin D1, inhibits proliferation, migration and induces apoptosis in cancer cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2006; 374: 11-20. [\[CrossRef\]](#)
37. Tan YM, Yu R, Pezzuto JM. Betulinic acid-induced programmed cell death in human melanoma cells involves mitogen-activated protein kinase activation. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2866-75.
38. Zeng AQ, Yu Y, Yao YQ, Yang FF, Liao M, Song LJ, et al. Betulinic acid impairs metastasis and reduces immunosuppressive cells in breast cancer models. *Oncotarget* 2018; 9: 3794-804. [\[CrossRef\]](#)
39. Zheng Y, Liu P, Wang N, Wang S, Yang B, Li M, et al. Betulinic Acid Suppresses Breast Cancer Metastasis by Targeting GRP78-Mediated Glycolysis and ER Stress Apoptotic Pathway. *Oxid Med Cell Longev* 2019; 2019. [\[CrossRef\]](#)
40. Weber D, Zhang M, Zhuang P, Zhang Y, Wheat J, Currie G, et al. The efficacy of betulinic acid in triple-negative breast cancer. *SAGE Open Med* 2014; 2: 205031211455197. [\[CrossRef\]](#)
41. Xu T, Pang Q, Wang Y, Yan X. Betulinic acid induces apoptosis by regulating PI3K/Akt signaling and mitochondrial pathways in human cervical cancer cells. *Int J Mol Med* 2017; 40: 1669-78. [\[CrossRef\]](#)
42. Liu W, Li S, Qu Z, Luo Y, Chen R, Wei S, et al. Betulinic acid induces autophagy-mediated apoptosis through suppression of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway and inhibits hepatocellular carcinoma. *Am J Transl Res* 2019; 11: 6952-64.
43. Kim HJ, Cho HS, Ban HS, Nakamura H. Suppression of HIF-1 α accumulation by betulinic acid through proteasome activation in hypoxic cervical cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2020; 523: 726-32. [\[CrossRef\]](#)
44. Zhang H, Li L, Li M, Huang X, Xie W, Xiang W, et al. Combination of betulinic acid and chidamide inhibits acute myeloid leukemia by suppression of the HIF1 α pathway and generation of reactive oxygen species. *Oncotarget* 2017; 8: 94743-58. [\[CrossRef\]](#)
45. Liao L, Liu C, Xie X, Zhou J. Betulinic acid induces apoptosis and impairs migration and invasion in a mouse model of ovarian cancer. *J Food Biochem* 2020; 44: e13278. [\[CrossRef\]](#)
46. Yang C, Li Y, Fu L, Jiang T, Meng F. Betulinic acid induces apoptosis and inhibits metastasis of human renal carcinoma cells in vitro and in vivo. *J Cell Biochem* 2018; 119: 8611-22. [\[CrossRef\]](#)
47. Lu T, Wei D, Yu K, Ma D, Xiong J, Fang Q, et al. Betulinic acid restores imatinib sensitivity in BCR-ABL1 kinase-independent, imatinib-resistant chronic myeloid leukemia by increasing HDAC3 ubiquitination and degradation. *Ann N Y Acad Sci* 2020; 1467: 77-93. [\[CrossRef\]](#)
48. Yuan DY, Meng Z, Xu K, Li QF, Chen C, Li KY, et al. Betulinic acid increases radiosensitization of oral squamous cell carcinoma through inducing Sp1 sumoylation and PTEN expression. *Oncol Rep* 2017; 38: 2360-8. [\[CrossRef\]](#)
49. Amiri S, Dastghaib S, Ahmadi M, Mehrbod P, Khadem F, Behrouj H, et al. Betulin and its derivatives as novel compounds with different pharmacological effects. *Biotechnol Adv* 2020; 38: 107409. [\[CrossRef\]](#)
50. D'Adamo S, Schiano di Visconte G, Lowe G, Szaub-Newton J, Beacham T, Landels A, et al. Engineering the unicellular alga *Phaeodactylum tricornutum* for high-value plant triterpenoid production. *Plant Biotechnol J* 2019; 17: 75-87. [\[CrossRef\]](#)

Saliva as a Diagnostic Tool in Oral Diseases

Ağız Hastalıklarında Tanı Aracı Olarak Tükürük

Özlem Kart¹ , Ayşen Yarat² 

¹Faculty of Dentistry, Marmara University, Istanbul, Turkey

²Basic Medical Sciences, Biochemistry, Faculty of Dentistry, Marmara University, Istanbul, Turkey

ORCID ID: Ö.K. 0000-0002-3398-6270; A.Y. 0000-0002-8258-6118

Cite this article as: Kart Ö, Yarat A. Saliva as a diagnostic tool in oral diseases. Experimed 2020; 10(3): 135-9.

ABSTRACT

Saliva is a body fluid, which is secreted from 3 major salivary glands (parotid, submandibular and sublingual) and many minor salivary glands. It contains organic and inorganic substances with 99% water, and has several functions such as contribution to articulation, digestion, cleansing and protection of the oral mucosa, and antimicrobial effects. The concentration of saliva's substances vary according to the responses to physiological processes in the human body. Containing genetic materials such as DNA and RNA also highlights saliva as a potential diagnostic tool. Saliva analysis has advantages such as being cheaper, non-invasive, easier patient cooperation, and low technical sensitivity compared to blood tests; it can be used in the diagnosis of many diseases or routine risk assessments. It is also promising for its advantages in collection and storage of the samples. Advances in molecular biology, genomics, and proteomics have revealed the importance of saliva in the detection of many diseases, coining the term salivaomics. The early diagnosis of the diseases in which symptoms can be seen in late stages, may provide an easier treatment and improve the prognosis. In this review, the biomarkers of saliva in the presence of different diseases and the advantages of their use in diagnosis were examined.

Keywords: Saliva, oral diseases, diagnosis

ÖZ

Tükürük; başlıca üç majör tükürük bezi (parotid, submandibular ve sublingual) ve birçok minör tükürük bezinden salgılanan bir vücut sıvısıdır. İçerisinde %99 suyla birlikte organik ve inorganik maddeler bulunduran tükürüğün; artikülasyon, sindirim, ağız mukozasının temizlenmesi ve korunması ile antimikrobiyal etkiler gibi birçok işlevi vardır. Tükürüğün içerisindeki maddelerin konsantrasyonları vücuttaki fizyolojik süreçlere verilen yanıtlara göre değişiklik gösterir. DNA ve RNA gibi genetik materyalleri barındırması da tükürüğü potansiyel bir teşhis aracı olarak öne çıkarmaktadır. Kan tahlillerine göre hasta kooperasyonunun daha kolay olması, daha ucuz, non-invaziv ve teknik hassasiyetin az olması gibi avantajları olan tükürük testleri; birçok hastalığın teşhisinde kullanılabileceği gibi rutin risk değerlendirmelerinde de kullanılabilir. Örnek toplanması ve saklanmasıdaki avantajlarından dolayı da gelecek vaad etmektedir. Moleküler biyoloji, genomik ve proteomik alanlarındaki gelişmeler sayesinde salivaomik terimi ortaya çıkmış ve birçok hastalığın saptanmasında tükürüğün önemi belirtilmiştir. Özellikle semptomların geç görülmeye başladığı hastalıkların tükürük testleri sayesinde erken teşhis edilmesi, tedaviyi büyük oranda kolaylaştırabilir ve prognozu iyileştirebilir. Bu derlemede, farklı hastalıkların varlığında tükürükte bulunan biyobelirteçler ve teşhiste kullanımının avantajları incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Tükürük, ağız hastalıkları, teşhis

INTRODUCTION

Saliva is a body fluid, which is secreted from 3 major salivary glands, which are parotid, submandibular and sublingual, and nearly 1000 minor salivary glands. It helps to maintain the health and hygiene of the oral cavity and has many functions such as contribution to articulation, swallowing, and maturation of erupted teeth (1). Thanks to its antimicrobial properties, it is beneficial for the protection of microbial balance and the prevention of infections (2).

Saliva, secreted between 0.75 and 1.5 liters per day, is odorless, colorless and has a pH range of 6.5-7.5. It contains 99% water, organic and inorganic substances, and many microorganisms that play roles in different diseases (3). Organic substances are composed of urea, uric acid, glucose, fatty acids, glycerides, creatinine, peroxidase, amylase, and hormones. As for the inorganic molecules; Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Cl⁻, Mg²⁺, F⁻, I⁻, HCO₃⁻ and H₂PO₄⁻ are some of the ions found in saliva (4,5). These substances in the structure of saliva have different functions (6). For instance, amylase and lipase

Corresponding Author/Sorumlu Yazar: Özlem Kart **E-mail:** ozlemkart08@hotmail.com

Submitted/Başvuru: 13.08.2020 **Accepted/Kabul:** 31.08.2020



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

catalyze the digestion of carbohydrates and fats, while thiocyanate ions play a bactericidal role. Calcium in saliva contributes to the process of remineralization of tissues (7). Also, antioxidant enzymes in saliva protect the oral cavity from the negative effects of free radicals, reactive oxygen, and different forms of nitrogen (8,9). Some of the agents in saliva pass through transcellular and paracellular pathways from blood and their concentrations vary according to physiological processes, which makes saliva a potentially good diagnostic tool (10). Developments in molecular biology, genomics, and proteomics led to coining the term "salivaomics", which reveals the importance of salivary biomarkers in diagnosis of oral and systemic diseases and current stages of them (10).

The most important step for the treatment is to make an accurate diagnosis. When the clinical, radiological, and histological features of the disease are known, it will be easier to eliminate the disease factors (11). Caries, periodontal diseases, and oral malignant lesions are some of the examples of oral diseases that can be diagnosed with saliva tests (12). In addition to oral diseases, saliva can be used for the diagnosis of systemic diseases such as diabetes mellitus, cardiovascular diseases, and other infections. Also, it can be used for detection of drugs, and identification in forensics (13,14).

