



ISSN: 2146-2631  
eISSN: 2587-053X

# KAFKAS TIP BİLİMLERİ DERGİSİ

*Kafkas Journal of Medical Sciences*

Kafkas J Med Sci

Bu dergi Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi'nin akademik yayın organıdır.

*This journal is an official academic publication of Kafkas University Faculty of Medicine.*

## Endekslenme (Indexed in)

**TÜBİTAK-ULAKBİM**  
**Türkiye Atıf Dizini**  
**Türk Medline**  
**EBSCO**  
**Google Scholar**  
**DergiPark Akademik**  
**DOAJ**

## Yönetim (Administration)

**Prof. Dr. Sami ÖZCAN**, İmtiyaz Sahibi / Dekan Vekili (*Owner / Vice Dean*)

**Prof. Dr. Ayla ÖZCAN**, Yazı İşleri Müdürü (*Publishing Manager*)

## Editöryal Kurul (Editorial Board)

Editör (*Editor*)

**Prof. Dr. Ayla ÖZCAN**

Editör Yardımcıları (*Associate Editors*)

**Dr. Öğr. Üyesi Binali ÇATAK**

**Uzm. Dr. Aysu Hayriye TEZCAN**

**Dr. Öğr. Üyesi Tolga KASACI**

**Dr. Öğr. Üyesi Bora UZUNER**

Dil Editörü (*English Editor*)

**Dr. Öğr. Üyesi Tolga KASACI**

Sekreteryaya (*Secretary*)

**Dr. Öğr. Üyesi Pınar BAYRAM**

## İletişim (Correspondence)

Kafkas Tıp Bilimleri Dergisi  
Kafkas Üniversitesi, Tıp Fakültesi  
36300 KARS - TÜRKİYE  
Tel: 474 225 11 96  
Fax: 474 225 11 93  
E-mail: edit.tipdergi@gmail.com  
Web: <http://meddergi.kafkas.edu.tr>

## Yayın Hizmetleri (Publication Service)

Tasarım ve Uygulama (*Graphic Design*)  
BAYT Bilimsel Araştırmalar Basın Yayın ve Tanıtım Ltd. Şti.  
Ziya Gökalp Cad. 30/31, Kızılay - Ankara  
Tel: (312) 431 30 62  
[www.bayt.com.tr](http://www.bayt.com.tr)

Baskı (*Printing*)  
Miki Matbaacılık Ltd. Şti.  
Matbaacılar Sitesi, 560 Sk. No:27, İvedik - Ankara  
Tel: (312) 395 21 28

Baskı Tarihi (*Printing Date*): 18 Aralık 2018

## Danışma Kurulu (Advisory Board)

- Prof. Dr. Ahmet Taha ALPER**, Siyami Ersek Eğitim Araştırma Hastanesi, TÜRKİYE  
**Prof. Dr. Ebubekir BAKAN**, Atatürk Üniversitesi, TÜRKİYE  
**Prof. Dr. Okay BAŞAK**, Adnan Menderes Üniversitesi, TÜRKİYE  
**Prof. Dr. Duran CANATAN**, Akdeniz Kan Hastalıkları Vakfı, TÜRKİYE  
**Prof. Dr. Ali KOLUSAR**, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, TÜRKİYE  
**Prof. Dr. Kürşat TÜRKDOĞAN**, Sabahattin Zaim Üniversitesi, TÜRKİYE  
**Yrd. Doç. Dr. Helieh Saatara OZ**, Kentucky Tıp Merkezi Üniversitesi, ABD  
**Prof. Dr. Ayla ÖZCAN**, Kafkas Üniversitesi, TÜRKİYE  
**Prof. Dr. Hilal ÖZCEBE**, Hacettepe Üniversitesi, TÜRKİYE  
**Prof. Dr. Dilek ÖZCENGİZ**, Çukurova Üniversitesi, TÜRKİYE  
**Doç. Dr. Barış Doğu YILDIZ**, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, TÜRKİYE  
**Prof. Dr. İrina ZARNADZE**, Javakhishvili Tiflis Devlet Üniversitesi, GÜRCİSTAN

## Hakem Listesi (Referees List)

- |                           |                             |
|---------------------------|-----------------------------|
| <b>Ada BENDER</b>         | <b>Gentian VYSHKA</b>       |
| <b>Afife Ayla KABALAK</b> | <b>Haldun ARPACI</b>        |
| <b>Ahmet ALTINTAŞ</b>     | <b>Hasan ÇILGIN</b>         |
| <b>Asaad ALSHOUK</b>      | <b>Kemal SARICA</b>         |
| <b>Bilge İpek TORUN</b>   | <b>Kemal SAYAR</b>          |
| <b>Boran URFALI</b>       | <b>Mehmet Ali GÜNER</b>     |
| <b>Burcu HAYTA</b>        | <b>Muhammet Bora UZUNER</b> |
| <b>Caner TUĞRUL</b>       | <b>Murat BAĞCIOĞLU</b>      |
| <b>Cem ÖZİÇ</b>           | <b>Mustafa ÇELİK</b>        |
| <b>Cihan Caner AKSOY</b>  | <b>Nihal APAYDIN</b>        |
| <b>Dinçer ERDAĞ</b>       | <b>Nilnur EĞERCİ</b>        |
| <b>Ela CÖMERT</b>         | <b>Numan ÇİM</b>            |
| <b>Elif TÜRKÖĞLU</b>      | <b>Pınar BAYRAM</b>         |
| <b>Emre HURİ</b>          | <b>Rahime Nida ERGİN</b>    |
| <b>Esmâ Nur OKATAN</b>    | <b>Shashank RAMDURG</b>     |
| <b>Ferhat GENEÇİ</b>      | <b>Turgay UÇAK</b>          |
| <b>Filiz CAN</b>          | <b>Yakup YEĞİN</b>          |
| <b>Filiz ÖZYİĞİT</b>      | <b>Züla ÖNER</b>            |

**İçindekiler / Contents****ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE**

- Nar Kabuğu Ekstresinin Sıçanlarda Paklitakselle İndüklenen Primer Nöron Hasarına Karşı Koruyucu Etkisi..... 149**  
Protective Effects of Pomegranate Peel Extract on Paclitaxel Induced Primary Neuron Damage in Rats  
*Muhammed Yayla, Damla Çetin, Çağlar Demirbağ, Pınar Aksu Kılıçle*  
doi: 10.5505/kjms.2018.17136
- Diyabetik Maküla Ödeminde Unilateral ve Bilateral Uygulanan İntravitreal Ranibizumab Tedavisinin Anatomik ve Görsel Sonuçları..... 158**  
Anatomical and Visual Outcomes of Unilateral and Bilateral Intravitreal Ranibizumab Treatment Applied in Diabetic Macular Edema  
*Erdinç Bozkurt, Osman Öndaş*  
doi: 10.5505/kjms.2018.60590
- Pioglitazone Reduces Oxidative Stress in Kidney Against High Sucrose Diet-Induced Metabolic Syndrome in Rats ..... 165**  
Pioglitazon Sıçanlarda Yüksek Sükrozla Başlatılmış Metabolik Sendromda Böbrekteki Oksidatif Stresi Azaltır  
*Ayça Bilginoğlu*  
doi: 10.5505/kjms.2018.71224
- Ayak Arkus Açısı ve Ayak Uzunluğu Arasındaki İlişki ..... 172**  
Relationship Between the Angle of the Foot Arch and the Length of the Foot  
*Bilge İpek Torun, Nurdan Çay*  
doi: 10.5505/kjms.2018.81557
- Kronik Otitis Media ve Alerjik Rinit Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi..... 183**  
Evaluation of the Relationship Between Chronic Otitis Media and Allergic Rhinitis  
*Yavuz Güler, Rukiye Güler, Alper Şen, Kadir Özdamar, Esra Ayca Üstüol*  
doi: 10.5505/kjms.2018.34713
- Meme Hastalıkları Miyoma Uteri Birlikteliği..... 183**  
Breast Diseases and Myoma Uteri Co-Occurrence  
*Funda Dinç Elibol, Sezen Bozkurt Köseoğlu*  
doi: 10.5505/kjms.2018.90582
- Mesane Kanseri Nedeniyle Transüretal Rezeksiyon Yapılan 177 Olgunun Retrospektif Analizi..... 190**  
Retrospective Analysis of 177 Cases Treated with Transurethral Resection  
*Erkan Hirik, Mecdi Gürhan Balcı*  
doi: 10.5505/kjms.2018.55798
- Comorbid Conditions in Newborn Operated Due to Open Spinal Dysraphism and Retrospective Evaluation of Relation Between These Situations with Folic Acid Usage During the Pregnancy ..... 194**  
Açık Spinal Disrafizm Nedeniyle Opere Olan Yenidoğanlarda Komorbid Durumlar ve Bunların Gebelikte Folik Asit Kullanımıyla İlişkinin Retrospektif İncelenmesi  
*Abdurrahman Çetin, Abdulkadir Yektaş*  
doi: 10.5505/kjms.2018.60486
- Nazofarenks Punch Biyopsi Sonuçlarının Retrospektif Analizi..... 203**  
Retrospective Analysis of Nasopharynx Punch Biopsy Results  
*Selçuk Güneş, Mustafa Çelik, Burak Olgun, İrem Özen, Hüseyin Avni Ulusoy*  
doi: 10.5505/kjms.2018.38039
- Türk Toplumunda Foramen Magnum ve Kafa Tabanındaki Oluşumların İlişkileri ..... 207**  
Relations Between Foramen Magnum and Associated Structures Located Within the Skull Base of the Turkish Population  
*Burcu Erçakmak Güneş, Alper Vatanserver*  
doi: 10.5505/kjms.2018.93276

**Radiographic Examination of Talocrural Joint Morphometry in Individuals with Normal Joint Anatomy..... 214**

Articulatio Talocruralis Morfometrisinin Anatomik Olarak Normal Eklem Yapısına Sahip Bireylerin Radyografilerinde Değerlendirilmesi

*Muhammet Bora Uzuner, Mustafa F. Sargon, Ferhat Geneci, Mert Ocak, Tanzer Sancak, Deniz Demiryürek, Burak Bilecenoğlu*  
doi: 10.5505/kjms.2018.55476

**OLGU SUNUMU / CASE REPORT**

**Primer Sezaryen Sırasında Adneksial Torsiyon ve İfundibulo-Pelvik Ligament Yokluğu: Vaka Sunumu..... 222**

Adnexial Torsion and Infundibulo-Pelvic Ligament Absence During Primary Caesarean: Case Report  
*Gülten Sağır, Bakiye Akbaş, Özgür Özdemir*

doi: 10.5505/kjms.2018.23540

**Klippel-Feil Sendromu ile Bağlantılı Doğumsal Brakiyal Pleksus Hasarı Olgusu..... 227**

A Case of Obstetrical Brachial Plexus Injury Associated with Klippel-Feil Syndrome  
*Yeşim Garip, Bledjan Çuni, Özgül Bozkurt Tuncer*

doi: 10.5505/kjms.2018.38247

**DERLEME / REVIEW**

**Genom Düzenlemede CRISPR/Cas9 Çağı ve Lösemideki Uygulamaları..... 232**

CRISPR/Cas9 Age in Genome Editing and Leukemia Applications  
*Nurcan Gümüş, Burçin Tezcanlı Kaymaz*

doi: 10.5505/kjms.2018.94715



# Nar Kabuğu Ekstresinin Sıçanlarda Paklitakselle İndüklenen Primer Nöron Hasarına Karşı Koruyucu Etkisi

*Protective Effects of Pomegranate Peel Extract on Paclitaxel Induced Primary Neuron Damage in Rats*

Muhammed Yayla<sup>1</sup>, Damla Çetin<sup>1</sup>, Çağlar Demirbağ<sup>2</sup>, Pınar Aksu Kılıçle<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Kars; <sup>2</sup>Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Tekirdağ; <sup>3</sup>Kafkas Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Kars; Türkiye

## ABSTRACT

**Aim:** The combination of chemotherapeutics and pomegranate peel extract has been shown to have a stronger anti-cancer effect. However, there is no information about how pomegranate peel extract will affect the neurotoxicity that may develop due to cancer chemotherapy. In this study, we aimed to the effects of strong antioxidant pomegranate peel extract on paclitaxel induced primary neuron damage in newborn rats by biochemical and molecular analysis.

**Material and Method:** Paclitaxel toxicity was induced in the primary neuron cell culture derived from newborn rats. PPE 200, 300 and 400 mg/ml doses were applied 2 hours before the paclitaxel for protective effect.

**Results:** In the MTT analysis, paclitaxel reduced cell viability by caused neuronal damage at the end of 24 hours. PPE has demonstrated significant protective effect on cell viability by preventing paclitaxel toxicity at all doses. PPE was demonstrated its effects by reducing oxidative stress, increasing antioxidant capacity, and also by suppressing the TNF- $\alpha$  expression which is pro-inflammatory cytokine, and caspase 9 and 3 expression which are apoptotic proteins.

**Conclusion:** PPE prevents primary neuron damage caused paclitaxel by its antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic effect.

**Key words:** apoptosis; pomegranate; neuron; oxidative stress; paclitaxel

## ÖZET

**Amaç:** Potansiyel bir anti-karsinojen olan nar kabuğunun kemoterapötikler ile tedavisinin tedaviyi desteklediği ve daha güçlü anti kanser etki oluşturduğu gösterilmiştir. Ancak nar kabuğunun kanser kemoterapisine bağlı gelişebilecek nörotoksositeye karşı nasıl bir etki göstereceği konusunda bir bilgi bulunmamaktadır. Çalışmamızda güçlü antioksidan olan nar kabuğunun sıçanlarda paklitakselle ile indüklenen primer nöron hasarındaki etkilerini biyokimyasal ve moleküler analizler ile ortaya koymayı amaçladık.

Muhammed Yayla, Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Kars, Türkiye, 36100, Tel. 0534 210 50 42 Email. muhammed.yayla@gmail.com  
Geliş Tarihi: 02.08.2018 • Kabul Tarihi: 22.10.2018

**Materyal ve Metot:** Yeni doğan sıçan yavrularından elde edilen primer nöron hücre kültüründe paklitakselle toksisitesi indüklendi. PPE 200, 300 ve 400 mg/ml dozlarında koruyucu etki için paklitakselle 2 saat önce uygulandı.

**Bulgular:** Hücre canlılığı için yapılan MTT analizinde paklitakselle 24 saat sonunda nöron hasarı oluşturarak hücre canlılığını azaltmıştır. PPE ise tüm dozlarda anlamlı bir şekilde paklitakselle toksisitesini önleyerek hücre canlılığını korumuştur. PPE bu etkilerini oksidatif stresi azaltarak, antioksidan kapasiteyi artırarak ve aynı zamanda pro-inflamatuar sitokin olan TNF- $\alpha$  ekspresyonunu ve apoptotik proteinler olan caspase 9 ve 3 ekspresyonunu baskılayarak ortaya koymuştur.

**Sonuç:** PPE antioksidan, anti-inflamatuar ve anti-apoptotik etkisi ile paklitakselle bağlı gelişen primer nöron hasarını önlemiştir.

**Anahtar kelimeler:** apoptozis; nar; nöron; oksidatif stres; paklitakselle

## Giriş

Mevcut antikanser ilaçlar aynı zamanda sitotoksik etkileri ile bilinmektedirler. Pek çok kanser türünde kemoterapi imkanı sağlayan bu ilaçların ciddi yan etkileri tedavi sonrasında yaşamı olumsuz etkilemektedir. Çalışmamızda kullandığımız taksan sınıfı bileşikler son yıllarda önemli kemoterapötikler arasına girmiştir. Paklitakselle ve yarı sentetik türevi olan dosetaksel over, meme, akciğer ve pekçok kanser hasta grubunda tek başına veya diğer kemoterapötiklerle kombine olarak kullanılmaktadır<sup>1-3</sup>. Nötropeni, periferik nöropati gibi ciddi yan etkilere yol açan paklitakselle yapılan çalışmalar sonucunda nöron hasarına da yol açtığı görülmüştür<sup>4-6</sup>. Bu yüzden antikanser ilaçların toksisitelerini önlemek için antioksidan ve sitoprotektif etkiye sahip ajanlar kombine edilerek kullanılmaktadır<sup>7,8</sup>. Ancak halen kemoterapiye bağlı gelişen organ hasarlarının önüne geçilememiştir. Bu yüzden antikanser ilaçların

toksik etkilerini önlemeye yönelik yeni stratejiler geliştirilmekte ve güçlü antioksidan maddeler keşfedilerek aktiviteleri denenmektedir.

Punicaceae ailesinin önemli bir üyesi olan nar (*Punica granatum*); antik çağdan beri bilinen pek çok özelliklere sahip bir meyvedir. Nar, tohum (ağırlığın %3'ü), su (ağırlığın %30'u) ve kabuk olmak üzere 3 bölümden oluşan güçlü antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklere sahiptir. Günümüzde yapılan çalışmalarda narın kimyasal bileşenlerinin ve terapötik etkilerinin tanımlanmasında kayda değer ilerlemeler sağlanmıştır. Narın ihtiva ettiği önemli biyoaktif maddeler kabuk, meyve ve çekirdeğinde farklılıklar göstermekte ve bu durum narın hipolipidemik, antioksidan, anti diyabetik, anti-neoplastik etkilerden faydalanmamız için çeşitlilik sunmaktadır<sup>9-11</sup>. Nar kabuğundaki yüksek miktarda (Punikalagin) PNG, narın anti-inflamatuvar, antioksidan, anti-apoptotik ve daha birçok faydalı biyolojik etkiler ortaya çıkarmasını sağlamaktadır<sup>12,13</sup>. Yine kabuğunda bulunan diğer yağ asitleride hem antioksidan hemde anti-inflamatuvar etkilere sahiptir<sup>14</sup>. Aynı zamanda yapılan son çalışmalar incelendiğinde nar kabuğunun potansiyel bir anti-karsinojen olabileceğini görülmektedir<sup>15</sup>. Kemoterapötikler ile nar kabuğu ekstresinin kombine tedavisinin tedaviyi desteklediği ve daha güçlü anti kanser etki oluştuğu da önceki çalışmalarda gösterilmiştir<sup>16</sup>. Ancak nar kabuğunun kanser kemoterapisine bağlı gelişebilecek nörotoksositeye karşı nasıl bir etki göstereceği konusunda bir bilgi bulunmamaktadır. Bu yüzden çalışmamızda güçlü antioksidan olan nar kabuğunun sıçanlarda paklitaksel ile indüklenen primer nöron hasarındaki etkilerini biyokimyasal ve moleküler analizler ile ortaya koymayı amaçladık.

## Materyal ve Metot

### Ekstrenin hazırlanması

*Punica granatum* (Nar), ülkemizde hicaz narı olarak bilinen türü Mersin ilinden 2016 yılında temin edilmiştir.

Bitkilerin ekstresi, Clevenger (Wisd-Wise Therm) cihazında, su buharı distilasyonu yöntemiyle elde edildi. Bu amaçla meyveler gölgede kurutulduktan sonra kabukları ayrıldı. 160 gr bitki parçalayıcıda ince toz haline getirildi. Öğütülen örnek cam balon içerisine konularak üzerine 1600 ml distile su ilave edildikten sonra Clevenger cihazına yerleştirilip cihaz çalıştırıldı. Buharlaştırma başladıktan sonra üç saat süre boyunca bekletildi. Bu süre boyunca Clevengerin toplama borusunda biriken hidrosol steril edilmiş ayrı bir şişeye alındı. Bu sürenin sonunda toplama borusunda biriken

son hidrosolde alındıktan sonra, geriye kalan ekstre kullanılıncaya kadar koyu renkli şişelerde, ağzı kapalı olarak, +4°C'de buzdolabında muhafaza edildi.

### Ekstrede bulunan maddelerin HPLC-DAD ile analizi

Ekstrede gallik asit, ellajik asit ve punikalajin A ve B maddeleri tespit edildi ve miktar tayinleri Agilent 1200 Serisi HPLC-DAD cihazında yapıldı.

### Örnek hazırlama

Sabit tartıma getirilen ekstre, konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde metanol ile çözüldü ve stok çözelti elde edildi. 10000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Elde edilen süpernatant fosfat tamponu (pH=2,5, 0,025 M) ile seyreltilerek çalışma çözeltileri hazırlandı. Çalışma çözeltileri enjeksiyon filtresinden geçirildikten sonra sisteme enjekte edildi. Her enjeksiyon üçer kez tekrarlandı.

### Etik kurul izinleri ve hayvanların temini

Bu çalışmamızda Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi (ATADEM) bünyesindeki deneysel hayvan laboratuvarından temin edilen toplam 10 adet yeni doğan Sprague dawley cinsi sıçanlar kullanıldı. (Bağlı bulunduğum üniversitede deney hayvanları üretimi olmadığı için çalışma Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezinden (ATADEM) temin edildi). Çalışmanın etik kurallara uygunluğu Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (KAÜ-HADYЕК) tarafından onaylanmıştır (HADYЕК 2017-004).

### Kültür yapımı

Yeni doğan Sprague dawley sıçan yavruları hızlı bir şekilde dekapite edildikten sonra korteks nöronları alınarak 1:1 tripsin ilave edildi ve inkübatörde 30 dakika süreyle bekletildikten sonra 3 defa santrifüj yapıp ve her defasında süpernatant atıldı ve yeni medyum ilave edildi. Aynı bir tüpte nörobasal medyum 1000:1 penisilin 50:1 B27 supplement ve 10:1 fetal bovine serum ilave edilerek medyum hazırlandı. Hazırlanan medyumun içine hücreler eklendi. 96 kuyucuklu plate'in her odacığına 150 µl medyum eklendi. Hücrelerin odacıkların tabanına yapışması ve tabanını kaplaması ve büyümesi için 10 gün inkübatörde bekletildi<sup>7</sup>.

### İlaç uygulaması

Kurulan korteks primer kültürüne distile su ile çözülen PPE 200, 300 ve 400 mg/ml dozlarında uygulandıktan

2 saat sonra  $10^{-7}$  ve  $10^{-8}$  M dozlarında paklitaksel ile toksisite oluşturuldu.

#### Gruplar:

1. Grup; Sağlıklı kontrol (herhangi bir ilaç uygulaması yapılmadı)
2. Grup Paklitaksel  $10^{-7}$  M (Toksosite grubu yüksek doz)
3. Grup Paklitaksel  $10^{-8}$  M (Toksosite grubu düşük doz)
4. Grup PPE 200 mg/ml
5. Grup PPE 300 mg/ml
6. Grup PPE 400 mg/ml
7. Grup PPE 200 mg/ml + Paklitaksel- $7$  M
8. Grup PPE 300 mg/ml + Paklitaksel- $7$  M
9. Grup PPE 400 mg/ml + Paklitaksel- $7$  M
10. Grup PPE 200 mg/ml + Paklitaksel- $8$  M
11. Grup PPE 300 mg/ml + Paklitaksel- $8$  M
12. Grup PPE 400 mg/ml + Paklitaksel- $8$  M

#### Canlılık testleri

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) proliferasyon kiti (CAYMAN-10009365) ile ölü/canlı hücre sayısı ortaya kondu. Hücrelere paklitaksel uygulandıktan 24 saat sonra kitte yer alan direktiflere uygun bir şekilde ölçüm yapıldıktan sonra her bir numunenin absorbansı 570 nm'de mikropate okuyucu kullanılarak ölçüldü.

#### Oksidan ve antioksidan kapasite ölçümleri

**Total antioksidan kapasite (TAK) analizi:** Primer nöron kültür hücreleri üzerindeki TAK seviyelerini belirlemek amacıyla ticari TAK kiti kullanılmıştır (RELASSAY-Mega01). Kitin uygulamasında amaç, kullanılan örneklerin bir serbest radikal olan 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) bileşiğinin oluşumunu inhibe etmek suretiyle sahip oldukları antioksidan düzeylerini belirlemektir. Hücrelere paklitaksel uygulandıktan 24 saat sonra medyumlar toplanarak TAK ölçümü yapıldı. Çalışmadan en iyi belirlenen sonuçlar arasında karşılaştırma yapıldı.

**Total oksidan kapasite (TOD) Analizi:** Primer nöron kültür hücreleri üzerindeki TOD düzeylerini belirlemek amacıyla ticari TOD kiti kullanılmıştır (RELASSAY-Mega02). Hücrelere paklitaksel uygulandıktan 24 saat sonra medyumlar toplanarak TOD ölçümü yapıldı. Çalışmadan en iyi belirlenen sonuçlar arasında karşılaştırma yapıldı.

**Moleküler analizler:** Çalışmamızda Qiagenrat takım problu caspase 3, caspase 9 ve TNF $\alpha$  mRNA ekspresyon düzeyleri gruplar arasında karşılaştırıldı. Çalışmadan en iyi belirlenen sonuçlar arasında karşılaştırma yapıldı.

**Hücrelerden RNA ekstraksiyonu ve cDNA sentezi:** Önceki yapmış olduğumuz çalışmalardaki<sup>17</sup> direktiflere uygun bir şekilde hücrelere paklitaksel uygulandıktan 6 saat sonra hücreler kazınarak RNA izolasyonu (Qiagen RNaeasy mini kit-74104) ve cDNA sentezi (Qiagen RT-HT First Strand cDNA sentezi kiti-330404) gerçekleştirilmiştir.

**Real-Time PCR ile mRNA ekspresyonlarının kantitatif olarak belirlenmesi:** Caspase 9, caspase 3 ve TNF- $\alpha$  mRNA ekspresyonu, Taq Man Gene Expression Master Mix kiti kullanılarak kantifiye edildi. Amplifikasyon ve kantifikasyon işlemi StepOne Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems) cihazında yapıldı. 100ng cDNA için TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays'ler pipetlendi ve 40 siklus ile yürütüldü. Cycle threshold ( $C_t$ ) değerleri cihazda otomatik olarak  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ye çevrildi.

**İstatistiksel analiz:** Çalışmamızın verileri IBM 21,00 SPSS paket programı ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Gruplar arasındaki anlamlılık için One Way Anova çoklu karşılaştırma testinden Tukey testine göre yapıldı. Şekillerde sütunlardaki harfler birbirinden farklı ise aralarında anlamlı bir fark vardır, harfler birbiri ile aynı ise aralarındaki fark anlamsızdır. Analiz için ortalama ve standart sapma değerleri kullanıldı.  $p < 0,05$  anlamlı kabul edildi.

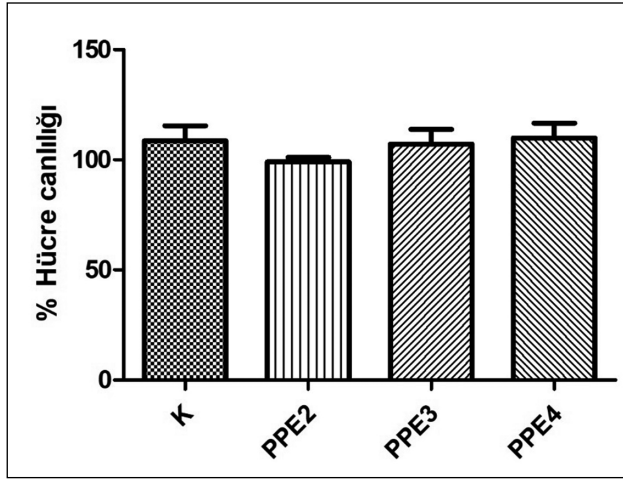
#### Bulgular

##### HPLC sonuçları

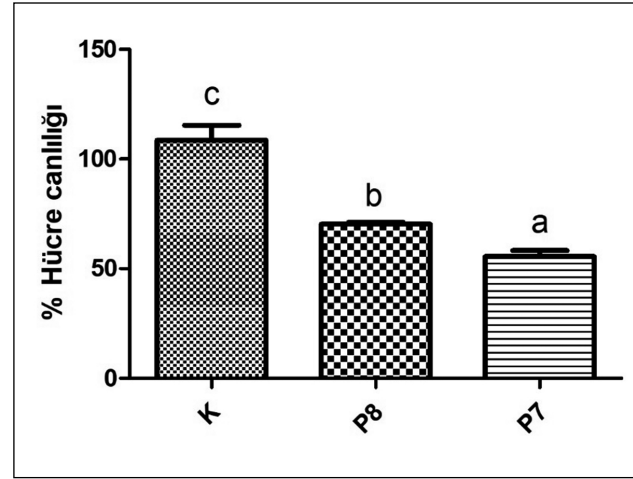
Tablo 1'de görüldüğü gibi nar kabuğu yüksek miktarda punikalajin A ve B ihtiva etmektedir. Aynı zamanda nar kabuğunda güçlü antioksidan biyoaktif maddelerden gallik asit ve ellajik asit yeterli miktarda bulunmaktadır.

**Tablo 1.** 1,00 gr ekstrede bulunan madde miktarları

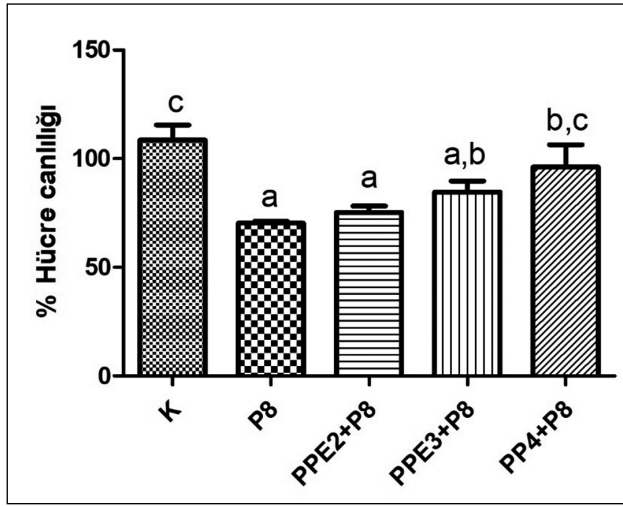
Madde Adı	Miktarı (mg/g)
Gallik Asit	14,45±0,53
Punikalajin A	191,56±0,36
Punikalajin B	189,48±0,62
Ellajik Asit	68,02±0,42



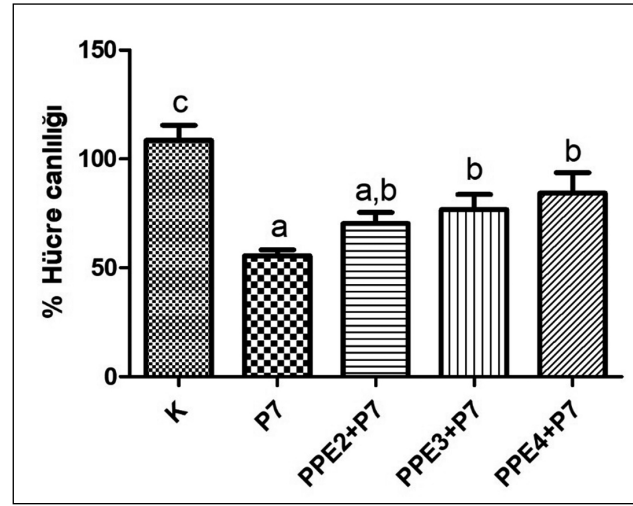
**Şekil 1.** Nar kabuğu ekstresinin 200, 300 ve 400 mg/ml dozlarındaki nöron hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT analizi ile gösterilmesi.



**Şekil 2.** Paklitakselin  $10^{-7}$  ve  $10^{-8}$  M dozlarındaki nöron hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT analizi ile gösterilmesi ( $p < 0,05$  anlamlı Kabul edilmiştir). Sütunlardaki harfler birbirinden farklı ise istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir farklılık var demektir).



**Şekil 3.** Paklitakselin  $10^{-8}$  M dozu ile indüklenen nörotoksitede PPE'nin koruyucu etkisinin MTT analizi ile gösterilmesi ( $p < 0,05$  anlamlı Kabul edilmiştir). Sütunlardaki harfler birbirinden farklı ise istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir farklılık var demektir).



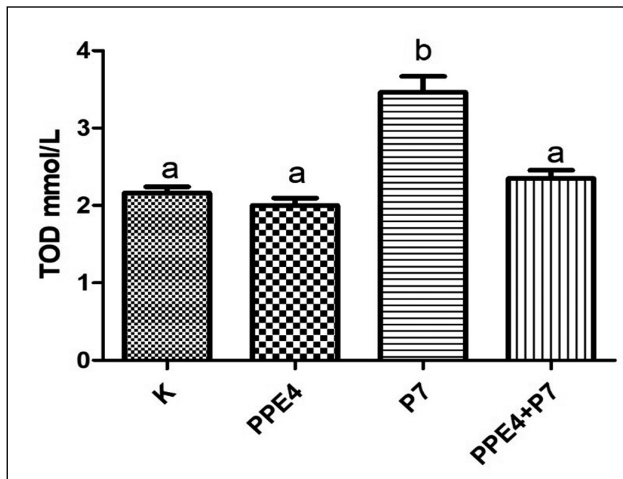
**Şekil 4.** Paklitakselin  $10^{-7}$  M dozu ile indüklenen nörotoksitede PPE'nin koruyucu etkisinin MTT analizi ile gösterilmesi ( $p < 0,05$  anlamlı Kabul edilmiştir). Sütunlardaki harfler birbirinden farklı ise istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir farklılık var demektir).

### Hücre canlılığı sonuçları

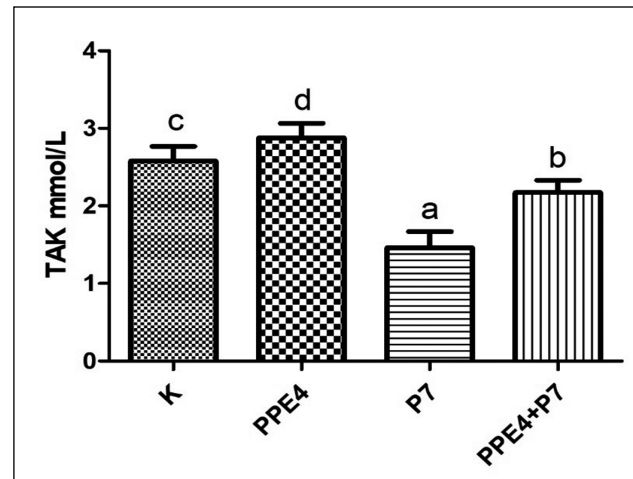
Çalışmamızda ilk olarak nar kabuğunun uyguladığımız dozlardaki primer nöronların canlılığı üzerindeki etkisini gösterdik. Şekil 1'de görüldüğü üzere 200, 300 ve 400 mg/ml dozlarında PPE'nin hücre canlılığı üzerine herhangi bir toksik etkisi görülmemiştir. Hatta sayısal olarak doza bağlı bir şekilde hücre proliferasyonunda artış gözlenmiştir. Çalışmamızda paklitaksel ile indüklenen toksite gruplarında ise doza bağlı bir şekilde hücre canlılığı anlamlı olarak azalmıştır (Şekil 2) ( $p < 0,05$ ).

Şekil 3 incelendiğinde paklitakselin  $10^{-8}$  M dozunda PPE'nin hücre canlılığı üzerindeki etkisi gösterilmiştir. PPE artan dozlarda paklitaksele bağlı gelişen toksisiteyi önlemiştir ( $p < 0,05$ ). Yine Şekil 4'te paklitakselin  $10^{-7}$  M olan daha toksik dozuna karşı PPE anlamlı bir etki ortaya koyarak hücre canlılığını önemli ölçüde korumuştur ( $p < 0,05$ ). Bu durumda toksik etki bakımından paklitakselin  $10^{-7}$  M dozu ve koruyucu etki olarak da PPE'nin 400 mg/ml dozu biyokimyasal ve moleküler çalışmalarda denenmiştir.

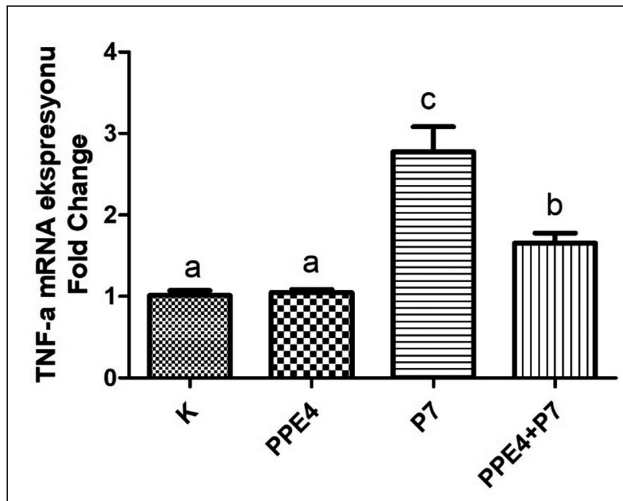




**Şekil 5.** Paklitaksel ile indüklenen nörotoksistide PPE uygulamasının Total oksidan düzey (TOD) üzerindeki etkilerinin gösterilmesi ( $p < 0,05$  anlamlı) Kabul edilmiştir. Sütunlardaki harfler birbirinden farklı ise istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir farklılık var demektir. PPE4:400 mg/ml, P7:10<sup>-7</sup> M).



**Şekil 6.** Paklitaksel ile indüklenen nörotoksistide PPE uygulamasının Total antioksidan kapasite (TAK) üzerindeki etkilerinin gösterilmesi ( $p < 0,05$  anlamlı) Kabul edilmiştir. Sütunlardaki harfler birbirinden farklı ise istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir farklılık var demektir. PPE4:400 mg/ml, P7:10<sup>-7</sup> M).



**Şekil 7.** Paklitaksel ile indüklenen nörotoksistide PPE uygulamasının pro-inflamatuar sitokin olan TNF- $\alpha$  mRNA ekspresyonu üzerindeki etkilerinin gösterilmesi ( $p < 0,05$  anlamlı) Kabul edilmiştir. Sütunlardaki harfler birbirinden farklı ise istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir farklılık var demektir. PPE4:400 mg/ml, P7:10<sup>-7</sup> M).

#### Toplam oksidan düzeyin (TOD) belirlenmesi

Şekil 5'te gruplar arasındaki TOD düzeyleri karşılaştırılmıştır. PPE nöron kültürünün oksidan düzeyi üzerinde tek başına bir etki oluşturmamıştır ( $p > 0,05$ ). Ancak paklitaksel uygulaması oksidan düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde artırmıştır ( $p < 0,05$ ). Bu durum paklitakselin oksidatif stresi artırdığını ve nöron hasarında etkili bir mekanizma olabileceğini göstermektedir. PPE ise paklitakselin artırmış olduğu oksidatif stresi sağlıklı gruba yaklaştırmış ve koruyucu etki ortaya koymuştur ( $p < 0,05$ ).