DENTAL CARIES

Dental caries is a common multifactorial oral disease that can progress to the loss of teeth with symptoms of pain by demineralization of mineralized tissues in enamel, dentin and cement (6). Dental caries are not reversible especially in the later stages, therefore it's essential to prevent it with good oral hygiene or to diagnose in early stages. Saliva can be easily used to detect risk factors because it contains structures such as molecules that cause remineralization and bacteria. There are many studies analyzing biomarkers by taking different saliva samples. Among the most important caries markers in saliva are microorganisms. *Lactobacilli* and *Streptococcus mutans* are the primary bacteria that cause caries. Other bacteria such as *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus cricetus*, *Streptococcus rattus*, *Streptococcus macacae*, *Streptococcus downei*, and *Prevotella genus* differ between healthy individuals and patients (8,15). Proteins like statherin, cystatin, histatins, and proline-rich proteins (PRP) contribute to maintenance of enamel's structural integrity, so they are important biomarkers in caries diagnosis. It has been shown that these proteins are found in larger amounts in individuals without previous caries history (16). It is thought that there is a difference in immunoglobulin (Ig) levels in the presence of caries. Although studies on this subject are limited, it has been revealed that IgA levels are higher in individuals with caries (17). Oxidative stress in saliva also causes the carious lesions, restricting the movement of dentin fluids, so the inflammatory response of dentin is affected. As a result, dentin becomes more sensitive to bacterial acids and the destruction of hard dentin tissues is observed. A study that examines the relation of salivary glutathione and dental health also showed that there may be a relation between caries and antioxidants

found in saliva (18). Matrix metalloproteinases (MMP) such as collagenase in extracellular fluids, are enzymes that show cell death. Dentin contains collagen Type I and a small amount of collagen Type V, so the presence of collagenase in saliva causes destruction of dentin and indicates pulp or periodontal tissue destruction due to severe dental caries (19). Studies have shown that mucins may be another potential biomarker of caries. Mucins help to enhance the agglutination of bacteria, therefore they contribute to the protection of teeth from caries. So the decrease in mucins may accelerate demineralization (20). The amount, flow rate, and viscosity of saliva are important as well as the content for the prevention of dental caries (21). In the patients whose salivary flow rate is insufficient, saliva may not be able to clear the acids of the food consumed and eventually, the pH balance will deteriorate thorough acidic direction, which will increase the risk of caries (20). In a study in which erosion was examined by taking unstimulated saliva in children, the rate of saliva flow in children with erosion was noticeably lower than the control group. In the same study, the amount of chloride was higher in children with erosion (22).

PERIODONTAL DISEASES AND PERI-IMPLANTITIS

Periodontal diseases develop with inflammation of the gingiva, the periodontal ligament and alveolar bone around teeth and it is one of the reasons for tooth loss (23). Peri-implantitis, on the other hand, is a disease that develops in tissues around the implant and includes bone loss (24). Although their etiologies are similar, resorption in peri-implantitis progresses much faster. Many studies were carried out to provide early diagnosis of these diseases by detecting biomarkers in gingival fluid and saliva. The most important biomarkers are gram (-) bacteria such as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum* and *Eikenella corrodens* (4,16). Studies revealed that an increase in the amount of salivary IgA, IgG, and IgM could contribute to the immunological response against these bacteria. The most commonly used methods for the detection of Igs in saliva are radial immunodiffusion and nephelometer. Also, an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) can be used in detection of many biomarkers found in saliva in addition to Igs. Likewise, it has been observed that these glycoproteins decrease after treatment (25). Interleukins (IL) such as IL-1 and IL-6 are also involved in the inflammatory process in periodontitis and they have been proved to trigger osteoclastic activity and cause bone and tissue destruction. Interleukins may be products of epithelial cells, fibroblasts, osteoblasts, polymorphonuclear neutrophils, and endothelial cells and play a role in the activity of MMPs and their inhibitors (26). MMP-8 and MMP-9 are very important biomarkers in periodontal and implant-related diseases. PerioSafe and ImplantSafe, which are developed as applicable chair-side, are used in detecting active MMP-8, especially in oral fluids. While active MMP-8 was positive in patients with periodontitis or peri-implantitis, the response turned negative after the treatments (27). Other important factors determining periodontal health are oxidative stress mark-

ers. Studies that evaluated the total antioxidant capacity levels showed a decrease in antioxidants in non-smoking individuals with periodontal disease. The level of antioxidants rises again after the treatment (28,29). In another study, it was observed that the level of nitric oxide in saliva increased in patients with gingivitis, chronic and aggressive periodontitis as compared to healthy individuals, while adrenomedullin may be an important marker only in patients with aggressive periodontitis (8).

SJÖGREN'S SYNDROME

Sjogren's syndrome (SS) is an autoimmune disease that affects the secretory glands. Although the cause of this disease is not yet fully known, it may be accompanied by some inflammatory rheumatic diseases (30). Today, the diagnosis of SS is made by evaluation of the symptoms and the biopsy of the salivary glands. But it is possible to distinguish primary and secondary SS from each other or other autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus by conducting proteomic and transcriptomic examinations of saliva. Rheumatoid factor, Anti-Ro/SS-A and Anti-La/SS-B are conventional biomarkers used in the diagnosis of SS (31). Other than that, studies showed a relation between SS and 19 different genes, which were involved in the presentation of antigens and osmosis of lymphocytes (32). When patients and healthy individuals are compared; higher levels of IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, clusterin, cathepsin-d, α -enolase, and β 2-microglobulin are observed (10,26). It is also mentioned that there is oxidative stress in the presence of a disease. Markers such as increased oxidative DNA damage can play an important role in controlling the disease (4). A recent study evaluating lymphocytes in patients with SS concluded that lymphocytes are found in parotid saliva in both primary and secondary SS while there are no findings in healthy individuals (33).

ORAL PREMALIGNANT LESIONS AND ORAL CANCERS

Oral premalignant lesions are among the abnormalities that dentists frequently encounter after caries and periodontal diseases in their clinical applications. These lesions can turn into cancer if they are not treated or controlled with follow-up examinations. Lichen planus (LP) especially when it shows an erosive-atrophic pattern, leukoplakia, erythroplakia, precancerous melanosis and oral submucous fibrosis are some of the premalignant lesions that could be seen in the oral cavity (34).

Lichen planus: Chronic inflammation in epithelial cells can be seen as a white lesion with reticular structure and erythematous borders. Amalgam, non-steroidal anti-inflammatory drugs, and hepatitis C virus are thought to cause antigenic change as etiological factors (35). Currently, the most studied biomarkers in the diagnosis of lichen planus are cortisol, Igs, cytokines, and oxidative stress-related molecules. In a study, an increase was observed in salivary cortisol levels due to anxiety in patients with lichen planus when compared to healthy individuals (36). An analysis of Ig by ELISA showed an increase in IgA and IgG levels (25).

Leukoplakia: It is one of the frequently encountered precancerous lesions. There is a 10% risk of developing cancer in leukoplakia (37). Studies are carried out on cytokines as biomarkers. There are studies showing the increase in IL-1 β , IL-6, cystatin, and apolipoprotein A-1 on unstimulated whole saliva in patients with leukoplakia (38,39).

Oral cancers: Carcinomas seen in the oral cavity are among the most common cancers in the head and neck region (34). The most common is oral squamous cell carcinoma (OSCC). It has a high mortality rate in many countries. The initial diagnostic tool of carcinomas today is biopsies which are mostly invasive procedures (3). So the need for non-invasive diagnostic tools is increasing. More than 100 biomarkers are known for the diagnosis of oral cancers, primarily salivary proteins, RNA and DNA (4). While unstimulated whole saliva is generally used in detecting these biomarkers, there are studies showing that stimulated saliva gives the same valuable results. MicroRNAs (miRNA) obtained from saliva may have an important role in the diagnosis of head and neck cancers (10). It has been observed that miRNA-9 and miRNA-191 obtained from small amounts of saliva using the miRNA isolation kit and QIAzol methods together can be important biomarkers while there was a decrease in miRNA-125a and miRNA-200a levels in samples taken from patients with OSCC (16,40). In addition to miRNA, the tumor suppressor p53 gene and anti-p53 proteins that are produced in the presence of multiple DNA damages, CA15-3 and CA125 can be used as biomarkers for cancers in other regions (breast, ovarian, and lung cancers, etc.) as well as head and neck cancers (41). Moreover, MMPs are thought to play a role in different stages of the progression of tumors. In the cell proliferation phase, proteolytic MMPs may cause the activation of growth factors or intercellular destruction (19). In angiogenesis, they can change the activities of the endothelial and epithelial growth factor, control the inflammatory response, and affect invasion in the pathological process of new blood vessels. At the stage of invasion and metastasis, tumors need MMPs to interact with the membrane and extracellular matrix. Therefore, some MMPs can be produced by tumors or growth factors, chemokines, and cytokines. This way, tumors may grow locally and metastasize. Studies evaluating MMPs found in higher levels of MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-10, and MMP-12 in patients as compared to healthy people (12,19).

SYSTEMIC DISEASES

Cardiovascular Diseases

They are among the leading causes of death in the world, include diseases such as hypertension, atherosclerosis, and myocardial infarction. In the presence of these diseases, changes in the levels of some biomarkers can be detected in saliva (42). In addition to the classical diagnostic methods (clinical findings and electrocardiogram, etc.) used today, studies on saliva analysis as a supportive tool are continuing. The level of C-reactive protein (CRP) in saliva can be determined by using a system based on nano-biochips, that can be applied chair-side (5). In a study of acute myocardial infarction patients who experi-

enced chest pain in the previous 48 hours, CRP, MMP-9, IL-1 β , adiponectin, gro- α , E-selectin, and IL-18 increased in saliva more than serum (42). In addition, there are studies showing that the amount of MMP-8 and lysozyme in saliva increases in the presence of hypertension (42). The level of vitamin C and antioxidants in serum and saliva can also affect the nitric oxide level, indicating carotid endothelial damage in atherosclerosis patients (43). In a study in individuals with ischemic heart disease and periodontitis, it was found that patients with ischemic heart disease have lower levels of lutein, lycopene, α -tocopherol and β -carotene levels in saliva (43).

Diabetes Mellitus

Today, the control of diabetes is done with blood tests, which is an invasive method. In saliva, glucose and urea levels are found to be in direct relation with blood levels (44). In diabetic patients, there was also an increase found in the levels of amylase, total protein, and electrolytes such as potassium, calcium and chloride (44,45).

Infections

It is common to use viral DNA and RNA biomarkers in saliva for the diagnosis of infections. Saliva is used in the diagnosis of many viruses such as Human Immunodeficiency Virus, Hepatitis A, B and C viruses, and rubella (8). Many studies are conducted on the use of saliva as a non-invasive tool to detect the COVID-19, which appeared in 2019 and the number of cases is increasing rapidly. The results of studies comparing the saliva and nasopharyngeal samples are promising (46). In a study conducted with 200 patients, who have symptoms of COVID-19, with an average age of 36, viral DNA was obtained from the samples taken and 19 patients were found to carry the virus according to the nasopharyngeal samples. When the saliva samples of these patients are examined, it has been shown that saliva can be used in virus detection by determining the compatibility of two samples with 84.2% sensitivity and 98.9% specificity (47).

Renal Diseases

Saliva can also be used in the diagnosis of renal diseases. Salivary creatinine levels show an increase in patients with renal diseases (48). Studies also have shown that selenium in saliva decreases in the presence of renal stones so it can be used as a biomarker (49). In addition, dialysis patients' salivary pH increases because of high urea concentrations (48).

CONCLUSION

Saliva is an important tool that contains biomarkers that are used in the diagnosis and treatment of many oral and systemic diseases. Saliva analysis has advantages such as being non-invasive, cheaper compared to blood tests, having good patient cooperation and low technical sensitivity. It is also promising for its advantages in collecting and storing samples. Saliva is actively used for some diseases today and with the advances in salivaomics, it can help as an alternative to serum or can be used in addition to some conventional diagnostic methods. However, studies need to be more comprehensive and standardized so that saliva tests will become more widespread and

gain more importance in early diagnosis by using routine controls in the coming years.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - Ö.K., A.Y.; Data Collection - Ö.K., A.Y.; Data Analysis and/or Interpretation - Ö.K., A.Y.; Literature Search - Ö.K., A.Y.; Writing - Ö.K., A.Y.; Critical Reviews - Ö.K., A.Y.

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

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

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarımı - Ö.K., A.Y.; Veri Toplama - Ö.K., A.Y.; Veri Analizi/Yorumlama - Ö.K., A.Y.; Literatür Tarama - Ö.K., A.Y.; Yazım - Ö.K., A.Y.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi - Ö.K., A.Y.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

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

REFERENCES

- Emekli N, Yarat A. Tükürük. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 2008.
- Sharma S, Gaur P, Gupta S. Impact of saliva on health: An overview. *EJBPS* 2018; 5(6): 202-4.
- Martina E, Campanati A, Diotallevi F, Offidani A. Saliva and oral diseases. *J Clin Med* 2020; 9: 466. [CrossRef]
- Wu DT, Tao O, Trinh N, Javaid MA, Ahmed AS, Durand R, et al. Saliva - A promising tool for diagnosing oral diseases. *Curr Oral Health Rep* 2018; 5: 242-9. [CrossRef]
- Yordanova M, Gerova D, Galunska B. Saliva application in oral and systemic diseases. *Scr Sci Med* 2018; 50(2): 13-8. [CrossRef]
- Akyüz S, Yarat A, Emekli Alturfan E, Kaya S. Flouride in saliva and its impact on health. In: Preedy VR, editor. *Fluorine: Chemistry, Analysis, Function and Effects (Food and Nutritional Components in Focus)*. London: Royal Society of Chemistry 2015.p.173-85. [CrossRef]
- Yarat A, Emekli Alturfan E, Akyüz S. Calcium in saliva and impact on health. In: Preedy VR, editor. *Calcium: Chemistry, Analysis, Function and Effects (Food and Nutritional Components in Focus)*. London: Royal Society of Chemistry 2015.p.364-83. [CrossRef]
- Zhang CZ, Cheng XQ, Li JY, Zhang P, Yi P, Xu X, et al. Saliva in the diagnosis of diseases. *Int. J. Oral Sci.* 2016 Sep 2. [CrossRef]
- Tóthová L, Kamodyová N, Cervenka T, Celec P. Salivary markers of oxidative stress in oral diseases. *Front Cell Infect Microbiol* 2015; 5: 73. [CrossRef]
- Tasoulas J, Patsouris E, Giaginis C, Theocharis S. Salivaomics for oral diseases biomarkers detection. *Expert Rev Mol Diagn* 2015; 17.
- Bhat M, Bhat D. Salivary diagnostics in oral diseases. In: Gokul S, editor. *Saliva and Salivary Diagnostics (book online)* 2019 May (cited 2020 Mar 2): (19 pages). Available from: URL: <https://www.intechopen.com/books/saliva-and-salivary-diagnostics/salivary-diagnostics-in-oral-diseases> [CrossRef]
- Buzalaf MAR, Ortiz AC, Carvalho TS, Fideles SOM, Araújo TT, Moraes SM, et al. Saliva as a diagnostic tool for dental caries, periodontal disease and cancer: is there a need for more biomarkers?. *Expert Rev Mol Diagn* 2020; 20(3): 543-55. [CrossRef]