#### Toplam antioksidan kapasitenin (TAK) belirlenmesi

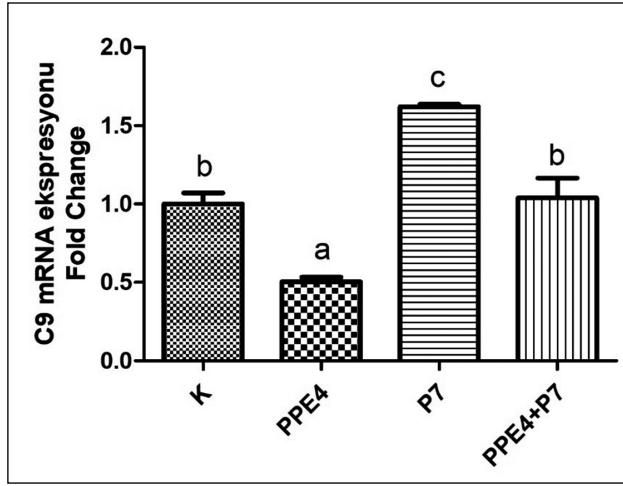
Şekil 6'ya göre PPE tek başına toplam antioksidan kapasiteyi kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde artırmıştır ( $p < 0,05$ ). Paklitaksel uygulaması ise kontrol grubuna göre anlamlı şekilde antioksidan kapasiteyi azaltmıştır ( $p < 0,05$ ). PPE, paklitakसेle bağlı gelişen azalmış antioksidan kapasiteyi düzelterek hücre toksitesini önemli ölçüde önlemiştir ( $p < 0,05$ ).

#### TNF- $\alpha$ mRNA ekspresyon düzeyleri

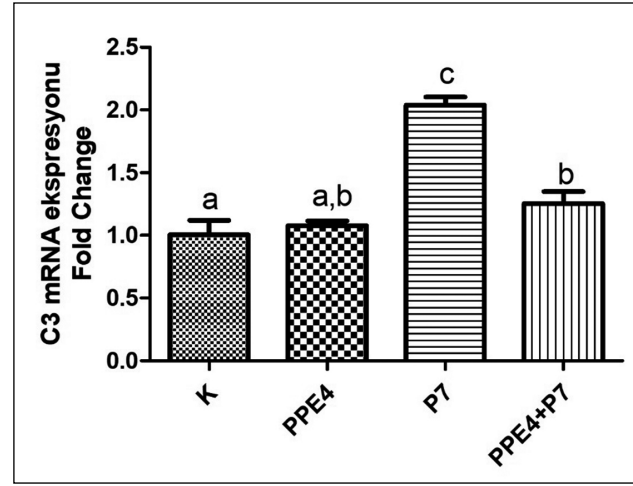
Paklitakसेle bağlı gelişen hasarın mekanizmasında inflamasyonun rolünü gösterebilmek için TNF- $\alpha$  seviyeleri ölçüldü (Şekil 7). PPE uygulaması tek başına kontrol grubuna göre herhangi bir etki ortaya koymamıştır ( $p > 0,05$ ). Ancak paklitaksel uygulaması TNF- $\alpha$  mRNA ekspresyonunu anlamlı şekilde artırmıştır ( $p < 0,05$ ). Bu durum paklitakselin oksidatif stres ile birlikte inflamasyonda artırdığını göstermektedir. PPE ise paklitakसेle bağlı gelişen inflamasyonu önemli ölçüde azaltarak anti-inflamatuar etki ortaya koymuş ve nöron hasarını önlemiştir ( $p < 0,05$ ).

#### Apoptotik etkinin gösterilmesi

**Caspase 9 mRNA ekspresyon düzeyleri:** Paklitaksel kanser hücrelerinde azalmış olan apoptozisi artırarak kanser hücreleri ile savaşmaktadır. Ancak sağlıklı hücreler üzerinde de bu etkisi ile ciddi etkiler ortaya çıkmaktadır. Çalışmamızda paklitaksel



**Şekil 8.** Paklitaksel ile indüklenen nörotoksistide PPE uygulamasının apoptotik protein olan caspase 9 mRNA ekspresyonu üzerindeki etkilerinin gösterilmesi ( $p < 0,05$  anlamlı) Kabul edilmiştir. Sütunlardaki harfler birbirinden farklı ise istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir farklılık var demektir. PPE4:400 mg/ml, P7:  $10^{-7}$  M).



**Şekil 9.** Paklitaksel ile indüklenen nörotoksistide PPE uygulamasının apoptotik protein olan caspase 3 mRNA ekspresyonu üzerindeki etkilerinin gösterilmesi ( $p < 0,05$  anlamlı) Kabul edilmiştir. Sütunlardaki harfler birbirinden farklı ise istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir farklılık var demektir. PPE4:400 mg/ml, P7:  $10^{-7}$  M).

uygulaması caspase 9 ve caspase 3 mRNA ekspresyonlarını primer nöron hücrelerinde anlamlı şekilde artırmıştır ( $p < 0,05$ ). Bu durum oksidatif stress ve inflamasyon ile birlikte hücrelerin apoptoza uğradığı ve bu şekilde ciddi toksik etki ortaya koyabileceğini göstermektedir (Şekil 8 ve 9). Tek başına PPE uygulaması caspase 9 mRNA ekspresyonunu baskımlarken caspase 3 mRNA ekspresyonu üzerinde herhangi bir etki ortaya koymamıştır. Ancak, PPE uygulamasından sonra paklitaksel verildiğinde PPE, paklitakselin yapmış olduğu apoptotik proteinlerin gen düzeyindeki ekspresyon artışlarını önlemiş ve hücre canlılığını korumuştur.

## Tartışma

Çalışmamızda güçlü antioksidan ve antikanser etkinliği olan nar kabuğu ekstresinin sıçanlarda paklitaksel ile indüklenen primer nöron hasarındaki koruyucu rollerini biyokimyasal ve moleküler olarak gösterdik.

Son zamanlarda kanser kemoterapisindeki yaygınlığı artan paklitaksel aynı zamanda pek çok kemoterapötik ajan ile de birlikte kullanılabilir. Ancak son zamanlarda kanser hastalarının tedavi sonrasında ilaca bağlı gelişen toksisite riskinin artması kemoterapötik ilaçlara destekleyici alternatif yaklaşımların artmasına yol açmıştır. Paklitakselin pek çok yan etkisi olmasına rağmen konumuzla ilgili olarak nörotoksisteye yol açması yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir.

Çalışmalar paklitakselin doza ve zaman bağlı olarak nörotoksisteye yol açabileceğini göstermektedir<sup>4,5</sup>. Paklitaksel maruziyeti sonrasında da aksonlar şişerek<sup>18</sup> parçalanır ve nöron ölümü gerçekleşir<sup>6,19,20</sup>. Aynı zamanda paklitakselin akson uzunluğunu azalttığı ve doğrudan çevresel faktörleri uyararak aksonal dejenerasyona yol açtığı önceki çalışmalarda gösterilmiştir<sup>20</sup>. Ancak hasarın mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

Yapılan çalışmalarda toksisitenin önemli göstergelerinden birisi hücre canlılığı testidir. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) hücre canlılığı için yaygın olarak kullanılan önemli yöntemlerden birisidir. Canlı hücrelerde mitokondride yer alan süksinat-dehidrogenaz enzimi tetrazolyum halkasını parçalayarak çözünmeyen formazan tuzları oluşturur. Hücreler çoğaldıkça formazon tuzu oluşumuna bağlı olarak absorban değeri de artar<sup>21,22</sup>.

Önceki yapılan çalışmalarda paklitakselin sitotoksik etkisine bağlı olarak primer nöron canlılığını azalttığı gösterilmiştir<sup>7,23</sup>. Çalışmamızda da paklitaksel uygulaması doza bağlı olarak primer nöron hücrelerinin canlılığını önemli ölçüde azaltmıştır. PPE'nin ise tek başına verildiği zaman tüm dozlarda herhangi bir toksik etki oluşturmadığı görülmüştür. Hatta sayısal olarak hücre proliferasyonunu artırmıştır. PPE, paklitaksele bağlı gelişen primer nöron hasarını önemli ölçüde önleyerek

hücre canlılığını korumuştur. Daha önceki yapılan çalışmalarda nar kabuğu ekstresi kullanımının pek çok farklı modelde oluşturulan toksisiteyi önlediği gösterilmiştir<sup>24,25</sup>. PPE genel olarak bu etkilerini antioksidan ve antiinflamatuvar etkinliği ile ortaya koymuştur.

Bizde çalışmamızda paklitakselin primer nöron üzerindeki toksik etkisinin ve PPE'nin ise göstermiş olduğu bu protektif etkinin hangi mekanizmalar üzerinden olduğunu anlamak için biyokimyasal ve moleküler analizler ile bulgularımızı destekledik.

Paklitakselin nörotoksositeye yol açan en önemli etkilerinden birisi oksidatif stresin artması ve antioksidan sistemin ise azalmasıdır<sup>7,26-27</sup>. Oksidatif strese bağlı olarak artmış serbest radikaller membran hasarına yol açarak hücrelerin ölümüne neden olmaktadır. Vücudumuzda ise serbest radikallerin bu zararlı etkilerinden korunmak için anti-oksidan savunma sistemleri bulunmaktadır. Eğer antioksidan savunma sistemi azalır ise oksidatif stresin vereceği hasar daha da şiddetlenir. Bu yüzden antioksidan etkinliğe sahip olan maddelerin oksidatif strese bağlı gelişebilecek hasarı önlediği düşünülmektedir<sup>28,29</sup>. Yapılan çalışmalarda oksidatif stres ve antioksidan sistemin göstergesi olarak pek çok yöntem kullanılmaktadır. Bunlardan özellikle doğrudan toplam oksidan ve antioksidan düzeyi belirlememize yardımcı olan TAK ve TOD ölçümleri literatürde yaygın olarak kullanılmaktadır<sup>30-32</sup>. Paklitakselle indüklenen nörotoksitede TOD seviyesinin arttığı, TAK seviyesinin ise azaldığı önceki çalışmalarda gösterilmiştir<sup>7</sup>. Çalışmamızda tek başına PPE uygulaması toplam oksidan düzeyi etkilemezken, toplam antioksidan kapasiteyi kontrol grubuna göre artırmıştır. Ancak paklitaksel uygulaması oksidan düzeyi artırırken, antioksidan düzeyi de anlamlı şekilde azaltmıştır. PPE 400+paklitaksel grubunda ise PPE, paklitakselin etkisini önleyerek oksidatif stresin azalmasını sağlamış ve nöron hasarını korumuştur.

Çalışmamızda ikincil olarak hasarın önemli bir göstergesi olan inflamasyonun varlığı gösterilmiştir. Bilindiği üzere ilaca bağlı gelişen toksisitelere oksidatif strese inflamasyonda eşlik etmekte ve hasarın şiddeti artmaktadır. Membrana yerleşmiş bir sitokin olan TNF- $\alpha$  vücudumuzda hem proinflamatuvar etkileri ile hem de ekstrinsik apoptotik etkisi ile bilinmektedir<sup>33</sup>. Artmış olan TNF- $\alpha$  makrofajlar ve monositler ile birlikte inflamatuvar süreci başlatarak gelişen hasarın şiddetlenmesine yol açmaktadır. Aynı zamanda hücre yüzeyindeki TNF- $\alpha$  reseptör 1 (TNFR1) veya 2 (TNFR2)'ye bağlanarak apoptozisin başlamasına yol

açmaktadır<sup>34,35</sup>. Yapılan nörotoksosite çalışmalarında paklitakselin proinflamatuvar bir sitokin olan TNF- $\alpha$  üretimini artırdığını göstermektedir<sup>36-38</sup>. Bu durum paklitakselin hem inflamasyona yol açtığı hem de nöron hücrelerinin apoptozisine yol açabileceğini göstermektedir. Çalışmamızda da paklitaksel uygulaması kontrol grubuna göre anlamlı şekilde TNF- $\alpha$  ekspresyonunu indüklerken PPE uygulaması bu etkiyi önemli ölçüde düzeltmiştir. PPE'nin artmış olan TNF- $\alpha$  ekspresyonunu önlemesi antioksidan etkisinin yanında önemli anti-inflamatuvar etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Nitekim yapılan çalışmalarda da PPE'nin antiinflamatuvar etkinliği desteklenmektedir<sup>39,40</sup>. Bu yüzden PPE'nin pek çok faydalı etkiler ortaya koyduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda son olarak paklitakselin indüklediği nörotoksitede apoptozis mekanizmasının rolünü ortaya koyduk. Paklitaksel bilindiği üzere mikrotübülleri stabilize ederek hücrenin bölünmesini durdurur ve en sonunda hücre apoptozise uğrar<sup>41</sup>. Paklitakselin bu etkisi kanser hücrelerinde seçici olamadığı için sağlıklı hücrelerimizi de etkilemektedir. Paklitaksel apoptozisin hem intrinsik hemde ekstrinsik yollarını aktive ederek apoptozisi indüklemektedir. Ekstrinsik yolağı da özellikle TNF- $\alpha$ 'yı indükleyerek göstermektedir. Hücrelerde apoptozisin pek çok farklı belirteçleri bulunmaktadır. Bunlardan hem intrinsik hemde ekstrinsik mekanizmanın sorumlusu caspase proteinleridir<sup>42</sup>. Paklitakselin yapılan çalışmalarda nöronlarda caspase proteinlerini indükleyerek nöron hasarına yol açabileceği gösterilmiştir<sup>43,44</sup>. Literatüre paralel bir şekilde çalışmamızda da paklitakselin kontrol grubuna göre hem caspase 3 hem de caspase 9 ekspresyonunu artırdığı ve bu yüzden hücre ölümüne yol açtığı da gösterilmiştir. PPE'nin tek başına uygulaması ilginç bir şekilde caspase 9 ekspresyonunu baskılamıştır. Ancak caspase 3 üzerinde bir etkisi olmamıştır. Paklitaksele bağlı artmış olan caspase 9 ve 3 ekspresyonunu ise PPE uygulaması anlamlı şekilde baskılayarak hücre canlılığını korumuştur. Bu durum PPE'nin sağlıklı hücreler üzerinde önemli anti-apoptotik etkilerinin olabileceğinin göstermektedir. Liu ve ark.<sup>45</sup> yaptığı çalışmada PPE, amikasin ile indüklenen ototoksitede caspase proteinlerini anlamlı şekilde baskılayarak anti-apoptotik etki göstermiş ve organ hasarını önlemiştir.

Tüm bu bilgilerden yola çıkarak paklitakselin pek çok farklı mekanizma ile nörotoksositeye yol açtığı görülmektedir. PPE ise göstermiş olduğu güçlü antioksidan, anti-inflamatuvar ve anti-apoptotik etkisi ile

paclitakselin neden olduğu nörotoksisiteyi önlemiştir. Bu çalışmamız nar kabuğunun sağlık alanındaki fizyolojik önemini artırmış olup ileri klinik çalışmalar ile desteklenmesi sonucuna varılmıştır.

## Kaynaklar

- Schwab CL, English DP, Roque DM, Santin AD. Taxanes: their impact on gynecologic malignancy. *Anticancer Drugs* 2014;25:522-5.
- Bachegowda LS, Makower DF, Sparano JA. Taxanes: impact on breast cancer therapy. *Anticancer Drugs* 2014;25:512-1.
- Joshi M, Liu X, Belani CP. Taxanes, past, present, and future impact on non-small cell lung cancer. *Anticancer Drugs* 2014;25:571-3.
- Letourneau P, Ressler A. Inhibition of neurite initiation and growth by taxol. *J. Cell Biol* 1984;98:1355-2.
- Scuteri A, Nicolini G, Miloso M, Bossi M, Cavaletti G, Windebank A, et al. Paclitaxel toxicity in post-mitotic dorsal root ganglion (DRG) cells. *Anticancer Res* 2006;26:1065-70.
- Yang I, Siddique R, Hosmane S, Thakor N, Höke A. Compartmentalized microfluidic culture platform to study mechanism of paclitaxel-induced axonal degeneration. *Exp Neurol* 2009;218:124-8.
- Cetin D, Hacimuftuoglu A, Tatar A, Turkez H, Togar B. The in vitro protective effect of salicylic acid against paclitaxel and cisplatin-induced neurotoxicity. *Cytotechnology* 2016;68:1361-7.
- Ramezani F, Samadi N, Mostafavi-Pour Z. Sequential therapy of breast cancer cell lines with vitamin C and quercetin improves the efficacy of chemotherapeutic drugs. *Nutr Cancer* 2017;69:881-91.
- Syed DN, Afaq F, Mukhtar H. Pomagranate derived products for cancer chemoprevention. *Semi. Cancer Biol* 2007;17:377-85.
- Borochoy NH, Judeinstein S, Tripler E, Harari M, Greenberg A, Shomer I, et al. Seasonal and cultivar variations in antioxidant and sensory quality of pomagranate (*Punica granatum L.*)fruit. *J Food Compos Anal* 2009;22:189-95.
- Chandra R, Jadhav VT, Shrama J. Global scenario of pomagranate (*Punica granatum L.*)culture with special reference to India. *Fruit Veg Cereal Sci* 2010;4:17-8.
- Gil MI, Tomas-Barberan FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem* 2000;48:4581-9.
- Xu J, Guo CJ, Yang JJ, Wei JY, Li YF, Pang W, et al. Intervention of antioxidant system function of aged rats by giving fruit juices with different antioxidant capacities. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 2005;39:80-3.
- Singh B, Singh JP, Kaur A, Singh N. Phenolic compounds as beneficial phytochemicals in pomegranate (*Punica granatum L.*)peel: A review. *Food Chem* 2018;261:75-6.
- Bagheri M, Fazli M, Saeednia S, Kor A, Ahmadiankia N. Pomegranate peel extract inhibits expression of  $\beta$ -catenin, epithelial mesenchymal transition, and metastasis in triple negative breast cancer cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*2018;64:86-91.
- Chen XX, Lam KK, Feng YB, Xu K, Sze SC, Tang SC, et al. Ellagitannins from Pomegranate Ameliorates 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Mucositis in Rats while Enhancing Its Chemotoxicity against HT-29 Colorectal Cancer Cells through Intrinsic Apoptosis Induction. *J Agric Food Chem* 2018;66:7054-64.
- Cadirci E, Halici Z, Yayla M, Toktay E, Bayir Y, Karakus E, et al. Blocking of urotensin receptors as new target for treatment of carrageenan induced inflammation in rats. *Peptides* 2016;82:35-43.
- Shemesh O, Spira M. Paclitaxel induces axonal microtubules polar reconfiguration and impaired organelle transport: implications for the pathogenesis of paclitaxel-induced polyneuropathy. *Acta. Neuropathol* 2010;119:235-48.
- Malgrange B, Delree P, Rigo JM, Baron H, Moonen G. Image analysis of neuritic regeneration by adult rat dorsal root ganglion neurons in culture: quantification of the neurotoxicity of anticancer agents and of its prevention by nerve growth factor or basic fibroblast growth factor but not brain-derived neurotrophic factor or neurotrophin-3. *J Neurosci Methods* 1994;53:111-22.
- Wang M, Davis A, Culver D, Glass J. WldS mice are resistant to paclitaxel (taxol) neuropathy. *Ann Neurol* 2002;52:442-7.
- Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett* 2006;160:171-7.
- Van de Loosdrecht AA, Beelen RH, Ossenkoppele GJ, Broekhoven MG, Langenhuijsen MM. A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. *J Immunol Methods* 1994;174:31-20.
- Duggett NA, Griffiths LA, McKenna OE, de Santis V, Yongsanguanchai N, Mokori EB, Flatters SJ. Oxidative stress in the development, maintenance and resolution of paclitaxel-induced painful neuropathy. *Neuroscience* 2016;333:13-26.
- Liu S, Zhang X, Sun M, Xu T, Wang A. FoxO3a plays a key role in the protective effects of pomegranate peel extract against amikacin-induced ototoxicity. *Int J Mol Med* 2017;40:175-81.
- Wang T, Men R, Hu M, Fan X, Yang X, Huang X, et al. Protective effects of *Punica granatum* (pomegranate) peel extract on concanavalin A-induced autoimmune hepatitis in mice. *Biomed Pharmacother* 2018;100:213-20.
- Hara Y, Sakagami H, Shi H, Abe T, Tamura N, Takeshima H, et al. Partial Protection of Paclitaxel-induced Neurotoxicity by Antioxidants. *In Vivo* 2018;32:745-52.
- Kim HK, Zhang YP, Gwak YS, Abdi S. Phenyl N-tert-butyl nitron, a free radical scavenger, reduces mechanical allodynia in chemotherapy-induced neuropathic pain in rats. *Anesthesiology* 2010;112:432-9.

28. Doyle T, Chen Z, Muscoli C, Bryant L, Esposito E, Cuzzocrea S, et al. Targeting the overproduction of peroxynitrite for the prevention and reversal of paclitaxel-induced neuropathic pain. *J Neurosci* 2012;32:6149–60.
29. Motor S, Ozturk S, Ozcan O, Gurpinar AB, Can Y, Yüksel R, et al. Evaluation of total antioxidant status, total oxidant status and oxidative stress index in patients with alopecia areata. *Int J Clin Exp Med* 2014;7:1089–93.
30. Aslan R, Kutlu R, Civi S, Tasyurek E. The correlation of the total antioxidant status (TAS), total oxidant status (TOS) and paraoxonase activity (PON1) with smoking Author links open overlay panel. *Clin Biochem* 2014;47:393–7.
31. Abundan M, Çelik M, Almaz V, Geter S, Selek S, Koca B, et al. Evaluation of S-100B and Oxidative Status before and after Treatment in Children with Bacterial Meningitis. *Klin Derg* 2012;25:67–70.
32. Meloni F. Tumor necrosis factor  $\alpha$ . Biological aspects. *Gior Itali di Chemi* 1989;36:29–37 40.
33. MacEwan DJ. TNF ligands and receptors - a matter of life and death. *Brit J Pharm* 2002;135 855–5.
34. MacEwan DJ. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Sig* 2002;14:477–92.
35. Bogdan C, Ding A. Taxol, a microtubule-stabilizing antineoplastic agent, induces expression of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 in macrophages. *J Leuk Biol* 1992;52:119–21.
36. Wood SC, Tang X, Tesfamariam B. Paclitaxel potentiates inflammatory cytokine-induced prothrombotic molecules in endothelial cells. *J Card Pharma* 2010;55:276–85.
37. Wu Z, Wang S, Wu I, Mata M, Fink DJ. Activation of TLR-4 to produce tumour necrosis factor- $\alpha$  in neuropathic pain caused by paclitaxel. *Eur J Pain* 2015;19:889–98.
38. Zhu Y, Yao Z, Wu Z, Mei Y, Wu M. Role of tumor necrosis factor alpha-induced protein 1 in paclitaxel resistance. *Oncogene* 2014;33:3246–55.
39. Soojin P, Jin KS, Jun Yup K, Hwa-Jin S, YoungMi K, Yong CB. Anti-Inflammatory Effects of Pomegranate Peel Extract in THP-1 Cells Exposed to Particulate Matter PM10. *Evid Based Complement Alternat Med* 2016;16:683–0.
40. Maressa CM, Joicelem MS, Milena T, Danilo M, Patricia B, Hudson SB, et al. Neuroprotective Effects of Pomegranate Peel Extract after Chronic Infusion with Amyloid- $\beta$  Peptide in Mice. *PLoS One* 2016;9:11.
41. Jordan M, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 2004;4:53–65.
42. Christian W, Spencer G, Gary LJ. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals. *J Biol Chem* 1998;273:7141–7.
43. Hitoshi T, Daisuke K, Tsubasa O, Masatoshi T, Takashi K. Paclitaxel induces neurotoxicity through endoplasmic reticulum stress. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;437:151–5.
44. Giorgia M, Michela T, Francesca C, Angelo Q, Franco T, Giuseppe L. Alpha-lipoic acid prevents mitochondrial damage and neurotoxicity in experimental chemotherapy neuropathy. *Exp Neurol* 2008;214:276–84.
45. Shuangyue L, Xiao Z, Meiling S, Tao X, Aimei W. FoxO3a plays a key role in the protective effects of pomegranate peel extract against amikacin-induced ototoxicity. *Int J Mol Med* 2017;40:175–81.



# Diyabetik Maküla Ödeminde Unilateral ve Bilateral Uygulanan İntravitreal Ranibizumab Tedavisinin Anatomik ve Görsel Sonuçları

*Anatomical and Visual Outcomes of Unilateral and Bilateral Intravitreal Ranibizumab Treatment Applied in Diabetic Macular Edema*

Erdinç Bozkurt<sup>1</sup>, Osman Öndaş<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Kars; <sup>2</sup>Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Erzurum; Türkiye

## ABSTRACT

**Aim:** Comparison of anatomical and visual results of unilateral and bilateral intravitreal ranibizumab treatment in patients with diabetic macular edema.

**Material and Method:** The files of patients with diabetic macular edema (DME) who underwent intravitreal ranibizumab (IVR) for a total of 3 times between April 2012 and May 2017 were reviewed retrospectively at Atatürk University Ophthalmology Department. Age, gender, duration of diabetes, duration between complaints and first ranibizumab treatment, other treatments, follow-up period, intraocular pressure, best corrected visual acuity (BCVA) were recorded. The paired-t test was used for statistical analysis,  $p < 0.05$  was considered significant.

**Results:** 120 eyes of 80 patients with DME, whose 43 were males, 37 were females and 59–82 years old were included. 40 patients were treated unilaterally because of DME and 40 patients were treated bilaterally due to DME. Mean BCVA was  $0.19 \pm 0.23$  (Snellen) in unilateral cases,  $0.21 \pm 1.35$  in the right eye,  $0.29 \pm 0.76$  in the left eye in bilateral case ( $p > 0.05$ ) at the time of admission, in the 6th month, the mean values were  $0.42 \pm 0.32$ ,  $0.53 \pm 2.59$ ,  $0.49 \pm 1.92$  ( $p > 0.05$ ), respectively. Mean central foveolar thickness (CFT) was  $458.1 \pm 177.6 \mu\text{m}$  in unilateral cases,  $412.5 \pm 233.8 \mu\text{m}$  in right eye and  $463.2 \pm 721.9 \mu\text{m}$  in left eye ( $p > 0.05$ ) in bilateral cases. After treatment, at the 6th month, respectively; mean CFT was  $301.3 \pm 129.6 \mu\text{m}$ ,  $297.3 \pm 316 \mu\text{m}$ ,  $280.1 \pm 317.3 \mu\text{m}$  ( $p > 0.05$ ).

**Conclusion:** We didn't determine any significant change in CFT and BCVA in the other eyes of the patients applied unilateral IVR. When comparing unilateral IVR with bilateral IVR, we conclude that there isn't statistically significant difference in terms of changes in BCVA and CFT and there isn't synergistic effect of bilateral IVR administration.

**Key words:** diabetic macular edema; visual acuity; intravitreal ranibizumab; central macular thickness

Erdinç Bozkurt, Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Kliniği, Kars, Tel. 0506 615 77 88 Email. dverdinbozkurt@hotmail.com  
Geliş Tarihi: 22.10.2018 • Kabul Tarihi: 01.12.2018

## ÖZET

**Amaç:** Diyabetik makula ödemi olan hastalarda unilateral ve bilateral uygulanan intravitreal ranibizumab tedavisinin anatomik ve görsel sonuçlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

**Materyal ve Metot:** Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Kliniği'nde Nisan 2012-Mayıs 2017 tarihleri arasında diyabetik makula ödemi (DMÖ) olan ve birer ay ara ile toplam 3 kez intravitreal ranibizumab (İVR) enjeksiyonu uygulanan hastaların dosyaları retrospektif olarak incelendi. Yaş, cinsiyet, diyabetin süresi, şikayetler ile ilk ranibizumab tedavisi arasındaki süre, uygulanan diğer tedaviler, takip süresi, göz içi basıncı, görme keskinliği (EDGK) kaydedildi. İstatistiksel analizlerde paired-t testi kullanıldı,  $p < 0,05$  olması anlamlı kabul edildi.

**Bulgular:** Çalışmaya; DMÖ olan 43'ü erkek, 37'si kadın, yaşları 59–82 olan, 80 hastanın 120 gözü dahil edildi. 40 hasta unilateral, 40 hasta bilateral DMÖ nedeniyle tedavi edildi. İlk kez tedavi gören hastalara birer ay ara ile toplam 3 kez İVR enjeksiyonu uygulandı. Ortalama diyabet süresi unilateral olgularda 10,6 yıl, bilateral olgularda 11,2 yıl idi. Şikayetler ile ilk ranibizumab tedavisi arasındaki süre, unilateral olgularda 21 gün, bilateral olgularda 18 gün idi. Takip süresi unilateral olgularda ortalama 6,3 ay, bilateral olgularda 6,7 ay idi. Başvuru anında ortalama EDGK unilateral olgularda  $0,19 \pm 0,23$  (Snellen), bilateral olgularda sağ gözlerde  $0,21 \pm 1,35$ , sol gözlerde  $0,29 \pm 0,76$  ( $p > 0,05$ ), 6. ayda ise sırasıyla  $0,42 \pm 0,32$ ,  $0,53 \pm 2,59$ ,  $0,49 \pm 1,92$  ( $p > 0,05$ ) idi. OCT incelemesinde; başvuru anında ortalama santral foveolar kalınlığı (SFK) unilateral olgularda  $458,1 \pm 177,6 \mu\text{m}$ , bilateral olgularda sağ gözlerde  $412,5 \pm 233,8 \mu\text{m}$ , sol gözlerde  $463,2 \pm 721,9 \mu\text{m}$  ( $p > 0,05$ ), tedavi sonrası 6. ayda ise sırasıyla;  $301,3 \pm 129,6 \mu\text{m}$ ,  $297,3 \pm 316$ ,  $280,1 \pm 317,3 \mu\text{m}$  ( $p > 0,05$ ) idi.

**Sonuç:** Unilateral İVR uygulanan hastaların diğer gözlerinde SFK'ında ve görme düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptamadık. Bilateral ve unilateral İVR uygulamaları kıyaslandığında, EDGK ve SFK'ındaki değişim açısından istatistiksel olarak anlamlı farkın olmadığı ve bilateral İVR uygulamasının sinerjistik etkisinin olmadığı kanaatindeyiz.

**Anahtar kelimeler:** diyabetik makula ödemi; görme keskinliği; intravitreal ranibizumab; santral foveolar kalınlık

## Giriş

Diyabetik makula ödemi görme kaybının en yaygın sebeplerinden biridir. Mikroanevrizmalardan direkt sızıntı ya da iç retina tabakalarındaki hipoksinin vasküler endotelial büyüme faktör (VEBF), interlökin 1-6 gibi vasküler geçirgenliği artıran faktörlerin salınımına neden olmasıyla ortaya çıkan klinik bir tablodur. Eğer hipoksi uzun süre devam ederse makulada geri dönüşümsüz yapısal değişiklikler oluşmakta ve görme kaybı kalıcı bir hale gelmektedir. Tedavinin temel amacı spontan regresyon olmadığı durumlarda ödemin süresini azaltarak fotoreseptör hasarının en aza indirilmesidir<sup>1</sup>. Diyabetik retinopatinin ciddiyetine bağlı olarak makula ödemi sıklığı da artmaktadır. Hafif nonproliferatif diyabetik retinopati (NPDR)'de %3, orta/ciddi NPDR'de %38, proliferatif DRP'de %71 oranında makula ödemi bildirilmiştir<sup>2</sup>.

Diyabetik makula ödemi tedavisinde etkinliği kanıtlanmış tedaviler lazer fotokoagülasyon, intravitreal uygulanan kortikosteroidler ve anti-vasküler endotelial büyüme faktörü (anti-VEBF) ajanlarıdır<sup>3</sup>. DMÖ tedavisinde günümüzde en sık tercih edilen yöntem ise intravitreal anti VEBF uygulamasıdır<sup>4</sup>.

Bu çalışmadaki amacımız diyabetik retinopatili hastalarda bilateral uygulanan intravitreal ranibizumab (İVR) tedavisinin diğer gözdeki makula ödemi üzerine sinerjistik etkisinin olup olmadığı ve unilateral İVR uygulamalarının diğer gözdeki makulayı etkileyip etkilemediğini araştırmaktır.

## Materyal ve Metod

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Kliniği'nde Nisan 2012-Mayıs 2017 tarihleri arasında diyabetik makula ödemi (DMÖ) olan ve 1'er ay ara ile toplam 3 kez, 10 mg/ml intravitreal ranibizumab enjeksiyonu uygulanan hastaların dosyaları retrospektif olarak incelendi. Yaş, cinsiyet, diyabetin süresi, şikayetler ile ilk ranibizumab tedavisi arasındaki süre, uygulanan diğer tedaviler, takip süresi, göz içi basıncı (GİB), en iyi düzeltilmiş görme keskinliği (EDGK) kaydedildi. İlk muayenelerde ve kontrollerde ayrıntılı oftalmolojik muayene sonrasında; renkli fundus fotoğrafı, fundus floresin anjiyografi, optik koherens tomografi (OCT) (Zeiss Cirrus HD-OCT Germany) çekildi. İstatistiksel analizlerde paired-t testi, varyans (ANOVA) analizi ile, kategorik değişkenler ki-kare testi ile değerlendirilmiştir, p<0,05 olması anlamlı kabul edildi. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik

Araştırmalar Etik Kurulundan 04,10,2018 tarihinde 06/15 sayı ile onam alınmıştır. Hastaların dosyalarındaki bilgilerin bilimsel araştırma için kullanılacağı, her türlü kişisel bilgilerinin saklı kalacağına dair hastalara bu konuda bilgi verilmiştir. Bununla birlikte çalışmamız Helsinki Bildirgesi etik ilkelerine uygun bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

*Göz içi enjeksiyon uygulaması:* İntravitreal enjeksiyonlar, ameliyathanede ortamında yapılmıştır. Enjeksiyon öncesi, topikal anestezi damlatıldıktan sonra, göz kapakları ve kirpikler povidon iyodin ile temizlenerek göz örtüsü örtülmüş ve %50 sulandırılmış povidon iyodin konjonktivaya damlatılmış ve 3 dakika beklenmiştir. Daha sonra her hasta için özel açılmış göz içi enjeksiyon kitinden alınan ekartör takıldıktan sonra, steril olarak enjektöre alınan ranibizumab 30 G iğne ile vitreus içine enjekte edilmiştir. Enjektör çekildikten sonra, reflü gözlenmeyinceye kadar pamuk uçlu aplikatör ile enjeksiyon bölgesine tampon uygulanmıştır. Daha sonra ekartör çıkarılarak işlem sonlandırılmıştır.

## Bulgular

Çalışmaya; DMÖ olan 43'ü (%53,75) erkek, 37'si (%46,25) kadın, yaşları 59-82 (63,2±7,6) olan, 80 hastanın 120 gözü dahil edildi. 40 (%50) hasta unilateral, 40 (%50) hasta ise bilateral DMÖ nedeniyle tedavi edildi. Unilateral olguların 21'i (%52,5) erkek, 19'u (47,5) kadın, yaş ortalaması 61,9, bilateral olguların 22'si (%55) erkek, 18'i (%45) kadın, yaş ortalaması 63,7 idi. İlk kez tedavi gören hastalara 1'er ay ara ile toplam 3 kez İVR uygulandı. Ortalama diyabet süresi unilateral olgularda 10,6 yıl, bilateral olgularda 11,2 yıl idi. Şikayetler ile ilk ranibizumab tedavisi arasındaki süre, unilateral olgularda 21 gün, bilateral olgularda 18 gün idi. Takip süresi unilateral olgularda ortalama 6,3 ay, bilateral olgularda 6,7 ay idi (Tablo 1). Takip süresince hastalara herhangi bir ek tedavi uygulanmadı. Unilateral olgularda ortalama GİB tedavi öncesi 11,23±3,91 mmHg, tedavi sonrası 12,66±2,53 mmHg, bilateral olgularda sağ gözlerde tedavi öncesi 12,21±4,72 mmHg, tedavi sonrası 13,60±5,13 mmHg, sol gözlerde tedavi öncesi 11,41±5,63 mmHg, tedavi sonrası 12,51±2,11 mmHg idi. İVR sonrası her ne kadar göz içi basınç yükselmiş gibi görünse de bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi (p>0,05). Başvuru anında ortalama EDGK Snellen eşeline göre unilateral olgularda 0,19±0,23, bilateral olgularda sağ gözlerde 0,21±1,35, sol gözlerde 0,29±0,76 düzeyinde idi, 6.

**Tablo 1.** İVR uygulaması yapılan iki grubun demografik özellikleri ve muayene bulguları

	Unilateral İVR uygulaması	Bilateral İVR uygulaması
Hasta Sayısı	40	40
Cinsiyet	21 erkek, 19 kadın	22 erkek, 18 kadın
Yaş ortalaması (yıl)	61,9	63,7
Diyabetin Süresi (ay)	10,6	11,2
Takip Süresi (ay)	6,3	6,7
Şikayet ile ilk Ranibizumab tedavisi arasındaki süre (gün)	21	18

İVR, intravitreal ranibizumab.