13. Jessica, Auerkari El. Saliva as a diagnostic tool in forensic odontology. *J Dentomaxillofac Sci* 2019; 4(3): 124-7. [CrossRef]
14. Pillai G, Krishnan AR, Subodh A, Rajan NS. Saliva: A diagnostic tool. *World J Pharm Pharm Sci* 2020; 9(5): 426-35.
15. Guo L, Shi W. Salivary biomarkers for caries risk assessment. *J Calif Dent Assoc* 2013; 41(2): 107-18.
16. Zhang X, Kulasinghe A, Karim R, Punyadeera C. Saliva diagnostics for oral diseases. In: Streckfus C, editor. *Advances in Salivary Diagnostics*. Springer, Berlin, Heidelberg 2015; 131-56. [CrossRef]
17. Silva Fidalgo TK, Freitas-Fernandes LB, Ammari M, Mattos CT, de Souza IPR, Maia LC. The relationship between unspecific s-IgA and dental caries: a systematic review and meta-analysis. *J Dent* 2014; 42(11): 1372-81. [CrossRef]
18. Öztürk LK, Furuncuoglu H, Atala MH, Uluköylü O, Akyüz S, Yarat A. Association between dental-oral health in young adults and salivary glutathione, lipid peroxidation and sialic acid levels and carbonic anhydrase activity. *Braz J Med Biol Res* 2008; 41: 956-9. [CrossRef]
19. Maciejczyk M, Pietrzykowska A, Zalewska A, Knaś M, Daniszewska I. The significance of matrix metalloproteinases in oral diseases. *Adv Clin Exp Med* 2016; 25: 383-90. [CrossRef]
20. Gao X, Jiang S, Koh D, Hsu CYS. Salivary biomarkers for dental caries. *Periodontol* 2000. 2016; 70: 128-41. [CrossRef]
21. Ezhil I, Savitha G, Kumar MPS. Saliva as a diagnostic tool: A review. *Drug Invent. Today* 2018; 10(11): 2188-93.
22. Zwier N, Huysmans MCDNJM, Jager DHJ, Ruben J, Bronkhorst EM, Truin GJ. Saliva parameters and erosive wear in adolescents. *Caries Res* 2013; 47(6): 548-52. [CrossRef]
23. Irani S, Barati I, Badieli M. Periodontitis and oral cancer - current concepts of the etiopathogenesis. *Oncol Rev* 2020; 14(1): 465: 23-34. [CrossRef]
24. Garcés MÁ, Escoda CG. Periimplantitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2004; 9: 63-74.
25. Lorenzo-Pouso A, Pérez-Sayáns M, Bravo SB, López-Jornet P, García-Vence M, Alonso-Sampedro M, et al. Protein-based salivary profiles as novel biomarkers for oral diseases. *Dis Markers (journal online)* 2018 Nov 7 (cited 2020 Mar 2): 6141845: (22 pages). Available from: URL: <https://www.hindawi.com/journals/dm/2018/6141845/> [CrossRef]
26. Roi A, Rusu LC, Roi CI, Luca RE, Boia S, Munteanu RI. A new approach for the diagnosis of systemic and oral diseases based on salivary biomolecules. *Dis Markers (journal online)* 2019 Feb 17 (cited 2020 Mar 2): 8761860: (11 pages). Available from: URL: <https://www.hindawi.com/journals/dm/2019/8761860/> [CrossRef]
27. Alassiri S, Parnanen P, Rathnayake N, Johannsen G, Heikkinen AM, Lazzara R et al. The ability of quantitative, specific, and sensitive point-of-care/chair-side oral fluid immunotests for aMMP-8 to detect periodontal and peri-implant diseases. *Dis Markers (journal online)* 2018 Aug 5 (cited 2020 Mar 2): 1306396: (5 pages). Available from: URL: <https://www.hindawi.com/journals/dm/2018/1306396/> [CrossRef]
28. Ateş G, Öztürk H. Detection of total antioxidant capacity of saliva in periodontal diseases. *EÜ Dışhek Fak Derg* 2018; 39(3): 165-74. [CrossRef]
29. Başer Ü, Işık HG, Ateş G, Işık G. The effect of initial periodontal therapy on saliva and plasma total antioxidant capacity of non-smoking periodontitis patients. *EÜ Dışhek Fak Derg* 2015; 36(1): 38-44. [CrossRef]
30. Ramos-Casals M, Brito-Zerón P, Sisó-Almiral A, Bosch X. Primary Sjögren Syndrome. *BMJ* 2012; 344: e3821. [CrossRef]
31. Aktaş A, Giray B, Aktaş G. Saliva; composition and function, importance for diagnosis. *ADO Journal of Clin Sci* 2009; 3(2): 361-7.
32. Khuder SA, Al-Hashimi I, Mutgi AB, Altork N. Identification of potential genomic biomarkers for Sjögren's Syndrome using data pooling of gene expression microarrays. *Rheumatol Int* 2015; 35(5): 829-36. [CrossRef]
33. Selifanova E, Beketova T, Spagnuolo G, Leuci S, Turkina A. A novel proposal of salivary lymphocyte detection and phenotyping in patients affected by Sjogren's Syndrome. *J Clin Med.* 2020; 9(2): 521. [CrossRef]
34. Özbayrak S, Pekiner FN. *Ağız Kanserleri: Erken Tanı Bakımından Dışhekimliği*. İstanbul: Quintessence; 2016. p.37-55.
35. Par M, Tarle Z. Psychoneuroimmunology of oral diseases - a review. *Stoma Edu J* 2019; 6(1): 55-65. [CrossRef]
36. Koray M, Dülger O, Ak G, Horasanlı S, Üçok A, Tanyeri H, et al. The evaluation of anxiety and salivary cortisol levels in patients with oral lichen planus. *Oral Dis* 2003; 9(6): 298-301. [CrossRef]
37. Tekin M, Çam OH. Oral Mukoza Hastalıkları ve Semptomatolojisi. *Klinik Gelişim* 2012; 25: 93-8.
38. Brailo V, Vucicevic-Boras V, Lukac J, Biocina-Lukenda D, Zilic-Alajbeg I, Milenovic A, et al. Salivary and serum interleukin 1 beta, interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in patients with leukoplakia and oral cancer. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2012; 17(1): e10-5. [CrossRef]
39. Camisasca DR, Gonçalves LR, Soares MR, Sandim V, Nogueira FCS, Garcia CHS, et al. A proteomic approach to compare saliva from individuals with and without oral leukoplakia. *J Proteomics* 2017; 151: 43-52. [CrossRef]
40. Ghizoni JS, Nichele R, Oliveira MT, Pamato S, Pereira JR. The utilization of saliva as an early diagnostic tool for oral cancer: microRNA as a biomarker. *Clin Transl Oncol* 2020; 22(6): 804-12. [CrossRef]
41. Kaczor-Urbanowicz KE, Carreras-Presas CM, Aro K, Tu M, Garcia-Godoy F, Wong DTW. Saliva diagnostics - current views and directions. *Exp Biol Med (Maywood)* 2017; 242(5): 459-72. [CrossRef]
42. Abdul Rehman S, Khurshid Z, Hussain Niazi F, Naseem M, Al Waddani H, Sahibzada HA, et al. Role of salivary biomarkers in detection of cardiovascular diseases (CVD). *Proteomes* 2017; 5(3): 21. [CrossRef]
43. Isola G, Polizzi A, Muraglie S, Leonardi R, Lo Giudice A. Assessment of vitamin C and antioxidant profiles in saliva and serum in patients with periodontitis and ischemic heart disease. *Nutrients* 2019; 11(12): 2956. [CrossRef]
44. Mrag M, Kassab A, Omezzine A, Belkacem Chebil R, Ben Fredj Ismail F, Nabiha D, et al. Saliva diagnostic utility in patients with type 2 diabetes: Future standard method. *J Med Biochem* 2019; 13. [CrossRef]
45. Abd-Elraheem SE, El Saeed AM, Mansour HH. Salivary changes in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab Syndr* 2017; 11(2): 637-41. [CrossRef]
46. Takeuchi Y, Furuchi M, Kamimoto A, Honda K, Matsumura H, Kobayashi R. Saliva-based PCR tests for SARS-CoV-2 detection. *J Oral Sci* 2020; 62(3): 350-1. [CrossRef]
47. Pasomsub E, Watcharananan SP, Boonyawat K, Janchompoo P, Wongtabtim G, Suksuwan W, et al. Saliva sample as a non-invasive specimen for the diagnosis of coronavirus disease-2019 (COVID-19): a cross-sectional study. *Clin Microbiol Infect* 2020; 15. [CrossRef]
48. Deepa T, Thirrunavukkarasu N. Saliva as a potential diagnostic tool. *Indian J Med Sci* 2010; 64(7): 293-306. [CrossRef]
49. Emekli Alturfan E, Yarat A, Akyüz S. Selenium in saliva and impact on health. In: Preedy VR, editor. *Selenium: Chemistry, Analysis, Function and Effects (Food and Nutritional Components in Focus)*. London: Royal Society of Chemistry; 2015.p.341-53. [CrossRef]

Molecular Mechanism of General Anesthesia

Genel Anesteziklerin Moleküler Mekanizması

Özge Köner¹ , Sibel Temür¹ , Turgay İsbir² 

¹Department of Anesthesiology and Reanimation, Yeditepe University, Istanbul, Turkey

²Department of Molecular Medicine, Yeditepe University, Istanbul, Turkey

ORCID ID: Ö.K. 0000-0002-5618-2216; S.T. 0000-0002-4494-2265; T.İ. 0000-0002-7350-6032

Cite this article as: Köner Ö, Temür S, İsbir T. Molecular Mechanism of General Anesthesia. Experimed 2020; 10(3): 140-3.

ABSTRACT

Despite the widespread changes induced by general anesthetic agents, their exact effect sites are not clearly defined in the central nervous system (CNS). Recent molecular studies have pointed out specific sites in CNS on which anesthetic drugs show their effects. Hypnosis, amnesia, sedation are mediated by different receptors, neurotransmitters and neuronal pathways in the CNS. Protein base theory of anesthesia, which focuses on ion channels, took the place of lipid-based theory in the 1980's. There are two types of receptors, which are known to be responsible for the general anesthetic action: neurotransmitter receptors and ion channels. Background channels are also described as targets for anesthetic action. Enhancement and block of TWIK Related K⁺ channels (TREK), TWIK related arachidonic acid activated K⁺ channel (TRAAK), and TWIK related acid-sensitive K⁺ channels (TASK) channels have been reported at low concentrations of volatile anesthetic agents. Two-pore-domain potassium channels are protein complexes embedded in cell membranes. They selectively allow potassium ions to pass through the cellular membrane. These channels are also capable of changing the membrane potential by means of neuronal excitability, neurotransmitters and hormone secretion. Of those channels, TASK-1 and TREK-1 are activated by volatile anesthetic agents. In this article, receptors responsible for anesthesia in CNS and their mechanism of action will be reviewed.

Keywords: General anesthesia, molecular pharmacology, consciousness

ÖZ

Genel anestezik ajanlar, nörotransmitterleri modüle ederek santral sinir sisteminde yaygın nöronal değişime neden olmaktadır. Yeni yapılan moleküler araştırmalarda anestezik ajanların etki ettiği spesifik alanlar üzerinde durulmaktadır. Hipnoz, amnezi, sedasyon santral sinir sisteminde farklı reseptör, nörotransmitter ve nöronal yollar aracılığıyla sağlanır. 1980'lerin başında yapılan çalışmalar sonrasında, iyon kanallarına odaklanan protein temelli anestezi teorisi, lipid temelli anestezi teorisinin yerini almıştır. Protein temelli teoriye göre, genel anestezik etkiden sorumlu iki tip reseptör mevcuttur; nörotransmitter reseptörler ve iyon kanalları. "Background" iyon kanalları da anestezik etki için yeni tanımlanmış hedef reseptörlerdir. İki porlu (two-pore-domain) potasyum kanallarından TWIK ilişkili K⁺ kanalı (TREK), TWIK ilişkili arachidonik asitle aktive K⁺ kanalı (TRAAK), TWIK ilişkili asit duyarlı K⁺ kanalları (TASK) tipteki kanalların volatil ajanların düşük konsantrasyonunda güçlendiği ya da bloke olduğu bildirilmiştir. İki porlu potasyum kanalları, biyolojik membranlarda bulunan protein kompleksleridir. İki porlu potasyum kanalları, potasyum iyonları için özeldir ve potasyumun hücre membranından geçmesine izin verirler. İki porlu potasyum kanalları, nöronal uyarılma, nörotransmitter ve hormon salınımı yoluyla, membran potansiyelindeki değişikliklerden de sorumludurlar. İki porlu potasyum kanallarının TASK-1 ve TREK-1 alt tipleri volatil anestezik ajanlarla (örneğin, izofluran, kloroform, dietil eter) uyarılır. Bu makalede santral sinir sisteminde bulunan ve genel anesteziklerin etkisinden sorumlu reseptörler ve bunların etki mekanizmaları gözden geçirilecektir.

Anahtar Kelimeler: Genel anestezi, moleküler farmakoloji, bilinç

INTRODUCTION

Our understanding of mechanisms involving the conduct of general anesthesia has improved in recent years. Some specific sites within the central nervous system as the target of the anesthetic agents have been introduced. Hippocampus

has been shown to be responsible for the amnestic effects, neo cortex and thalamus were found to be related with sedation, and hypothalamus was thought to be the site responsible for the hypnotic action (1). Hypnosis, amnesia and sedation are mediated by different receptors, neurotransmitters and neuronal pathways in the central nervous system (CNS).

Corresponding Author/Sorumlu Yazar: Sibel Temür **E-mail:** stemur@yeditepe.edu.tr

Submitted/Başvuru: 12.11.2020 **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 28.11.2020

Last Revision Received/Son Revizyon: 28.11.2020 **Accepted/Kabul:** 01.12.2020



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

Protein base theory of anesthesia, which focuses on ion channels, took the place of lipid-based theory in the 1980's.

Recent studies again have been focusing on the anesthetic's effect on lipid membranes. Anesthetics have been shown to disrupt lipid ordered membranes, and shift their melting temperature (2-9).

RECEPTORS

There are two types of receptors, which are known to be responsible for the general anesthetic action: neurotransmitter receptors, and ion channels.