**Tablo 2.** İVR uygulaması yapılan iki grubun en iyi düzeltilmiş görme keskinliği, santral foveolar kalınlık ve göz içi basınç düzeylerinin karşılaştırılması

		Unilateral İVR Uygulanan		Bilateral İVR Uygulanan		
		İVR +	İVR-	Sağ	Sol	
EDGK	Tedavi öncesi	0,19±0,23	0,48±0,27	0,21±1,35	0,29±0,76	p>0,05
	Tedavi sonrası	0,42±0,32	0,47±1,21	0,53±2,59	0,49±1,92	p>0,05
SFK (µm)	Tedavi öncesi	458,1±177,6	275,5	412,5±233,8	463,2±721,9	p>0,05
	Tedavi sonrası	301,3±129,6	271±109,4	297,3±316	280,1±317,3	p>0,05
GİB (mmHg)	Tedavi öncesi	11,23±3,91	12,55±2,64	12,21±4,72	11,41±5,63	p>0,05
	Tedavi sonrası	12,66±2,53	12,47±2,35	13,60±5,13	12,51±2,11	p>0,05

İVR+, intravitreal ranibizumab uygulanan gözler; İVR-, intravitreal ranibizumab uygulanmayan gözler; EDGK, en iyi düzeltilmiş görme keskinliği; SFK, santral foveolar kalınlık; GİB, göz içi basınç.

ayda ise sırasıyla 0,42±0,32, 0,53±2,59, 0,49±1,92 idi, istatistiksel olarak anlamlı değildi. İVR öncesi ve sonrası görme düzeyleri arasındaki artış tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı idi (p<0,05). EDGK unilateral olgularda 33 (%82,5) gözde arttı, 6 (%15) gözde değişmedi, 1 (%2,5) gözde azaldı, bilateral olgularda sağ gözlerde 35 (%87,5) gözde arttı, 4 (%10) gözde değişmedi, 1 (%2,5) gözde azaldı, sol gözlerde 36 (%90) gözde arttı, 4 (%10) gözde ise değişmedi. OCT incelemesinde; başvuru anında ortalama SFK unilateral olgularda 458,1±177,6 µm, bilateral olgularda sağ gözlerde 412,5±233,8 µm, sol gözlerde 463,2±721,9 µm (p>0,05), tedavi sonrası 6. ayda ise sırasıyla; 301,3±129,6 µm, 297,3±316, 280,1±317,3 µm (p>0,05) idi (Tablo 2). Santral makula kalınlığındaki azalma tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı görüldü.

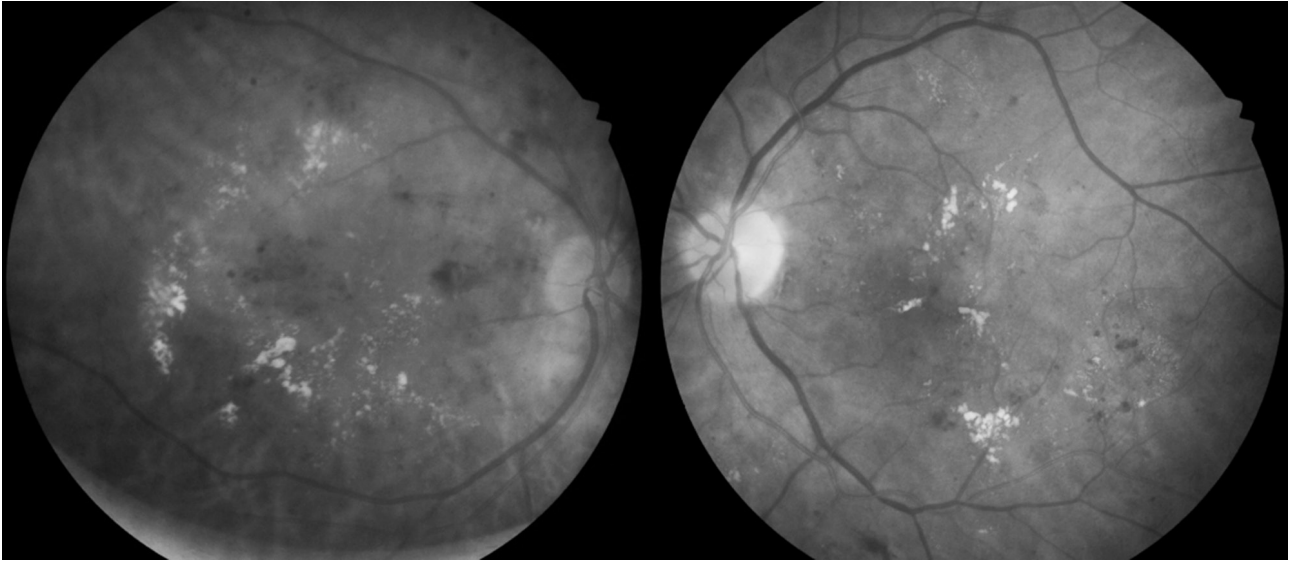
## Tartışma

Diyabetik makula ödemi (DMÖ), diyabetik retinopati (DR) hastalarda görme kaybının en önemli sebebidir<sup>5</sup>. DMÖ zamanında uygun şekilde tedavi edilmediğinde kalıcı görme kaybına neden olan ciddi bir

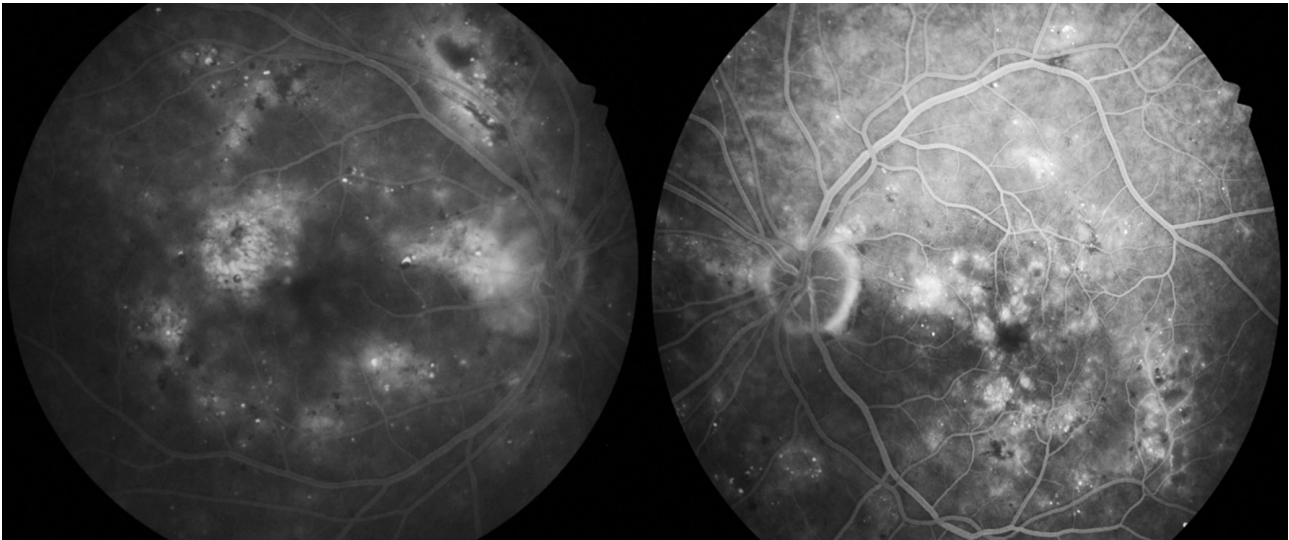
komplikasyondur. Son yıllarda yeni tedavi protokolleri sayesinde DMÖ'de ciddi görme kaybı gelişiminin azaldığı düşünülmekle birlikte, her yıl 12,000 ile 24,000 arası yeni olgu eklenmektedir<sup>6</sup>.

DMÖ tedavisinde günümüzde en sık tercih edilen yöntem ise intravitreal uygulanan vasküler endotelial büyüme faktörü inhibitörleridir<sup>4</sup>. Bu inhibitörlerden biri olan ranibizumab, monoklonal bir antikor fragmanıdır ve vitreus yarı ömrü 3,2 gün olup molekül ağırlığının düşük (48,000 D) olması sebebiyle retina katmanlarına geçebilmektedir. Faz 1 ve 2 çalışmalarda 6 ay boyunca ayda 2 mg'a kadar dozlarda verilmesi güvenilir ve etkili bulunmuştur ve VEBF-A'nın biyolojik olarak aktif tüm izoformlarına bağlanarak anjiyogenez ve damar geçirgenliğini azalttığı bilinmektedir. İnvitreal anti-VEBF enjeksiyonu, DMÖ'de standart tedavi olarak kabul edilen lazer fotokoagülasyona güçlü bir alternatiftir<sup>7-8</sup>. Literatürde DMÖ'de İVR ile ilgili birçok farklı klinik uygulamalar mevcuttur. RISE ve RIDE çalışmalarında aylık, RESOLVE çalışmasında ise ilk 3 ay aylık, daha sonra gerekli hallerde (Pro Re Nata: PRN) enjeksiyon yapılmıştır<sup>9</sup>. READ çalışmasında ise başlangıçta ve 1, 3, 5. aylarda, daha sonra





Şekil 1. Diyabetik retinopatili hastanın renkli fundus fotoğraf görüntüsü.

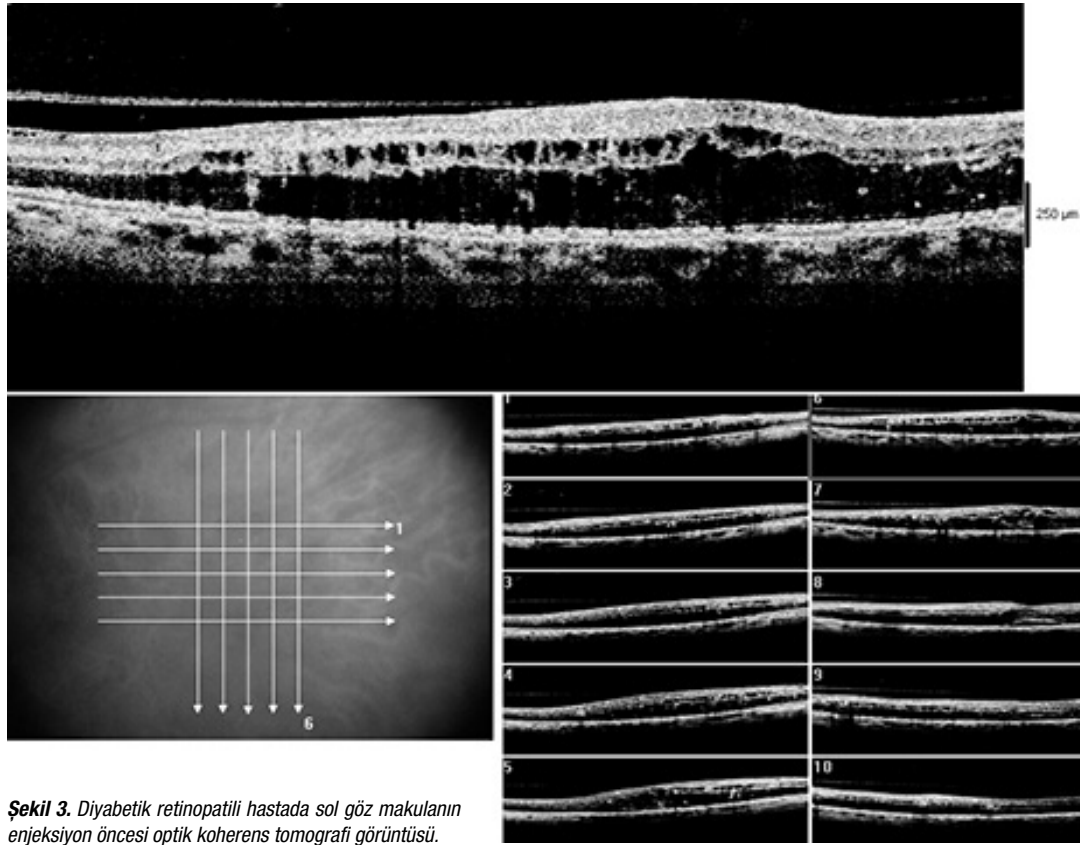


Şekil 2. Diyabetik retinopatili hastanın fundus floresein anjiografi görüntüsü.

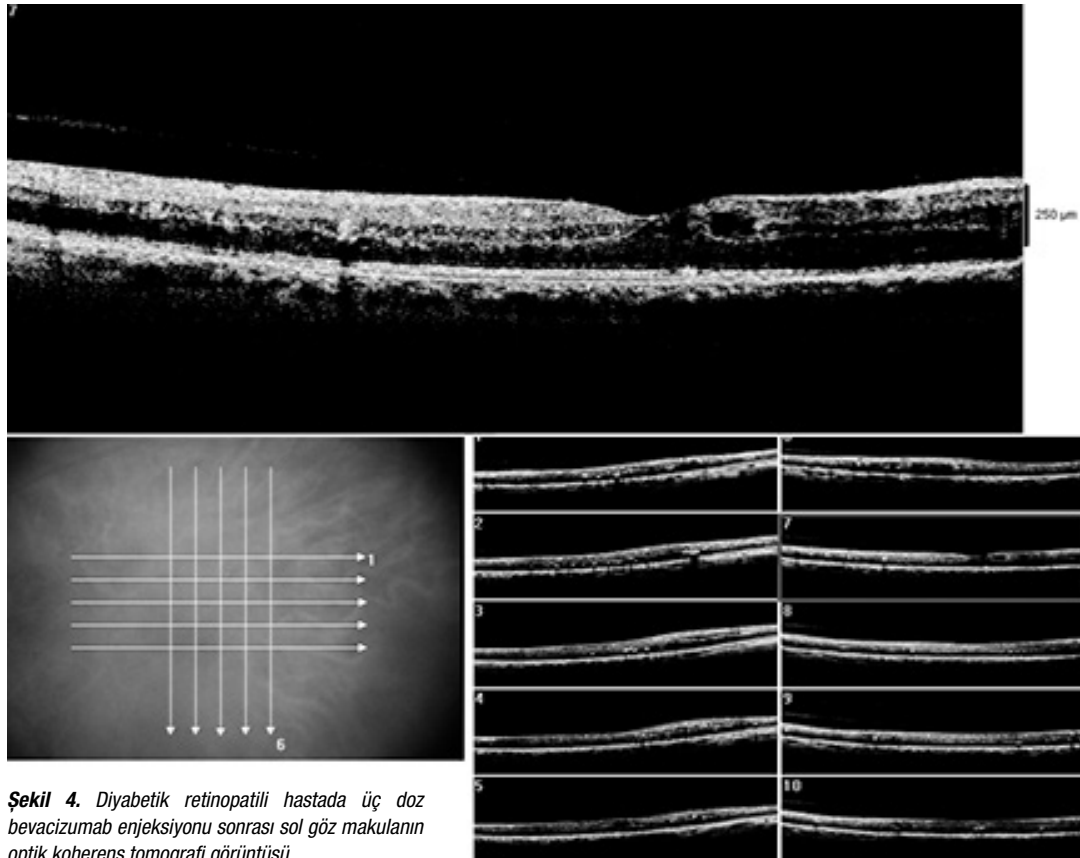
PRN enjeksiyon uygulanmıştır<sup>10</sup>. Bizim olgularımız da RESOLVE çalışma protokolüne benzer şekilde ilk 3 doz sonrası aylık kontrollerde gerekikçe tedavi edildi. Hastalara aylık izlem ve PRN tedavi protokolü düzenli olarak uygulandı.

Unilateral İVR uygulanan hastaların enjeksiyon yapılan gözlerinde EDGK 33 olguda (%82) artarken, 6 olguda (%15) değişmemiştir. İVR tedavisi uygulanmayan gözlerin %90'ında görme düzeyi değişmezken, %10'unda azalma saptanmıştır. SFK'da İVR uygulanan gözlerin

tamamında makula ödeminde azalma saptanmıştır. Bakri ve ark. yaptığı bir çalışmada İVR yapılan hastaların diğer gözlerinde görme düzeyinde artış ve makula ödeminde istatistiksel olarak önemli bir değişiklik saptanmamıştır<sup>11</sup>. Bizde çalışmamızda benzer şekilde İVR uygulanan hastaların diğer gözlerinde SFK'ında ve görme düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptamadık. Ranibizumab'ın sistemik yarılanma ömrünün 6 saatten kısa olması sebebiyle diğer göze penetrasyonu ve klinik etkisinin çok az olduğunu düşünmekteyiz.



**Şekil 3.** Diyabetik retinopatili hastada sol göz makulunun enjeksiyon öncesi optik koherens tomografi görüntüsü.



**Şekil 4.** Diyabetik retinopatili hastada üç doz bevacizumab enjeksiyonu sonrası sol göz makulunun optik koherens tomografi görüntüsü.

İVR uygulamalarının diğer göze etkisi tam olarak aydınlatılmamıştır. Fakat yapılan bazı çalışmalara göre retina ven dal tıkanıklığı sonrası diğer gözde makula kalınlığını azalttığı, posterior üveitli hastalarda İVR sonrası diğer gözlerde makula ödeminde değişiklik yaptığı tesbit edilmiştir<sup>12-13</sup>. Ranibizumab küçük moleküler yapıda olduğu için sistemik dolaşım yoluyla diğer göze geçişi diğer büyük molekül yapıdaki bevacizumab'a göre daha kolaydır. Yapılan hayvan deneyi çalışmalarında İVR sonrası serumda düşük düzeyde ranibizumab izlenmiş, fakat diğer göz humor aközde ranibizumab'a rastlanmamıştır. İntravital bevacizumab (İVB) enjeksiyonu sonrası serumda daha yüksek düzeylerde bevacizumab molekülüne rastlanmıştır. Diğer göz humor aközde de bevacizumab molekülü varlığı gösterilmiştir<sup>11</sup>. Bevacizumab'ın ranibizumaba göre sistemik dolaşımdaki VEBF düzeyini daha fazla azalttığı da gösterilmiştir. Bu durumun sebebi olarak bevacizumab molekülünün sistemik yarılanma ömrünün (20 gün) ranibizumaba göre (6 saat) daha uzun olmasına bağlanmıştır<sup>14</sup>. MARINA ve ANCHOR çalışmalarında senil makula dejenerasyonu sebebiyle İVR uygulanan hastaların diğer gözlerinde koroidal neovasküler membran gelişme insidansını azaltmadığı izlenmiştir<sup>15</sup>. Bakbak ve ark. 2013 yılında yaptığı bir çalışmada 32 diyabetik makula ödemi hastanın intravitreal ranibizumab sonrası diğer gözlerindeki santral makula kalınlığını araştırmış, fakat makula ödeminde azalma saptanmamıştır. İVB uyguladıkları 52 hastanın diğer gözlerinde ise santral makula kalınlığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir azalma izlenmiştir<sup>16</sup>. Bizde çalışmamızda Bakbak ve ark. çalışmasına benzer şekilde İVR yapılan hastaların diğer gözlerinde SFK'ında değişiklik ve EDGK düzelleme saptamadık.

Sül ve ark. 2018 yılında yaptığı bir çalışmada DMÖ sebebiyle İVR uygulamasının bilateral eşzamanlı enjeksiyonun, unilateral enjeksiyona göre ilave terapötik etkisinin olmadığını belirtmiştir<sup>17</sup>. Yaptığımız bu çalışmada bilateral ranibizumab enjeksiyonu yapılan hastaların görme düzeylerindeki artış ve makula ödemindeki azalma unilateral ranibizumab enjeksiyonu yapılan hastalardan istatistiksel olarak farklı değildi. Bu durum bilateral enjeksiyon uygulamalarının sinerjistik etkisinin olmadığını yani diğer göz makulasında ve görme düzeyinde anlamlı bir değişiklik oluşturmadığını gösteriyor.

Sonuç olarak DMÖ olan olgularda intravitreal ranibizumab uygulamasının görsel ve anatomik sonuçları

oldukça tatminkardır. Unilateral İVR uygulanan hastaların diğer gözlerinde SFK'ında ve görme düzeyinde anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Bilateral İVR uygulaması ile unilateral İVR uygulamaları kıyaslandığında, EDGK ve SFK'ındaki değişim açısından anlamlı bir farkın olmadığı ve bilateral intravitreal ranibizumab uygulamasının sinerjistik etkisinin olmadığı görüşündeyiz.

## Kaynaklar

1. Rehak J, Rehak M. Branch Retinal Vein Occlusion: Pathogenesis, Visual Prognosis, and Treatment Modalities *Current Eye Research* 2008;33:111-131.
2. Davidson J K. Clinical diabetes mellitus, diabetic eye disease. Thime Medica Publishers 1991;427-44.
3. Ayyıldız O, Durukan AH, Ozgurtas T, Gunal A. A Comparison of Intravitreal Bevacizumab and Steroid Activity in an Experimental Uveitis Model. *Curr Eye Res* 2015;40(12):1261-8.
4. SCORE Study Research Group. A randomized trial comparing the efficacy and safety of intravitreal triamcinolone with standard care to treat vision loss associated with macular edema secondary to branch retinal vein occlusion: the Standard Care vs Corticosteroid for Retinal Vein Occlusion (SCORE) Study report 6. *Arch Ophthalmol* 2009;127:1115-28 20.
5. Klein R, Klein BE, Moss SE, Cruickshanks KJ. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. XV. The long-term incidence of macular edema. *Ophthalmology* 1995;102:7-16.
6. Klein R, Knudtson MD, Lee KE, Gangnon R, Klein BE. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy XXIII. the twenty-five-year incidence of macular edema in persons with type 1 diabetes. *Ophthalmology* 2009;116:497-503.
7. Fong AH, Lai TY. Long-term effectiveness of ranibizumab for age-related macular degeneration and diabetic macular edema. *Clin Interv Aging* 2013;8:467-83.
8. Chun DW, Heier JS, Topping TM, Duker JS, Bankert JM. A Pilot Study of Multiple Intravitreal Injections of Ranibizumab in Patients with Center -Involving Clinically Significant Diabetic Macular Edema. *Ophthalmology* 2006;113:1706-1712.
9. Nguyen QD, Brown DM, Marcus DM, Boyer DS, Patel S, Feiner L et al. RISE and RIDE Research Group. Ranibizumab for diabetic macular edema: results from 2 phase III randomized trials: RISE and RIDE. *Ophthalmology* 2012;119:789-801.
10. Nguyen QD, Shah SM, Heier JS, Do DV, Lim J, Boyer D et al. READ-2 Study Group. Primary End Point (Six Months) Results of the ranibizumab for edema of the macula in diabetes (READ-2) study. *Ophthalmology* 2009;116:2175-81.
11. Bakri, S. J., Snyder, M. R., Reid, J. M., Pulido JS, Singh RJ. Pharmacokinetics of intravitreal ranibizumab (Lucentis). *Ophthalmology* 114:2179-2182, 2007.

12. Wu Z, Sadda SR. Effects on the contralateral eye after intravitreal bevacizumab and ranibizumab injections: a case report. *Ann Acad Med Singapore* 2008;37:591–593.
13. Acharya, Nisha R, Wantanee S, Ying Q, Kevin H, Salena LM OD Bilateral Effect Of Unilateral Ranibizumab In Patients With Uveitis-Related Macular EDEMA Retina: October 2011 - Volume 31 - Issue 9 - p.1871–1876.
14. Zehetner C., Kirchmair R., Huber S., Kralinger MT., Kieselbach GF. Plasma levels of vascular endothelial growth factor before and after intravitreal injection of bevacizumab, ranibizumab and pegaptanib in patients with age-related macular degeneration, and in patients with diabetic macular oedema. *Br. J. Ophthalmol* 97:454–459, 2013.
15. Barbazetto IA, Saroj N, Shapiro H, Wong P, Ho AC, Freund KB. Incidence of new choroidal neovascularization in fellow eyes of patients treated in the MARINA and ANCHOR trials. *Am J Ophthalmol* 2010;149:939–946.
16. Bakbak B, Ozturk BT, Gonul S, Yilmaz M, Gedik S. Comparison of the effect of unilateral bevacizumab and ranibizumab on diabetic macular edema of the fellow eye. *J Ocul Pharmacol Ther* 2013;29(8):728–32.
17. Sül S, Karalezli A. *Turkiye Klinikleri J Ophthalmol* 2018–60714.



# Pioglitazone Reduces Oxidative Stress in Kidney Against High Sucrose Diet-Induced Metabolic Syndrome in Rats

*Pioglitazon Sıçanlarda Yüksek Sükrozla Başlatılmış Metabolik Sendromda Böbrekteki Oksidatif Stresi Azaltır*

**Ayça Bilginoğlu**

*Department of Biophysics, Faculty of Medicine, Yıldırım Beyazıt University, Ankara, Turkey*

## ABSTRACT

**Aim:** The metabolic syndrome (MS) is an important risk factor for the development of chronic kidney disease. Thiazolidinediones (TZDs) provide renovascular protection, probably in the MS. However, reports about the effect of pioglitazone on renal oxidative stress in high sucrose diet-induced MS remains to be determined. The aim of this study was to assess the effects of pioglitazone on oxidative stress markers in kidney tissues of MS rats.

**Material and Method:** Male Wistar rats (200–250 g in weight) were used in present study. They were divided as control (Con) group, MS group (receiving 935 mM sucrose in drinking water) and pioglitazone treated MS group (MSP) received pioglitazone treatment (30 mg/kg/day, via gavage) for two weeks at the end of the 18th weeks of MS group. Aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH), total oxidant status (TOS), and total antioxidant status (TAS) levels were measured using commercial kits. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), reduced glutathione (GSH), urea, uric acid and creatinine were measured. Thioredoxin 1 (TRX1) level was measured in cytosol and membrane tissues by western blot. TRX1 activity was measured in cytosol and membrane tissues using commercial kit.

**Results:** Compared with control rats, the sucrose-fed rats exhibited several characteristics of MS, including central obesity, insulin resistance, hyperinsulinemia, and hypertriglyceridemia. Furthermore, changed levels of AST, LDH, TOS, TAS, TBARS, GSH, urea, uric acid, creatinine and TRX1 activity and protein levels in the MS group were reversed to control levels by administration of pioglitazone.

**Conclusion:** Pioglitazone reduced the elevated oxidative stress in kidney of MS rats.

**Key words:** kidney; metabolic syndrome; oxidative stress; pioglitazone

## ÖZET

**Amaç:** Metabolik sendrom (MS), kronik böbrek hastalığının ilerlemesinde önemli bir risk faktörüdür. Tiyazolidindionlar (TZDs) muhtemelen MS'de renovasküler koruma sağlar. Bununla birlikte, yüksek sükroz başlangıçlı MS'de pioglitazonun böbreğe ait oksidatif stres

üzerine etkisinin açıklanmasıyla ilgili çalışmalar devam etmektedir. Bu çalışmanın amacı pioglitazonun MS'li sıçanların böbreklerindeki oksidatif stres belirleyicileri üzerine etkisinin incelenmesidir.

**Materyal ve Metot:** Çalışmada erkek Wistar türü sıçanlar (200–250 g ağırlıkta) kullanıldı. Onlar kontrol grup, MS grup (935 mM sükroz içme sularına katılarak) ve pioglitazon uygulanmış MS grup (MSP); MS grubun 18. haftasından başlayarak 2 hafta pioglitazon (30 mg/kg/gün, gavajla) uygulandı. Aspartate amino transferaz (AST), laktat dehidrojenaz (LDH), toplam oksidan durum (TOS), toplam antioksidan durum (TAS) seviyeleri ticari kitler kullanılarak ölçüldü. Tiyobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS), indirgenmiş glutatyon (GSH), üre, ürik asit and kreatin ölçüldü. Tiyoredoksin 1 (TRX1) düzeyi sitoplazma ve hücre zarında western blot ile ölçüldü. TRX1 aktivitesi sitoplazma ve hücre zarında ticari kit kullanılarak ölçüldü.

**Bulgular:** Kontrol sıçanları ile karşılaştırıldığında, sükroz ile beslenmiş olan sıçanlar abdominal obezite, insulin direnci, hiperinsülinemi, ve hipertrigliseridemi içeren MS'nin bir çok özelliğini göstermiştir. Bunun yanında, MS'de değişmiş olan AST, LDH, TOS, TAS, TBARS, GSH, üre, ürik asit and kreatin, TRX1 aktivitesi ve protein düzeyleri pioglitazon uygulamasıyla kontrol seviyelerine dönmüştür.

**Sonuç:** Pioglitazon, MS'li sıçanların böbreklerinde artmış olan oksidatif stresi azaltmıştır.

**Anahtar kelimeler:** böbrek; metabolik sendrom; oksidatif stres; pioglitazon

## Introduction

Previous studies reported that the distribution of visceral fat is a major risk factor for cardiovascular diseases (CVD)<sup>1</sup> and chronic kidney disease (CKD)<sup>2</sup> also obesity by itself is considered an independent risk factor for the development of the CKD<sup>3,4</sup>. Furthermore, metabolic syndrome is also related with at increased risk of morbidity and mortality associated with the CVD and the development of the CKD<sup>5</sup>.

Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) is a member of the nuclear hormone receptor superfamily, members of which are ligand-activated

*Ayça Bilginoğlu, Department of Biophysics, Faculty of Medicine, Yıldırım Beyazıt University, Ankara, Türkiye  
Tel. 0312 324 15 55 / 2065 Email. draycabilginoğlu@hotmail.com  
Geliş Tarihi: 15.05.2018 • Kabul Tarihi: 12.11.2018*

transcription factors related to retinoid, steroid and thyroid hormone receptors<sup>6</sup>. In addition, selective activation of PPAR $\gamma$  with specific agonists has been shown to exert therapeutic effects on cardiovascular disease, diabetes, inflammation and tumors<sup>7-9</sup>. In the case of kidney disorders, pioglitazone, a PPAR $\gamma$  agonist, is capable of protecting the kidney from ischemia-reperfusion injury by enhancing the antioxidant capacity<sup>10</sup>.

The mechanisms of impaired renal function in obesity largely remain unclear. In addition to hemodynamic factors, inflammation and oxidative stress have been implicated<sup>11</sup>, along with the decreased antioxidant defenses, represented by lower antioxidant enzymes (e.g., SOD and catalase) in the kidney in obese individuals. Oxidative stress triggered by the overproduction of reactive oxygen species (ROS) or inefficient antioxidant systems is also involved in the development of renal injury<sup>12</sup>.

The hypothesis of this study is that pioglitazone whether affects or not on the augment effect of MS on oxidative stress in isolated kidney from sucrose-fed induced MS rat model.

## Material and Method

### *Animals and Induction of Metabolic Syndrome*

Three-months-old male Wistar Albino rats (200–250 g) were used and maintained under standardized conditions (12-hour (h) light/dark cycle,  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ , 35–60% humidity). Rats were fed with standard laboratory chow with free access to water. The animals were randomly divided into the three groups consisting of 8 rats each. Control group (Con) received standard laboratory diet and drinking water. Metabolic syndrome induced group (MS) received 32% sucrose (935 mM) including drinking water for 20 weeks<sup>13</sup>. Pioglitazone treated MS group (MSP) received pioglitazone treatment (30 mg/kg/day, via gavage) for two weeks at the end of the 18<sup>th</sup> weeks of MS group. Homeostatic model assessment (HOMA) is a method for assessing  $\beta$ -cell function and insulin resistance (IR) from basal (fasting) glucose and insulin concentrations. HOMA-IR is calculated using following formule:  $\text{HOMA-IR} = \text{fasting blood glucose (mmol/L)} \times \text{fasting insulin (mU/L)} / 22.5$ . HOMA- $\beta$  is calculated using following formule:  $\text{HOMA-}\beta = [20 \times \text{fasting insulin (mU/L)}] / [\text{fasting glucose (mmol/L)} - 3.5]$ .<sup>14,15</sup> The units used according to IU (International units of system) Insulin and triglyceride were measured using commercial kits

(Cayman). All animal procedures and experiments described in present study were approved by the Animal Ethics Committee of Ankara University Faculty of Medicine (2015–2–37).

### *Tissue Homogenization*

Kidneys were homogenized with a motor-driven teflon to glass homogenizer in cold (mM) TrisHCl 20 (pH 7.4), NaCl 150, KCl 2, EDTA 2, DTT 0.5, protease inhibitor cocktail 100, PMSF 0.4 and 2% NP-40. And then centrifugation step was done to separate the cell membrane and cytosol. Protein content of cytosol was used in biochemical assays and western blot measurement.

### *Biochemical Assays*

After homogenization of kidney tissues, protein content was analyzed using the Bradford method (Bio-Rad), and bovine serum albumin was used as the standard. Then, important enzymes such as lactate dehydrogenase (LDH) and aspartate aminotransferase (AST) were measured using commercial kits (Cusabio, Biovision; respectively). Total oxidant status (TOS) and total antioxidant status (TAS) such a marker of oxidative stress were determined using commercial kits (Rel assay diagnostics). Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were estimated in sera as described by Wasowicz et al<sup>16</sup>. Reduced glutathione (GSH) was estimated in sera by the method as described by Ellman et al<sup>17</sup>. Markers of renal function such as urea, uric acid and creatinine were measured in sera according to the method of Berthelot reagent as described by Hammes et al.<sup>18</sup>, the method of Enzyme Colorimetric as described by Agbafor et al.<sup>19</sup>, the method as described by Barham<sup>20</sup>, respectively.

### *Thioredoxin 1 (TRX1) protein level and activity*

Protein level of thioredoxin 1 (TRX1) was determined by Western blot. Shortly, equal amount of proteins (20  $\mu\text{g}$ ) from samples were loaded and separated on 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis under reducing conditions. After electrophoresis (150 V, 1.5 h), the samples were electro blotted onto a PVDF membrane (20 V, 2 h). TRX1 contents in the samples were identified using anti-TRX1 (1/1000, rabbit, Abcam) antibody. Immunoreactive protein bands were visualized using the ECL plus detection system. TRX1 activity was measured using commercial kit (Elabscience).

All parameters were expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (S. E. M.). Statistical analyses were performed using one-way analysis of variance followed by Bonferroni post-hoc analysis. The p values less than 0.01 were considered to be statistically significant.

## Results

MS animals had significantly ( $p < 0.001$ ) high glucose levels compared with control animals at the end of the 20 weeks of experimental period (Table 1). During this period, also they gain weight compared with Con group. They also showed that both the serum insulin level and triglyceride content increased significantly ( $p < 0.001$ ) compared with the Con group. HOMA (homeostasis model of assessment) index, the other marker of MS, for measuring insulin resistance increased 190% compared with the Con group. There was a decrease of body weight in MSP group compared with MS group. Pioglitazone treatment decreased significantly the elevated blood glucose level of MS group. The serum insulin level of MSP group significantly increased ( $p < 0.001$ ) compared with Con group but it decreased significantly compared with MS group. Triglyceride content of MSP group increased compared with Con group but it decreased (not significantly) compared with MS group (Table 1).

Table 2 showed that the levels of urea, uric acid and creatinine significantly increased ( $p < 0.01$ ) in MS group as compared to the Con group. Pioglitazone administration significantly reduced ( $p < 0.01$ ) these levels as compared to the MSP group. The activities of AST were significantly increased ( $p < 0.01$ ) in MS as compared to the Con group. MSP group showed increases (not significantly) in AST levels as compared with the Con group, but the activities of AST were decreased (not significantly) as compared to the MS. The activities of LDH were significantly increased ( $p < 0.01$ ) in MS as compared to the Con group. Pioglitazone treatment decreased (not significantly) the activities of LDH in kidney as compared to the MS rat.

Figure 1a represents TBARS as a graph in tissues of kidney. TBARS in MS group increased ( $p < 0.01$ ) as compared to the Con group. Pioglitazone treatment significantly reduced ( $p < 0.01$ ) the activities of TBARS in kidney as compared to the MS group. GSH level was shown as a graph in Figure 1b. GSH level decreased ( $p < 0.01$ ) in MS group as compared to the Con group. Treatment of pioglitazone significantly increased ( $p < 0.01$ ) GSH level in MS group. The activities of TOS in MS and MSP group in kidney tissues showed in Figure 2a. TOS level was significantly increased ( $p < 0.01$ ) in MS as compared to the Con

**Table 1.** General characteristics of animals

	Body Weight (g)	Blood Glucose (mg/dL)	Insulin (ng/ml)	Triglyceride (mg/dL)	HOMA-IR	HOMA- $\beta$
Con (n=8)	347.11 $\pm$ 17.31	143.13 $\pm$ 11.21	1.51 $\pm$ 0.12	31.02 $\pm$ 1.01	9.31 $\pm$ 1.32	0.55 $\pm$ 0.07
MS (n=8)	449.32 $\pm$ 8.11*	359.02 $\pm$ 41.13*	3.12 $\pm$ 0.21*	42.01 $\pm$ 3.02*	25.23 $\pm$ 2.12*	0.43 $\pm$ 0.05
MSP (n=8)	395.23 $\pm$ 19.12* <sup>#</sup>	211.22 $\pm$ 45.11*	2.23 $\pm$ 0.12* <sup>#</sup>	40.01 $\pm$ 1.02*	16.91 $\pm$ 1.32*	0.45 $\pm$ 0.04

All parameters were expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (S. E. M.).

Con, control; MS, metabolic syndrome; MSP, pioglitazone treated metabolic syndrome group; n, number of rats.

\* $p < 0.01$  versus Con.

<sup>#</sup> $p < 0.01$  versus MS.

**Table 2.** Biochemical parameters

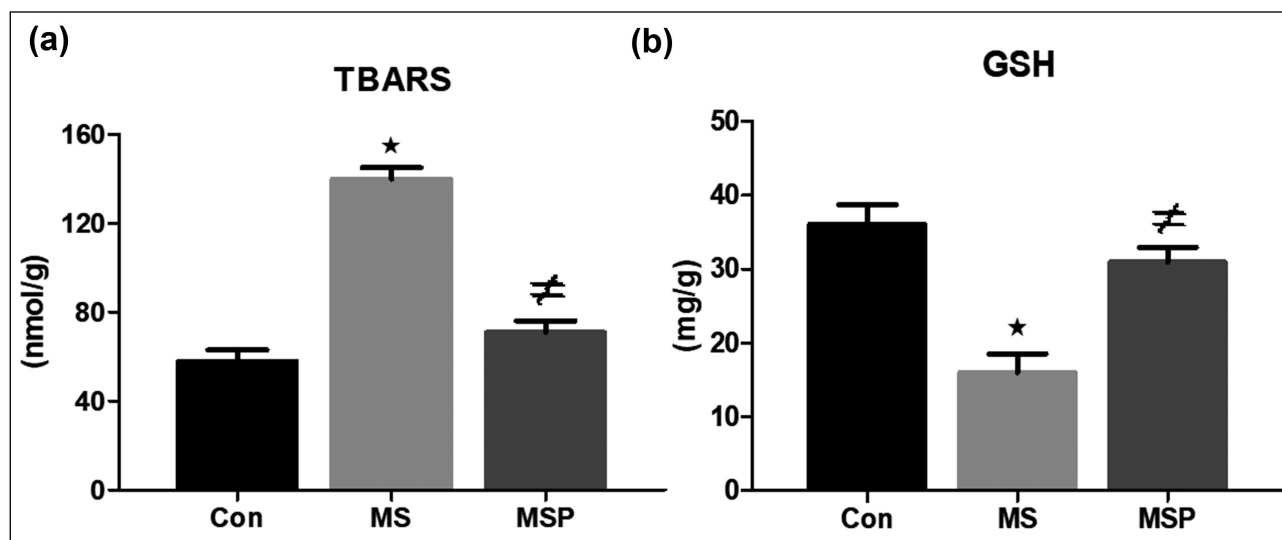
	Con (n=8)	MS (n=8)	MSP (n=8)
Urea (mg/dL)	17.6 $\pm$ 2.3	51.4 $\pm$ 4.6*	30.7 $\pm$ 3.4* <sup>#</sup>
Uric acid (mg/dL)	1.6 $\pm$ 0.1	6.3 $\pm$ 0.3*	3.9 $\pm$ 0.2* <sup>#</sup>
Creatinine (mg/dL)	0.21 $\pm$ 0.01	0.55 $\pm$ 0.03*	0.32 $\pm$ 0.04* <sup>#</sup>
AST (mU/mL)	0.28 $\pm$ 0.03	0.54 $\pm$ 0.04*	0.39 $\pm$ 0.05
LDH (mg/g)	2.1 $\pm$ 0.1	3.5 $\pm$ 0.1*	2.6 $\pm$ 0.3

All parameters were expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (S. E. M.).

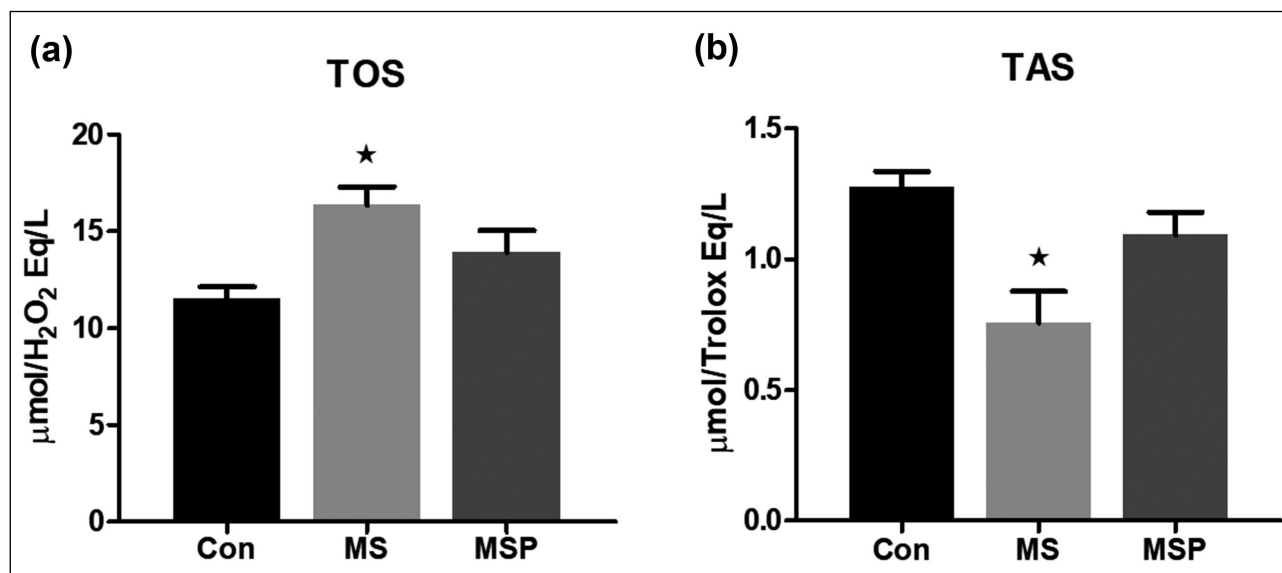
AST, aspartate aminotransferase, LDH, lactate dehydrogenase, Con, control; MS, metabolic syndrome; MSP, pioglitazone treated metabolic syndrome group; n, number of rats.

\* $p < 0.01$  versus Con.

<sup>#</sup> $p < 0.01$  versus MS.



**Figure 1. a, b.** Changes of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (a) and changes of reduced glutathione (GSH) (b) in kidney of experimental groups. Bar graph was expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (S. E. M.) from control group (Con, n=8), metabolic syndrome group (MS, n=8), pioglitazone treated metabolic syndrome group (MSP, n=8). \*  $p < 0.01$  versus Con.

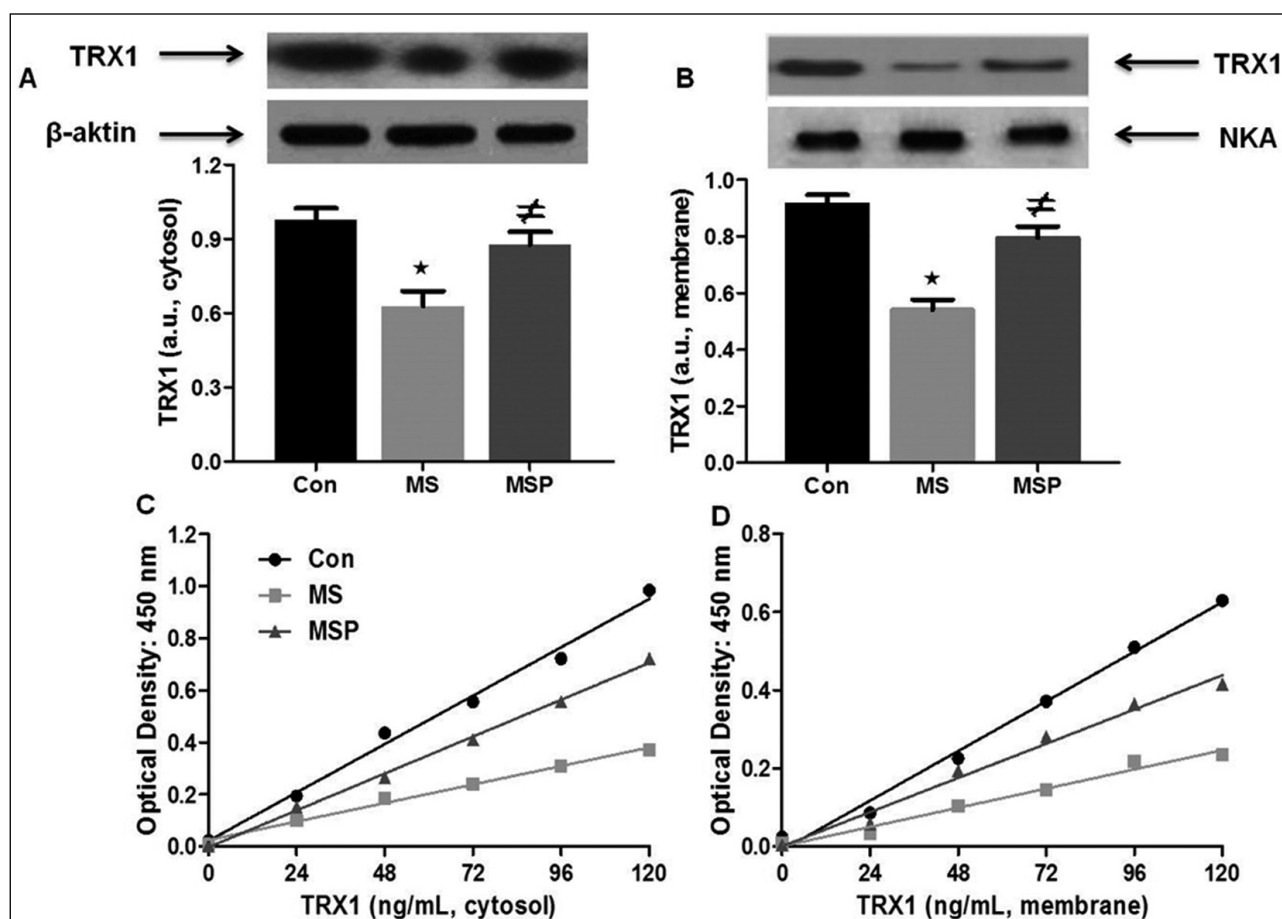


**Figure 2. a, b.** Changes of total oxidant status (TOS) (a) and changes of total antioxidant status (TAS) (b) in kidney of experimental groups. Bar graph was expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (S. E. M.) from control group (Con, n=8), metabolic syndrome group (MS, n=8), pioglitazone treated metabolic syndrome group (MSP, n=8). \*  $p < 0.01$  versus Con.

group. Pioglitazone treatment decreased (not significantly) the activities of TOS in kidney as compared to the MS rat. The activities of TAS were shown as a graph in Figure 2b for tissues of kidney. MS group showed significantly reduced ( $p < 0.01$ ) levels of TAS as compared to the Con group. Pioglitazone treatment restored these elevated TAS levels in kidney tissues of metabolic syndrome but not significantly.

Figure 3a and 3b showed that TRX1 protein level significantly decreased ( $p < 0.01$ ) in MS kidney tissues in cytosol and membrane respectively as compared to the Con group. TRX1 protein level in MSP group significantly increased ( $p < 0.01$ ) in cytosol and membrane as compared to the MS group. TRX1 activity in cytosol was lower in MS group than control group, but treatment of pioglitazone enhanced the activity





**Figure 3. a–d.** Representative western blots of thioredoxin 1 (TRX1) for cytosol (a) and membrane (b) of kidney tissue in experimental groups is given at the top of the bar graphs. Densitometric results are expressed as a percentage of the band obtained with control in each of the experiments. Activity of thioredoxin 1 (TRX1) for cytosol (c) and membrane (d) of kidney tissue in experimental groups. Bar graphs were expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (S. E. M.) from control group (Con,  $n=8$ ), metabolic syndrome group (MS,  $n=8$ ), pioglitazone treated metabolic syndrome group (MSP,  $n=8$ ) \*  $p<0.01$  versus Con,  $\neq p<0.01$  versus MS.

of TRX1 in MS group (Figure 3c). TRX1 activity in membrane was lower in MS group than control group. Pioglitazone treatment enhanced the activity of TRX1 in MS group (Figure 3d).

## Discussion

The present investigation was undertaken to assess the effect of pioglitazone on sucrose-fed-induced oxidative stress in renal system of rats. A high risk for chronic kidney disease (CKD) in patients with the metabolic syndrome has been recently reported in several investigations<sup>5,21</sup>. Our results indicated that pioglitazone may play an important role in regulation of oxidative stress in sucrose-fed induced metabolic syndrome rats.

In agreement with previous studies that investigated the effect of high sucrose diets in rodents<sup>22</sup>, we found

that wistar albino rats receiving 32% sucrose in the drinking water had higher daily water intake, higher glycemia and triglyceridemia, higher insulin resistance and higher insulin values than those observed in control animals. Pioglitazone restored these parameters to the near control levels.

Serum creatinine is an indicator of renal health, because it is an easily measured by product of muscle metabolism that is excreted unchanged by the kidney. In the present study the creatinine level of MS group increased as compared to the Con group. Urea which plays an important role in the metabolism of nitrogen containing compounds by animal and is the main nitrogen containing substance in urine of mammals, when urea is high in blood can result to tissue breakdown e.g. hemorrhage. In the present study, the

results showed that there was a significantly increase in urea concentration in sera from MS group. The other marker of renal function is uric acid. Uric acid concentration significantly increased in sera from MS group as compared to the Con group. The levels of urea, uric acid and creatinine in kidneys of MS rat were markedly reduced after administration of pioglitazone, and these results substantiated the renoprotective effect of pioglitazone that was proposed in the previous studies. Clinical surveys and animal model experiments have revealed that raised level of AST activities are indicative of organ damage; specifically, in pathologic and toxicological events leading to cardiac and necrosis<sup>23,24</sup>. Our research showed that AST increased significantly in kidney tissues of MS group compared with the Con group. This increase may be caused by high sucrose induced damage in kidney tissues.

The LDH enzyme activity can reflect the tissue damage degree, which mainly presents in myocardium, skeletal muscle, liver, and kidneys<sup>25</sup>. The increased concentrations of LDH are indicative of cellular injury and inflammatory changes in tissues, particularly the kidney<sup>26,27</sup>. The results in LDH levels increased significantly in kidney tissues of MS group as compared with the Con group. The results showed that pioglitazone can reduce the elevated levels of both AST and LDH in kidney tissues in MS group.

Measuring plasma total antioxidant status is a sensitive and reliable marker in evaluation of the effects of different treatments such as exercise on plasma redox status<sup>28</sup>. In the present study, there was a significantly increase in the TOS level of kidney tissues from MS group as compared with the Con group. Furthermore, there was a significantly increase in the TAS level of kidney tissues from MS group as compared with the Con group. In results, MS in rats was associated with increased oxidative stress, indicated by the increased TBARS level and decreased endogenous antioxidant such as reduced glutathione level. These results showed that there was a level of oxidative stress in high sucrose induced MS<sup>29</sup>. It was shown that pioglitazone treatment caused a protective effect in the renal system against MS damage in rats.

Thioredoxins are ubiquitous antioxidant enzymes that play important roles in many health-related cellular processes. TRX1 is an oxidoreductase that plays an important role in maintaining intracellular thiols in a reduced state<sup>30</sup>. Our results indicated that TRX1 protein level significantly decreased in both cytosol

and membrane of kidney tissues from MS group as compared with Con group. Treatment of pioglitazone significantly restored these levels in cytosol and membrane of kidney tissues from MS group to the Con group. Furthermore, activity of TRX1 in both cytosol and membrane of kidneys in MS group lower than in Con group. Pioglitazone elevated the TRX activity in MS group.

In conclusion, the current study results demonstrated that pioglitazone administration reduced the observed level of blood glucose, triglyceride, insulin resistance the other markers of MS as compared with Con group. In addition, it was also observed that pioglitazone reversed the levels of AST, LDH, TOS, TAS, TBARS, GSH, urea, uric acid and creatinine in kidney tissues of MS rats. Furthermore, TRX1 activity and protein level increased in pioglitazone treated-MS group. Our results showed that pioglitazone has protective effect in the renal system against MS induced oxidative stress in rats.

The limitation of the present study is that unfortunately, the blood pressure of metabolic syndrome induced rats could not be determined before treatment of pioglitazone and after treatment of pioglitazone. Furthermore, the urine could not be collected from experimental group to measure proteinuria and albuminuria levels.

#### Acknowledgment

I would like to thank Prof. Dr. Belma Turan and Dr. M. Fulya Tutar Selçuk for their departmental encouragement.

#### Financial Support and Sponsorship

This study was supported by TUBITAK-SBAG-115S827 and Ankara Yıldırım Beyazıt University Projects Office-2864.

#### References

1. Masson W, Epstein T, Huerin M, Lobo LM, Molinero G, Angel A et al. Cardiovascular risk stratification in patients with metabolic syndrome Without diabetes or cardiovascular disease: Usefulness of metabolic syndrome severity score. *High Blood Press Cardiovasc Prev* 2017;24(3):297–303.
2. Huh JH, Yadav D, Kim JS, Son JW, Choi E, Kim SH et al. An association of metabolic syndrome and chronic kidney disease from a 10-year prospective cohort study. *Metabolism* 2017;67:54–61.
3. Panwar B, Hanks LJ, Tanner RM, Muntner P, Kramer H, McClellan WM et al. Obesity, metabolic health, and the risk of end-stage renal disease. *Kidney Int* 2015;87:1216–22.

4. Prasad GVR. Metabolic syndrome and chronic kidney disease: current status and future directions. *World J Nephrol* 2014;3:210–9.
5. Kurella M, Lo JC, Chertow GM. Metabolic syndrome and the risk for chronic kidney disease among nondiabetic adults. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:2134–40.
6. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988;240:889–95.
7. Peraldi P, Xu M, Spiegelman BM. Thiazolidinediones block tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced inhibition of insulin signaling. *J Clin Invest* 1997;100:1863.
8. Hallakou S, Doare L, Foufelle F, Kergoat M, Guerre-Millo M, Berthault MF et al. Pioglitazone induces in vivo adipocyte differentiation in the obese Zucker fa/fa rat. *Diabetes* 1997;46:1393–9.
9. Qi HP, Wang Y, Zhang QH, Guo J, Li L, Cao YG et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) through NF- $\kappa$ B/BRG1 and TGF- $\beta$ 1 pathways attenuates cardiac remodeling in pressure-overloaded rat hearts. *Cell Physiol Biochem* 2015;35:899–912.
10. Zou C, Hu H, Xi X, Shi Z, Wang G, Huang X. Pioglitazone protects against renal ischemia-reperfusion injury by enhancing antioxidant capacity. *J Surg Res* 2013;184:1092–5.
11. Keaney Jr JF, Larson MG, Vasani RS, Wilson PW, Lipinska I, Corey D et al. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:434–9.
12. Elks CM, Reed SD, Mariappan N, Shukitt-Hale B, Joseph JA, Ingram DK et al. A blueberry-enriched diet attenuates nephropathy in a rat model of hypertension via reduction in oxidative stress. *PLoS One* 2011;6:e24028.
13. Ruiz-Ramirez A, Chavez-Salgado M, Peneda-Flores JA, Zapata E, Masso F, El-Hafidi M. High-sucrose diet increases ROS generation, FFA accumulation, UCP2 level, and proton leak in liver mitochondria. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011;301:E1198–207.
14. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412–9.
15. Vasques AC, Rosado LE, Cassia GR, Geloneze B. Critical analysis on the use of the homeostasis model assessment (HOMA) indexes in the evaluation of the insulin resistance and the pancreatic beta cells functional capacity. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2008;52:32–9.
16. Wasowicz W, Nève J, Peretz A. Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. *Clin Chem* 1993;39:2522–6.
17. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;82(1):70–7.
18. Hammes S, R. The further redefining of steroid-mediated signaling. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100(5):21680–700.
19. Agbafor K. N., Engwa A. G., Ude C. M., Obiudu I. K. and Festus B. O. Effect of Aqueous Leave Extract of *Ageratum Conyzoides* on Blood Glucose, Creatinine and Calcium ion Levels in Albino rats. *Journal of Pharmaceutical Chemical and Biological Sciences* 2015;3(3):408–15.
20. Barham T. Enzymatic Colorimetric Determination of Uric Acid. *Journal of Clinical Chemistry* 1972;97(2):142–4.
21. Chen J, Muntner P, Hamm LL, Jones DW, Batuman V, Fonseca V et al. The metabolic syndrome and chronic kidney disease in U. S. adults. *Ann Intern Med* 2004;140:167–74.
22. Soria A, D'Alessandro ME, Lombardo YB. Duration of feeding on a sucrose-rich diet determines metabolic and morphological changes in rat adipocytes. *J Appl Physiol* 2001;91:2109–16.
23. Adedara IA, Abolaji AO, Odion BE, Okwudi IJ, Omolaja AA, Farombi EO. Impairment of hepatic and renal functions by 2, 5-hexanedione is accompanied by oxidative stress in rats. *J Toxicol* 2014;2014:239240.
24. Suanarunsawat T, Ayutthaya WD, Songsak T, Thirawarapan S, Pongshompoo S. Lipid-lowering and antioxidative activities of aqueous extracts of *Ocimum sanctum* L. leaves in rats fed with a high-cholesterol diet. *Oxid Med Cell Longev* 2011;2011:962025.
25. Akila P, Asaikumar L, Vennila L. Chlorogenic acid ameliorates isoproterenol-induced myocardial injury in rats by stabilizing mitochondrial and lysosomal enzymes. *Biomed Pharmacother* 2017;85:582–91.
26. Quigg RJ, Cybulsky AV, Jacobs JB, Salant DJ. Anti-Fx1A produces complement-dependent cytotoxicity of glomerular epithelial cells. *Kidney international* 1988;34:43–52.
27. Vikramathithan J, Gautami G, Ganesh I, Srikumar K. Differences in Rat Tissue Lactate Dehydrogenase Activity Caused by Gibberellic Acid and Homobrassinolide. *Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry-Turk J Biochem]* 2009;34(2):57–61.
28. Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med* 2000;29:1106–14.
29. Liu J, Yeo HC, Övervik-Douki E, Hagen T, Doniger SJ, Chyu DW et al. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J Appl Physiol* 2000;89:21–8.
30. Yamawaki H, Haendeler J, Berk BC. Thioredoxin: a key regulator of cardiovascular homeostasis. *Circ Res* 2003;93:1029–33.



# Ayak Arkus Açısı ve Ayak Uzunluğu Arasındaki İlişki

## Relationship Between the Angle of the Foot Arch and the Length of the Foot

Bilge İpek Torun<sup>1</sup>, Nurdan Çay<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı; <sup>2</sup>Radyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

### ABSTRACT

**Aim:** Foot morphology and anthropometry are known to be associated with biomechanical measurements of foot. The medial longitudinal arch (MLA), which is the main arch contributing to the foot morphology, provides an elastic connection between the forefoot and hindfoot. Problems and alignment disorders, specifically caused by MLA, such as pes cavus and pes planus, ultimately affect the functions of the muscles and joints of the lower extremity. In this study, we aimed to investigate the relation between MLA and bony-length of foot by making measurements on radiographs.

**Material and Method:** 212 (106 right and 106 left sides) weight-bearing lateral x-ray images of 106 patients (36 females, 70 males) aged between 18–80 (m: 18–75, f: 18–80) were evaluated. Images of the patients aged under 18 or above 80, with any sign of trauma or surgery, space-occupying lesion of foot or deformity of foot bones were excluded. The maximal bony-length of the foot and in order to evaluate the medial longitudinal arch (MLA) the angle between the calcaneus and the 1st metatarsal bone and calcaneal inclination angle were measured on the x-ray images. The results were evaluated statistically.

**Results:** The mean bony-length of the foot was measured as 237.5 mm (216.5–256.7 mm) in females and 264.1 mm (205.0–293.6 mm) in males. The mean respective calcaneal inclination angle and the angle between the calcaneus and the 1st metatarsal bone were measured as 18.2° (2.7°–31.4°) and 140.2° (119.5°–159.8°). In both gender there was a significant correlation between the bony-length of foot and angles ( $p < 0.01$  for both angles). There was also found a significant correlation between calcaneal inclination angle and the angle between the calcaneus and the 1st metatarsal bone ( $p < 0.01$ ).

**Conclusion:** MLA, known to be effective on functions such as balance, walking, standing on one or two feet, jumping and squatting, which are associated with foot morphology, was found to be related to foot length in both gender. This results in a prediction of predisposition to the pes planus in people with large feet.

**Key words:** medial longitudinal arch; foot length; foot arch

### ÖZET

**Amaç:** Ayak morfolojisinin ve antropometrisinin ayağın biyomekanik ölçümleri ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Ayak morfolojisine katkıda bulunan esas ark olan medial longitudinal ark (MLA), ön ayak ve arka ayak arasında elastik bir bağlantı sağlar. Pes kavus ve pes planus gibi spesifik olarak MLA'dan kaynaklanan problemler ve dizilim bozuklukları, sonuçta alt ekstremité kaslarının ve eklemlerinin işlevini etkiler. Biz bu çalışmamızda radyografiler üzerinden ölçümler yaparak MLA'nın ayak uzunluğuyla olan ilişkisini araştırmayı amaçladık.

**Materyal ve Metot:** 18–80 yaş aralığındaki (erkek: 18–75, kadın: 18–80) 106 kişiye (70 erkek, 36 kadın) ait 212 adet (106 sağ, 106 sol) basarak çekilmiş lateral ayak grafisi geriye dönük olarak değerlendirildi. 18 yaşın altında ya da 80 yaşın üstünde olan, ayağında geçirilmiş travma veya cerrahi bulgusu, yer kaplayan lezyon ya da ayak kemiklerinde herhangi bir deformite bulunan kişilerin grafileri değerlendirme dışına bırakıldı. Grafilerde ayağın kemik boyu ve MLA'yı değerlendirmek üzere kalkaneal eğim açısı ve calcaneus - 1. metatars açısı ölçüldü. Ölçümlerden elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

**Bulgular:** Ortalama ayak kemik boyu kadınlarda 237,5 mm (216,5–256,7 mm), erkeklerde 264,1 mm (205,0–293,6 mm) olarak ölçüldü. Ortalama kalkaneal eğim açısı 18,2° (2,7°–31,4°), calcaneus - 1. metatars açısı 140,2° (119,5°–159,8°) olarak ölçüldü. Her iki cinstede ayak kemik boyu ve açılar arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulundu (hem kalkaneal eğim açısı hem calcaneus - 1. metatars açısı için  $p < 0,01$ ). Kalkaneal eğim açısı ve calcaneus - 1. metatars açısı arasında da anlamlı ilişki bulundu ( $p < 0,01$ ).

**Sonuç:** Ayak morfolojisiyle ilişkili olan denge, yürüyüş, tek veya çift ayak üstünde durma, zıplama, çömelme gibi fonksiyonlar üzerinde etkili olduğu bilinen MLA'nın her iki cinstede ayak uzunluğuyla ilişkili olduğu bulundu. Bu durum büyük ayağa sahip kişilerde pes planus'a yatkınlığın daha çok olacağına öngörülmesi sonucunu doğurur.

**Anahtar kelimeler:** medial longitudinal ark; ayak uzunluğu; arcus pedis

### Giriş

Ayak morfolojisi denge, yürüyüş, tek veya çift ayak üstünde durma, zıplama, çömelme gibi pek çok fonksiyonla yakından ilişkilidir<sup>1,2</sup>. Yapılan çalışmalarda ayak morfolojisinin ve antropometrisinin ayağın biyomekanik ölçümleri ile ilişkili olduğu bulunmuştur<sup>3</sup>. Ayağın iki adet (medial ve lateral) longitudinal, bir adet de

Bilge İpek Torun, Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Eskişehir Yolu Lodumlu Mevkii Bilkent, Ankara, 06100 Türkiye  
Tel. 0532 246 87 78 Email. bilgeipek@yahoo.com  
Geliş Tarihi: 20.09.2018 • Kabul Tarihi: 19.11.2018

transvers yönde olmak üzere bulunan üç adet arkı ayak kubbesini oluşturur. Lateral longitudinal arkı calcaneus, os cuboideum ve dördüncü ve beşinci metatarsal kemikler, medial longitudinal arkı (MLA) ise calcaneus, talus, os naviculare, üç os cuneiforme ve ilk üç metatarsal kemik oluşturur. Ayak kubbesini aktif olarak kaslar korurken pasif olarak bağlar korur<sup>4</sup>.

Ayak yapısına katkıda bulunan esas ark olan MLA, ön ayak ve arka ayak arasında elastik bir bağlantı sağlar. Bu da yük taşıma sırasında meydana gelen plantar kuvvetlerin çoğunun, uyluk ve bacak kemiklerine ulaşmadan önce dağılmasını sağlar. Pes kavus ve pes planus gibi spesifik olarak MLA'dan kaynaklanan problemler ve dizilim bozuklukları, sonuçta alt ekstremitte kaslarının ve eklemlerinin işlevini etkiler<sup>5</sup>. Bu problemler edinilmiş veya yapısal nedenlerle olabilir<sup>6-8</sup>. MLA'nın yapısında değişikliklere neden olan etkenlerin araştırılması halen devam etmektedir. Radyografik teknikler, ayağın iskeletsel hizalanmasının statik basarak pozisyonda değerlendirilmesinde altın standart olarak kabul edilmektedir<sup>9</sup>. Biz de bu çalışmada radyografiler üzerinden ölçümler yaparak MLA'nın ayak kemik uzunluğuyla olan ilişkisini araştırmayı amaçladık.

## Materyal ve Metot

Bu çalışmada Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne Ocak 2018–Ağustos 2018 tarihleri arasında başvurmuş olan, 18–80 yaş aralığındaki (erkek: 18–75, kadın: 18–80) 106 kişiye (70 erkek, 36 kadın) ait 212 adet (106 sağ, 106 sol) basarak çekilmiş lateral ayak grafisi geriye dönük olarak değerlendirildi. 18 yaşın altında ya da 80 yaşın üstünde olan, ayağında geçirilmiş travma veya cerrahi bulgusu, yer kaplayan lezyon ya da ayak kemiklerinde herhangi bir deformite bulunan kişilerin grafileri değerlendirme dışında bırakıldı. Çalışma için gerekli etik kurul onayı Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı'ndan alındı (15.08.2018/182).

Tüm grafiler yük biner pozisyonda (ayakta, basarak) standartlara uygun (kVp: 71,5, mAs: 7,1) çekilen konvansiyonel direkt lateral grafilerdi (Siemens Multix-top, Germany). Ölçümler PACS (Picture Archiving Communication System) Programı (Extremite PACS, Ankara) kullanılarak yapıldı. Grafilerde ayağın en uzun kemik boyu ve MLA'yı değerlendirmek üzere iki açı ölçüldü. Ayağın en uzun kemik boyu, calcaneus'un arkadaki en çıkıntılı noktası ile ayağın en distaldeki falanksının ucu arasındaki mesafeyle ölçüldü (Şekil 1). En distaldeki falanks bazı kişilerde birinci, bazı kişilerdeyse ikinci

parmağa aitti. MLA'yı değerlendirmek için pratikte en çok kullanılan açılardan ikisi olan kalkaneal eğim açısı (Şekil 2) ve calcaneus - 1. metatars açısı kullanıldı (Şekil 3). Bu açılar, MLA'yı değerlendirmek üzere, ölçüm kolaylığı ve güvenilirliğinin yanı sıra sagittal düzlemde ayak duruşunu yansıtmaları nedeniyle seçildi<sup>10</sup>. Kalkaneal eğim açısı ölçümü, calcaneus'un alt yüzü (lateral grafilerde calcaneus'un alt yüzündeki en çıkıntılı iki noktayı birleştiren çizgi) ile ayağın bastığı düzlem arasındaki açıyla, calcaneus - 1. metatars açısı ise calcaneus'un alt yüzü ile 1. metatarsal kemiğin aksı (proksimal ve distal uçlarının orta noktalarını birleştiren çizgi) arasındaki açıyla ölçüldü.

Ölçümler her bir grafi üzerinde iki çalışmacı tarafından ayrı ayrı yapılarak çalışmacıların ölçüm sonuçları paired samples t-test ile istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Ölçümlerden elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirmesi IBM SPSS Statistics 20 programı kullanılarak yapıldı. Sağ-sol taraflar ve kadın-erkek ölçümleri arasında fark olup olmadığı paired samples t-test ile değerlendirildi. P<0,01 olan farklılık değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Açılar ve ayak kemik boyunun uzunluğu arasındaki ilişkiler Pearson korelasyon testiyle değerlendirildi.

## Bulgular

İki çalışmacının yaptığı ölçümler arasındaki korelasyon %94 idi (p<0,001). Ortalama ayak kemik boyu kadınlarda 237,5 mm (216,5–256,7 mm), erkeklerde 264,1 mm (205,0–293,6 mm) olarak ölçüldü (Tablo 1). Ayak kemik boyları açısından sağ ve sol taraflar arasında anlamlı fark bulunmazken kadınlarda ve erkeklerde ölçülen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu (p<0,01). Ortalama kalkaneal eğim açısı 18,2° (2,7°–31,4°), calcaneus - 1. metatars açısı 140,2° (119,5°–159,8°) olarak ölçüldü (Tablo 1). Hem sağ ve sol taraflar arasında hem de kadınlarda ve erkeklerde ölçülen açılar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Ayak kemik boyunun kalkaneal eğim açısı ve calcaneus - 1. metatars açısı ile olan ilişkisinin Pearson korelasyon testiyle değerlendirilmesi sonucu her iki cinste de ayak kemik boyu ve açılar arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulundu (hem kalkaneal eğim açısı hem calcaneus - 1. metatars açısı için p<0,01). Buna göre ayak uzunluğu arttıkça calcaneus - 1. metatars açısı artıyor, kalkaneal eğim açısı azalıyor. Beklendiği gibi kalkaneal eğim açısı ve calcaneus - 1. metatars açısı arasında da anlamlı ilişki bulundu (p<0,01). Calcaneus - 1. metatars açısı arttıkça kalkaneal eğim açısı azalıyor.



**Şekil 1.** Ayak kemik boyu calcaneus'un arkasındaki en çıkıntılı nokta ile en distaldeki falanksın ucu arasında ölçüldü.



**Şekil 2.** Kalkaneal eğim açısı, calcaneus'un alt yüzü (calcaneus'un altındaki en çıkıntılı iki noktayı birleştiren çizgi) ile ayağın bastığı düzlem arasında ölçüldü (KEA: kalkaneal eğim açısı).



**Şekil 3.** Calcaneus - 1. metatars açısı, calcaneus'un alt yüzü (calcaneus'un altındaki en çıkıntılı iki noktayı birleştiren çizgi) ve 1. metatars'ın aksı arasında ölçüldü (C1MA: calcaneus - 1. metatars açısı).

**Tablo 1.** Ayak boyu ve açılı ölçümleri

	En az	En çok	Ortalama	SD
Kadın ayak boyu (mm)	216,5	256,7	237,5	12,1
Erkek ayak boyu (mm)	205,0	293,6	264,1	16,5
Hibbs açısı	119,5°	159,8°	140,2°	7,5°
KEA	2,73°	31,4°	18,2°	5,7°

KEA, kalkaneal eğim açısı.

## Tartışma

Klinikte MLA'yı değerlendirmek üzere dinamik ve statik yöntemler kullanılmaktadır. Dinamik ölçümler yürüyüş testleriyle, statik ölçümler çekilmiş grafiler üzerinde veya çeşitli enstrümanlarla ayak ölçülerek yapılır<sup>11,12</sup>. MLA'nın klinik veya radyolojik olarak değerlendirilmesinde tüm dünyada kabul görmüş tek bir yöntem henüz yoktur<sup>13</sup>. Radyolojik değerlendirmeler genellikle basarak çekilen lateral grafiler üzerinde yapılır<sup>13,14</sup>. Bu yöntemle MLA'yı değerlendirmek için calcaneus - 1. metatars açısı, kalkaneal eğim açısı, talus - 1. metatars açısı, ark yüksekliği, lateral talokalkaneal açı, talo-horizontal açı gibi pek çok parametre kullanılmaktadır<sup>10,13,14</sup>. Biz bu çalışmamızda MLA'yı değerlendirmek üzere hem ölçüm kolaylığı nedeniyle, hem de tüm literatüre baktığımızda daha sık kullanılmış olduğunu gördüğümüz iki açı olan calcaneus - 1. metatars açısı ve kalkaneal eğim açısını kullandık.

Önceki çalışmalarda pes planus'un erkek cinsiyetle<sup>15,16</sup> ve fazla kiloyla<sup>17,18</sup> ilişkili olduğu pes cavus'ansa daha çok bazı nörolojik hastalıklara eşlik ettiği<sup>19</sup> bulunmuş. Bizim çalışmamızda MLA'yı değerlendirmek üzere ölçtüğümüz kalkaneal eğim açısı ve calcaneus - 1. metatars açısı cinsiyetler arasında anlamlı fark göstermiyordu ancak her iki açı da ayak boyuyla ilişkiliydi. Yalçın ve ark.'nın<sup>13</sup> 95 kişiye ait lateral ayak grafilerini geriye dönük değerlendirdikleri çalışmada bizim çalışmamızla benzer şekilde kalkaneal eğim açısı ile cinsiyet arasında ilişki bulunmamış ancak bu açı bizim çalışmamızda bulduğumuz değerlerden farklı olarak ortalama 41° bulunmuş. Vanderwilde ve ark.<sup>20</sup>, 6 ay - 10 yaş arası 74 bebek ve çocukta yaptıkları radyografik çalışmada, lateral grafilerde talokalkaneal, tibiokalkaneal, tibiotalar, talus - 1. metatarsal ve talohorizontal açıları ölçmüşler ve bu çalışmada da açılarla cinsiyet arasında bir ilişki tespit etmemişler.

Ayak kubbesinin lateral grafilerdeki görüntüsünü bir üçgene benzetirsek, kalkaneal eğim açısı ve calcaneus - 1. metatars açısının bu üçgenin iki açısını oluşturduğu görülür. Üçüncü açı ise 1. metatarsal kemiğin gövde ortasıyla ayağın bastığı düzlem arasında meydana gelir (Şekil 4). Buradan da anlaşılacağı gibi kalkaneal eğim açısı ile calcaneus - 1. metatars açısı arasında bir ilişki vardır. Kalkaneal eğim açısı azaldıkça calcaneus - 1. metatars açısı artar, yani ayak kubbesi düzleşir. Bunun tersi de doğrudur. Çalışmamızda elde ettiğimiz ölçümlere göre ayak kemik boyu arttıkça calcaneus - 1. metatars açısı artıp kalkaneal eğim açısı azalmakta, yani ayak kubbesi düzleşmekteydi.

Pek çok antropometrik özellik gibi ayak anatomisinin, kemik gelişiminin ve postürünün de yaşla değişiklik göstermesi nedeniyle<sup>21,22</sup> MLA'nın yaşla ilişkisi de araştırılabilir. Vanderwilde ve ark.<sup>20</sup>, ortopedik sorunu olmayan 6 ay - 10 yaş arası 74 bebek ve çocukta yaptıkları çalışmada bebek ve çocukların ayaklarının basarak ön-arka, lateral ve maksimum dorsifleksiyonda lateral grafilerini çekerek ayak kemiklerine ait on adet açıyı değerlendirmişler. Bu çalışmaya göre maksimum dorsifleksiyonda lateral tibi-okalkaneal açı hariç diğerleri (ön-arka talokalkaneal ve calcaneus - 5. metatarsal, lateral talokalkaneal ve talus - 1. metatarsal, lateral tibiotalar, talohorizontal ve maksimum dorsifleksiyonda talokalkaneal açıları) yaşla azalma göstermiş. Bu açılardan talus - 1. metatars açısı MLA'yı değerlendirmek için sıklıkla kullanılan açılardan ve bahsedilen çalışmada birkaç derecelik bir açı değişikliği tespit edilip klinik açıdan muhtemelen çok önemli olmadığı şeklinde yorumlanmış. Diğer açılarda ön, orta ve arka ayağın yapısını ve kemiklerin dizilimini değerlendirmek üzere ölçülmektedir. Bizim çalışmamızda yer alan kişilerin yaşlarının büyük oranda (%80) 18-20 yaş aralığında toplanması nedeniyle MLA'nın yaşla ilişkisini değerlendiremedik.



**Şekil 4.** Calcaneus - 1. metatars açısı, kalkaneal eğim açısı ve ayığın bastığı düzlem bir üçgen meydana getirmektedir (KEA: kalkaneal eğim açısı, C1MA: calcaneus - 1. metatars açısı).

Biz bu çalışmamızda yalnızca basarak çekilen lateral grafileri değerlendirdik. Ancak ayak arkı kemikler, kaslar ve bağlar tarafından oluşturulan karmaşık bir yapı olduğu için basarak ve basmayarak çekilen grafilerde açılarının değişiklik göstermesi olasıdır. Bizim görüntüleri taradığımız hastane veri tabanında, aldığımız tarih aralığında aynı kişilere ait basarak ve basmadan çekilmiş yeteri kadar grafinin bulunmaması nedeniyle, iki durum arasında bu açıların değişip değişmediğini değerlendiremedik. Daha geniş bir taramayla basarak ve basmayarak çekilen grafilerde açıların değişip değişmediği de değerlendirilebilir.