1. Neurotransmitter receptors (10)

a. Ligand gated receptors (ionotropic receptors)

These are excitatory or inhibitory in nature according to the neurotransmitter that binds to it. Ligand gated receptors have got two domains. The first one has got a trans-membrane domain. It functions as a channel. The other one, which has got ligand-binding sites, is extracellular (11).

Examples of ligand-gated receptors are nicotinic acetylcholine receptors, 5-HT₃ receptors, gamma-aminobutyric acid type A (GABA-A) receptor, glutamate (ionotropic) receptors, glycine receptors, and purinergic receptors.

b. G protein-coupled receptors (metabotropic receptors)

Binding to this metabotropic type of receptors changes the structure and causes the activation of G protein. Then generation of messengers such as cAMP, cGMP, diacylglycerol or calcium is controlled. At the end of the process G protein is inactivated by GTPase enzyme.

Metabotropic glutamate receptors, muscarinic acetylcholine receptors, GABA-B receptors, most of the serotonin receptors, and receptors for epinephrine, norepinephrine, dopamine, histamine, neuropeptides and endocannabinoids are the examples of G protein-coupled receptors (12).

2. Neurotransmitter receptors

GABA receptors: GABA is the major inhibitor receptor in the CNS. GABA receptor has five subunits (α , β , γ , δ , and ϵ) which cluster to compose a chlorine channel. The most frequently encountered receptor combinations are $\alpha 1 \beta 2 \gamma 2$ (60% of GABA α receptors), $\alpha 1 \beta 3 \gamma 1$ and $\alpha 3, \beta n \gamma 2$ (13,14). Volatile anesthetic agents and barbiturates have an agonistic effect on GABA-A receptors whereas ketamine has an antagonistic effect on GABA-A receptors (15-17).

Glycine receptors: Glycine receptors are inhibitory receptors located in the CNS, but predominantly in the spinal cord. The receptor is composed of five subunits (3 α and 2 β). Its function resembles that of the GABA-A receptors and once the inhalation anesthetics bind to glycine receptors in the spinal cord the inflow of chloride ions into the cells is enhanced, the result is loss of response to a painful stimulus (18,19). The minimal al-

veolar concentration (MAC) value of volatile anesthetic agents is increased when glycine receptors are blocked. They are responsible for the 20-55% of isoflurane-mediated immobility, and 20% of halothane-induced immobility (20,21).

Nicotinic acetylcholine receptors (nAChR): These receptors control the synaptic conduction in CNS. Once activated, the resulting excitatory postsynaptic currents (EPSCs) lead to the cellular cation inflow. Low concentrations of general anesthetics display suppressive action on nAChR by blocking EPSCs. (22). Propofol inhibits human neuronal $\alpha 3 \beta 2$ and $\alpha 7$ nAChR subtypes expressed in oocytes (23).

Glutamate receptors: These receptors are the dominant excitatory neurotransmitter of the CNS. It acts via metabotropic (pre-synaptic) and ionotropic (post-synaptic) receptors. Ionotropic glutamate receptors are NMDA, AMPA, and kainate. Nitrous oxide, xenon and ketamine are glutamate receptor antagonists with high potency (21,24). Ionotropic glutamate receptors generate EPSCs by leading the inflow of the cation as well. Volatile anesthetic agents block excitatory neurotransmission by both inhibiting postsynaptic glutamate receptors and releasing glutamate from the presynaptic area (25,26). Isoflurane has been shown to inhibit GLuR6 kainate receptor subunits at medullary level, thereby increasing the MAC of anesthetic agents. AMPA receptors and different subunits have been found to be responsible for the Xenon's ability to induce immobility (21,24,27).

Serotonin receptors: Serotonin receptors are responsible for the cation conductance which leads to membrane depolarization and neuronal excitation. The main member of this receptor family is the serotonin subtype of 5-HT₃. The activation of serotonin receptors by halogenated anesthetic agents, and inhibition by barbiturates or ketamine results in an altered state of consciousness (21,28). Experimental studies, which have been given specific serotonin capture inhibitors in determined cerebral nuclei, have reported an increase in MAC necessary for immobility.

3. Ion channels

a. Potassium channels: Potassium channels are activated by volatile agents and ketamine, as a result the transport of potassium ions is increased, cell membrane is hyperpolarized, and neuronal activity is inhibited (29,30).

b. Sodium channels: Volatile anesthetic agents inhibit presynaptic voltage-gated sodium channels located in the glutamatergic synapses. Therefore, the release of presynaptic neurotransmitters is blocked and neuronal activation is inhibited (31).

4. Background channels

Background channels are also described as targets for the action of the anesthetic agents. The action of TWIK Related K⁺ channels (TREK), TWIK related arachidonic acid activated K⁺ channel (TRAAK), and TWIK related acid-sensitive K⁺ channels (TASK) channels is enhanced and blocked at low concentrations of volatile anesthetic agents (32).

Two-pore-domain potassium channels (K2p): Potassium channels are protein complexes embedded in the biological membranes. They are selectively permeable to potassium ions and allow potassium to pass through the cellular membrane. Two-pore-domain potassium channels are also responsible for the changes of the membrane potential by means of neuronal excitability, neurotransmitters and hormone secretion. There are four different types of K2p channels, Tandem of pore domains in weak inward rectifying K⁺ channel (TWIK)-1, TWIK-2, TREK-1, and TRAAK. Volatile anesthetic agents (e.g. isoflurane, chloroform, diethyl ether) activate two of those K2p channels, TASK-1 and TREK-1 (32-38). TREK-1 is an inhibitory mechanoreceptor or an inhibitory effector. Once activated, TREK-1 inhibits neuronal firing by hyperpolarizing the cell (39).

It has recently been shown that volatile anesthetics activate phospholipase D2 (PLD2) by disruption of palmitate-mediated localization and substrate presentation causes anesthetic sensitivity in TREK-1 (4). The PLD2 appears to be an important factor for understanding the regulation of TREK-1. Transferring the PLD2 binding site to it could transfer the anesthetic sensitivity to an anesthetic insensitive channel TRAAK. However, the reason as to why anesthetic induced expansion by anesthetics lead to PLD2 translocation is not clear. The suggested mechanism of action is dependent on the affinity of PLD2 to the carboxyl C-terminal in TREK-1 (39).

The role of anesthetics on lipid membrane: Physiological role of the TREK-1 receptor in anesthesia has been clarified (32,40,41). This receptor's anesthetic action depends on the lipid membrane. This dependence has led us to think that the lipid cell membrane may be a target for anesthetic agents. It has also been shown that anesthetic sensitivity could be transferred to an insensitive channel TRAAK by means of PLD2. Therefore it is suggestive that this effect may be transferable (4). The nicotinic acetylcholine receptor (PA activates), GABA-A receptor and NMDA (PIP2 regulates) are other channels which have anesthetic action potential by disruption of lipid regulation (42-44).

Anesthetic agents have activating action on mechanical channels whereas they both activate and inhibit anesthetic sensitive membrane channels. However, most of the anesthetic agents inhibit excitatory channels but activate inhibitory channels. Inhibitory channels are generally neurotransmitter-gated in nature (45). An intermediary structure such as a lipid would be an explanation for this opposite effect.

CONCLUSION

General anesthetic drugs are used for inducing unconsciousness. They have been traditionally known as nonspecific drugs with their widespread effects. However, recent molecular pharmacology studies have shown selective receptors and structures in CNS, which are modulated by specific anesthetics and as a result inducing unconsciousness. Future treatment modalities in medicine focus on molecular receptors for patient based specific therapies. Molecular explorations on effects of general anesthetics will be more precise for performing patient based anesthesia.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - Ö.K., S.T., T.İ.; Data Collection and/or Processing - Ö.K., S.T., T.İ.; Data Analysis and/or Interpretation - Ö.K., S.T., T.İ.; Literature Search - Ö.K., S.T., T.İ.; Writing - Ö.K., S.T., T.İ.; Critical Reviews - Ö.K., S.T., T.İ.;

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.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarımı - Ö.K., S.T., T.İ.; Veri Toplama - Ö.K., S.T., T.İ.; Veri Analizi/Yorumlama - Ö.K., S.T., T.İ.; Literatür Tarama - Ö.K., S.T., T.İ.; Yazım - Ö.K., S.T., T.İ.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi - Ö.K., S.T., T.İ.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

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

REFERENCES

1. Brown EN, Purdon PL, Van Dort CJ. General anesthesia and altered states of arousal: A systems. *Annu Rev Neurosci* 2011; 34: 601-28. [\[CrossRef\]](#)
2. Bandejas C, Serro AP, Luzyanin K, Fernandes A, Saramago B. Anesthetics interacting with lipid rafts. *Eur J Pharm Sci* 2013; 48: 153-65. [\[CrossRef\]](#)
3. Weinrich M, Worcester DL. The actions of volatile anesthetics: a new perspective. *Res Pap Acta Cryst* 2018; 74: 1169-77. [\[CrossRef\]](#)
4. Pavel MA, Petersen EN, Lerner RA, Hansen SB. Studies on the Mechanism of General Anesthesia. *BioRxiv* 2018. [\[CrossRef\]](#)
5. Weinrich M, Worcester DL. Xenon and other volatile anesthetics change domain structure in model lipid raft membranes. *J Phys Chem B* 2013; 117: 16141-7. [\[CrossRef\]](#)
6. Gray E, Karlslake J, Machta BB, Veatch SL. Liquid general anesthetics lower critical temperatures in plasma membrane vesicles. *Biophys J* 2013; 105: 2751-9. [\[CrossRef\]](#)
7. Papahadjopoulos D, Jacobson K, Poste G, Shepherd G. Effects of local anesthetics on membrane properties I changes in the fluidity of phospholipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* 1975; 394: 504-19. [\[CrossRef\]](#)
8. Lee AG. Model for action of local anaesthetics. *Nature* 1976; 262: 545-8. [\[CrossRef\]](#)
9. Vanderkooi JM, Landesberg R, Selick H, McDonald GG. Interaction of general anesthetics with phospholipid vesicles and biological membranes. *Biochim. Biophys Acta* 1977; 464: 1-18. [\[CrossRef\]](#)
10. Snyder SH. Drug and neurotransmitter receptors in the brain. *Science* 1984; 6: 224: 22-32. [\[CrossRef\]](#)
11. Keramidas A, Moorhouse AJ, Schofield PR, Barry PH. Ligand-gated ion channels: mechanisms underlying ion selectivity. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 2004; 86: 161-204. [\[CrossRef\]](#)
12. Gilman AG. G proteins: Transducers of Receptor-Generated Signals. *Annual Review of Biochemistry* 1987; 56: 615-49. [\[CrossRef\]](#)
13. Bowery NG, Smart TG. GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history. *British Journal of Pharmacology* 2006; 47: 109-19. [\[CrossRef\]](#)