## Sonuç

Ayak morfolojisiyle ilişkili olan denge, yürüyüş, tek veya çift ayak üstünde durma, zıplama, çömelme gibi fonksiyonlar üzerinde etkili olduğu bilinen MLA'nın her iki cinsten de ayak uzunluğu arttıkça düzleştiği bulundu. Bu durum büyük ayağa sahip kişilerde pes planus'a yatkınlığın daha çok olacağını öngörülmesi sonucunu doğurur. Ancak ayak büyüklüğü kaç numara olduğunda klinik olarak pes planus'un ortaya çıkacağıyla ilgili bir görüş öne sürebilmek için daha geniş serilerde, ileri biyomekanik ölçümler de eklenerek çalışmalar yapılması gerektiğini düşünmekteyiz. Yapılacak daha ileri çalışmaların sonuçlarıyla büyük ayak numarasına sahip kişiler için MLA destekli ayakkabı tasarlanması da düşünülebilir.

## Kaynaklar

1. Jankowicz-Szymanska A, Mikolajczyk E, Wardzala R. Arch of the foot and postural balance in young judokas and peers. *J Pediatr Orthop B* 2015;24(5):456-60.
2. Lin CJ, Lai KA, Kuan TS, Chou YL. Correlating factors and clinical significance of flexible flatfoot in preschool children. *J Pediatr Orthop* 2001;21(3):378-82.
3. Mootanah R, Song J, Lenhoff MW, Hafer JF, Backus SI, Gagnon D, et al. Foot type biomechanics part 2: are structure and anthropometrics related to function? *Gait Posture* 2013;37(3):452-6.
4. Arıncı K, Elhan A. *Anatomi*. Ankara: Güneş Kitabevi; 2014:71-128.
5. Franco AH. Pes cavus and pes planus. *Analyses and treatment. Physical Therapy* 1987;67(5):688-94.
6. Harris EJ, Vanore JV, Thomas JL, Kravitz SR, Mendelson SA, Mendicino RW, et al. Diagnosis and treatment of pediatric flatfoot. *J Foot Ankle Surg* 2004;43(6):341-73.
7. Deland JT Adult-acquired flatfoot deformity. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 2008;16(7):399-406.
8. Wozniacka R, Bac A, Matusik S, Szczygiel E, Ciszek E. Body weight and the medial longitudinal foot arch: high-arched foot, a hidden problem? *Eur J Pediatr* 2013;172(5):683-91.
9. Menz HB. Alternative techniques for the clinical assessment of foot pronation. *Journal of the American Podiatric Medical Association* 1998;88(3):119-29.
10. Murley GS, Menz HB, Landorf KB. A protocol for classifying normal- and flat-arched foot posture for research studies using clinical and radiographic measurements. *J Foot Ankle Res* 2009;2:22.



11. Scholz T, Zech A, Wegscheider K, Lezius S, Braumann KM, Sehner S, et al. Reliability and correlation of static and dynamic foot arch measurement in a healthy pediatric population. *Journal of the American Podiatric Medical Association* 2017;107(5):419–27.
12. Muller S, Carlsohn A, Müller J, Baur H, Mayer F. Static and dynamic foot characteristics in children aged 1–13 years: a cross-sectional study. *Gait Posture* 2012;35(3):389–94.
13. Yalçın N, Esen E, Kanatlı U, Yetkin H. Medial longitudinal arkin değerlendirilmesi: dinamik plantar basınç ölçüm sistemi ile radyografik yöntemlerin karşılaştırılması. *Acta Orthop Traumatol Turc* 2010;44(3):241–5.
14. Saltzman CL, Nawoczenski DA, Talbot KD. Measurement of the medial longitudinal arch. *Arch Phys Med Rehabil* 1995;76:45–9.
15. Pfeiffer M, Kotz R, Ledl T, Hauser G, Sluga M. Prevalence of flat foot in preschool-aged children. *Pediatrics* 2006;118(2):634–9.
16. Chang JH, Wang SH, Kuo CL, Shen HC, Hong YW, Lin LC. Prevalence of flexible flatfoot in Taiwanese school-aged children in relation to obesity, gender, and age. *Eur J Pediatr* 2010;169(4):447–52.
17. Mauch M, Grau S, Maiwald C, Horstmann T. Foot morphology of normal, underweight and overweight children. *Int J Obes (Lond)* 2008;32(7):1068–75.
18. Tenenbaum S, Hershkovich O, Gordon B, Bruck N, Thein R, Darazne E, et al. Flexible pes planus in adolescents: body mass index, body height, and gender--an epidemiological study. *Foot Ankle Int* 2013;34(6):811–7.
19. Eleswarapu AS, Yamini B, Bielski RJ. Evaluating the Cavus Foot. *Pediatr Ann* 2016;45(6): e218–22.
20. Vanderwilde R, Staheli L, Chew DE, Malagon V. Measurements on radiographs of the foot in normal infants and children. *The Journal of Bone and Joints Surgery* 1988;70-A(3):407–15.
21. Uzuner MB, Geneci F, Ocak M, Bayram P, Sancak İT, Dolgun A, et al. Sex determination from the radiographic measurements of calcaneus. *Anatomy* 2016;10(3):200–4.
22. Redmond AC, Crane YZ, Menz HB. Normative values for the foot posture index. *Journal of Foot and Ankle Research* 2008;1(1).



# Kronik Otitis Media ve Alerjik Rinit Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi

## Evaluation of the Relationship Between Chronic Otitis Media and Allergic Rhinitis

Yavuz Güler<sup>1</sup>, Rukiye Güler<sup>2</sup>, Alper Şen<sup>3</sup>, Kadir Özdamar<sup>3</sup>, Esra Aycan Üstyol<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Balıkgöl Devlet Hastanesi, Kulak Burun Boğaz Bölümü; <sup>2</sup>Şanlıurfa Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kulak Burun Boğaz Bölümü; <sup>3</sup>Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı; <sup>4</sup>Balıkgöl Devlet Hastanesi, Tıbbi Biyokimya Bölümü, Şanlıurfa, Türkiye

### ABSTRACT

**Aim:** This study was planned for the purpose of revealing whether patients with allergic rhinitis (AR) carry a greater risk compared with healthy individuals in terms of developing chronic suppurative otitis media (CSOM).

**Material and Method:** 676 volunteer patients (402 female, 274 male) who were referred to the otorhinolaryngology (ENT) outpatient clinics of secondary care hospitals were randomly included in the study. The score for allergic rhinitis (SFAR) points and otomicroscopic examination findings of all the volunteers were recorded. The patients were grouped as AR (+) and AR (-) based on whether they had allergic rhinitis, and as CSOM (+) and CSOM (-) based on whether they had chronic suppurative otitis media. For all statistical analysis, SPSS version 21.0 was used.

**Results:** While 18.6% of the AR (+) patients were KSOM (+), 28.7% of the AR (-) patients were KSOM (+). Chronic suppurative otitis media was seen significantly more in the AR (-) group compared with the AR (+) group ( $p < 0.026$ ).

**Conclusion:** Allergic rhinitis is not seen as a risk factor in the etiology of chronic suppurative otitis media. Conversely, the factors that play a role in the etiology of allergic rhinitis could be effective against chronic suppurative otitis media.

**Key words:** allergic rhinitis; SFAR; chronic suppurative otitis media; etiology; prevalence

### ÖZET

**Amaç:** Bu çalışma alerjik riniti (AR) olan hastaların, kronik süpuratif otitis mediaya (KSOM) yakalanma açısından, sağlıklı bireylere göre daha fazla risk taşıyıp taşımadığını ortaya koymak amacıyla planlanmıştır.

**Materyal ve Metot:** Çalışmaya ikinci basamak bir hastanenin Kulak Burun Boğaz (KBB) polikliniklerine başvuran ve gönüllü olan 676 hasta (402 kadın, 274 erkek) randomize olarak dahil edildi. Tüm

gönüllülerin, alerjik rinit için skor (score for allergic rhinitis; SFAR) puanları ve otomikroskopik muayene bulguları kaydedildi. Hastalar alerjik rinit olup olmamasına göre AR (+) ve AR (-) olarak, kronik süpuratif otitis media olup olmamasına göre KSOM (+) ve KSOM (-) olarak gruplandırıldı. İstatistik analizlerin tümü için SPSS 21,0 versiyonu kullanıldı.

**Bulgular:** AR (+) hastaların %18,6'sı (n=22) KSOM (+) iken, AR (-) hastaların %28,7'si (n=160) KSOM (+) idi. Kronik süpuratif otitis media, AR (-) grupta, AR (+) gruba göre anlamlı bir şekilde daha fazla görüldü ( $p < 0,026$ ).

**Sonuç:** Alerjik rinit, kronik süpuratif otitis media etyolojisinde bir risk faktörü olarak görülmemektedir. Tam tersine alerjik rinit etyolojisinde rol oynayan faktörler, kronik süpuratif otitis mediaya karşı koruyucu etki gösteriyor olabilir.

**Anahtar kelimeler:** alerjik rinit; SFAR; kronik süpuratif otitis media; etyoloji; prevalans

### Giriş

Kronik otitis media (KOM) gelişmemiş ve gelişmekte olan toplumlarda önemli bir sağlık problemi olmaya devam etmektedir. Perforasyonlu KOM perfore bir kulak zarından en az 6 hafta süre ile sürekli veya ara ara akıntı olması olarak tanımlanmaktadır<sup>1</sup>. Perforasyonlu KOM tedavisinde ise genellikle cerrahi müdahale uygulanmaktadır. Hastaların cerrahiye hazırlanma süreçleri ve bu sürede aldıkları medikal tedaviler, cerrahi uygulamalar ve post-operatif dönemdeki kontrol gereksinimleri ekonomik olarak kayıplara yol açmaktadır. Ayrıca cerrahinin çoğunlukla genel anestezi altında yapılması nedeniyle anesteziye bağlı komplikasyonlar da görülebilmektedir. Bu nedenle KOM etyolojisinde rol oynayan faktörlerin ortaya konması hastalığın önlenmesi açısından oldukça önemlidir.

Yavuz Güler, Balıkgöl Devlet Hastanesi, Şanlıurfa, Türkiye  
Tel. 0414 318 90 00 Email. dryavuzguler@hotmail.com  
Geliş Tarihi: 15.08.2018 • Kabul Tarihi: 30.10.2018

KOM patogenezinde genetik ve immünolojik faktörlerin yanı sıra östaki disfonksiyonu dahil olmak üzere pasif sigara maruziyeti, anne sütü ile beslenme süresi, eğitim durumu, sosyoekonomik düzey ve sık üst solunum yolu enfeksiyonu geçirmek gibi bir çok çevresel faktör rol oynamaktadır<sup>2</sup>. Bununla birlikte alerjik rinit (AR) ile KOM arasındaki ilişki henüz netlik kazanmamıştır. Literatüre bakıldığında bazı araştırmacıların AR'nin KOM etyolojisinde rol oynadığı bildirilirken<sup>3-5</sup>, bazı araştırmalarda etkisinin olmadığı sonucuna varıldığı görülmektedir<sup>6,7</sup>. Bununla birlikte bazı yayınlarda AR ile KOM arasında ters orantılı bir ilişki olduğu bildirilmiştir<sup>8,9</sup>.

Bu çalışmada toplumda KOM sıklığını arttıran faktörler arasında AR'in rolü olup olmadığını ortaya koymak amaçlandı.

## Materyal ve Metot

Balıkliğöl Devlet Hastanesi Kulak Burun Boğaz (KBB) polikliniklerine 1 Mayıs 2018–31 Temmuz 2018 tarihleri arasında başvuran ve gönüllü olan 676 (402 kadın, 274 erkek) hasta çalışmaya dahil edildi. Tüm hastaların ayrıntılı KBB muayenesinin yanı sıra anterior rinoskopik, nazal endoskopik ve otomikroskopik muayeneleri yapıldı. Üst solunum yolu enfeksiyonu, akut veya kronik rinosinüzit, nazal polipozis, inverted papillom ve sinonazofarengeal malignite vb. patolojileri bulunan hastalar çalışma dışı bırakıldı.

Hastalara AR tanısı öykü ve fizik muayene bulgularının yanı sıra 'Alerjik rinit için skor (score for allergic rhinitis; SFAR)' anketi ile konuldu. AR tanısında SFAR'ın cutt-off puanı  $\geq 7$  olarak ayarlandığında, testin sensitivitesi %74 ve spesifitesi %83 olduğu bildirilmiştir<sup>10</sup>. Ayrıca Cingi ve ark.<sup>11</sup> tarafından Türkiye'de yapılan validasyon çalışmasında SFAR anketinin  $\alpha$ -Chronbach güvenilirlik değerini 0,69 olarak bildirmiş ve anketin Türk toplumu için uygun, etkili ve güvenilir bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda tüm hastalara SFAR anketi uygulandı ve skorlaması yapılarak kaydedildi. Hastalara alerjik rinit tanısı öykü, fizik muayenede anterior rinoskopi ve nazal endoskopik bulguların AR ile uyumlu olması (konka hipertrofisi, soluk renkte mukoza ve seröz akıntı) ve SFAR puan değerinin  $\geq 7$  olması ile konuldu. Çalışmada kullanılan SFAR anketi ve skorlama yöntemi Tablo 1'de gösterilmiştir.

Kronik süperatif otitis media tanısı ise otoskopik ve otomikroskopik muayenede kulak zarında 6 haftadan uzun süren perforasyon bulunması ve orta kulakta pürülan akıntının aralıklı veya sürekli olarak tabloya eşlik

etmesi ile kondu<sup>1</sup>. Hastane kayıtlarında en erken 6. hafta süre ile kulak zarındaki perforasyonun devam ettiği görülen hastalar çalışmaya dahil edildi. 6 haftadan kısa süreli takibi bulunan ve travmatik nedenli kulak zarı perforasyonu olan hastalar çalışma dışı bırakıldı.

En az bir kulakta perforasyonlu KOM olan hastalar KOM (+), her iki kulak zarı sağlam olan hastalar KOM (-) ve alerjik riniti olan hastalar AR (+), alerjik riniti olmayan hastalar ise AR (-) olarak gruplandırıldı. KOM görülme sıklığı AR (+) ve AR (-) gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Bu çalışma için Harran Üniversitesi etik kurulundan 05,04,2018 tarihli (çalışma numarası: 18-04-32) etik kurul onayı alındı. Tüm gönüllülerden bilgilendirilmiş onam formu alındı. Çalışma Helsinki deklarasyonu uyarınca gerçekleştirildi.

İstatistik analizlerin tümü için SPSS 21,0 versiyonu (IBM, NY, US) kullanıldı. Grupların cinsiyet dağılımları ve kategorik verilerindeki farklılık Fisher's exact test ile, yaşlar arasındaki farklılık ise Student-t test ile değerlendirildi. Sonuçlar yaş için mean  $\pm$  SD, cinsiyet dağılımında ve kategorik değişkenlerde ise %olarak ifade edildi. *p* değerinin  $\leq 0,05$  olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## Bulgular

Çalışma 676 hasta (%59,5 (n=402) kadın, %40,5 (n=274) erkek, ortalama yaş:  $29 \pm 12,3$  yıl, 16–56 yıl arası) üzerinde yapıldı. KOM (+) gruptaki hasta sayısı 182 (%26,9) iken AR (+) gruptaki hasta sayısı 118 (%17,5) idi (Tablo 2).

AR (+) hastaların %69,5'i (n=82) kadın cinsiyete sahip iken, %30,5'i (n=36) erkek cinsiyete sahip idi. Alerjik rinit, kadın cinsiyette istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla görüldü ( $p=0,015$ ) (Tablo 2).

AR (+) gruptaki hastaların %18,6'sı (n=22) KOM (+) grubunda da yer alırken, AR (-) gruptaki hastaların %28,7'si (n=160) KOM (+) grubunda yer almaktadı. Perforasyonlu KOM AR (-) grupta istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla görüldü ( $p < 0,026$ ) (Tablo 2).

## Tartışma

KOM düşük sosyo-ekonomik düzeyli toplumlarda daha sık görülmektedir<sup>12,13</sup>. Prevalansı tüm dünyada %1 ile %46 arasında değişmektedir<sup>14</sup>. Ayrıca KOM'un düşük sosyoekonomik toplumlarda daha fazla görüldüğü,

**Tablo 1.** Alerjik rinit için skor (Score for allergic rhinitis; SFAR)

<b>'Alerjik rinit kronik süperatif otitis media için bir risk faktörü müdür?' çalışması hasta anket formu</b>					
1-	Son 1 yılda grip ve soğuk algınlığı dışında yandaki şikayetlerden birisi oldu mu?	Burun Tıkanıklığı	Evet (...)	Hayır (...)	
		Hapşuruk	Evet (...)	Hayır (...)	
		Burun akıntısı	Evet (...)	Hayır (...)	
* Herbir semptom için 1 puan. Toplam 3 puan			<b>Puan:</b>		
2-	Son 1 yılda bu şikayetlere gözlerde kaşıntı eşlik etti mi?	Evet (...)	Hayır (...)		
* Cevap evet ise 2 puan			<b>Puan:</b>		
3-	Son 1 yılda bu burun şikayetleri hangi aylarda görüldü?	Aralık (...)	Mart (...)	Haziran (...)	Eylül (...)
		Ocak (...)	Nisan (...)	Temmuz (...)	Ekim (...)
		Şubat (...)	Mayıs (...)	Ağustos (...)	Kasım (...)
* Perineal için 1 puan, polen sezonu için 1 puan			<b>Puan:</b>		
4-	Hangi faktörler burun problemlerinizi artırır?	Ev tozları (...)	Polenler (...)	Hayvanlar(Kedivs.) (...)	
* Polenler ve evtozu akarları için 1 puan, varsa hayvanlar için ek 1 puan			<b>Puan:</b>		
5-	Size göre Alerjiniz var mı?	Evet (...)	Hayır (...)		
* Cevap evet ise 2 puan			<b>Puan:</b>		
6-	Daha önceden allerji testi yapıldı mı? (Deri testi, IgE?)	Evet (...)	Hayır (...)		
7-	6. soruya cevabınız evet ise; bu testler pozitif mi çıktı?	Evet (...)	Hayır (...)		
* Cevap evet ise 2 puan			<b>Puan:</b>		
8-	Öncesinde bir doktor tarafından allerji tanısı aldınız mı?	Evet (...)	Hayır (...)		
* Cevap evet ise 1 puan			<b>Puan:</b>		
9-	Ailede allerjik hastalığı olan var mı?	Anne (...)	Baba (...)	Kardeşler (...)	
* Cevap evet ise 2 puan			<b>Toplam Puan:</b>		
10-	Cinsiyetiniz?	Kadın (...)		Erkek (...)	
11-	Yaşınız?	..... Yıl			

**Tablo 2.** Çalışma gruplarının özellikleri

	Toplam	AR (+) % (n)	AR (-) % (n)	P
Hasta Sayısı	676	118	558	
Yaş (Yıl)	29±12,3	30,8±13,9	29,3±11,9	0,228
Cinsiyet				
Kadın	59,5 (402)	69,5 (82)	57,3 (320)	0,015*
Erkek	40,5 (274)	30,5 (36)	42,7 (238)	
KOM (+)	26,9 (182)	18,6 (22)	28,7 (160)	<0,026*
KOM (-)	73,1 (494)	81,4 (96)	71,3 (398)	

\* p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı, Fisher's exact test.  
AR, alerjik rinit.

AR'nin ise gelişmiş toplumlarda daha sık görüldüğü bilinmektedir<sup>12,13,16</sup>. Bu araştırmalar, çalışmamızın da sonucu olan AR'li hastalarda KOM'un daha az görüldüğü bilgisini desteklemektedir.

Yetersiz anne sütü alımı, pasif sigara maruziyeti, biberonla beslenme, kalabalık aile yaşamı ve kötü hijyen gibi bir çok çevresel faktörün KOM etyolojisinde rol oynadığı bilinmektedir<sup>15</sup>. Ancak sunulan çalışmamıza katılan hastalar bu nedenler yönünden sorgulanmadı. Bu durum çalışmamızın bir limitasyonudur.

Literatürde AR'KOM prevalansına etkisi ile ilgili ilişkili sonuçlar bildirildiği görülmektedir. Nemati S ve ark.<sup>3</sup> 62 konik süperatif otitis medialis hastayı, 61 sağlıklı hasta ile AR yönünden karşılaştırmışlar ve AR'si olan hastalarda kronik otitis medianın anlamlı olarak fazla görüldüğünü bildirmişlerdir. Aynı şekilde yapılan diğer bir çalışmada 61 KOM'lu hasta ile 31 sağlıklı bireyden oluşan gruplar karşılaştırılmış ve sonuç olarak AR'nin KOM'lu hastalarda anlamlı olarak daha fazla görüldüğünü bildirilmiştir<sup>4</sup>. Bu çalışmalarda, AR'ye bağlı nazal mukoza konjesyonunun östaki fonksiyonunu bozduğu ve KOM gelişimine zemin hazırladığı belirtilmiştir. Nitekim yapılan bir çalışmada AR'li hastalarda 2 hafta polene maruziyet sonrası östaki disfonksiyonu oranının iki kat arttığı bildirilmiştir<sup>5</sup>. Ancak AR'nin KOM etyolojisinde etkili bir faktör olduğunu savunan bu yayınlara bakıldığında çalışma popülasyonunun oldukça sınırlı olduğu görülmektedir. Bununla birlikte AR'nin intermittan seyri nedeniyle KOM oluşumunda rol oynamadığını savunan çalışmalar da vardır<sup>6,7</sup>. Nitekim, 252 hasta üzerinde yapılan bir çalışmada kronik süperatif otitis medialis hastalarda alerjik rinit sıklığını, sağlıklı grupla aynı olduğu bildirilmiştir<sup>6</sup>. Yine 88 kronik süperatif otitis medialis çocukla 76 kontrol grubu üzerinde yapılan bir çalışmada, atopinin kronik otitis etyolojisinde etkili bir faktör olmadığı bildirilmiştir<sup>7</sup>. Buna karşın sunulan çalışmamızda alerjik rinit sıklığı ile kronik süperatif otitis media sıklığı arasında ters ilişkili olduğu görüldü. Nitekim literatürde çalışmamızın sonucu ile uyumlu olan yayınların daha geniş hasta popülasyonunda yapıldıkları görülmektedir. Korean National Health and Nutrition Examination Survey, 2008–2012 (KNHANES, 2008–2012) verilerinin kullanıldığı bir çalışmada kronik otitis media ile alerjik rinit prevalansı arasında ters ilişki olduğu bildirilmiştir<sup>8</sup>. Aynı şekilde Park M. ve ark.<sup>9</sup> toplam 16 063 hasta üzerinde yaptıkları prevalans çalışmasında, alerjik rinit ile kronik süperatif otitis media arasında negatif bir korelasyon bulunduğunu bildirmişlerdir.

KOM patogeneğinde östaki disfonksiyonu önemli bir rol oynamaktadır. Ancak AR in östaki disfonksiyonuna yol açıp açmadığı henüz netlik kazanmamıştır. Östaki tüpü ve nazofarenks arasındaki yakın anatomik ilişkiden dolayı, genel olarak AR gibi bu bölgede inflamasyona neden olan hastalıkların östaki disfonksiyonuna neden olabileceği düşünülmektedir<sup>17</sup>. Buna karşın yapılan bir çok çalışmada AR in yoğun tedavisi ile nazal semptomların gerilediği ancak otitis medianın gerilemediği bildirilmiştir<sup>18</sup>. Yine AR in intermittan seyri nedeniyle sürekli bir östaki disfonksiyonuna neden olmadığı ve sonuç olarak KOM etyolojisinde rol oynamadığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır<sup>6-7</sup>.

Östaki disfonksiyonu dışında Strachan DP<sup>19</sup> tarafından ileri sürülen 'hijyen hipotezi' nin çalışmamızın sonucu olan AR ile KOM arasındaki negatif ilişkiyi açıklayabileceğini düşünmekteyiz. Bu hipoteze göre, günlük hayatta artan hijyen oranı ve azalmış enfeksiyon maruziyeti ile bağışıklık sistemindeki Th1-Th2 dengesi, Th2 hücreleri lehine bozulmaktadır. Bunun sonucunda humoral immünite aktive olmakta ve kandaki IgE ve eozinofil düzeyleri artmaktadır<sup>20</sup>. Sonuç olarak kişide alerjik hastalıklara yatkınlık oluşmaktadır. Th1 hücreleri, Th2 hücrelerinin doğal dengeleyicisidir ve vücuda giren protozoa ve bakterilerce indüklenmektedir<sup>21</sup>. Enfeksiyon maruziyetinin arttığı durumlarda vücuda giren patojenlerin etkisi ile Th1 hücre sayısı da artmaktadır. Th1 hücre artışı Th2 hücreleri üzerindeki inhibitör etkiyi artırmakta ve kandaki IgE ve eozinofil düzeyleri azalmakta, dolayısıyla kişide alerjik hastalık riski de azalmaktadır<sup>21</sup>. Matricardi PM ve ark.<sup>22</sup> 240 atopik erişkin hastayı, 240 non-atopik kontrol grubu enfeksiyon maruziyeti yönünden karşılaştırmışlar ve erken bebeklik döneminde *Toxoplasma gondii*, *Hepatitis A virus*, ve *Helicobacter pylori* gibi oro-fekal enfeksiyöz ajanlarla karşılaşan bireylerde alerji riskinin daha az olduğunu belirtmişlerdir. Tüm bu bilgiler, çalışmamızın sonucu olarak bulunan kronik süperatif otitis media hastalarında alerjik rinit sıklığının hijyen nedeniyle daha az olduğu sonucunu düşündürmektedir. Bu yönden sunulan çalışmamız hijyen hipotezi ile uyum göstermektedir.

Sonuç olarak AR'li hastalarda KOM normal popülasyona göre daha az sıklıkla saptanmıştır. Bu nedenle AR'in KOM için ek risk oluşturmadığını söylemek daha uygundur. Daha geniş popülasyonda yapılacak prospektif çalışmaların, bu konuya daha fazla katkı sağlayacaktır.

## Kaynaklar

1. Akyıldız, A. N. Kulak Hastalıkları ve Mikrocerrahisi. Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi, 1998, pp 86, 337, 373.
2. Humaid AH, Ashraf AH, Masood KA, Nuha AH, Saleh AD, Awadh AM. Prevalence and risk factors of Otitis Media with effusion in school children in Qassim Region of Saudi Arabia. *Int J HealthSci (Qassim)* 2014;8(4):325–34.
3. Nemati S, Shakib RJ, Shakiba M, Araghi N, Azimi SZ. Allergic rhinitis in adults with chronic suppurative otitis media. *Iranian Journal of Otorhinolaryngology*. Jul 2015;27(4):261–266.
4. Gorgulu O, Ozelci M, Ozdemir S, Yasar M, Olgun MK, Arikan OK. The role of allergy in the pathogenesis of chronic suppurative otitis media. *Journal of International Advanced Otolaryngology* 2012, Vol 8 Issue 2, p276–281 6p.
5. Knight LC, Eccles R, Morris S. Seasonal allergic rhinitis and its effects on eustachian tube function and middle ear pressure. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1992 Aug; 17(4):308–12.
6. Bakhshae M, Rajati M, Fereidouni M, Khadivi E, Varasteh A. Allergic rhinitis and chronic suppurative otitis media. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2011 Jan; 268(1):87–91.
7. Fliss DM, Shoham I, Leiberman A, Dagan R. Chronic suppurative otitis media without cholesteatoma in children in southern Israel: incidence and risk factors. *Pediatr Infect Dis J* 1991 Dec; 10(12):895–9.
8. Heo KW, Kim MJ, Lee JH. Impact of nasal conditions on chronic otitis media: a cross-sectional study in Koreans. *Acta Otolaryngol* 2018 Feb; 138(2):116–121.
9. Park M, Lee JS, Lee JH, Oh SH, Park MK. Prevalence and risk factors of chronic otitis media: the Korean national health and nutrition examination survey 2010–2012. *PLoS One* 2015 May 15;10(5): e0125905.
10. Kim DH, Han K, Kim SW. Relationship Between Allergic Rhinitis and Mental Health in the General Korean Adult Population. *Allergy Asthma Immunol Res* 2016 Jan; 8(1):49–54.
11. Cingi C, Songu M, Ural A, Annesi-Maesano I, Erdogmus N, Bal C, et al. The Score For Allergic Rhinitis study in Turkey. *Am J Rhinol Allergy* 2011;25:333–7.
12. Shaheen MM, Nahar S. Comparison of chronic suppurative otitis media in rural and urban primary school children in Bangladesh. *J Laryngol Otol* 2014 Jun; 128(6):499–503.
13. World Health Organization. Chronic suppurative otitis media; burden of illness and management options. Geneva, Switzerland. World Health Organization 2004;2–83.
14. Guler Y, Ozdamar K, Erdim İ, Sen A, Guler R. Does breastfeeding protect from allergic rhinitis ?. *Praxis of Otorhinolaryngology* 2018;6(1):17–21.
15. Steele RW, Suskind-Liu OL. Contemporary Diagnosis and Management of Otitis Media. Newton: Handbooks in Health Care Co.;2000.
16. De Marco R, Cappa V, Accordini S, Rava M, Antonicelli L, Bortolami O, et al. Trends in the prevalence of asthma and allergic rhinitis in Italy between 1991 and 2010. *European Respiratory Journal* 2012;39:883–892.
17. Lack G, Caulfield H, Penagos M. The link between otitis media with effusion and allergy: a potential role for intranasal corticosteroids. *Pediatr Allergy Immunol* 2011;22(3):258–66.
18. Simpson SA, Lewis R, van der Voort J, Butler CC. Oral or topical nasal steroids for hearing loss associated with otitis media with effusion in children. *Cochrane Database Syst Rev* 2011 May 11;(5): CD001935.
19. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 1989;299:1259–1260.
20. Robinson DS. Th2 cytokines in allergic disease. *Br Med Bull* 2000;56:956–6.
21. Stirling RG, Chung FK. New immunologic approaches and cytokine targets in asthma and allergy. *Eur Respir J* 2000;16:1158–74.
22. Matricardi PM, Rosmini F, Rapicetta M, Gasbarrini G, Stroffolini T. Atopy, hygiene, and anthroposophic lifestyle. San Marino Study Group. *Lancet* 1999;354:43.



# Meme Hastalıkları Miyoma Uteri Birlikteliği

## Breast Diseases and Myoma Uteri Co-Occurrence

Funda Dinç Elibol<sup>1</sup>, Sezen Bozkurt Köseoğlu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Radyoloji Anabilim Dalı; <sup>2</sup>Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Muğla, Türkiye

### ABSTRACT

**Aim:** To evaluate the association between fibrocystic changes of the breast and myoma uteri of which have hormonal factors in their etiology.

**Material and Method:** Between January 2017 to March 2017 a total of 665 consecutive women were retrospectively evaluated. One hundred and four patients having myoma uteri and 84 patients not having myoma uteri proved with imaging techniques, were included in the study. Mammographic breast density, and also whether there were mass, microcalcification, axillary lymphadenopathy or not, and mammographic BI-RADS results were enrolled. Besides, breast type, solid lesions, cysts, multiple cysts, ductal ectasia in ultrasonography and sonographic BI-RADS results were recorded. If it is available, the biopsy results were noted.

**Results:** Mean age of myoma uteri group was 48.6±6.1 and control group was 50.0±8.7 and there was consistency in respect to ages. There was no significant difference in breast density, mass, microcalcification, ductal ectasia, and malignant lesions between the study and control group. Statistically, a significant difference was found in breast cysts between study (% 72.5) and control (% 51.9) group ( $p=0.008$ ).

**Conclusion:** Fibrocystic changes are more common in myoma uteri. It might be helpful in clinical practice to keep in mind this result in management of myoma uteri patients.

**Key words:** fibrocystic changes; breast cysts; myoma uteri

### ÖZET

**Amaç:** Etiyolojisinde hormonal faktörlerin suçlandığı memenin fibrokistik değişiklikleri ve miyoma uteri birlikteliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

**Materyal ve Metot:** Ocak 2017-Mart 2017 tarihleri arasında toplam 665 ardışık kadın hasta geriye dönük tarandı. Görüntüleme bulguları ile miyoma uteri olan 104 ve olmayan 84 hasta çalışmaya dahil edildi. Mamografide meme dansitesi ve ayrıca kitle, mikrokalsifikasyon, aksiller lenfadenopati bulunup bulunmaması, mamografi raporunun BI-RADS sonucu kaydedildi. Ayrıca hastaya ait meme

ultrasonografisinde meme tipi, ultrasonografide solid lezyon, kist, multipl kist, duktal ektazi bulunup bulunmadığı ve BI-RADS sonucu değerlendirildi. Eğer mevcut ise biyopsi sonuçları da kaydedildi.

**Bulgular:** Miyoma uteri grubunda yaş ortalaması 48,6±6,1, kontrol grubunda 50,0±8,7 olup gruplar yaş bakımından uyumlu bulunmuştur. Çalışma ve kontrol grubunda meme dansiteleri, solid kitle, mikrokalsifikasyon, duktal ektazi ve malign lezyon sıklığı, açısından fark bulunmazken, kistler miyoma uteri grubunda (%72,5) istatistiksel olarak kontrol grubuna göre (%51,9) daha sık olarak bulunmuştur ( $p=0,008$ ).

**Sonuç:** Miyoma uteride fibrokistik değişiklikler daha sık görülmektedir. Bu sonucun klinik pratikte miyoma uterili hastaların yönetiminde dikkate alınması faydalı olacaktır.

**Anahtar kelimeler:** fibrokistik değişiklikler; meme kistleri; miyoma uteri

### Giriş

Fibrokistik değişiklikler (FD) memenin en sık görülen benign hastalığıdır<sup>1,2</sup>. Etiyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte progesterona karşı östrojen hakimiyetinin bu hastalığın gelişiminde temel nokta olduğu düşünülmektedir<sup>1,3</sup>. FD, mikro ve makro kistleri adenozis, atipili veya atipisiz epitelyal hiperplazi, apokrin metaplazi, radyal skar ve papillom gibi solid lezyonları içeren bir durumdur<sup>3</sup>. Memenin fibrokistik değişikliklerinde; geç yaşta menapoz, östrojen replasman tedavisi, nüliparite, yüksek sosyal sınıf, düşük vücut kitle indeksi (VKI) artmış risk faktörleri olarak bildirilmektedir<sup>4</sup>. Ayrıca steroid hormonlarının ve oral kontraseptiflerin benign meme hastalıkları ile olan ilişkisi ile ilgili birbiriyle çelişen çalışmalar mevcuttur<sup>5</sup>. Uzun süreli hormon replasman tedavisinde (HRT) ise benign meme lezyonlarının arttığı ve meme kanseri gelişme riskinin arttığı bilinmektedir<sup>5,6</sup>. HRT'nin mamografide meme dansitesini arttırdığı ve daha dens memelerde meme kanseri gelişme riskini daha fazla artırdığı da literatürde bildirilmiştir<sup>6</sup>.

Sezen Bozkurt Köseoğlu, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Muğla, Türkiye, Tel. 0505 259 66 06 Email. drsezenkoseoglu@gmail.com  
Geliş Tarihi: 27.06.2018 • Kabul Tarihi: 21.09.2018

Myometriyumun düz kas kaynaklı monoklonal tümörleri olan 'uterin fibroidler' (leiomyoma, miyom, miyoma uteri) reproduktif çağıdaki kadınlarda %70'lere varan oranlarda görülmektedir<sup>7,8</sup>. Miyoma uteri bulunan kadınların yaklaşık olarak 1/3'ü semptomatiktir<sup>7</sup>. Miyoma uterusunun kesin nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte hormonal, genetik ve büyüme faktörleri gibi predispozan faktörler suçlanmaktadır<sup>7,9</sup>. Hem östrojen hem de progesteron myom gelişimine katkıda bulunmaktadır. Fakat kan östrojen ve progesteron seviyelerinin leiomyomu olan ve olmayan kadınlarda benzer olduğu gösterilmiştir<sup>7-9</sup>. Ayrıca östrojen ve progesteronun reseptörleri; yaşam boyu östrojen maruziyetini artıran obezite, erken menarş gibi durumlar leiomyoma insidansını artırırken, östrojen seviyelerini azaltan egzersiz ve multiparite insidansını azaltmaktadır<sup>9</sup>. Düz kas hücrelerinden ve fibroblastlardan salınan büyüme faktörleri proliferasyonu kontrol ederek myomun büyümesini uyarır<sup>7</sup>.

Myomauterinin görüntülenmesinde en pratik yöntem transvaginal ultrasonografi (USG) olup, büyük lezyonların varlığında pelvik ultrasonografi de kullanılabilir. Manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ise myomların yerleşimi ile ilgili detaylı bilgi sağlayarak, cerraha ameliyat öncesi oldukça yardımcı olur<sup>7</sup>.

Memenin fibrokistik değişiklikleri ve malign hastalıklarında ve ayrıca uterin leiomyomlarda östrojen ve progesteron gibi hormonal nedenler suçlanmaktadır<sup>3,5,7,10</sup>. Hormonal etkilerin önemli olduğu bu iki organın patolojilerinin arasında bağlantı olup olmadığı ile ilgili bilginiz dahilinde literatürde çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle bu çalışmada myomu bulunan ve bulunmayan kadınlarda meme tipleri, memenin fibrokistik hastalıkları, solid lezyonları, sonuç BI-RADS kategorileri arasında fark olup olmadığını değerlendirmeyi amaçladık.

## Materyal ve Metot

Bu kesitsel çalışma Ocak 2017-Mart 2017 tarihleri arasında Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesinde yapıldı. Bu tarih aralığında radyoloji bölümünde mamografi ve/veya meme ultrasonografisi yapılan toplam 655 hasta geriye dönük olarak taranarak abdomen, pelvik ultrasonografi ve/veya abdomen, pelvik magnetik rezonans görüntüleme uterusu uterin leiomyomu olup olmamasına göre 2 gruba ayrıldı. Miyoma uterusu olan 104 hasta çalışma grubunu oluştururken, olmayan 84 hasta ile kontrol grubu oluşturuldu. Miyoma uterusu olan 104 hastanın 24'ünün

meme ultrasonografisi, 7'sinin ise mamografisi yoktu. Kontrol grubundaki hastaların ise 7'sinin meme ultrasonografisi, 4'ünün ise mamografisi yoktu (Şekil 1).

Tüm hastaların geriye dönük olarak mamografisi ve meme ultrasonografisi incelendi. Mamografide meme dansitesi, kitle, mikrokalsifikasyon, aksiler lenfadenopati ve BI-RADS skoru bilgileri, meme ultrasonografisinde ise meme tipi, solid lezyon, kist, multipl kist, duktal ektazi ve BI-RADS skoru bilgileri kaydedildi. Eğer hastaların hastanemizde meme biyopsisi var ise biopsisi sonucu da değerlendirmeye alındı. Mamografi ve meme USG raporları Amerikan Radyoloji derneği 2013 standartlarına göre değerlendirilmiş ve sonuçlandırılmıştır (ACR-BI-RADS: Meme Görüntüleme Raporlama ve Veri Sistemi).

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul onayı alındı (II/02). Verilerin analizi SPSS for Windows 21,0 paket program ile yapıldı. Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uyup uymadığını belirlemek için Shapiro Wilk testi kullanıldı. Sürekli değişken ortalama  $\pm$  standart deviasyon ile, nominal değişkenler ise hasta sayısı yüzde (%) olarak gösterildi. Gruplar arası ortama bakımından farkın önemliliği Student's t testi ile, nominal değişkenler için ki-kare testi ile değerlendirildi.  $p < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

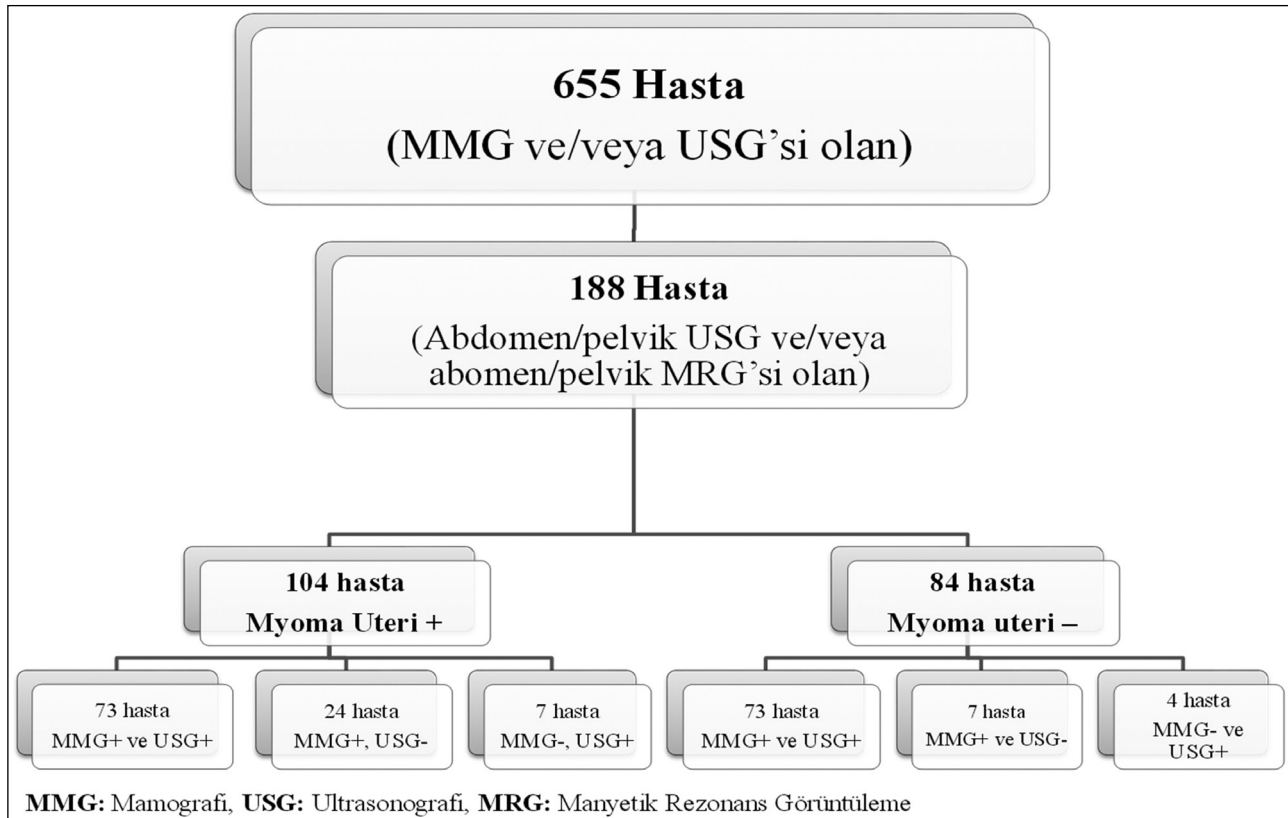
## Bulgular

Miyoma uterusu olan grupta yaş ortalaması  $48,6 \pm 6,1$  iken, kontrol grubunda  $50,0 \pm 8,7$  idi. Gruplar yaş bakımından uyumlu idi ( $p = 0,194$ ).

Meme tipleri meme ultrasonografisinde ACR-BI-RADS kategorilerine tip a, b, c olarak değerlendirilmiş olup bazı raporlarda ise meme tipi değerlendirilirken sadece yaş ile uyumlu olarak belirtilmişti. Grupların meme ultrasonografisindeki meme paternleri Tablo 1'deki gibiydi. Her iki grupta da en sık raporlanan meme paterni 'c' idi. Meme ultrasonografisinde çalışma grubunda en sık saptanan sonuç BI-RADS skoru BI-RADS 2 iken, kontrol grubunda ise BI-RADS 1 idi (Tablo 2).

Çalışma grubundaki hastaların 17'sinde, kontrol grubundaki hastaların ise 24'ünde meme ultrasonografisinde solid lezyon mevcuttu. Miyomlu hastaların 9'unda, miyomu olmayan hastaların ise 7'sinde solid lezyonlar bilateral idi (Tablo 3). Solid lezyon sıklığı bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ( $p > 0,05$ ). Çalışma grubunda





**Şekil 1.** Hasta seçimi, toplam çalışma grubu dağılımı şeması.

**Tablo 1.** Meme ultrasonografisinde meme paternleri

Meme paterni	Çalışma grubu (n=80)	Kontrol grubu (n=77)
a	8 (%10)	11 (%14,1)
b	25 (%31,25)	20 (%25,9)
c	31 (%38,75)	34 (44,15)
Yaş ile uyumlu	16 (%20)	12 (%15,5)

**Tablo 2.** Meme ultrasonografisinde BI-RADS skorları

BIRADS skoru	Çalışma grubu (n=80)	Kontrol grubu (n=77)
BI-RADS 0	1 (%1,25)	0 (%0)
BI-RADS 1	18 (%22,5)	29 (%37,6)
BI-RADS 2	43 (%53,75)	27 (%35,0)
BI-RADS 3	15 (%18,75)	13 (%16,6)
BI-RADS 4a	2 (%2,5)	5 (%6,4)
BI-RADS 4b	0 (%0)	1 (%1,2)
BI-RADS 5	1 (%1,25)	2 (%2,2)

**Tablo 3.** Meme ultrasonografisinde solid lezyon varlığı

	Çalışma grubu (n=80)	Kontrol grubu (n=77)	p değeri
Solid lezyon yok	63 (%78,7)	53 (%68,8)	0,143
Solid lezyon var	17 (%21,3)	24 (%31,2)	
	bilateral: 9	bilateral: 7	
	sol: 3	sol: 6	
	sağ: 5	sağ: 11	

solid lezyon raporlanan 17 hastanın, 14'ü BI-RADS 3, 2'si BI-RADS 4a, 1'i BI-RADS 5, olarak raporlanmıştı. Kontrol grubunda USG'de solid lezyon tanımlanan 24 hastanın 3'ü BI-RADS 2, 13'ü BI-RADS 3, 5'i BI-RADS 4a, 1'i BI-RADS 4b, 2'si BI-RADS 5 olarak sonuç raporu yazılmıştı. Malignite riskleri nedeniyle BI-RADS 4 ve 5 olgulara histopatolojik örnekleme yapılmıştı (Şekil 2). Benign (BI-RADS 2), yüksek olasılıkla benign olarak raporlanan (BI-RADS 3) veya biyopsi ile benign tanı alan olguların sayısı çalışma grubunda 16, kontrol grubunda 20'ydü (Şekil 2).

Meme ultrasonografisinde kistlerinin mevcut olup olmadığı ve yönü raporlar doğrultusunda kaydedildi. Eğer kistler birden fazla ise multipl olarak değerlendirildi ve kaydedildi. Gruplarda meme ultrasonografisindeki kist, multipl kist ve duktal ektazi dağılımları Tablo 4'deki gibi izlenmektedir. Miyoma uterisi olan hastalarda memede kist ve multipl kist daha sık olarak tespit edildi ve sıklık istatistiksel olarak anlamlı idi ( $p=0,008$ ,  $p=0,014$ , sırasıyla). Çalışma ve kontrol grubunda kist saptanan olguların sırasıyla %91,4'ünde ve %90'ında kistlerin multipl olduğu saptandı. Çalışma grubunda kist olan hastaların 49'unda, kontrol grubundaki hastaların ise 35'inde kistler bilateraldi.

Meme tipleri mamografide ACR-BI-RADS tip a, b, c olarak değerlendirilmiştir. Mamografide uterin leiomyomu olan ve olmayan hastalarda en sık görülen meme tipi 'c', en seyrek görülen meme tipi ise 'd' idi (Tablo 5). Çalışma grubundaki hastaların %12,3'ünde, kontrol grubundaki hastaların %25'inde mamografide kitle izlendi. Kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha sık olarak memede kitle izlendi ( $p=0,030$ ). Her iki grupta kitle en sık sağ memede izlendi (Tablo 6). Mamografide kitle tanımlanan çalışma grubunda 12 olgudan 1'inde invaziv meme kanseri histopatolojik olarak gösterilmişken, kontrol grubunda ise 20 olgudan 4'ü invaziv meme kanseri tanısı almıştır. Kontrol grubunda ayrıca biyopsi yapılan olgulardan 3'ü de patolojik olarak fibroadenom tanısı almıştır (Şekil 3).

Çalışma grubunda mamografide kitle saptanan olguların %8,3'ü, kontrol grubunda ise %20'sinde malignite saptanmıştır. Miyoma uterisi olan hastaların 7'sinde, olmayan hastaların 5'inde memede mikrokalsifikasyon izlendi (Tablo 7). Mikrokalsifikasyon sıklığı açısından gruplar arasında anlamlı farklılık izlenmedi ( $p=0,799$ ). Çalışma grubundaki hastaların hiçbirinde aksillerlenfadenopati izlenmedi. Kontrol grubunda ise sadece 2 hastada aksiller lenfadenopati mevcuttu. Mamografide

sonuç BI-RADS skorları açısından grupların dağılımı ise Tablo 8'deki idi. Her iki grupta da en sık sonuç BI-RADS 1 olarak raporlanmıştı.

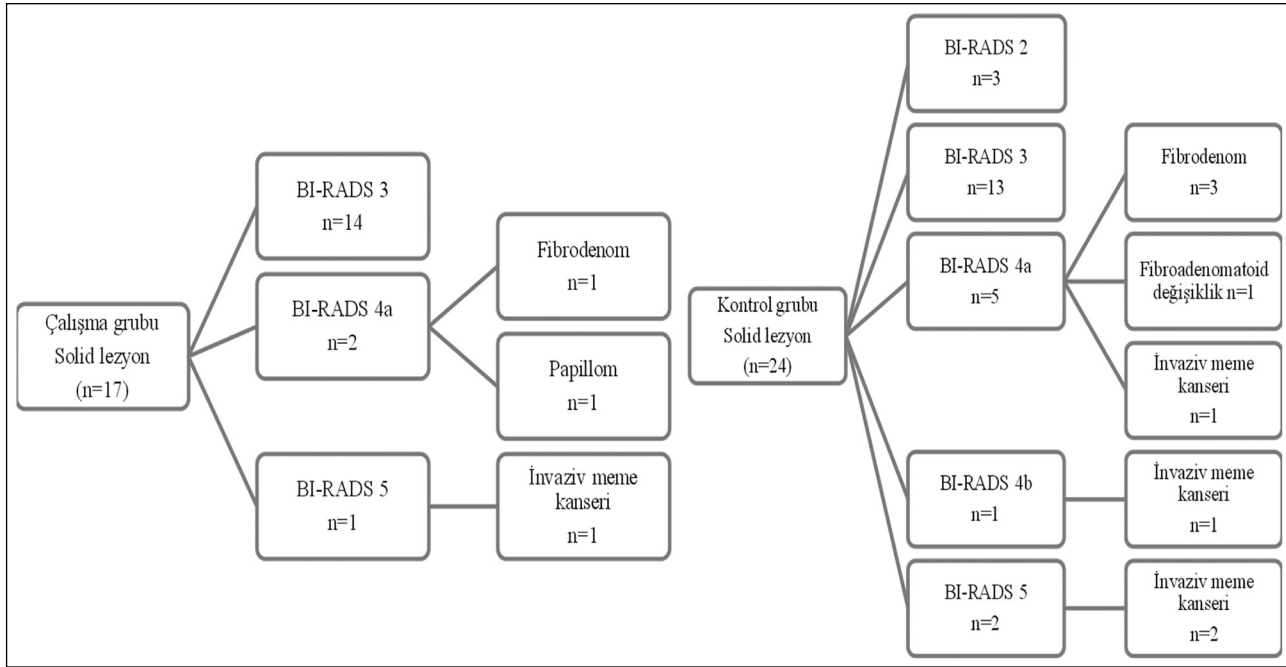
Çalışma grubunda toplam 7, kontrol grubundan ise 10 hastaya meme biopsisi yapılmış idi. Çalışma grubunda 1 invaziv meme kanseri, kontrol grubunda 4 invaziv meme kanseri olgusu vardı.

## Tartışma

Meme ve uterus hormon duyarlı organlardır. Bu çalışma ile uterin leiomyomu olan olgularda memede kistlerin ve multiple kistlerin sıklığını artmış olarak bulduk. Literatürde HRT ile meme dansitesinde artış ve meme dansitesinde artış ile meme kanseri riskinde artış bildirilmiştir<sup>10</sup>. Ayrıca foliküler östrojen değerleri ile premenapozal kadınlarda mamografik meme dansitesi arasında ilişki olduğu gösterilmiştir<sup>11,12</sup>. Fakat bizim çalışmamızda myom grubu ile kontrol grubunda meme dansiteleri arasında anlamlı bir fark saptamadık.

Bir diğer endokrin organ olan tiroid hastalıkları ile memenin benign kistik hastalıkları birlikteliği ve hatta memenin malign hastalıkları ile birlikteliğiyle<sup>13</sup> ilgili yapılmış çalışmalar mevcut iken çalışmamız miyoma uteri ile memenin kistik hastalık birlikteliğinin değerlendirildiği ilk çalışmadır<sup>12,13</sup>. Bu çalışma ile memenin kistik hastalıklarının normal popülasyondan istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde fazla olduğunu saptadık. Bu miyoma uterisi olan hastaların yönetiminde önem arz edebilecek bir durum olup, kadın doğum kontrolünde saptandığı durumlarda da memenin kistik hastalıkları açısından değerlendirme yapılabilir ve hastalar bu konuda bilgilendirilebilir.

Progesteron-östrojen imbalansı ile giden polikistik over sendromunda hiperandrojeneminin FD gelişiminden koruyucu bir faktör olduğu gösterilmiştir<sup>14</sup>. Östrojen predominansı ve progesteron yetersizliğine bağlı geliştiği düşünülen, bağ dokuda hiperproliferasyon ile seyreden fibrokistik değişiklikler 40'lı yaşların başında progrese olurken postmenapozal dönemde ise azalır<sup>15</sup>. FD olan olgularda meme kanseri riskinin 2-4 kat arttığı ve gelişen epitelyal hiperplazi ile ilişki olabileceği düşünülmektedir<sup>15,16</sup>. Bizim çalışmamızda ise miyom grubunda FD daha sık görülürken, meme kanseri ise kontrol grubunda daha sık olarak görülmüştür. Bu durum kontrol grubunda bulunansemptomatik olan ya da referans merkezi olarak hastanemize gönderilen hastalar nedeniyle olabilir.



**Şekil 2.** Solid lezyon rapor edilen çalışma ve kontrol grubunun BI-RADS sonuçlarına göre dağılımı.

**Tablo 4.** Meme ultrasonografisinde kist, multiple kist ve duktal ektazi dağılımları

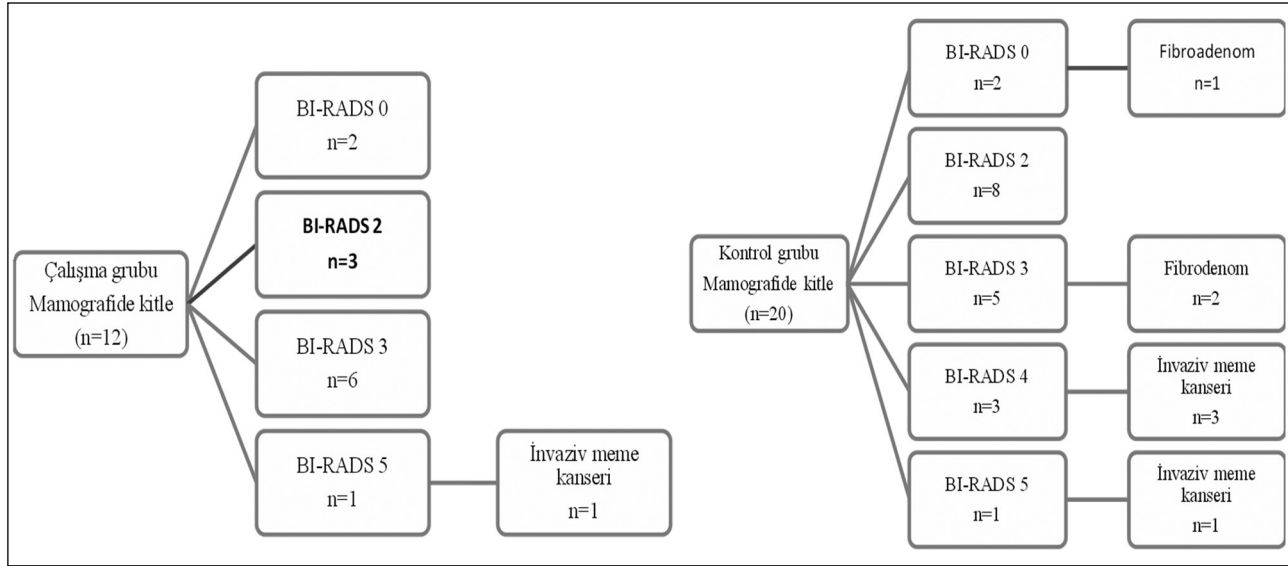
		Çalışma grubu (n=80)	Kontrol grubu (n=77)	p değeri
Kist	var	58 (%72,5)	40 (%51,9)	0,008
	yok	22 (%27,5)	37 (%48,1)	
Multipl kist	var	53 (%66,25)	36 (%46,75)	0,014
	yok	27 (%33,75)	41 (%53,25)	
Duktal ektazi	var	4 (%3,75)	1 (%1,2)	0,187
	yok	76 (%96,25)	76 (%98,8)	

**Tablo 5.** Mamografide meme tipleri

Meme tipi	Çalışma grubu (n=97)	Kontrol grubu (n=80)
a	13 (%13,5)	19 (%23,75)
b	29 (%29,8)	16 (%20)
c	47 (%48,5)	40 (%50)
d	8 (%8,2)	5 (%6,25)

**Tablo 6.** Mamografide kitle varlığı

	Çalışma grubu (n=97)	Kontrol grubu (n=80)	p değeri
Kitle yok	85 (%87,7)	60 (%75)	0,030
Kitle var	12 (%12,3)	20 (%25)	
	bilateral: 4	bilateral: 3	
	sol: 3	sol: 7	
	sağ: 5	sağ: 10	



Şekil 3. Mamografide kitle tanımlanan olguların BI-RADS sonuçları ve patolojik sonuçlarının dağılımı.

Tablo 7. Mamografide mikrokalsifikasyon varlığı

	Çalışma grubu (n=97)	Kontrol grubu (n=80)	p değeri
Mikrokalsifikasyon yok	90 (%92,7)	75 (%93,75)	0,799
Mikrokalsifikasyon var	7 (%7,3)	5 (%6,25)	

Tablo 8. Mamografide BIRADS skorları dağılımı

	Çalışma grubu (n=97)	Kontrol grubu (n=80)
BI-RADS 0	3 (%3,1)	9 (%11,2)
BI-RADS 1	69 (%71,1)	46 (%57,4)
BI-RADS 2	12 (%12,3)	13 (%16,2)
BI-RADS 3	11 (%11,3)	8 (%10)
BI-RADS 4	1 (%1,1)	1 (%0,8)
BI-RADS 4b	0 (%0)	1 (%0,8)
BI-RADS 4 c	0 (%0)	1 (%0,8)
BI-RADS 5	1 (%1,1)	1 (%0,8)

Memenin solid lezyonları histopatolojileri bakımında papillom, fibroadenom gibi benign tümörlerden, malignfilloides, invaziv meme kanserleri gibi oldukça heterojen bir gruptur<sup>17</sup>. Bizim çalışma grubumuzda malign tanı alan ve solid lezyonu bulunan hasta sayısı az olduğundan bu yönde değerlendirme yapılamadı. Bu çok geniş yelpazedeki solid lezyonların gelişiminde çok farklı patogenezeleler mevcut olup myoma uteri olan ve olmayan gruplarda bu malign veya benign olabilecek solid lezyonların görülme sıklıkları ve farklılık olup

olmadığının değerlendirilmesi için çok geniş serili çalışmalara ihtiyaç vardır.

En sık memede görülmekle birlikte fibroadenomlar meme dışı lokalizasyonlarda da görülebilir. Jinekolojik kökenli olarak vulvada fibroadenomu bulunan ve memede fibroadenomu ve myoma uteri olan vaka bildirilmiştir. Fibroadenomlardaki hormonal resptör düzeylerinin belirlenmesinin önemli olduğu belirtilen bu yazıda fibroadenom tedavisinde tamoksifen

kullanılmıştır<sup>18</sup>. Fibroadenomlar sıklıkla sonografik ve mamografik olarak BI-RADS 3 lezyonlar olarak tanımlandıkları için sıklıkla biyopsi yapılmadan takip edilirler. Bizim çalışmamızda da BI-RADS 3 lezyonlara biyopsi yapılmamış olup miyoma uteri grubu ve kontrol grubunda fibroadenomlar açısından fark olup olmadığı değerlendirilememiştir. Memede sık karşılaşılan fibroadenomların fibroidlerle olan birlikteliğinin değerlendirilmesi açısından geniş serili çalışmalara ihtiyaç vardır.

Mamografide kitle raporlanması yönünden kontrol grubunda (%25), çalışma grubuna (%12,3) göre istatistiksel olarak anlamlı daha fazla kitle saptanmıştır. Bu kontrol grubunun tarama popülasyonu yanı sıra ele gelen kitle gibi nedenlerle mamografi yapılan hastalardan oluşması nedeniyle olabilir. Ayrıca mamografide kitle saptanan olguların çalışma ve kontrol grubu olarak sırasıyla %8,3'ü ve %20'sinde malignite saptanmıştır. Çalışma grubunda mamografik kitlesi olanlarda daha az malignite izlenmesi, bu grupta daha fazla fibrokistik değişiklik izlenmesi ve buna bağlı kistler ve benign solid lezyonların da malignler gibi mamografide kitle şeklinde görülmesine bağlı olabilir.

Sonuç olarak, miyoma uteride fibrokistik değişikliklerin daha sık görülmesi, klinik pratikte leiomyomlu hastaların takibi ve yönetiminde önem arz edebilir. Miyoma uteri tespit edilen olgularda meme kistlerine yönelik değerlendirme gerekebileceğini akılda tutmak gerekir. Fibrokistik değişiklikler ve miyoma uteri arasında ilişkinin daha iyi anlaşılabilmesi daha geniş popülasyonlu ve prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır.

## Kaynaklar

1. Wu C1, Ray RM, Lin MG, Gao DL, Horner NK, Nelson ZC et al. A case-control study of risk factors for fibrocystic breast conditions: Shanghai Nutrition and Breast Disease Study, China, 1995–2000. *Am J Epidemiol* 2004;160(10):945–60.
2. Mannello F, Tonti GAM, Papa S. Human gross cyst breast disease and cystic fluid: bio-molecular, morphological, and clinical studies. *Breast Cancer Res Treat* 2006;97(2):115–29.
3. Talaei A, Moradi A, Rafei F. The evaluation of the effect of metformin on breast fibrocystic disease. *Breast Dis* 2017;37(2):49–53.
4. Gadducci A, Guerrieri ME, Genazzani AR. Benign breast diseases, contraception and hormone replacement therapy. *Minerva Ginecol* 2012;64(1):67–74.
5. Azam S, Lange T, Huynh S, Aro AR, von Euler-Chelpin M, Vejborg I, et al. Hormone replacement therapy, mammographic density, and breast cancer risk: a cohort study. *Cancer Causes Control* 2018 Apr 18.
6. Parker WH. Etiology, symptomatology, and diagnosis of uterine myomas. *Fertil Steril* 2007;87(4):725–36.
7. Cramer SF, Patel A. The frequency of uterine leiomyomas. *Am J Clin Pathol* 1990;94(4):435–8.
8. Flake GP, Andersen J, Dixon D. Etiology and pathogenesis of uterine leiomyomas: a review. *Environ Health Perspect* 2003;111(8):1037–54.
9. Yenen MC, Dede M, Goktolga U, Kuçuk T, Pabuçcu R. Hormone replacement therapy in postmenopausal women with benign fibrocystic mastopathy. *Climacteric* 2003;6(2):146–50.
10. Mellissa YongCharlotte AtkinsonKatherine M. NewtonErin J. Aiello BowlesFrank Z. Stanczyk et al. Associations between endogenous sex hormone levels and mammographic and bone densities in premenopausal women. *Cancer Causes Control* 2009;20(7):1039–53.
11. Bertrand KA, Eliassen AH, Hankinson SE, Rosner BA, Tamimi RM. Circulating Hormones and Mammographic Density in Premenopausal Women. *Horm Cancer* 2018;9(2):117–27.
12. Anil C, Guney T, Gursoy A. The prevalence of benign breast diseases in patients with nodular goiter and Hashimoto's thyroiditis. *J Endocrinol Invest* 2015;38(9):971–5.
13. Giustarini, E., Pinchera, A., Fierabracci, P., Roncella, M., Fustaino, L., Mammoli, C., et al. Thyroid autoimmunity in patients with malignant and benign breast diseases before surgery. *European journal of endocrinology*, 154(5), 645–649.
14. Ozkaya, E., Cakir, E., Cinar, M., Kara, F., Baser, E., Cakir, C., et al. (2012). Is hyperandrogenemia protective for fibrocystic breast disease in PCOS?. *Gynecological Endocrinology*, 28(6), 468–471.
15. Vorherr H. Fibrocystic breast disease: pathophysiology, pathomorphology, clinical picture, and management. *Am J Obstet Gynecol* 1986;154(1):161–79.
16. Habor V, Habor A, Copotoiu C, Panțiru A. Fibrocystic breast disease--breast cancer sequence. *Chirurgia* 2010;105(2):191–4.
17. Meisner ALW, Houman Fekrazad M, Royce ME. Breast Disease: Benign and Malignant. *Med Clin North Am* 2008;92(5):1115–41.
18. Audisio T, Crespo-Roca F, Giraudo P, Ramallo R. Fibroadenoma of the vulva- simultaneous with breast fibroadenomas and uterine myoma. *J Low Genit Tract Dis* 2011;15(1):75–9.



# Mesane Kanseri Nedeniyle Transüretal Rezeksiyon Yapılan 177 Olgunun Retrospektif Analizi

## Retrospective Analysis of 177 Cases Treated with Transurethral Resection

Erkan Hirik<sup>1</sup>, Mecdi Gürhan Balcı<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı; <sup>2</sup>Patoloji Anabilim Dalı, Erzincan, Türkiye

### ABSTRACT

**Aim:** Bladder cancers are the ninth most common malignancies in the world. These are the most common malignancies of the urinary tract. The most common histological type of this cancer is urothelial cell carcinoma. It has very high rates of recurrence and invasion. The aim of this study is to evaluate the results of bladder TUR and re-TUR cases in terms of invasion and histological grade, to share the results with the literature, to determine the prognosis of patients and to contribute to the clinical follow-up and treatment.

**Material and Method:** Pathology archive of Erzincan Binali Yıldırım University was used in this study. Cases with urothelial carcinoma of the bladder were included in the study. A total of 177 cases who underwent bladder TUR between 2013–2018 were examined. Sections from the paraffin blocks of these cases were evaluated with Hematoxylin-Eosin staining. Re-TUR results were compared with the first TUR diagnosis.

**Results:** 153 of the patients were male and 24 were female. In 103 cases, the tumor was high-grade and 74 patients had low-grade tumor. Sixty-six cases had non-invasive urothelial carcinoma. Lamina propria invasion was detected in 102 cases and muscularis propria invasion in 9 cases. 46 (26%) cases had a recurrence. Recurrence rates were significantly higher in the cases with high-grade tumor and in the invasive cases. 3 (27.2%) of the recurrent 11 low-grade cases had a high-grade tumor in the recurrence material. The invasion was detected in 2 (18.2%) of 11 noninvasive cases.

**Conclusion:** Bladder TUR and re-TUR results were shared with the literature. It was emphasized that if there is invasion and histological grade changes in the recurrence and the first TUR diagnosis, treatment and follow-up of patients should be re-planned.

**Key words:** bladder; transurethral resection; urothelial carcinoma; recurrence

### ÖZET

**Amaç:** Dünyada en sık görülen kanserler arasında dokuzuncu sırada yer alan mesane kanserleri, üriner sistemin en sık görülen maligniteleridir. 60 yaşın üzerinde ve erkeklerde daha sık görülürler. En sık görülen belirtisi hematuridir. En sık görülen histopatolojik

tipi ürotelyal hücreli karsinomlardır. Oldukça yüksek rekürrens ve invazyon oranlarına sahiptirler. Mesane kanseri nedeniyle transüretal rezeksiyon (TURM) yapılan hastalar ilk iki yıl boyunca en az üç-dört ayda bir, sonraki üç yıl boyunca her altı ayda bir, daha sonra yılda bir defa klinik/sistoskopik olarak takip edilirler. Çalışmanın amacı, mesane tümörü tanısıyla TURM uygulanan vakaları ve bu vakaların nüks materyallerindeki re-TUR sonuçlarını invazyon ve histolojik grade açısından karşılaştırmalı olarak değerlendirmek, sonuçları literatürle paylaşmak, hastaların prognozunun belirlenmesine, klinik takibi ve tedavisine katkı sağlamaktır.

**Materyal ve Metot:** Çalışmada üniversitemizin patoloji arşivi kullanıldı. Mesane ürotelyal karsinom tanısı alan vakalar çalışmaya dahil edildi. 2013–2018 tarihleri arasında mesane tümörü tanısıyla TURM yapılan 177 olgu incelendi. Bu olguların parafin bloklarından alınan kesitler Hematoksilen-Eozin boyamayla değerlendirildi. İlk doku teşhisi ile re-TUR sonuçları karşılaştırıldı.

**Bulgular:** Hastaların 153'ü erkek, 24'ü kadındı. Histopatolojik olarak 103 olguda yüksek dereceli, 74 olguda düşük dereceli ürotelyal karsinom mevcuttu. 66 vakada noninvaziv ürotelyal karsinom mevcuttu. 102 vakada lamina propria invazyonu, 9 vakada muscularis propria invazyonu saptandı. 46 (%26) vakada nüks olduğu saptandı. Tümör histolojik grade'i yüksek olan vakalarda ve invaziv vakalarda nüks oranları istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti. Nüks eden 11 düşük grade'li vakanın 3 (%27,2) tanesinde rekürrens materyallerinde yüksek grade'li tümör saptandı. Nüks eden 11 noninvaziv vakanın 2 (%18,2)'sinde invazyon saptandı.

**Sonuç:** Mesane TURM ve re-TUR sonuçları literatürle paylaşıldı. İlk doku teşhisi ile nüks materyalinde invazyon varlığı ve histolojik grade değişiklikleri mevcutsa, hastaların tedavi ve takibinin yeniden planlanması gerektiği vurgulandı.

**Anahtar kelimeler:** mesane; transüretal rezeksiyon; ürotelyal karsinom; rekürrens

### Giriş

Batıda en sık görülen kanserler arasında beşinci, dünyada dokuzuncu sırada yer alan mesane kanserleri, üriner sistemin en yaygın maligniteleridir. İnsidansı yılda 400,000'den fazladır<sup>1,2</sup>. Erkeklerde görülme oranı kadınlara göre daha yüksektir. Tütün kullanımı en

Erkan Hirik, Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Erzincan, Türkiye, Tel. 0505 232 58 64 Email. ehirik@gmail.com  
Geliş Tarihi: 25.10.2018 • Kabul Tarihi: 04.12.2018

önemli predispozan faktördür. En sık görülen belirtisi hematuridir. Yaşlı kişilerde daha yaygındır, ancak her yaşta ortaya çıkabilirler<sup>3</sup>. Mesane kanseri insidansı yılda 400 000'den fazladır ve bu hastalıktan yılda yaklaşık 165 000 kişi ölmektedir<sup>4</sup>. Transüretral rezeksiyon (TUR) mesane tümörlerinde tanı, evreleme ve tedavi için kullanılan temel cerrahi yöntemdir<sup>5</sup>.

Mesane kanserlerinin yaklaşık %90'ı ürotelyal hücreli karsinomlardır. Başlangıçta %70–80 oranında mukozaya veya submukozada sınırlıdır<sup>6,7</sup>. Mesane kanserlerinde invazyonun varlığı en önemli prognostik parametredir. Tümörün agresif yapısına bağlı olarak yüksek rekürrens ve invazyon oranlarına sahiptirler<sup>8,9</sup>. Kanser hücreleri mesane detrusor kası invaze ettiğinde kas invaziv mesane kanseri teşhisi konulur<sup>10</sup>. Başlangıçta noninvazif teşhisi konan mesane kanserlerinin %20 kadarı yaklaşık 5 yıl içinde invaziv kansere dönüşmektedir<sup>11</sup>.

Mesane kanserlerinde klinik seyri öngörebilme açısından farklı moleküler ve immünohistokimyasal çalışmalar bulunsa da rekürrens ve progresyonu tahmin etmede en sık European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) nin skorlama ve risk tablosu kullanılmaktadır. Hastaların takip ve tedavisini belirlerken klinisyenler tümör çapı, grade'i ve evresi gibi prognostik parametreleri göz önünde bulundurmaktadırlar<sup>12</sup>.

Çalışmanın amacı, mesane TUR vakaları ve bu vakaların re-TUR sonuçlarını invazyon ve histolojik grade açısından karşılaştırmak, sonuçları literatürle paylaşmak, hastaların prognozunu belirlemesine, klinik takibi ve tedavisine katkı sağlamaktır.

## Materyal ve Metot

Çalışmada 2013–2018 tarihleri arasında Erzincan Üniversitesi Mengücekgazi Eğitim ve Araştırma Hastanesinde mesane ürotelyal karsinom tanısı alan

177 mesane TUR vakası retrospektif olarak değerlendirildi. Mesane ürotelyal karsinom tanısı alan vakalar çalışmaya dahil edildi. Çalışma için Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi klinik araştırmalar etik kurul başkanlığından; 06/11/2018 tarih ve 33 sayılı oturumda 33/11 sayılı etik kurul kararı alınmıştır. Olguların parafin bloklarından alınan 4 mikronluk kesitler Hematoksilen-Eozin boyamayla değerlendirildi. İlk doku teşhisi ile re-TUR sonuçları karşılaştırıldı.

Hastalar cinsiyete göre erkek ve kadın olarak 2 gruba ayrıldı. Tümör histopatolojik olarak düşük grade'li ve yüksek grade'li olarak 2 grupta incelendi. İnvazyon varlığına göre vakalar: non invaziv, lamina propria invazyonu mevcut, muskularis propria invazyonu mevcut şeklinde 3 grupta sınıflandırıldı.

Kontrol biyopsilerinde nüks saptanan olgular ilk tanılarıyla invazyon ve histolojik grade açısından karşılaştırıldı. İstatistiksel olarak veriler SPSS 20,0 programı kullanılarak analiz edildi. Grupları karşılaştırmak için Student t testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık değeri  $p \leq 0,050$  olarak belirlendi.

## Bulgular

Hastaların 153'ü erkek, 24'ü kadındı. Yaş aralığı 31–86, ortalama yaş: 66,91, en sık hastalık görülme yaş aralığı: 60–70 olarak saptandı. Tümör diferansiyasyon derecesine göre değerlendirmede, 103 olguda tümör yüksek dereceli, 74 olguda düşük dereceliydi. İnvazyon varlığına göre değerlendirmede, 66 vakada tümör mukozada sınırlı olup noninvaziv'di. 102 vakada lamina propria invazyonu, 9 vakada muskularis propria (kas tabakası) invazyonu mevcuttu. Vakaların cinsiyete göre dağılımı, histolojik grade ve invazyonun değerlendirilmesi Tablo 1'de özetlenmiştir.

Olguların yaklaşık 5 yıllık takiplerinde 46 (%26) vakada nüks olduğu saptandı. Nüks olan vakaların

**Tablo 1.** Vakaların cinsiyete göre dağılımı, histolojik grade ve invazyonun değerlendirilmesi

	Mesane tur	Noninvaziv	L. Propria invazyonu+	M. Propria invazyonu+	Düşük gradeli	Yüksek gradeli
Kadın	24 (%13,6)	9 (%5,1)	13 (%7,4)	2 (%1,1)	9 (%5,1)	15 (%8,5)
Erkek	153 (%86,4)	57 (%32,2)	89 (%50,2)	7 (%4,0)	65 (%36,7)	88 (%49,7)
Toplam	177 (%100)	66 (%37,3)	102 (%57,6)	9 (%5,1)	74 (%41,8)	103 (%58,2)

35 tanesi ilk tanısı yüksek grade'li olan 103 vakanın olduğu gruba aitti, bu grupta nüks oranının %33,9 olduğu görüldü. Nüks eden 11 vaka ilk tanısı düşük grade'li mesane ürotelyal karsinom tanısı almış olan 74 hastanın olduğu gruba aitti, bu grupta nüks oranının %14,8 olduğu görüldü. İlk doku tanısı düşük grade'li olan ve nüks eden 11 vakanın 3 (%27,2) tanesinde rekürrens materyallerinde yüksek grade'li tümör saptandı. İstatistiksel olarak tümör histolojik grade'i ve nüks arasında anlamlı ilişki bulunmuştur ( $p<0,050$ ).