14. Rebecchi MJ, Pentyala SN. Anesthetic actions on other targets: protein kinase C and guanine nucleotide binding proteins. *Br Journal of Anaesthesia* 2002; 89: 62-78. [\[CrossRef\]](#)
15. Franks NP, Lieb WR. Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature* 1994; 367: 607-14. [\[CrossRef\]](#)
16. Mihic SJ, Ye Q, Wick MJ, Koltchine VV, Krasowski MD, Finn SE. Sites of alcohols and volatile anesthetic action on GABA (A) and glycine receptors. *Nature* 1997; 389: 385-9. [\[CrossRef\]](#)
17. Zuo Z, De Vente J, John RA. Halothane and isoflurane dose dependently inhibit the cyclic GMP increase caused by methyl D-aspartate in rat cerebellum: novel localization and quantitation by in vivo autoradiography. *Neuroscience* 1996; 74: 1069-75. [\[CrossRef\]](#)
18. Sonner JM, Antognini JF, Dutton RC, Flood P, Gray AT, Harris RA, et al. Inhaled anesthetics and immobility: mechanisms, mysteries, and minimum alveolar anesthetic concentration. *Anesth Analg* 2003; 97: 718-40. [\[CrossRef\]](#)
19. Ouyang W, Hemmings HC Jr. Depression by isoflurane of the action potential and underlying voltage-gated ion currents in isolated rat neurohypophysial nerve terminals. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 312: 801-8. [\[CrossRef\]](#)
20. Zhang Y, Laster MJ, Hara K, Harris RA, Eger EI. Glycine receptors mediate part of the immobility produced by inhaled anesthetics. *Anesthesia and Analgesia* 2003; 96: 97-101. [\[CrossRef\]](#)
21. Uwe R, Bernd A. Molecular and neuronal substrates for general anesthetics. *Nature reviews of neuroscience*. 2004; 4: 709-16.
22. Flood P, Ramirez-Latorre J, Role L. Alpha 4 beta 2 neuronal nicotinic acetylcholine receptors in the central nervous system are inhibited by isoflurane and propofol, but alpha 7-type nicotinic acetylcholine receptors are unaffected. *Anesthesiology* 1997; 86: 859-65. [\[CrossRef\]](#)
23. Fagerlund MJ, Krupp J, Dabrowski MA. Propofol and AZD3043 inhibit adult muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* Oocytes. *Pharmaceuticals (Basel)* 2016; 6: 9; 8. [\[CrossRef\]](#)
24. Flood P, Matthew K. Intravenous Anesthetics differentially modulate ligand-gated ion channels. *Anesthesiology* 2000; 92: 1418-22. [\[CrossRef\]](#)
25. Lin LH, Chen LL, Harris RA. Enflurane inhibits NMDA, AMPA, and kainate-induced currents in *Xenopus* oocytes expressing mouse and human brain mRNA. *FASEB J* 1993; 7: 479-85. [\[CrossRef\]](#)
26. MacIver MB, Mikulec AA, Amagasa SM, Monroe FA. Volatile anesthetics depress glutamate transmission via presynaptic actions. *Anesthesiology* 1996; 85: 823-34. [\[CrossRef\]](#)
27. Bruce A, Bray D. *Alberts Molecular Biology of the cell*. Fourth edition. Mc Graw Hill, New York 2007 1224.
28. Grasshoff C, Drexler B, Uwe R, Bernd A. *Anaesthetic Drugs: Linking Molecular Actions to Clinical Effects*. *Current Pharmaceutical Design*. 2006; 12: 3665-79. [\[CrossRef\]](#)
29. Kulkarni RS, Zorn LJ, Anantharam V, Bayley H, Treistman SN. Inhibitory effects of ketamine and halothane on recombinant potassium channels from mammalian brain. *Anesthesiology* 1996; 84: 900-9. [\[CrossRef\]](#)
30. Harris T, Shahidullah M, Ellingson JS, Covarrubias M. General anesthetic action at an internal protein site involving the S4-S5 cytoplasmic loop of a neuronal K(+) channel. *J Biol Chem* 2000; 275: 4928-36. [\[CrossRef\]](#)
31. Hemmings HC Jr. Sodium channels and the synaptic mechanisms of inhaled anesthetics. *Br J Anaesth* 2009; 103: 61-9. [\[CrossRef\]](#)
32. Patel AJ, Honore E, Lesage F, Fink M, Romey G, Lazdunski M. Inhalational anesthetics activate two-pore domain background K+ channels. *Nat Neurosci* 1999; 2: 416-22. [\[CrossRef\]](#)
33. Duprat F, Lesage F, Fink M, Reyes R, Heurteaux C, Lazdunski M. TASK, a human background K1 channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J* 1997; 16: 5464-71. [\[CrossRef\]](#)
34. Fink M, Duprat F, Lesage F, Reyes R, Romey G, Heurteaux C, Lazdunski M. Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K1 channel. *EMBO J* 1996; 15: 6854-62. [\[CrossRef\]](#)
35. Kim D, Fujita A, Horio Y, Kurachi Y. Cloning and functional expression of a novel cardiac two-pore background K1 channel (CT-BAK-1). *Circ Res* 1998; 82: 513-18. [\[CrossRef\]](#)
36. Leonoudakis D, Gray AT, Winegar BD, Kindler CH, Harada M, Taylor DM, et al. An open rectifier potassium channel with two pore domains in tandem cloned from rat cerebellum. *J Neurosci* 1998; 18: 868-77. [\[CrossRef\]](#)
37. Maingret F, Patel AJ, Lesage F, Lazdunski M, Honore' E. Mechano- or acid stimulation, two interactive modes of activation of the TREK-1 potassium channel. *J Biol Chem* 1999; 274: 26691-6. [\[CrossRef\]](#)
38. Patel AJ, Honore E, Maingret F, Lesage F, Fink M, Duprat F, et al. A mammalian two pore domain mechano-gated S-type K1 channel. *EMBO J* 1998; 17: 4283-90. [\[CrossRef\]](#)
39. Enyedi P, Czirjak G. Molecular background of leak K+ currents: two-pore domain potassium channels, *Physiol. Rev.* 2010; 90: 559-605. [\[CrossRef\]](#)
40. Heurteaux C, Guy N, Laigle C, Blondeau N, Duprat F, Mazzuca M, et al. TREK-1, a K+ channel involved in neuroprotection and general anesthesia. *EMBO J* 2004; 23: 2684-95. [\[CrossRef\]](#)
41. Gruss M, Bushell TJ, Bright DP, Lieb WR, Mathie A, Franks NP. Two-pore domain K+ channels are a novel target for the anesthetic gases xenon, nitrous oxide, and cyclopropane. *Mol Pharmacol* 2004; 65: 443-452. [\[CrossRef\]](#)
42. Lavery D, Desai R, Uchański T, Masiulis S, Stec WJ, Malinauskas T, et al. Cryo-EM structure of the human $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ GABAA receptor in a lipid bilayer. *Nature* 2019; 565: 516-20. [\[CrossRef\]](#)
43. Michailidis IE, Helton TD, Petrou VI, Mirshahi T, Ehlers MD, Logothetis DE. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate regulates NMDA receptor activity through alpha-actinin. *J Neurosci* 2007; 27: 5523-32. [\[CrossRef\]](#)
44. Hamouda AK, Sanghvi M, Sauls D, Machu TK, Blanton MP. Assessing the lipid requirements of the Torpedo californica nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry* 2006, 45: 4327-37. [\[CrossRef\]](#)
45. Krasowski MD, Harrison NL. General anaesthetic actions on ligand-gated ion channels. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55: 1278-303. [\[CrossRef\]](#)

Causes of Male Infertility

Erkek İnfertilite Nedenleri

Münevver Serdaroğulları^{1,2} 

¹Department of Embryology, British Cyprus IVF Hospital, Nicosia, Cyprus

²Faculty of Medicine, Cyprus International University, Nicosia, Cyprus

ORCID ID: M.S. 0000-0001-5196-297X

Cite this article as: Serdaroğulları, M. Causes of Male Infertility. Experimed 2020; 10(3): 144-7.

ABSTRACT

Infertility is a global health problem and is defined as an inability to achieve a clinical pregnancy after 12 months of regular unprotected sexual intercourse. The global incidence of infertility is approximately 8–12%, and half of these patients seek medical help for the condition. The use of assisted reproduction technology (ART) has been increasingly used worldwide, and advances in ART have enabled many couples to overcome infertility. Infertility can be related to female infertility, male infertility, a combination of the two or unexplained factors. Male infertility constitutes nearly half of all instances of infertility and affects approximately 7% of the male population. The initial evaluation of male infertility includes obtaining a detailed medical history, a physical examination, an endocrine assessment and semen analysis. Male infertility can be due to hormonal imbalances, genetic problems, physical causes, environmental lifestyle factors or psychological or behavioural factors. Also, advanced male age may affect the quality of sperm, which can lead to male infertility. In conclusion, the causes of male infertility are multifarious. The evaluation and management of male infertility during infertility treatment are of the utmost importance for couples.