Nüks eden olguların 11 (%23,9) tanesi ilk doku tanısı noninvaziv olan ve kontrol biyopsilerinde 2 (%18,2) tanesinde invazyon saptanan 66 olguya aitken, 36 (%76,1)'si ilk doku tanısı invaziv ürotelyal karsinom olan vakalara aitti. İstatistiksel olarak invazyon varlığı ve nüks oranları arasında anlamlı ilişki bulunmuştur ( $p<0,050$ ).

## Tartışma

Mesane tümörleri için yapılan TUR'un temel amacı; görünür tümörün tamamının çıkarılmasını sağlamak, tümörün invazyon derinliğini belirlemek, dokuların histopatolojik incelenmesi sonucu tümörün histopatolojik tipinin ve derecesinin belirlenmesi, displazi veya karsinoma in situ alanlarının belirlenmesini sağlamaktır<sup>5,13</sup>.

Mesane kanserleri oldukça sık rekürrens gösteren tümörler olduğundan yakın klinik takip gerektirirler. Mesane kanseri nedeniyle TUR yapılan hastalar ilk 2 yıl boyunca en az üç-dört ayda bir, sonraki 3 yıl boyunca her altı ayda bir ve daha sonra yılda bir kez olmak üzere klinik/sistoskopik olarak takip edilmelidirler<sup>14</sup>.

Mesane kanserli hastalarda invazyon, nüks ve progresyonun belirlenmesi TUR sonrası tedavi stratejilerinin belirlenmesi için önemlidir<sup>15,16</sup>. TUR sonrasında erken dönemde nüks görülmesi tümörün gelecekteki nüks ve progresyonu için önemli bir risk faktörüdür. TUR'da tümörün tamamının çıkarılması nüks görülme oranını azaltmak ve progresyonu için hayati derecede önemlidir. Tümörün histolojik grade'inin yüksekliği ve evresi gibi risk faktörlerinin yanı sıra erken dönemde görülen nükslerin önemli nedenlerinden bir tanesi de TUR'un ve operasyon sonrası tedavinin yetersiz yapılmasıdır<sup>17</sup>. Kliniğimizde TURM yapılan, tümör çapı 3 cm'nin üzerinde olan ve multiodaklı olan olgulara postoperatif ilk 6 saatlik dönemde intravezikal kemoterapi

(mitomisin), yüksek grade'li tümörlere intravezikal immunoterapi (BCG) uygulanmaktadır.

Mesane kanseri nedeniyle ameliyat olan hastalarda invazyon varlığı hastaların prognozunu kötüleştiren en önemli parametredir. Yaklaşık %70 oranında ilk tanıda tümör mukozada sınırlı ve noninvazivdir, noninvazif kanser teşhisi alan vakaların %20 kadarı invaziv kansere dönüşebilmektedir<sup>6,7,11,18</sup>. Bu çalışmada hastalar yaklaşık 5 yıl takip edilmiş olup; literatürle uyumlu olarak vakaların %26'sinde nüks saptanmıştır, en erken nüks altıncı ayda görülmüştür. İlk teşhisinde noninvaziv kanser belirlenen vakaların nüks materyallerinde %18,2 oranında invazyon varlığı saptanmıştır.

İnvazyon dışında, nüks varlığı, tümör boyutunun 3 cm'nin üzerinde olması, çok sayıda tümöral odak varlığı, mesane tümörünün histopatolojik olarak yüksek dereceli olması prognozu kötüleştiren diğer önemli parametreler olup, nüks materyallerinde ilk tanıya göre grade farklılıkları görülebilmektedir<sup>16</sup>. Bu çalışmada ilk teşhisi düşük dereceli olan ve nüks eden tümörlerin %27,2'sinde nüks materyallerindeki tümörün yüksek dereceli olduğu görülmüştür.

Mesane kanserlerinde prognozu ve tedavi şeklini belirlemede invazyon varlığı oldukça önemli olduğundan, tanının doğru konulması için kas dokusunu da içeren örnekleme yapılması, TUR materyallerinin tamamının takibe alınarak incelenmesi gerekmektedir. Mesane kanserleri nüksleri oldukça sık olan tümörler olduğundan yakın klinik takip, nüks materyallerindeki prognostik parametrelerin ilk tanıyla karşılaştırılarak değerlendirilmesi takip ve doğru tedavi şeklini belirlemek için önemlidir.

Sonuç olarak mesane tümörleri rekürrensleri oldukça sık olan tümörler olup invazyon varlığında ve histolojik olarak yüksek grade'li tümörlerde nüks oranlarının daha yüksek olduğu, ilk tanı ve nüks materyallerinde invazyon ve histolojik grade açısından farklılıklar olabileceği, nüks eden vakalarda invazyon varsa veya tümör grade'inde yükselme mevcutsa, hastalarda tedavi ve takibin yeniden planlanmasının, hastaların prognozunda ve yaşam sürelerini uzatmada faydalı olacağı vurgulandı.

Mevcut çalışmamızın kısıtlılıkları arasında başlıca; hasta sayısının nispeten az olması, geriye dönük bir çalışma olması, postoperatif tedavi uygulanan ve uygulanmayan olguların kayıt edilmemesi bulunmaktadır.



## Kaynaklar

1. Ploeg M, Aben KK, Kiemeny LA. The present and future burden of urinary bladder cancer in the world. *World J. Urol* 2009;27:289–93.
2. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 2013;63:11–30.
3. Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, Znaor A, Jemal A, Bray F. Bladder cancer incidence and mortality: a global overview and recent trends. *Eur Urol* 2017;71:96–108.
4. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61:69–90.
5. Herr HW, Donat SM. Quality control in transurethral resection of bladder tumours. *BJU Int* 2008;102:1242–6.
6. Kaufman DS, Shipley WU, Feldman AS 2009. Bladder cancer. *Lancet* 2009;374:239–49.
7. Wallace DMA, Bryan RT, Dunn JA, Begum G, Bathers S 2002. Delay and survival in bladder cancer. *BJU Int* 2002;89:868–78.
8. Yun SJ, Kim WJ. Role of the epithelial-mesenchymal transition in bladder cancer: From prognosis to therapeutic target. *Korean J Urol* 2013;54:645–50.
9. Montie JE, Abrahams NA, Bahnson RR, Eisenberger MA, El-Galley R, Herr HW, et al. Bladder cancer. Clinical guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 2006;4:984–1014.
10. Babjuk M, Böhle A, Burger M, Capoun O, Cohen D, Comperat EM, et al. EAU Guidelines on Non-Muscle-invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder: Update 2016. *Eur Urol* 2017;71:447–61.
11. Black PC. Fine-tuning risk stratification for non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol* 2016;69:70–1.
12. Bertz S, Otto W, Denzinger S, Wieland WF, Burger M, Stohr R, et al. Combination of CK20 and Ki-67 immunostaining analysis predicts recurrence, progression, and cancer-specific survival in pT1 urothelial bladder cancer. *Eur Urol* 2014;65:218–226.
13. Mostafid H, Brausi M. Measuring and improving the quality of transurethral resection for bladder tumour (TURBT). *BJU Int* 2012;109:1579–82.
14. Kim JK, Moon KC, Jeong CW, Kwak C, Kim HH, Ku JH. Papillary Urothelial Neoplasm of Low Malignant Potential (PUNLMP) After Initial TUR-BT. Comparative Analyses with Non-invasive Low-Grade Papillary Urothelial Carcinoma (LGPU). *J Cancer* 2017;8:2885–91.
15. Van Rhijn BW, Burger M, Lotan Y, Solsona E, Stief CG, Sylvester RJ, et al. Recurrence and progression of disease in non-muscle-invasive bladder cancer: from epidemiology to treatment strategy. *Eur Urol* 2009;56:430–42.
16. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, Witjes JA, Bouffieux C, Denis L, et al. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage TaT1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol* 2006;49:466–75.
17. Holmang S, Johansson SL. Stage TA-T1 bladder cancer: the relationship between findings at first followup cystoscopy and subsequent recurrence and progression. *J Urol* 2002;167:1634–7.
18. Kamat AM, Bağcıoğlu M, Huri E. What is new in non-muscle-invasive bladder cancer in 2016? *Turk J Urol* 2017;43:9–13.



# Comorbid Conditions in Newborn Operated Due to Open Spinal Dysraphism and Retrospective Evaluation of Relation Between These Situations with Folic Acid Usage During the Pregnancy

*Açık Spinal Disrafizm Nedeniyle Opere Olan Yenidoğanlarda Komorbid Durumlar ve Bunların Gebelikte Folik Asit Kullanımıyla İlişkinin Retrospektif İncelenmesi*

Abdurrahman Çetin<sup>1</sup>, Abdulkadir Yektaş<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Neurosurgery; <sup>2</sup>Department of Anesthesiology and Reanimation, Gazi Yaşargil Research and Training Hospital, Diyarbakır

## ABSTRACT

**Aim:** In the present study, we aimed to analyze comorbid conditions associated with operated myelomeningocele and their relationship with folic acid usage during pregnancy.

**Material and Method:** Eighty-one newborns who were operated on due to myelomeningocele were included in this study. The patient's files were retrospectively reviewed, and the data of the patients were recorded. The patients were divided into two groups: folic acid users and non-folic acid users during pregnancy. The two groups were compared in terms of weight, height, hemogram, biochemistry, time of diagnosis, delivery method, maturity, localization, type (meningocele or myelomeningocele), neurological deficit, scoliosis, hydrocephalus, timing of surgery, ventriculomegaly, treatment method, additional pathology, tethered cord syndrome, dermal sinus, maternal disease, and number of malformations such as cerebrospinal fluid fistula.

**Results:** The rate of folic acid usage during the antenatal period was 44.4%. Myelomeningocele was located in lumbar (40.7%) and sacral (46.9%) regions. The rate of operation with early diagnosis newborn (1<week) was high (60.5%). There was no significant relationship between the timing of surgery and complications. Hydrocephalus (55.0%), ventriculomegaly (61.7%), scoliosis (34.6%), cerebrospinal fluid fistula (4.9%), and dermal sinus (46.9%) accompanied anomalies. Comparing the folic acid group with the non-folic acid group, it was revealed that the rates of cesarean delivery (75% ; p=0.017), meningomyelocele (80% ; p<0.01), paraparesis (39.5% ; p=0.006), paraplegia (16% ; p=0.006), and dermal sinus (53.1% ; p=0.022) were significantly higher in the non-folic acid group, whereas the mean birth weight was significantly lower (p=0.04) in the non-folic acid group.

**Conclusion:** In our study, folic acid usage during pregnancy results in higher birth weight, higher number of normal births, and lower rates of myelomeningocele, paraplegia, and paraparesis but a higher rate of dermal sinus in newborn who have been operated for meningocele or myelomeningocele. Therefore, we recommend folic acid usage during pregnancy.

**Key words:** open spinal dysraphism; myelomeningocele; meningocele; folic acid; pregnancy

Abdulkadir Yektaş, TC. SBU. Gazi Yaşargil EAH, Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı, Diyarbakır, Turkey, Tel. 0505 388 18 84 Email. akyektas@hotmail.com  
Geliş Tarihi: 05.09.2018 • Kabul Tarihi: 30.11.2018

## ÖZET

**Amaç:** Biz bu çalışmada, opere edilen meningocele ve miyelomeningocele olgularına eşlik eden komorbid durumları ve bunların gebelikte kullanılan folik asitle ilişkisini incelemeyi amaçladık.

**Materyal ve Metot:** Meningocele ve miyelomeningocele tanısıyla opere edilen 81 yenidoğan bu çalışmaya dahil edildi. Hasta dosyaları retrospektif olarak taranarak olguların verileri kaydedildi. Olgular, gebelik döneminde folik asit kullanan ve kullanmayan grup olarak ikiye ayrıldı. İki grup arasında yenidoğanların ağırlık, boy, hemogram, biyokimya, tanı zamanı, doğum şekli, maturite, lokalizasyon, tip, nörolojik defisit, skolyoz, hidrosefali, cerrahi zamanı, ventrikülomegali, tedavi şekli, ek patoloji, tetheredcord sendromu, dermal sinüs traktı, maternal hastalık birlikteliği ve BOS fistülü gibi malformasyonların sayısı, karşılaştırıldı.

**Bulgular:** Antenatal dönemde folik asit kullanımı %44,4 olarak saptandı. Meningomyelocele %40,7 lomber, ve %46,9 sakral bölgedeydi. Erken tanı yenidoğanlarda (<1 hafta) operasyon oranı daha (%60,5) yüksekti. Cerrahi zamanlama ile komplikasyonlar arasında anlamlı bir ilişki yoktu. Hidrosefali (%55,0), ventrikülomegali (%61,7), skolyoz (%34,6), BOS fistülü (%4,9) ve dermal sinüs traktı (%46,9) eşlik eden ek anomalilerdi. Folik asit kullanılan ve kullanılmayan gruplar karşılaştırıldığında, folik asit kullanılmayan grupta sezaryenle doğum oranı (%75) (p=0,017), miyelomeningocele oranı (%80) (p<0,01), paraparezi %39,5 ve parapleji %16 (p=0,006) anlamlı derecede yüksek, dermal sinüs traktı (%35,6) (p=0,022) ve ortalama doğum ağırlığı ise anlamlı derecede düşük (p=0,04) saptandı.

**Sonuç:** Bizim yaptığımız bu retrospektif çalışmada, meningocele ve miyelomeningocele tanısıyla opere olan yenidoğanlarda gebelik döneminde folik asit kullanımı daha yüksek doğum ağırlığı ve daha yüksek oranda normal doğumla birliktelik göstermekte, daha az oranda miyelomeningocele, parapleji ve parapareziye neden olmaktadır ancak folik asit kullanımı daha yüksek oranda dermal sinüs traktına neden olmaktadır, bu bilgiler doğrultusunda gebelik döneminde folik asit kullanımını önermekteyiz.

**Anahtar kelimeler:** açık spinal disrafizm; miyelomeningocele; meningocele; folik asit; gebelik

## Introduction

Open spinal dysraphisms (OSD) are the most common congenital malformations of the central nervous system (CNS) and develop due to the late closure or failed closure of neural tubes during the first month of pregnancy. A myelomeningocele and meningocele as OSD may be accompanied by anomalies such as hydrocephalus, scoliosis, tethered cord, neurological deficit, ventriculomegaly, dermal sinus tract and CSF fistula. Although the predisposing factors for OSD are not precisely known, hyperthermia, drugs (e.g., valproic acid), folic acid deficiency, various chemical compounds, malnutrition, maternal obesity or diabetes, and genetic anomalies in the folic acid pathway are associated with the development of OSD<sup>1</sup>. The incidence of OSD varies by race, ethnicity, geographical region, and socioeconomic status and the incidence of OSD has been reported to be 11.7/10.000 in Africa, 9/10.000 in Europe, and 3.3/10.000 in the US<sup>2,3</sup>. OSD can be prevented by folic acid usage during pregnancy<sup>4</sup>. Based on the results of observational studies, the US Public Health Service (1992) recommends that all women of childbearing age should take folic acid or women planning to become pregnant should consume 400 mcg of folic acid daily, provided that they begin to use it 3 months before pregnancy and continue during the first three months of pregnancy<sup>4</sup>. In most studies in

the literature, the effect of folic acid usage on the development of OSD has been investigated<sup>4</sup>.

We retrospectively aimed to investigate the effect of folic acid usage on the incidence of congenital malformations such as meningocele, myelomeningocele, hydrocephalus, scoliosis, tethered cord, neurological deficit, ventriculomegaly, dermal sinus tract and CSF fistula in newborn who have been operated for meningocele or myelomeningocele.

## Material and Method

After obtaining approval from the Non-Interventional Clinical Trials Ethics Committee of our hospital, the data of 81 newborns [43 female (53.19%), 38 male (46.9%)], aged 1–16 days (mean age:  $7.6 \pm 2.8$ ), who were diagnosed with meningocele and myelomeningocele (Figure 1) and operated on between January 1, 2012, and January 1, 2017, were retrospectively analyzed. The data of maternal, including age, mother and father from same ancestor and drug abuse of mother and father were recorded. The data of newborns, including age, gender, weight, height, hemogram, biochemistry, time of diagnosis, delivery method, maturity, localization, type, neurological deficit, scoliosis, hydrocephalus, timing of surgery, ventriculomegaly, treatment method, additional pathology, maternal folic acid usage, tethered cord syndrome, dermal sinus tract (Figure 2), maternal



**Figure 1.** Meningocele and myelomeningocele.



**Figure 2.** Dermal sinus tract.

disease, and cerebrospinal fluid (CSF) fistula, were recorded, and descriptive statistics of all these data are presented. The newborns were divided into two groups: those whose mothers were folic acid users and those whose mothers were folic acid non-users. Newborns' weight, height, hemogram, biochemistry, time of diagnosis, delivery method, maturity, localization, type, neurological deficit, scoliosis, hydrocephalus, timing of surgery, ventriculomegaly, treatment method, additional pathology, maternal folic acid usage, tethered cord syndrome, dermal sinus tract, and number of malformations such as CSF fistula were compared between the two groups.

### *Statistical analysis*

Statistical analysis was performed using SPSS 21.00 for Windows. The conformity of the data to normal distribution was analyzed using Kolmogorov-Smirnov test. The comparison of data with normal distribution was performed using Student's t-test. The results are presented as mean  $\pm$  SD. The comparison of categorical data was performed using chi-square test, and the results are presented as number and percentage. A P value  $\leq 0.05$  was considered statistically significant in the comparison of all data.

## **Results**

Descriptive statistics of the patients' demographic data are presented in Table 1.

Descriptive statistics of gender, time of diagnosis, delivery method, maturity, meningocele ve miyelomeningocele localization and type, congenital anomalies associated with meningocele and myelomeningocele such as, neurological deficit, scoliosis, hydrocephalus, ventriculomegaly, tethered cord syndrome, dermal sinus tract, CSF fistula ve timing of surgery, treatment method, folic acid usage during pregnancy, additional pathology and maternal disease are presented in Table 2. Folic acid usage during pregnancy had an effect on the weight of newborns, and the weight of newborns born to mothers who consumed folic acid was significantly higher ( $p=0.004$ ).

The comparison of the effect of folic acid usage during pregnancy in terms of gender, age, weight, height, cell blood count and blood biochemistry is presented in Table 3. The comparison of the effect of folic acid usage during pregnancy in terms of gender, time of diagnosis, delivery method, maturity, localization, type,

neurological deficit, scoliosis, hydrocephalus, ventriculomegaly, timing of surgery, treatment method, additional pathology, tethered cord syndrome, dermal sinus tract, maternal disease, and number of CSF fistula is presented in Table 4. In the folic acid group, the number of cesarean sections was significantly lower than that in the non-folic acid group ( $p=0.017$ ). The number of cases with meningocele was significantly higher in the folic acid group ( $p=0.001$ ). The number of cases with myelomeningocele was significantly higher in the non-folic acid group ( $p=0.001$ ). The number of cases with monoparesis was significantly higher in the folic acid group ( $p=0.006$ ). The number of cases with paraparesis and paraplegia was significantly higher in the non-folic acid group ( $p=0.006$ ). The number of cases with dermal sinus tract was significantly higher in the folic acid group ( $p=0.022$ ).

We have performed our study with neonatals who have been operated for meningocele or myelomeningocele. Demographic data of mothers who used or did not use folic acid during the pregnancy and comparison of bearing risks related to open spinal dysraphism are given at Table 5. The ages of mothers are not shown statistically significant difference in both groups. Mothers have had no risks with regards to diabetes, smoking, high fever, usage of drugs that would reduce the folate levels and drug abuse.

## **Discussion**

During our study, 81 neonatals who have been operated for meningocele or myelomeningocele have been evaluated, and while 45 mothers did not use folic acid during the pregnancy, 36 of mothers regularly used folic acid during their pregnancy period. By considering these parameters, we assessed the effect of folic acid usage on these parameters in neonatals who were diagnosed with meningocele or myelomeningocele. We also evaluated the ages and drug abuse habits of the mothers who used and did not use folic acid, and their relationship by affinity with the fathers of neonatals.

While information regarding how folic acid prevents the development of NTD (Neural Tube Defect) is limited, it has been detected that folic acid promotes the fast cell cycle which is highly critical for the closure of neural tube. Folates act as co-factor of enzymes that have a function in biosynthesis of DNA and RNA and intracellular reactions. Folic acid is transformed into S-adenosyl methionine as a result of series of reactions in methylation cycle, and enables usage and transfer

**Table 1.** Laboratory and demographic data of cases

Parameters	n	Minimum	Maximum	Mean	Standard deviation
Age (Day)	81	1.0	16.0	7.6	2.8
Weight (kg)	81	1.6	3.4	2.2	0.3
Height (cm)	81	46.0	53.0	50.9	1.7
RBC	81	2.1	5.9	4.8	1.0
HBG	81	7.0	20.3	15.3	4.3
HTC	81	7.8	64.0	43.5	15.7
WBC	81	9.5	22.0	15.0	3.2
NEU	81	3.1	50.1	9.1	8.4
PLT	81	155.0	553.0	321.6	115.5
MPV	81	7.8	11.6	9.2	1.0
CRP	81	1.0	19.0	3.4	4.3
Glucose	74	33.0	141.0	86.5	27.4
Creatinin	81	0.1	31.0	0.9	3.4
Total Protein	81	4.3	7.0	5.5	0.7
Direct Bilirubin	81	0.1	4.8	0.6	0.8
Total Bilirubin	81	0.1	13.3	3.8	3.4
Aspartate Aminotransferase (AST)	81	28.0	167.0	62.1	36.8
Alanine Aminotransferase (ALT)	81	6.0	87.0	29.1	19.5
$\gamma$ -Glutamyl transferaz (GGT)	81	5.0	312.0	107.8	87.9
Na	81	120.0	152.0	139.6	6.6
K	81	2.2	9.6	4.9	1.4
Ca	81	7.3	10.7	8.7	0.9

RBC, red blood count; HBG, hemoglobin; HTC, hematocrit; WBC, white blood cell; NEU, neutrophil; PLT, platelet; MPV, mean platelet volume; CRP, C-reactive protein.

of the only carbon group in biosynthesis of urine and pyrimiding, which are the building blocks of DNA. Besides, it acts as a source of carbon for different oxidative reactions. Its primary duty is to prevent the existence of mutated genes. In addition, by providing the methyl groups to metilation cycle, it enables homocysteine to transform into methionine again<sup>5</sup>.

There are two main hypotheses regarding the effects of folate deficiency on development of NTD. Both hypothesis put emphasis on micronutrients and genetic factors that affect the development of NTD. The first hypothesis asserts that in case of low serum folate levels, due to the limited transfer of folic acid to the embryo's cells, normal cell functions are damaged and proliferation is limited. In case of folic acid deficiency, methionine formation decreases, and intracellular S-adenosyl methionine level falls. As a result, methylation of cytosine and thymine is damaged, and that creates activation of improper protooncogens. Therefore, malignant

transformation is stimulated and evaluation of mutated genes cannot be prevented. Limitation of thymidylate formation results in wrong DNA formation and stimulates the evaluation of megaloblastosis. Additionally, in case of folic acid deficiency, cells cannot move forward in metaphase and anaphase during cellular division<sup>6</sup>.

According to the second hypothesis, in case of folic acid deficiency, plasma homocysteine level increases. Thus, homocysteine prevents the closure of neural tube by repressing the N-methyl-D-aspartate receptors in neural epithelium<sup>7</sup>.

One of the primary factors of the methylation cycle is the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) enzyme. MTHFR acts as a catalyst for reduction of 5,10-methylenetetrahydrofolate to 5-methylenetetrahydrofolate. As an active form of folic acid, 5-methylenetetrahydrofolate methylates the homocysteine in order to transform into methionine again. MTHFR deficiency causes increase in plasma

**Table 2.** Parameters of newborns

Parameters		n	(%)
Gender	Female	43	(53.19)
	Male	38	(46.9)
Time of diagnosis	<1 week	49	(60.5)
	1 week-1 month	32	(39.5)
Delivery method	normally	49	(60.5)
	C/S	32	(39.5)
Maturity	prematura	45	(55.6)
	term	36	(44.4)
Localization	sacral	38	(46.9)
	lumbar	33	(40.7)
	thoracic	10	(12.3)
Type	meningocele	29	(35.8)
	myelomeningocele	52	(64.2)
Neurological deficit	monoparesis	36	(44.4)
	paraparesis	32	(39.5)
	paraplegia	13	(16.0)
Scoliosis	-	53	(65.4)
	+	28	(34.6)
Hydrocephalus	-	36	(45.0)
	+	44	(55.0)
Ventriculomegaly	-	31	(38.3)
	+	50	(61.7)
Timing of surgery	<1 week	11	(13.6)
	1 week – 1 month	39	(48.1)
	1 month – 2 month	31	(38.3)
Treatment method	surgery	81	(100.0)
Additional pathology	-	2	(2.5)
	+	79	(97.5)
Folic acid usage during pregnancy	-	45	(55.6)
	+	36	(44.4)
Tethered cord syndrome	-	50	(61.7)
	+	31	(38.3)
Dermal sinus tract	-	43	(53.1)
	+	38	(46.9)
Maternal disease	-	80	(98.8)
	+	1	(1.2)
Cerebrospinal fluid (CSF) fistula	-	77	(95.1)
	+	4	(4.9)

homocysteine levels and that result in increase in cardiovascular diseases and NTD risk<sup>8</sup>.

It has been detected that 677 C-T mutation of MTHFR gene decreases the activity of this enzyme and plays an important role in NTD formation<sup>9</sup>.

Decrease in MTHFR activity is characterized by low plasma folate level, high plasma homocysteine level and low RCF. It has been detected that negative effects based on low MTHFR activity in mothers with 677 C-T mutation have been decreased as a result of the external application of folic acid<sup>9</sup>.

In an animal study, the present results indicate that maternal folic acid deficiency stimulates neuronal apoptosis via miR-34a (microRNA-34a) associated with Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) signalling in brain tissue of rat offspring. These findings provide novel insights into the mechanism of action of maternal folate deficiency in early neurogenesis<sup>10</sup>.

Studies conducted in USA before 1998 showed that folic acid supplement had a decreasing effect on open spinal dysraphism; however this relationship has not been proven at more recent studies. This situation undermines the connection between folic acid and open spinal dysraphism<sup>11</sup>.

However, folic acid usage in women in Ethiopia against neural tube defects is highly low and in this case, the folic acid usage should be increased<sup>12</sup>.

A study conducted in China showed that a decrease has observed for both types of open spinal dysraphism after folic acid supplement, but the amount of this decrease was higher with neonatal girls<sup>13</sup>.

Study of Hokkaido did not reveal any relation between serum folate level in first trimester and birth defects. They have said that potential comorbid factors had affected their results<sup>14</sup>.

A study conducted in Japan revealed that formation of open spinal dysraphism could be reduced by folic acid usage<sup>15</sup>.

As a result of the study conducted by Mutlu M et al., it has been shown that an important part of the NTDs could be prevented by periconceptional folic acid usage. The women in reproductive age group with high NTD risk factor should be given high dose (4 mg) of folic acid before starting planned pregnancy, and the women without NTD risk should be given 0.4 mg folic acid. This situation should be reinforced with practically applicable policies. Multidisciplinary approach is highly

**Table 3.** Folic acid usage during pregnancy effects to parameters of newborn

Folic acid usage during pregnancy		n (%)	Mean	Standard deviation	P
Age (Day)	-	45 (55.5)	7.76	3.113	0.620
	+	36 (44.4)	7.44	2.512	
Weight (kg)	-	45 (55.5)	2.14	0.28031	0.004
	+	36 (44.4)	2.33	0.29234	
Height (cm)	-	45 (55.5)	50.62	1.850	0.061
	+	36 (44.4)	51.31	1.390	
RBC	-	45 (55.5)	4.70	1.07347	0.335
	+	36 (44.4)	4.8972	0.76994	
HBG	-	45 (55.5)	15.2022	4.43619	0.874
	+	36 (44.4)	15.3561	4.23474	
HTC	-	45 (55.5)	43.4404	15.98771	0.958
	+	36 (44.4)	43.6256	15.66030	
WBC	-	45 (55.5)	14.91140	3.433529	0.725
	+	36 (44.4)	15.16475	3.027160	
NEU	-	45 (55.5)	10.49876	10.918576	0.069
	+	36 (44.4)	7.36583	2.670820	
PLT	-	45 (55.5)	311.13	106.865	0.375
	+	36 (44.4)	334.64	125.712	
MPV	-	45 (55.5)	9.244	1.0621	0.371
	+	36 (44.4)	9.056	0.8279	
CRP	-	45 (55.5)	3.5442	4.37299	0.772
	+	36 (44.4)	3.2625	4.30451	
Glucose	-	42 (51.8)	91.417	28.7138	0.069
	+	32 (39.5)	79.978	24.5370	
Creatinin	-	45 (55.5)	0.5022	0.17706	0.300
	+	36 (44.4)	1.3928	5.07763	
Total Protein	-	45 (55.5)	5.4213	0.58106	0.223
	+	36 (44.4)	5.6117	0.76936	
Direct Bilirubin	-	45 (55.5)	0.5511	0.66764	0.299
	+	36 (44.4)	0.7528	0.98917	
Total Bilirubin	-	45 (55.5)	3.1636	3.28475	0.056
	+	36 (44.4)	4.6100	3.37685	
Aspartate Aminotransferase (AST)	-	45 (55.5)	60.96	33.859	0.766
	+	36 (44.4)	63.47	40.537	
Alanine Aminotransferase (ALT)	-	45 (55.5)	28.29	17.536	0.700
	+	36 (44.4)	30.03	21.898	
$\gamma$ -Glutamyl transferaz (GGT)	-	45 (55.5)	101.84	78.389	0.512
	+	36 (44.4)	115.19	99.221	
Na	-	45 (55.5)	138.69	6.708	0.159
	+	36 (44.4)	140.75	6.281	
K	-	45 (55.5)	4.9927	1.40083	0.626
	+	36 (44.4)	4.8347	1.47688	
Ca	-	45	8.66942	0.832748	0.747
	+	36	8.73250	0.899465	

RBC, red blood count; HBG, hemoglobin; HTC, hematocrit; WBC, white blood cell; NEU, neutrophil; PLT, platelet; MPV, mean platelet volume; CRP, C-reactive protein.

**Table 4.** Folic acid usage during pregnancy relationship with OSD in the newborn

		Folic acid usage during pregnancy				P
		-		+		
		n	(%)	n	(%)	
Gender	Female	27	(60.0)	16	(44.4)	0.163
	Male	18	(40.0)	20	(55.6)	
Time of diagnosis	<1 week	31	(68.9)	18	(50.0)	0.184
	1 week-1 month	14	(31.1)	18	(50.0)	
Delivery method	normaly	22	(48.9)	27	(75.0)	0.017
	C/S	23	(51.1)	9	(25.0)	
Maturity	premature	26	(57.8)	19	(52.8)	0.653
	term	19	(42.2)	17	(47.2)	
Localization	sacral	25	(55.6)	13	(36.1)	0.196
	lumbar	16	(35.6)	17	(47.2)	
	thoracic	4	(8.9)	6	(16.7)	
Type	meningocele	9	(20.0)	20	(55.6)	0.001
	myelomeningocele	36	(80.0)	16	(44.4)	
Neurological deficit	monoparesis	13	(28.9)	23	(63.9)	0.006
	paraparesis	22	(48.9)	10	(27.8)	
	paraplegia	10	(22.2)	3	(8.3)	
Scoliosis	-	26	(57.8)	27	(75.0)	0.105
	+	19	(42.2)	9	(25.0)	
Hydrocephalus	-	24	(54.5)	12	(33.3)	0.058
	+	20	(45.5)	24	(66.7)	
Ventriculomegaly	-	17	(37.8)	14	(38.9)	0.919
	+	28	(62.2)	22	(61.1)	
Timing of surgery	<1 week	3	(6.7)	8	(22.2)	0.094
	1 week-1 month	25	(55.6)	14	(38.9)	
	1 month-2 month	17	(37.8)	14	(38.9)	
Treatment method	surgery	45	(100)	36	(100.0)	
Additional pathology	-	2	(4.4)	0	(0.0)	0.2
	+	43	(95.6)	36	(100.0)	
Tethered cord syndrome	-	29	(64.4)	21	(58.3)	0.574
	+	16	(35.6)	15	(41.7)	
Dermal sinus tract	-	29	(64.4)	14	(38.9)	0.022
	+	16	(35.6)	22	(61.1)	
Maternal disease	yok	44	(97.8)	36	(100.0)	0.368
	var	1	(2.2)	0	(0.0)	
Cerebrospinal fluid (CSF) fistula	-	41	(91.1)	36	(100)	0.067
	+	4	(8.9)	0	(0.0)	

**Table 5.** Demographic data of mothers (mean  $\pm$  SD and n, %)

	Age (Year)	Smoking	Drug abuse	High fever ( $^{\circ}$ C)
Folic acid usage	33 $\pm$ 9.12	0%	0%	36.3 $\pm$ 1.13
Non folic acid usage	31 $\pm$ 8.23	0%	0%	36.56 $\pm$ 1.56
p	0.548	1	1	0.123



important for early solution and observance of neonatals who were born with NTD. Early operation can reduce the frequency of other problems, especially infection<sup>16</sup>.

One study suggests that folate levels of pregnant women at their third trimester determine the approximate value of weight of neonatals. However, it has been concluded that this result should be confirmed by more comprehensive studies<sup>17</sup>.

Wani MA said that folic acid usage may prevent the neural tube defects<sup>18</sup>.

Another study revealed that myelomeningocele, which emerges as a result of having arsenic contaminated drinking water could be prevented via folic acid usage at third trimester of pregnancy<sup>19</sup>.

In the present study, correlation was found between the folic acid usage and delivery method. Contrary to the literature, the rate of vaginal delivery in the present study was found to be 60.5% (n=49) in the folic acid usage group<sup>20-22</sup>. Consistent with the literature, the lumbosacral region was found to be the most common location for meningocele and myelomeningocele (87.6%)<sup>23</sup>. In terms of gender distribution, meningocele and myelomeningocele were found to be more common in females (n=43; 53.19%), which is consistent with the literature<sup>24</sup>. Reportedly, folic acid deficiency is a significant risk factor for the development of OSD<sup>25</sup>. Patients with any disease (patients with OSD) satisfy this need by consuming drugs or food supplements<sup>26</sup>.

In our study, there was no statistically significant difference between mother who folic acid usage with mother who non folic acid usage in terms of age, drug abuse and consanguineous marriage. Therefore, there has been a decrease in the number of cases with OSD in developed countries<sup>27</sup>. Meningocele (n=9; 20%) was less common in newborns of mothers who did not use folic acid than in newborns of mothers who used folic acid, whereas myelomeningocele (n=36; 80%) was more common in newborns of mothers who did not use folic acid (p=0.001).

In patients with myelomeningocele whose mothers did not take folic acid, the incidence of congenital scoliosis and ventriculomegaly was found to be 42.2% and 62.2%, respectively, a finding consistent with the findings reported in the literature<sup>28</sup>. Another common anomaly in these infants with OSD is urinary system anomaly<sup>29,30</sup>. Vesicoureteral reflux (VUR) occurs in 3%-5% of newborns with OSD, and if newborns with OCD not treated, the risk of detecting VUR at the

age of 5 years is increased to 30%-40%. Therefore, the urinary systems of all patients with myelomeningocele should be evaluated by ultrasonography<sup>30,31</sup>. It was observed in the literature that 70%-91% of newborns diagnosed with myelomeningocele are operated on within the first 72 hours of life<sup>6,16,17</sup>. In the study by Bulbul et al.<sup>6</sup>, it was found that the length of hospital stay and the rate of CNS infections were significantly lower in newborns operated on due to myelomeningocele within the first 3 days of life. In the study by Rodrigues et al.<sup>32</sup>, the risk of developing CNS infections was found to be 5.72-fold lower in newborns operated on within the first 48 hours. In our study, 62.65% of patients were operated on within the first month of life, and this rate is consistent with that observed in the literature<sup>21,32</sup>.

In conclusion, we found that failure to use folic acid during pregnancy had an impact on the delivery method in newborns and that the rate of vaginal delivery is significantly higher in folic acid users than in non-folic acid users (p=0.017). The number of cases with myelomeningocele was significantly higher in the non-folic acid group than in the folic acid group (p=0.001). The number of cases with monoparesis was significantly higher in the folic acid group (p=0.006). The number of cases with paraparesis and paraplegia was significantly higher in the non-folic acid group (p=0.006). The number of cases with dermal sinus tract was significantly higher in the folic acid group than in the non-folic acid group (p=0.022). Based on these findings, we can conclude that OSD are common in Turkey due to nutritional problems and drug intake. Preventive medicine should become widespread in countries such as Turkey. In addition, physicians in the preventive medicine field should provide folic acid supplements, and awareness of folic acid supplementation for pregnant women should be increased.

### Limitation

Our study is retrospective and the amount of included patients is limited. We could not reach all the risk factors for open spinal dysraphism through the files of mothers. All these factors might influence our results. For the future, randomized, controlled, double blinded, prospective studies can be planned.

### References

1. Klinsman SL, Johnston MV. Congenital anomalies of the central nervous system. In: Kliegman RM, Stanton BF, Geme JW, Schor NF, (eds). Nelson Textbook of Pediatrics, 20th ed. Philadelphia: Saunders 2016;2802-2819.