Keywords: Male infertility, infertility

Infertility is a global health problem and is defined as an inability to achieve a clinical pregnancy after 12 months of regular unprotected sexual intercourse (1). The global incidence of infertility is approximately 8–12%, and half of these patients seek medical help for the condition (2). Assisted reproduction technology (ART) has been increasingly used worldwide, and advances in ART have enabled many couples to overcome infertility. Infertility can be related to female infertility, male infertility, a combination of the two or unexplained factors. Male infertility constitutes nearly half of all instances of infertility and affects approxi-

ÖZ

İnfertilite dünya çapında bir sağlık sorunu olup, 12 aylık düzenli korunmasız cinsel ilişki sonrası klinik bir hamilelik elde edememe olarak tanımlanmaktadır. Dünya çapında infertilitenin insidansı yaklaşık %8-12 olarak belirtilmekle birlikte hastaların yarısı bu durum için tıbbi yardım istemektedir. Yardımcı üreme teknolojisinin (YÜT) kullanımı dünya çapında giderek artmakla birlikte, YÜT'deki gelişmeler birçok çiftin infertilite sorunun üstesinden gelmesine izin vermiştir. İnfertilite, kadın infertilitesi, erkek infertilitesi, kadın ve erkek veya açıklanamayan faktörlerin bir kombinasyonu ile ilişkili olabilmektedir. Erkek infertilitesi, tüm infertilite vakalarının neredeyse yarısını oluşturur ve erkek nüfusun yaklaşık %7'sini etkilemektedir. Erkek infertilitesinin ilk değerlendirmesi, ayrıntılı bir tıbbi öykü, fizik muayene, endokrin değerlendirme ve semen analizini içermektedir. Erkek infertilitesi hormonal dengesizlikler, genetik problemler, fiziksel nedenler, çevresel yaşam tarzı faktörleri veya psikolojik veya davranışsal faktörlerden kaynaklanabileceği raporlanmıştır. Ayrıca, ileri erkek yaşı, sperm kalitesini etkileyerek erkek infertilitesine yol açabilir. Sonuç olarak, erkek infertilitesinin nedenleri çok yönlüdür. İnfertilite tedavisi sırasında erkek infertilitesinin değerlendirilmesi ve yönetimi çiftler için son derece önemlidir.

Anahtar Kelimeler: Erkek infertilitesi, infertilite

mately 7% of the male population (3). The initial evaluation of male infertility includes obtaining a detailed medical history, a physical examination, an endocrine assessment and semen analysis. The parameters assessed in a semen analysis are the sperm concentration, motility and morphology, and the semen volume and pH. The sperm vitality, the presence of leukocytes, and the number of immature germ cells are also assessed and compared to reference values from the World Health Organization (WHO) (1).

It is well documented that male infertility can be due to hormonal imbalances, genetic problems, physical causes,

Corresponding Author/Sorumlu Yazar: Münevver Serdaroğulları **E-mail:** munevver.coban@gmail.com

Submitted/Başvuru: 13.08.2020 **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 03.09.2020

Last Revision Received/Son Revizyon: 11.09.2020 **Accepted/Kabul:** 09.10.2020



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

or psychological or behavioural factors. Malnutrition, anaemia, excessive stress and exposure to environmental hazards such as pesticides, lead paint, radioactive substances, mercury, benzene, boron and heavy metals have also been reported to cause male infertility (4-6). Furthermore, advanced male age may affect the quality of sperm, which can lead to male infertility (7).

Spermatogenesis and steroidogenesis (steroid hormone production) are the main functions of the testis. Spermatogenesis is the process by which spermatogonia transform into mature spermatozoa through mitotic and meiotic division (8). Spermatogenesis begins at puberty and occurs in the epithelium of seminiferous tubules in the testis. The induction of spermatogenesis and the persistence of sperm production are regulated through the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. In the seminiferous tubules, Sertoli cells are the main cell type, while Leydig cells predominate in the interstitium, which is another main compartment of the testis that consists of loose connective tissue along with blood and lymph vessels (9-11). Testosterone, follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) participate in spermatogenesis. The synthesis of these hormones is stimulated by gonadotropin-releasing hormone (GnRH), which is secreted from the hypothalamus. Testosterone production occurs in Leydig cells and is induced by LH. FSH acts on Sertoli cells to support the synthesis of androgen-binding protein and the blood-testis barrier. GnRH secretion disorder causes testosterone deficiency and impairs sperm production (12).

Genetic factors that cause male infertility are heterogeneous. Chromosomal abnormality is defined as any alteration in one or more chromosomes and is categorised as either numerical or structural. Numerical abnormality is when a chromosome is missing or when there is an extra chromosome. For instance, Klinefelter syndrome, the presence of an extra X chromosome in men, is the most common numerical abnormality in men with impaired spermatogenesis (13-15). By contrast, the modification of chromosomal structures, such as translocations, inversions, Y chromosome microdeletions and copy number variations (CNVs), are defined as structural chromosomal abnormalities. Translocations can be Robertsonian (where a whole chromosome has joined to another at the centromere) or reciprocal (sections from two distinct chromosomes have been swapped). Translocations are 10 times more common among infertile men compared with the normal population. These translocations can lead to decreased fertility, spontaneous abortion and birth defects (16). Inversions occur when a piece of a chromosome rotates 180 degrees within the same chromosome; thus, there is no loss of genetic material (17). Like translocations, inversions may cause infertility, spontaneous abortions and birth defects (16-18). Y chromosome microdeletions may also be a cause of spermatogenic failure. Three regions on the long arm (Yq) of the Y chromosome have been identified: the azoospermia factors (AZFs) AZFa, AZFb and AZFc. Any deletions in these regions might cause male infertility (19). CNVs are large DNA segments that repeat in the ge-

nome; the number of repeats varies among individuals (20,21). CNVs have been found to cause spermatogenic failure by affecting genes that are essential for spermatogenesis (22,15).

Spermatogenesis is a complex process, and large numbers of genes are present during this event. Gene mutations that cause abnormal spermatogenesis without any other symptoms give rise to non-syndromic male infertility (23). Identified gene mutations have been generally grouped according to the resulting phenotype, such as spermatogenic failure, teratozoospermia and asthenozoospermia (13). Technological advances have enabled researchers to analyse the whole genome to identify various specific gene mutations that lead to male infertility (24). However, no single gene is known to cause male infertility (25). Some genes are notable owing to their prevalence in specific groups. *AURKC* and *DPY19L2* mutations have been related to teratozoospermia (26, 27). Two recurrent mutations have been identified for *AURKC*: one in the North African population and one in the European population. A carrier frequency of 1/50 was established in North African patients who had macrocephaly (large head and multi-tailed spermatozoa) (26). Later, it was demonstrated that the majority of macrocephalic spermatozoa are tetraploid, meaning that they have no chance of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) (28). Mutations in the *DPY19L2* gene have been correlated with globozoospermia (round-headed spermatozoa); this mutation is found in 60% of globozoospermic patients (27). It has been demonstrated that assisted oocyte activation enables better fertilization rates (29). Although there is no dominant gene yet to be the reason for spermatogenic failure, it has been reported that *TEX11* mutation can cause meiotic arrest and azoospermia with a frequency of 2-15% in azoospermic men (8,13,30). Furthermore, although there is limited evidence, mutations in *TEX15* are thought to cause spermatogenic failure and a decreased sperm count over time. Patients with this mutation could be advised to undergo sperm cryopreservation at an early age with the aim of protecting future fertility potential (31). According to a recent study, it has been demonstrated that *M1AP* mutation can cause severe spermatogenic failure leading to male infertility. In the study, they were able to trace *M1AP* mutation in different independent patients in different countries and concluded that *M1AP* should be included in the growing list of validated non-obstructive azoospermia (NOA) genes (32). In recent years, due to the discovery and presence of various specific gene mutations, there are few custom gene panels for infertility that are available as a diagnostic tool. Genes included in each custom panel are different but in general, gene panels would provide a definitive causal diagnosis and more accurate treatment in ART (33-36).

Physical problems can decrease the sperm count and/or sperm morphology. Varicocele is a congenital vascular anomaly that causes impaired sperm motility, decreased sperm count, and impaired sperm structure (37). Moreover, in some infertile men, sperm cannot travel from the testicles to the penis because of sperm duct obstruction. The blockage or deficiency of one or both tubes can be caused by genetic or developmental factors.

Torsion occurs when the testicle is bent in the scrotum and is characterized by excessive swelling. This leads to testicular damage because the blood vessels that feed the testicle are compressed. Furthermore, infections and diseases such as tuberculosis, brucellosis, gonorrhoea, typhoid, flu, chickenpox, rubella and syphilis can cause obstructions and testicular atrophy (38). These conditions can lead to changes in sperm quality by decreasing the sperm count and motility. Retrograde ejaculation (where the semen does exit the body at the time of ejaculation but instead transfers to the bladder), premature ejaculation or anejaculation (the lack of ejaculation) can also be reasons for male infertility (39).

In conclusion, the causes of male infertility are multifarious. Along with the assistance of emerging technology, the identification of genes for diagnostic purposes would provide better guidance to clinicians. The evaluation and management of male infertility during infertility treatment are of the utmost importance for couples.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of study - M.S.; Data Acquisition - M.S.; Data Analysis/Interpretation - M.S.; Critical Revision of Manuscript - M.S.; Technical or Material Support - M.S.

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.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarımı - M.S.; Veri Toplama - M.S.; Veri Analizi/Yorumlama - M.S.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi - M.S.; Malzeme ve teknik destek - M.S.

Çıkar Çatışması: Yazar çıkar çatışması bildirmemiştir.

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

REFERENCES

1. WHO. World Health Organisation (WHO) laboratory manual for the examination and processing of human semen Fifth edition. 2010.
2. Vander Borgh M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem* 2018; 62: 2-10. [CrossRef]
3. Krausz C. Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011; 25(2): 271-85. [CrossRef]
4. Esteves SC, Agarwal A. Novel concepts in male infertility. *Int Braz J Urol* 2011; 37(1): 5-15. [CrossRef]
5. Jenardhanan P, Panneerselvam M, Mathur PP. Effect of environmental contaminants on spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2016; 59: 126-40. [CrossRef]
6. Stuppia L, Franzago M, Ballerini P, Gatta V, Antonucci I. Epigenetics and male reproduction: the consequences of paternal lifestyle on fertility, embryo development, and children lifetime health. *Clin Epigenetics* 2015; 7: 120. [CrossRef]
7. Horta F, Vollenhoven B, Healey M, Busija L, Catt S, Temple-Smith P. Male ageing is negatively associated with the chance of live birth in IVF/ICSI cycles for idiopathic infertility. *Hum Reprod* 2019; 34(12): 2523-32. [CrossRef]
8. Tuttelmann F, Ruckert C, Ropke A. Disorders of spermatogenesis: Perspectives for novel genetic diagnostics after 20 years of unchanged routine. *Med Genet* 2018; 30(1): 12-20. [CrossRef]
9. Cole LA. Chapter 18 - Human Male Spermatogenesis. In: Cole LA, editor. *Biology of Life*. Academic Press; 2016. p. 135-41. [CrossRef]
10. Ernst C, Eling N, Martinez-Jimenez CP, Marioni JC, Odom DT. Staged developmental mapping and X chromosome transcriptional dynamics during mouse spermatogenesis. *Nat Commun* 2019; 10(1): 1251. [CrossRef]
11. Fietz D, Bergmann M. Functional Anatomy and Histology of the Testis. In: Simoni M, Huhtaniemi I, editors. *Endocrinology of the Testis and Male Reproduction*. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 1-29. [CrossRef]
12. Szmelskyj I, Aquilina L, Szmelskyj AO. Chapter 2 - Anatomy and physiology of the reproductive system: Prerequisites for conception. In: Szmelskyj I, Aquilina L, Szmelskyj AO, editors. *Acupuncture for IVF and Assisted Reproduction*. Churchill Livingstone; 2015. p. 23-58. [CrossRef]
13. Guerri G, Maniscalchi T, Barati S, Busetto GM, Del Giudice F, De Bernardinis E, et al. Non-syndromic monogenic male infertility. *Acta Biomed* 2019; 90(10-5): 62-7. [CrossRef]
14. Milani DAQ, Tadi P. Genetics, Chromosome Abnormalities. *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing; 2020.
15. Plaseska-Karanfilska D, Noveski P, Plaseski T, Maleva I, Madjunkova S, Moneva Z. Genetic causes of male infertility. *Balkan J Med Genet* 2012; 15(Suppl): 31-4. [CrossRef]
16. Dong Y, Du RC, Jiang YT, Wu J, Li LL, Liu RZ. Impact of chromosomal translocations on male infertility, semen quality, testicular volume and reproductive hormone levels. *J Int Med Res* 2012; 40(6): 2274-83. [CrossRef]
17. Kaiser-Rogers K, Rao KW. Structural Chromosome Rearrangements. In: Gersen SL, Keagle MB, editors. *The Principles of Clinical Cytogenetics*. New York, NY: Springer New York; 2013. p. 139-74. [CrossRef]
18. Harton GL, Tempest HG. Chromosomal disorders and male infertility. *Asian J Androl* 2012; 14(1): 32-9. [CrossRef]
19. Krausz C, Hoefsloot L, Simoni M, Tuttelmann F, European Academy of A, European Molecular Genetics Quality N. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. *Andrology* 2014; 2(1): 5-19. [CrossRef]
20. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 2006; 444(7118): 444-54. [CrossRef]
21. Thapar A, Cooper M. Copy number variation: what is it and what has it told us about child psychiatric disorders? *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2013; 52(8): 772-4. [CrossRef]
22. Miyamoto T, Minase G, Shin T, Ueda H, Okada H, Sengoku K. Human male infertility and its genetic causes. *Reprod Med Biol* 2017; 16(2): 81-8. [CrossRef]
23. Okutman O, Rhouma MB, Benkhalifa M, Muller J, Viville S. Genetic evaluation of patients with non-syndromic male infertility. *J Assist Reprod Genet* 2018; 35(11): 1939-51. [CrossRef]
24. Xavier MJ, Salas-Huetos A, Oud MS, Aston KI, Veltman JA. Disease gene discovery in male infertility: past, present and future. *Hum Genet* 2020. <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02202-x> [CrossRef]
25. Oud MS, Volozonoka L, Smits RM, Vissers L, Ramos L, Veltman JA. A systematic review and standardized clinical validity assessment of male infertility genes. *Hum Reprod* 2019; 34(5): 932-41. [CrossRef]

26. Dieterich K, Soto Rifo R, Faure AK, Hennebicq S, Ben Amar B, Zahi M, et al. Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility. *Nat Genet* 2007; 39(5): 661-5. [\[CrossRef\]](#)
27. Elinati E, Kuentz P, Redin C, Jaber S, Vanden Meerschaut F, Makarian J, et al. Globozoospermia is mainly due to DPY19L2 deletion via non-allelic homologous recombination involving two recombination hotspots. *Hum Mol Genet* 2012; 21(16): 3695-702. [\[CrossRef\]](#)
28. Dieterich K, Zouari R, Harbuz R, Vialard F, Martinez D, Bellayou H, et al. The Aurora Kinase C c.144delC mutation causes meiosis I arrest in men and is frequent in the North African population. *Hum Mol Genet* 2009; 18(7): 1301-9. [\[CrossRef\]](#)
29. Kuentz P, Vanden Meerschaut F, Elinati E, Nasr-Esfahani MH, Gurgan T, Iqbal N, et al. Assisted oocyte activation overcomes fertilization failure in globozoospermic patients regardless of the DPY19L2 status. *Hum Reprod* 2013; 28(4): 1054-61. [\[CrossRef\]](#)
30. Yatsenko AN, Georgiadis AP, Ropke A, Berman AJ, Jaffe T, Olszewska M, et al. X-linked TEX11 mutations, meiotic arrest, and azoospermia in infertile men. *N Engl J Med* 2015; 372(22): 2097-107. [\[CrossRef\]](#)
31. Okutman O, Muller J, Baert Y, Serdarogullari M, Gultomruk M, Piton A, et al. Exome sequencing reveals a nonsense mutation in TEX15 causing spermatogenic failure in a Turkish family. *Hum Mol Genet* 2015; 24(19): 5581-8. [\[CrossRef\]](#)
32. Wyrwoll MJ, Temel SG, Nagirnaja L, Oud MS, Lopes AM, van der Heijden GW, et al. Bi-allelic Mutations in M1AP Are a Frequent Cause of Meiotic Arrest and Severely Impaired Spermatogenesis Leading to Male Infertility. *Am J Hum Genet* 2020; 107(2): 342-51. [\[CrossRef\]](#)
33. Franca MM, Funari MFA, Nishi MY, Narcizo AM, Domenice S, Costa EMF, et al. Identification of the first homozygous 1-bp deletion in GDF9 gene leading to primary ovarian insufficiency by using targeted massively parallel sequencing. *Clin Genet* 2018; 93(2): 408-11. [\[CrossRef\]](#)
34. Lorenzi D, Fernandez C, Bilinski M, Fabbro M, Galain M, Menazzi S, et al. First custom next-generation sequencing infertility panel in Latin America: design and first results. *JBRA Assist Reprod* 2020; 24(2): 104-14. [\[CrossRef\]](#)
35. Riera-Escamilla A, Enguita-Marruedo A, Moreno-Mendoza D, Chianese C, Sleddens-Linkels E, Contini E, et al. Sequencing of a 'mouse azoospermia' gene panel in azoospermic men: identification of RNF212 and STAG3 mutations as novel genetic causes of meiotic arrest. *Hum Reprod* 2019; 34(6): 978-88. [\[CrossRef\]](#)
36. Rocca MS, Msaki A, Ghezzi M, Cosci I, Pilichou K, Celegghin R, et al. Development of a novel next-generation sequencing panel for diagnosis of quantitative spermatogenic impairment. *J Assist Reprod Genet* 2020; 37(4): 753-62. [\[CrossRef\]](#)
37. Choi WS, Kim SW. Current issues in varicocele management: a review. *World J Mens Health* 2013; 31(1): 12-20. [\[CrossRef\]](#)
38. Garcia-Velasco JA, Banker M, Shah R. *Infertility Management Series: Practical Management of Male Infertility*. New Delhi, India: Jaypee Brothers Medical Publishers; 2015. [\[CrossRef\]](#)
39. Leaver RB. Male infertility: an overview of causes and treatment options. *Br J Nurs* 2016; 25(18): S35-S40. [\[CrossRef\]](#)

REVIEWER LIST 2020

Ali Osman Gürol

Bilge Gökçen

Bilge Özsait Selçuk

Bilinç Bulucu

Birsu Çinçin

Cevdet Özdemir

Ebru Emekli Alturfan

Elif Özkök

Elif Sinem İplik

Elif Şahin

Elvan Bakar

Emel ERGÜL

Erdem Tüzün

Fahri Akbaş

Gaye Erten Yurdagül

Hülya Yılmaz-Aydoğan

Jülide Duymaz

Kamil Narter

Kıvanç Kayhan Bektaş

Mehmet Demirci

Naci ÇİNE

Nilgün Işıksaçan

Nurcan Orhan

Özlem Saçan

Pınar Aksoy

Rukset Attar

Sehkar Oktay

Selçuk Sözer

Sema Bilgiç Gazioğlu

Sevgi Çiftçi

Sezai Özkan

Tülay Çardaközü

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) ilkelerini uygun olarak yürütülmektedir.

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

Değerlendirme Süreci

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

Etik İlkeler

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

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

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

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

Yayın Kurulu, dergimize gönderilen çalışmalar hakkındaki intihal, 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.

Olgü Sunumu: Olgü 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", "Olgü Sunumu", "Tartışma" ve "Sonuç" alt başlıklarını içermelidir. Olgü 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 Arapik 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
Olgü 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](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