2. Zaganjor I, Sekkarie A, Tsang BL, Williams J, Razzaghi H, Mulinare J, et al. Describing the prevalence of neural tube defects worldwide: a systematic literature review. *Plos One* 2016;11(4):1–31.
3. Back SA, Plawner LL. Congenital malformations of the central nervous system. In: Gleason CA, Devaskar SU. (eds). *Avery's Diseases of the Newborn 9th ed.* Philadelphia: Elsevier 2012;844–868.
4. Food and Drug Administration. Food standards of identity for enriched grain products to require addition of folic acid. Final Rule 21 CFR 1996;131:3702–3737.
5. Donnelly JG. Folic acid. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2001 Jun; 38(3):183–223.
6. Refsum H. Folate, vitamin B12 and homocysteine in relation to birth defects and pregnancy outcome. *Br J Nutr* 2001 May; 85 Suppl 2: S109–13.
7. Rosenquist TH, Finnell RH. Genes, folate and homocysteine in embryonic development. *Proc Nutr Soc* 2001 Feb; 60(1):53–61.
8. Födinger M, Hörl WH, Sunder-Plassmann G. Molecular biology of 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase. *J Nephrol* 2000 Jan-Feb; 13(1):20–33. Review.
9. Molloy AM, Daly S, Mills JL, Kirke PN, Whitehead AS, Ramsbottom D, Conley MR, Weir DG, Scott JM. Thermolabile variant of 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase associated with low red-cell folates: implications for folate intake recommendations. *Lancet* 1997 May 31;349(9065):1591–3.
10. Li W, Li Z, Zhou D, Zhang X, Yan J, Huang G. Maternal folic acid deficiency stimulates neural cell apoptosis via miR-34a associated with Bcl-2 in the rat foetal brain. *Int J Dev Neurosci* 2018 Nov 14;72:6–12.
11. Viswanathan M, Treiman KA, Kish-Doto J, Middleton JC, Coker-Schwimmer EJ, Nicholson WK. Folic Acid Supplementation for the Prevention of Neural Tube Defects: An Updated Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force. *JAMA* 2017 Jan 10;317(2):190–203.
12. Dessie MA, Zeleke EG, Workie SB, Berihun AW. Folic acid usage and associated factors in the prevention of neural tube defects among pregnant women in Ethiopia: cross-sectional study. *BMC Pregnancy Childbirth* 2017 Sep 21;17(1):313.
13. Liu J, Xie J, Li Z, Greene NDE, Ren A. Sex differences in the prevalence of neural tube defects and preventive effects of folic acid (FA) supplementation among five counties in northern China: results from a population-based birth defect surveillance programme. *BMJ Open* 2018 Nov 8;8(11): e022565.
14. Ito K, Hanaoka T, Tamura N, Sasaki S, Miyashita C, Araki A et al. Association Between Maternal Serum Folate Concentrations in the First Trimester and the Risk of Birth Defects: The Hokkaido Study of Environment and Children's Health. *J Epidemiol* 2018 Oct 13.
15. Ishikawa T, Obara T, Nishigori H, Nishigori T, Metoki H, Ishikuro M et al. Update on the prevalence and determinants of folic acid use in Japan evaluated with 91, 538 pregnant women: the Japan Environment and Children's Study. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2018 Aug 19:1–10.
16. Mutlu M, Aslan Y, Kader Ş, Aktürk FC, Yazar U. Evaluation of newborns open neural tube defect retrospectively. *Türkiye Klinikleri J Pediatr* 2018;27(1):20–7.
17. Frelut ML, de Courcy GP, Christidès JP, Blot P, Navarro J. Relationship between maternal folate status and foetal hypotrophy in a population with a good socio-economical level. *Int J Vitam Nutr Res* 1995;65(4):267–71.
18. Wani MA. Neural tube defect and folic acid. *JK Pract* 2000 Jan-Mar; 7(1):1–3.
19. Mazumdar M, Ibne Hasan MO, Hamid R, Valeri L, Paul L, Selhub J, et al. Arsenic is associated with reduced effect of folic acid in myelomeningocele prevention: a case control study in Bangladesh. *Environ Health* 2015 Apr 10;14:34.
20. Greene S, Lee PS, Deibert CP, Tempel ZJ, Zwagerman NT, Florio K, et al. The impact of mode of delivery on infant neurologic outcomes in myelomeningocele. *Am J Obstet Gynecol* 2016;215(4):495. e1–495.
21. Bulbul A, Can E, Uslu S, Bas EK, Sahin Y, Yilmaz A, et al. Effect of operation time on prognosis and defined additional anomalies among neonatal meningomyelocele cases. *The Medical Bulletin of Sisli Etfal Hospital*, 2010;44(2):61–65.
22. Altas M, Aras M, Altas ZG, Aras Z, Serarslan Y, Yilmaz N. Retrospective analysis of neural tube defect patients. *MKU Med J* 2012;3(9):22–28.
23. Greene WB, Terry RC, DeMasi RA, Herrington RT. Effect of race and gender on neurological level in myelomeningocele. *Dev Med Child Neural* 1991;33:110–117.
24. Berry RJ, Li Z, Erickson JD, Li S, Moore CA, Wang H, et al. Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. China-u. S. Collaborative Project for Neural Tube Defect Prevention. *N Engl J Med* 1999;341:1485–1490.
25. MRC Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 338:131–137, 1991.
26. Sandford MK, Kissling GE, Joubert PE. Neural tube defect etiology: New evidence concerning maternal hyperthermia, health and diet. *Dev Med Child Neurol* 34:661–675, 1992.
27. Czeizel AE, Dudas I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 327:1832–1835, 1992.
28. Flood HD, Ritchey ML, Bloom DA, Huang C, McGuire EJ. Outcome of reflux in children with myelodysplasia managed by bladder pressure monitoring. *J Urol* 1994;152(5 Pt 1):1574–1577.
29. Bauer SB, Hallett M, Khoshbin S, Lebowitz RL, Winston KR, Gibson S, et al. Predictive value of urodynamic evaluation in newborns with myelodysplasia. *JAMA* 1984;252(5):650–652.
30. Flood HD, Ritchey ML, Bloom DA, Huang C, McGuire EJ. Outcome of reflux in children with myelodysplasia managed by bladder pressure monitoring. *J Urol* 1994;152(5 Pt 1):1574–1577.
31. Aygun C, Vurucu S, Celik FC, Dagnar A, Tanyeri B, Kucukoduk S. Experience of a tertiary care center on 100 newborns with neural tube defects. *Turk J Pediatr* 2013;55:359–364.
32. Rodrigues AB, Krebs VL, Matushita H, de Carvalho WB. Short-term prognostic factors in myelomeningocele patients. *Childs Nerv Syst* 2016;32:675–680.



# Nazofarenks Punch Biyopsi Sonuçlarının Retrospektif Analizi

## Retrospective Analysis of Nasopharynx Punch Biopsy Results

Selçuk Güneş<sup>1</sup>, Mustafa Çelik<sup>2</sup>, Burak Olgun<sup>1</sup>, İrem Özen<sup>1</sup>, Hüseyin Avni Ulusoy<sup>1</sup>

1Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kulak Burun Boğaz Baş ve Boyun Cerrahisi Kliniği, İstanbul; 2Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz Baş ve Boyun Cerrahisi Kliniği, Kars, Türkiye

### ABSTRACT

**Aim:** Evaluation of nasopharyngeal punch biopsy results due to malignancy suspicion.

**Material and Method:** In total, 491 patients (231 females 260 males; average age 36.72±16.91 years; range 16–90 years) were included in the present study. All patients' files were evaluated in terms of age, gender, the reason and the results of biopsy.

**Results:** Nasopharyngeal carcinoma was diagnosed in 21 patients (4.2%) as a result of nasopharyngeal punch biopsies performed due to malignancy suspicion and exclusion. Results of pathological evaluation of other patients; 454 benign pathologies (lymphoid hyperplasia, chronic lymphoid process, Tornwald cyst) (92.05%), 12 insufficient materials (2.44%) and 4 granulomatous diseases (0.8%), respectively. The mean age of patients with malignancy was statistically significantly higher than those with benign pathology ( $p=0.000$ ). There was no statistically significant difference in the gender distribution of malignant and benign cases ( $p=0.077$ ).

**Conclusion:** Taking punch biopsies containing mucosa and submucosa will provide the early diagnosis and treatment of nasopharyngeal carcinoma, in spite of the absence of a mass on endoscopic examination.

**Key words:** nasopharynx; biopsy; endoscopy; cancer; punch

### ÖZET

**Amaç:** Malignite şüphesi nedeniyle yapılan nazofarenks punch biyopsi sonuçlarının değerlendirilmesi.

**Materyal ve Metot:** Çalışmaya toplam 491 olgu (231 kadın 260 erkek; ortalama yaş 36,72±16,91 yıl, aralık 16-90 yıl) dahil edildi. Tüm olguların dosyaları, yaş, cinsiyet, biyopsi yapılma nedeni ve biyopsi sonuçları açısından retrospektif olarak değerlendirildi.

**Bulgular:** Malignite şüphesi olan ve ayırıcı tanı amacıyla nazofarenks punch biyopsisi yapılan hastalardan 21'i (%4,2) nazofarenks karsinomu tanısı almıştır. Diğer olguların patolojik değerlendirme sonuçları; 454 benign patoloji (lenfoid hiperplazi, kronik lenfoid süreç, Tornwald kisti) (%92,46), 12 yetersiz materyal (%2,44) ve 4

granülatöz hastalık (%0,8) olarak saptanmıştır. Malignite saptanan olguların ortalama yaşları, patoloji sonucu benign olan olgulara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksektir ( $p=0,000$ ). Malign ve benign olguların cinsiyet dağılımında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır.

**Sonuç:** Nazofarenks kanseri şüphesinde, endoskopik muayenede yer kaplayıcı kitle olmasa da mukoza ve submukozayı içeren punch biyopsi uygulaması nazofarenks kanserinin erken tanı ve tedavisine imkan sağlayacaktır.

**Anahtar kelimeler:** nazofarenks; biyopsi; endoskopi; kanser; punch

### Giriş

Nazofarenks kanserleri, belirgin coğrafik dağılım gösteren baş boyun kanserlerinin en sık görülenleridir. Baş boyun kanserleri arasında görülme oranları yaklaşık %2 iken, tüm kanserler arasında görülme oranları %0,25'dir<sup>1</sup>. Güneydoğu Çin, Güney Asya, Endonezya, Kuzey Afrika ülkelerinde endemik bir baş-boyun kanseri çeşididir<sup>2-4</sup>.

Nazofarenks kanserlerinin etyolojisinde, genetik faktörler, erkek cinsiyet, yüksek alkol alımı, Epstein-Barr virüsü, birinci derece akrabada nazofarenks kanseri varlığı, çevresel ve mesleki faktörler suçlanmaktadır<sup>5-7</sup>. Diğer baş boyun kanserlerinin aksine sigaranın nazofarenks kanserleri etyolojisindeki rolü halen tartışmalıdır<sup>5</sup>.

Nazofarenks kanserlerinin tamamına yakını semptomatik iken asemptomatik dönemde tanı alan olgu sayısı %1'den daha azdır. Olguların çoğu posterior servikal üçgende kitle, burun tıkanıklığı, tekrarlayan epistaksis, tek taraflı seröz otitis media, iletim tipi işitme kaybı, otalji ve baş ağrısı gibi şikayetler nedeniyle hekime başvurulur<sup>8-12</sup>. Wei ve Sham<sup>3</sup> yayınladıkları makalede nazofarenks kanserlerinin semptomlarını dört kategoriye ayırmışlardır. Bunlar;

Mustafa Çelik, Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz Baş ve Boyun Cerrahisi Kliniği, Kars, Türkiye, Tel. 0533 597 66 36 Email. dr.mcelik@yahoo.com  
Geliş Tarihi: 08.06.2018 • Kabul Tarihi: 25.07.2018

- Tümörün nazofarenkste yer kaplaması nedeniyle meydana gelen semptomlar (burun tıkanıklığı, epistaksis, burun akıntısı),
- Östaki tüp disfonksiyonuna bağlı olarak meydana gelen semptomlar (işitme kaybı, seröz otitis media, otalji),
- Tümörün yukarıya doğru yayılımına bağlı olarak meydana gelen semptomlar (baş ağrısı, diplopi, yüz ağrısı ve uyuşması)
- Palpabl boyun kitlesidir.

Baş boyun kanserleri arasında oldukça agresif olan nazofarenks kanserlerinin erken tanısı sağ kalım açısından önemlidir. Nazofarenks kanserlerinin geleneksel tanısı fizik muayene ve endoskopik nazofarenks biyopsisidir<sup>1,2</sup>.

Bu çalışmada, nazofarenks malignite şüphesi olan hastalarda ayırıcı tanı amacıyla yapılan endoskopik punch biyopsi sonuçları retrospektif olarak değerlendirilmiştir.

## Materyal ve Metot

Retrospektif olarak planlanan çalışmaya Ocak 2015-Haziran 2017 tarihleri arasında hastanemiz kulak burun boğaz polikliniğinde nazofarenks endoskopik punch biyopsi yapılan 491 olgu (231 kadın 260 erkek; ortalama yaş  $36,72 \pm 16,91$  yıl, aralık 16–90 yıl) dahil edildi. Çalışma Helsinki Deklarasyonu İlkeleri ve İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzuna uygun olarak ve hastanenin etik kurulu onayı alınarak gerçekleştirildi (Etik kurul no: 2017–04–45). Çalışmaya alınan olguların demografik bilgilerine ve patoloji sonuçlarına hastane kayıt sistemindeki dosyalar taranarak ulaşıldı.

Tüm olguların yaş, cinsiyet, biyopsi yapıma nedeni ve biyopsi sonuçları değerlendirildi. Uygulanan biyopsi prosedürü tüm olgularda aynı olup aşağıda tanımlandığı gibidir.

Tüm olgulara nazofarenks endoskopik biyopsileri poliklinikte lokal anestezi şartlarında uygulandı. Lidokain içeren nazal sprey ile lokal anestezi sağlandıktan sonra nazofarenks mukozası, torus tubarius, tuba östaki farengeal orifisi ve rosenmüller fossa değerlendirildi. Tekrarlayan burun kanaması, burun tıkanıklığı, servikal bölgede medikal tedaviye yanıt vermeyen lenfoadenopati ve tek taraflı seröz otitis media saptanan yetişkin olgularda nazofarenks kanserini ekarte etmek amaçlı biyopsiler alındı. Endoskopik olarak yapılan muayenede yer kaplayan lezyon olan olgularda lezyondan, herhangi bir mukozal patoloji saptanmayan olgularda farklı bölgelerden multipl derin punch biyopsiler alındı. Tüm

olgulardan alınan patoloji spesmenleri patoloji kliniğine gönderildi ve patoloji sonuçları kayıt altına alındı.

İstatistiksel analizler için NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007 (Kaysville, Utah, USA) programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodlarda ortalama, standart sapma, medyan, frekans, oran, minimum, maksimum kullanılırken; değişkenlerin dağılımı Kolmogorov Simirnov test ile ölçüldü. Nicel bağımsız verilerin analizinde bağımsız örneklem t test kullanıldı. Nitel bağımsız verilerin analizinde ki-kare test kullanıldı. Uyum analizinde kappa uyum testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık  $p < 0,05$  düzeylerinde değerlendirildi.

## Bulgular

Olguların demografik özellikleri Tablo 1’de verilmiştir. Malignite şüphesi ve ekartasyonu nedeniyle yapılan nazofarenks punch biyopsilerin sonucunda 21 olguya (%4,2) nazofarenks karsinomu tanısı konulmuştur. Diğer olguların patolojik değerlendirme sonuçları; 454 benign patoloji (lenfoid hiperplazi, kronik lenfoid süreç, Tornwald kisti) (%92,46), 12 yetersiz materyal (%2,44) ve 4 granülatöz hastalık (%0,8) şeklindedir.

Malignite şüphesi nedeniyle yapılan biyopsilerde 18 olguda malignite tespit edilirken, ekartasyon nedeniyle yapılan biyopsilerde ise 3 olguda malignite tespit edildi. Malignite şüphesi ile biyopsi sonucu arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde uyum mevcut idi ( $p=0,000$ ) (Tablo 2).

Malignite saptanan olguların ortalama yaşları patoloji sonucu benign olan olgulara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek idi ( $p=0,000$ ). Malign ve benign patoloji saptanan olguların cinsiyet dağılımında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ( $p=0,077$ ) (Tablo 3).

## Tartışma

Nazofarenks, anatomik olarak ulaşılması zor bir yerde, kafa tabanının altında, nazal kavitenin arkasında yerleşmiştir. Önemli anatomik yapılara olan komşuluğu nazofarenks cerrahisini güçleştirmektedir<sup>13</sup>.

Sadece endoskopik muayeneyle nazofarenks kanseri tanısı dışlanamaz. Nazofarenks kanseri, submukozal olarak yayılabildiği için, endoskopik muayenede mukoza normal görülebilir. Bu durum nazofarenks kanseri tanısını geciktirip kanserin daha ileri evrede tanı alınmasına neden olur. Oldukça agresif seyirli bu kanserlerin erken tanısı, hastaların yaşam süresini uzatacağı gibi tedavi başarısını da artıracaktır<sup>14,15</sup>. Eğer klinik olarak

nazofarenks kanserinden şüpheleniyor ve endoskopik muayenede patolojik bulguya rastlanmıyorsa, bundan sonraki aşama, manyetik rezonans (MR) görüntüleme gibi noninvazif işlemlere başvurulmasıdır. King ve ark.<sup>15</sup> tarafından yapılan çalışmada, MR'ın kanseri saptamada duyarlılığı %100 olarak rapor edilmiştir. Başka bir çalışmada, Bercin ve ark.<sup>16</sup> nazofarenks kanserleri için MR duyarlılığını %88,2 olarak bildirmiştir.

Nazofarenks kanserleri ile ilgili literatürde çok fazla sayıda makale ve uluslararası tıbbi rehber bulunmasına rağmen, nazofarenks punch biyopsi zamanı ve endikasyonları konusunda bir konsensus bulunmamaktadır. Nazofarenks kitlelerine yaklaşım konusunda yeterli tıbbi rehber bulunmamakla beraber nazofarenksin endoskopik muayenesi ve nazofarenks kitlelerinden biyopsi alınması, nazofarenks kitlelerine tanı koymak açısından önemli bir günlük pratik uygulamadır.

**Tablo 1.** Demografik özellikler

	Aralık	Ort.±s.s. / n-%
Yaş (yıl)	16–90	36,72±16,91
Cinsiyet	Kadın	231 %47,04
	Erkek	260 %52,96
	Malignite şüphesi	408 %83,10
	Ekartasyon	83 %16,90
Biyopsi sonucu	Malign	21 %4,2
	Benign	454 %92,46
	Yetersiz	12 %2,44
	Granulomatoz	4 %0,8

**Tablo 2.** Malignite şüphesi ve ekartasyonu için yapılan nazofarenks punch biyopsi sonuçlarının karşılaştırılması

	Benign	Malign	p
Malignite şüphesi	378	18	0,000 <sup>k</sup>
Ekartasyon	80	3	

<sup>k</sup>Kappa Uyum Testi

**Tablo 3.** Benign ve malign olguların yaş ve cinsiyetlerine göre dağılımı

	Benign (N: 458)	Malign (N: 21)	p
	Ort.±s.s.	Ort.±s.s.	
Yaş	36,0±16,6	54,0±16,1	0,000 <sup>l</sup>
Cinsiyet			0,077 <sup>z</sup>
	Kadın	219 %47,8	6 %28,6
	Erkek	239 %52,2	15 %71,4

<sup>z</sup>Ki-kare test.

<sup>l</sup>t-test.

Yetişkinlerde nazofarenks kitlelerine yapılan biyopsi sonuçlarını bildiren nispeten az sayıda çalışma bulunmaktadır. Tutar ve ark.<sup>9</sup> yaptıkları çalışmada, nazofarenks punch biyopsi uyguladıkları 685 olgudan 33'ünde (%4,81) malignite saptadıklarını bildirmiştir. Özbay ve ark.<sup>17</sup> yaptıkları çalışmada, nazofarenks punch biyopsi yaptıkları 80 olgudan 3'ünde (%7), Bercin ve ark.<sup>16</sup> 983 olgudan 45'inde (%4,6) malignite saptadıklarını bildirmiştir. Çalışmamızda ise 491 olguya nazofarenks punch biyopsi uygulanmış ve 21 olguya (%4,2) nazofarenks kanseri tanısı konulmuştur.

Nazofarenks kanserleri, histopatolojik tiplerinden bağımsız olarak benzer semptom ve bulgu verirler. Nazofarenks kanserleri östaki tüpünü tıkayarak ya da tensor veli palatini kasını invaze edip çalışamaz duruma getirerek östaki tüp disfonksiyonuyla seröz otitis mediaya neden olabilir<sup>14</sup>. Abu-Ghanem ve ark.<sup>18</sup> yaptıkları çalışmada, 135 tek taraflı seröz otitis media saptanan yetişkin olgudan yapılan nazofarenks biyopsi sonucunda 8 olguya (%5,9) nazofarenks kanseri tanısı koymuşlardır. Dang ve Gubbels<sup>14</sup> yayınladıkları derlemede, tek taraflı seröz otitis media şikayeti nedeniyle başvuran olgulara yapılan nazofarenks biyopsi sonuçlarına göre olguların %0,4 ile %7,4'ünde malignite çıkabileceğini bildirmişlerdir. Glynn ve ark.<sup>12</sup> seröz otitis mediaya bağlı işitme kaybı gelişen 85 olgudan 4 olguya (%4,7) nazofarenks biyopsi sonucunda malignite tanısı koymuşlardır. Başak ve ark.<sup>11</sup>, erişkin yaş grubunda görülen seröz otitis medialis olgulara yapılan biyopsi sonucunda %4,7, Ho ve ark.<sup>2</sup> ise, %5,7 oranında nazofarenks kanseri saptamışlardır.

Nazofarenks kanseri komşuluk yoluyla doğrudan ve/veya zengin submukozal lenfatik ağ yoluyla boyun lenf metastazına bağlı klinik bulgu verebilir. Lenf nodu metastazı en sık posterior servikal üçgenindeki lenf bezlerine ve tek veya çift taraflı olabilmektedir<sup>9</sup>. Douglas ve ark.<sup>10</sup> yaptıkları çalışmada lenf nodu metastazını %34 tek taraflı, %49 çift taraflı olmak üzere toplam %86 olarak bildirilmiştir. Tutar ve ark.<sup>9</sup>, nazofarenks

karsinomlarının %35'inde tek taraflı, %28'inde çift taraflı olmak üzere toplamda %64'ünün boyunda kitle şikayeti nedeniyle başvurduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda nazofarenkste yer kaplayan kitle, nazofarenks mukozasında patolojik değişimler, tekrarlayan epistaksis ve posterior servikal üçgende medikal tedaviye yanıt vermeyen kitle malignite şüphesi, tek taraflı seröz otitis media ise malignite ekartasyonu olarak değerlendirilmiştir. Malignite şüphesi olan olgulardan yapılan biyopsilerin sonucunda 18 olguda (%3,66) nazofarenks kanseri saptanırken, tek taraflı seröz otitis media saptanan olgulardan 3'ünde (%0,6) nazofarenks kanseri saptanmıştır. Literatür ile uyumlu olarak malignite saptanan olguların ortalama yaşları, benign patoloji saptanan olgulara göre daha yüksek bulunmuştur.

Çalışmamızın sonuçları üçüncü basamak bir hastanede yapılan nazofarenks punch biyopsi sonuçlarını bildirmesi açısından değerli olmasına rağmen bazı kısıtlamaları da bulunmaktadır. Çalışmanın retrospektif olması, malignite saptanan olguların takip ve prognozlarının bilinmemesi en önemli kısıtlamadır. Ayrıca çalışmada her bir klinik semptomun dosyalarda ayrıntılı şekilde yazılmamasından dolayı klinik semptom ve malignite arasında korelasyon kurulamamıştır. Bu nedenle ileriye dönük olarak planlanmış, nazofarenks punch biyopsi sonuçları ile klinik semptom ve prognozlar arasında korelasyon kuran ve uzun dönem takiplerin yapıldığı epidemiyolojik çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

## Sonuç

Bu çalışmada, üçüncü basamak bir hastanede nazofarenks punch biyopsi sonuçları değerlendirilmiştir. Yetişkin olgularda, tek taraflı seröz otitis media, posterior servikal üçgende medikal tedaviye yanıtız kitle, tekrarlayan epistaksis gibi durumlarda nazofarenks endoskopik muayenesi yapılmalıdır. Nazofarenks endoskopik muayenede yer kaplayıcı kitle olmasa da mukoza ve submukozayı içeren punch biyopsi alınması nazofarenks kanserinin erken tanı ve tedavisine imkan sağlayacaktır.

## Kaynaklar

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;127(12):2893–917.
2. Ho KY, Lee KW, Chai CY, Kuo WR, Wang HM, Chien CY. Early recognition of nasopharyngeal cancer in adults with only otitis media with effusion. *J Otolaryngol Head Neck Surg* 2008;37:362–5.
3. Wei WI, Sham JST. Nasopharyngeal carcinoma. *Lancet* 2005;365:2041–54.
4. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61:69–90.
5. Chang ET, Adami HO. The enigmatic epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:1765–77.
6. August M, Dodson TB, Nastri A, Chuang SK. Nasopharyngeal carcinoma: clinical assessment and review of 176 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;91:205–14.
7. Huang WB, Chan JYW, Liu DL. Human papillomavirus and World Health Organization type III nasopharyngeal carcinoma: Multicenter study from an endemic area in Southern China. *Cancer* 2017 Oct 26. doi:10.1002/cncr.31031. [Epub ahead of print]
8. Grammatica L, Achille G, Piepoli S, Paradiso A. Early, late symptoms and histological type of nasopharyngeal carcinoma. *Oncol Rep* 2005;6:1395–8.
9. Tutar B, Berkiten G, Kumral TL, Yıldırım G, Uyar Y, Kamalı GH. Punch Biyopsi Results of Nasopharynx Pathologies:3 Years Retrospective Analysis. *Okmeydanı Tıp Derg* 2014;30(1):30–3.
10. Douglas SA, Nelson N, Ashman H. Clinical features of nasopharyngeal carcinoma in Jamaica. *Journal of the National Medical Association* 2003;95:77–81.
11. Başak S, Metin K, Erpek G, Nar H. Erişkin yaş grubunda görülen sekretuar otitis mediada nazal kavite ve nazofarenks patolojileri. *KBB ve Baş Boyun Cerrahisi Dergisi* 1999;7:1–5.
12. Glynn F, Keogh IJ, Ali TA, Timon CI, Donnelly M. Routine nasopharyngeal biopsy in adults presenting with isolated serous otitis media: is it justified. *The Journal of Laryngology and Otology* 2006;120:439–41.
13. Pfister DG, Ang KK, Brizel DM, Burtness BA, Busse PM, Caudell JJ, et al. Head and neck cancers, version 2 2013. Featured updates to the NCCN guidelines. *J Natl Compr Canc Netw* 2013;11:917–23.
14. Dang PT, Gubbels SP. Is nasopharyngoscopy necessary in adult-onset otitis media with effusion? *Laryngoscope* 2013;123:2081–2.
15. King AD, Vlantis AC, Bhatia KSS, Zee BC, Woo JK, Tse GM, et al. Primary nasopharyngeal carcinoma: diagnostic accuracy of MR imaging versus that of endoscopy and endoscopic biopsy. *Radiology* 2011;258:531–7.
16. Bercin S, Yalciner G, Muderris T, Gul F, Deger HM, Kiris M. Pathologic Evaluation of Routine Nasopharynx Punch Biopsy in the Adult Population: Is It Really Necessary?. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 2017;10(3):283–7.
17. Özbay İ, Kucur C, Aksoy S, Oğhan F, Külekçi S, Yıldırım N. Nazofarenks Patolojilerinde Punch Biyopsi Sonuçları. *J Clin Exp Invest* 2016;7(1):83–6.
18. Abu-Ghanem S, Carmel NN, Horowitz G, Yehuda M, Leshno M, Abu-Ghanem Y, et al. Nasopharyngeal biopsy in adults: a large-scale study in a non endemic area. *Rhinology* 2015;53(2):142–8.



# Türk Toplumunda Foramen Magnum ve Kafa Tabanındaki Oluşumların İlişkileri

*Relations Between Foramen Magnum and Associated Structures Located Within the Skull Base of the Turkish Population*

Burcu Erçakmak Güneş<sup>1</sup>, Alper Vatanserver<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Ankara; <sup>2</sup>Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Balıkesir, Türkiye

## ABSTRACT

**Aim:** For reliable diagnosis and surgical approach, a fundamental knowledge of the normal anatomy and the morphometric measurements of the skull base are important to the clinicians. The aim of this study is to evaluate the morphometric dimensions of Foramen Magnum (FM) and clivus with respect to the related structures of Turkish population.

**Material and Method:** 313 patients' computed tomography angiography (CTA) image series of head and neck region was examined retrospectively. Length of the clivus (LoC), angle between the clivus and posterior margin of FM (C-FM), angle between the line along the posterior surface of the clivus and the other line along the posterior side of the dens of axis (C-D), antero-posterior diameter of the FM (FMap), largest transvers distance between lateral margins of the FM (FMt) and the area of the FM (FMa) were measured.

**Results:** The mean values of LoC, C-FM, C-D, FMap, FMt and FMa in female group are 32.1±3.4 mm, 153.46°±9.13, 140.61°±11.93, 34.72±2.57 mm, 29.25±2.1 mm and 733.26±102.09 mm<sup>2</sup> respectively. And also the mean values of LoC, C-FM, C-D, FMap, FMt and FMa in male group are 35.2±4 mm, 149.93°±8.6, 141.28°±10.33, 36.29±2.89 mm, 30.79±2.27 mm and 800.12±110.62 mm<sup>2</sup> respectively.

**Conclusion:** Parameters of the structures related to the skull base, especially the FM can easily be evaluated using CTA.

**Key words:** skull base; foramen magnum; anatomy

## ÖZET

**Amaç:** Kafa tabanı ile ilgili olguların tanısında ve cerrahilerinde doğru bir yaklaşım için bölgenin normal anatomisini ve morfometrik ölçümlerini bilmek klinisyenler için oldukça büyük bir önem taşımaktadır. Bu çalışmanın amacı Türk popülasyonunda Foramen Magnum (FM) ile Clivus'un ve ilgili yapıların morfometrik ölçümlerini değerlendirmek hedeflenmiştir.

**Materyal ve Metot:** Retrospektif olarak 313 hastanın baş ve boyun bölgelerinin bilgisayarlı tomografi anjiyografi (BTA) görüntüleri incelendi. Clivus uzunluğu (LoC), clivus ve FM'un arka kenarı arasındaki açı (C-FM), clivus'un arka yüzeyi ile, dens axis'in arka kenarı arasındaki açı (C-D), FM'un antero-posterior çapı (FMap), FM'un lateral kenarları arasındaki en geniş transvers mesafe (FMt) ve FM alanı (FMa) ölçüldü.

**Bulgular:** Sırasıyla LoC, C-FM, C-D, FMap, FMt ve FMa'nın ortalama değerleri kadın hastalarda 32,1±3,4 mm, 153,46°±9,13, 140,61°±11,93, 34,72±2,57 mm, 29,25±2,1 mm ve 733,26±102,09 mm<sup>2</sup> iken erkek hastalarda 35,2±4 mm, 149,93°±8,6, 141,28°±10,33, 36,29±2,89 mm, 30,79±2,27 mm ve 800,12±110,62 mm<sup>2</sup> olarak ölçüldü.

**Sonuç:** Kafa tabanı ile ilgili yapılara ait ölçümler BTA ile kolay bir şekilde değerlendirilebilir. Bu ölçümler klinisyenler için tanı ve tedavi için büyük önem taşımaktadır ancak toplumlar arası farklılıklar göz önünde bulundurulmalıdır.

**Anahtar kelimeler:** kafa tabanı; foramen magnum; anatomi

## Giriş

Kafa tabanı anatomik olarak en karmaşık bölgelerden biridir. Kafa tabanının kranio-metrik ölçümlerinin bilinmesi patolojik tanılar ile kranioservikal bileşke anomalilerinin tanımlanmasında, uygun cerrahi yöntemin seçilmesinde ve yapılacak rezeksiyonların belirlenmesinde klinisyenler için oldukça büyük önem arz etmektedir<sup>1-9</sup>. Kafatası aynı zamanda antropoloji ve adli tıp alanlarında, cinsiyet tespiti için en güvenilir kemiktir<sup>8,10,11</sup>. Foramen magnum (FM) fossa cranii posterior'un en alt kısmında bulunur ve kafatasının en geniş oluşumudur<sup>8</sup>. Bu yapı fossa cranii posterior ve canalis vertebralis'in birbiri ile bağlantısını sağlamaktadır<sup>8-10</sup>. Bir diğer önemli oluşum ise kafa tabanının tam ortasında bulunan clivus'tur<sup>12,13</sup>. Clivus, dorsum

Burcu Erçakmak Güneş, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye, Tel. 0312 305 21 01 Email. burcue@hacettepe.edu.tr  
Geliş Tarihi: 17.09.2018 • Kabul Tarihi: 30.10.2018

sellae'nın arkasında bulunan, kemik yapıda bir eğri-liklerdir ve FM'un ön kenarını oluşturur<sup>13</sup>. Clivus ve FM ile ilgili patolojiler nöroşirürji uzmanları için teknik zorluklar oluşturabilmektedir ve bu bölgeyle ilgili olguların tedavisinde pek çok cerrahi yaklaşım tarif edilmektedir<sup>14,15</sup>. Kranioservikal instabilitelerde bir diğer önemli ölçüm clivodens (clivoaxial) açısıdır (C-D)<sup>16</sup>. FM ve ilgili yapıların ölçümleri ve değerlendirmeleri, kranioservikal bileşkenin ön tarafında yerleşen patolojilerin cerrahi işlemlerinde oldukça kritik bir role sahiptir<sup>3,5,8,9</sup>. Kafa tabanının radyolojik değerlendirmeleri ve ölçümleri, preoperatif olarak cerrahlara yardımcı olmaktadır<sup>5</sup>. Bu yapıların morfometrik analizleri pek çok defa çalışılmış olmakla beraber, birbirleri ile ilişkileri detaylı bir şekilde bildirilmemiştir. Bu çalışmanın amacı Türk toplumunda kranioservikal bileşke cerrahilerine fayda sağlayabilmek amacıyla, FM ve clivus'un, ilgili yapılar ile morfometrik ve açısal ölçümlerini değerlendirmektir.

## Materyal ve Metot

### Hasta seçimi

Yaş aralıkları 23 ile 83 arasında (ortalama  $57,04 \pm 15,21$ ) olan 313 hastanın (148 kadın, 165 erkek) bilgisayarlı tomografi anjiyografi (BTA) görüntüleri retrospektif olarak incelendi. Hastalara ait BTA görüntü serileri, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyoloji Anabilim Dalı görüntü arşivleme sistemi (PACS) kullanılarak temin edildi. BTA görüntüleri incelenen hastaların baş bölgesine yönelik herhangi bir cerrahi ve/veya travma öyküsü ile birlikte malformasyon bulunmaması çalışmaya dahil edilmeleri için en önemli kriterler olarak belirlendi.

### Görüntü temini

Tomografi görüntüleme yöntemi için 64-dedektörlü çift sıralı bilgisayarlı tomografi tarayıcısı kullanıldı (Somatom Definition, Siemens Healthcare, Erlangen, Almanya). Sadece arteriyel faz görüntülemesi uygulandı. Protokol şu şekilde tanımlandı: 64 x 0,6 kolimasyon, 1,4 perde, 0,5-saniye dönme zamanı, 100 kV (en uç) ve efektif mAs 180'di. Aorta ascendens'i de içine alan mediastinum superior ve verteks bölgeleri tarandı. BTA zamanlaması "test-bolus" tekniği ile belirlendi. İkili enjektör kullanıldı. Kontrast madde uygulamasından önce ve sonra 10 mL "saline chaser" solüsyonu enjekte edildi. Kontrast madde (70 ml), 4 mL/s oranda olacak şekilde enjekte edildi. Ana görüntüler, aksiyel, koronal ve sagittal

açılardan 1-mm kesit kalınlığı olacak şekilde yeniden modellendi. Tüm ölçümler, iki araştırmacı tarafından, Osirix-Lite versiyon 9 (Pixmeo, SÄRL, İsviçre) yazılımı ile gerçekleştirildi ve ölçümlerin istatistiksel olarak karşılaştırılmasının ardından aralarında fark olmadığı saptandı.

### Morfometrik ölçümler

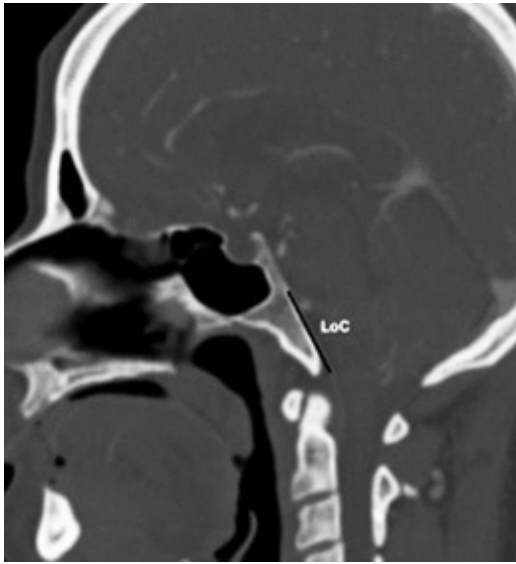
Literatürde yapılmış olan çalışmalar referans alınarak yapılacak olan ölçümlere karar verildi<sup>17</sup>. Ölçümler, normal anatomik pozisyonda çekilen BTA görüntülerinde, sagittal kesitte cranium'un inferior yüzünden elde edildi: (1) dorsum sellae'nın vertikal çıkıntısının en alt noktasından başlayıp clivus'un posterior yüzü boyunca uç noktasına kadar çizilen bir çizgi ile LoC (Şekil 1); (2) clivus'un posterior kenarı boyunca çizilen çizgi ile FM'un posterior kenarı arasındaki açı (C-FM) (Şekil 2); (3) clivus'un posterior yüzü ile dens axis'in posterior yüzü arasındaki açı (C-D) (Şekil 3); (4) FM'un antero-posterior çapı (FMap) (Şekil 4); FM'un lateral kenarları arasındaki en geniş transvers çapı (FMt) (Şekil 5) ölçüldü. Son olarak (6) FM'un kenarları Osirix-Lite yazılımının kalem özelliği kullanılarak alanı (FMa) "İlgilenilen Alan (Region of Interest-ROI)" menüsü kullanılarak ölçüldü (Şekil 6).

İstatistiksel analizler SPSS 23 paket programı kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm ölçüm değerlerinin normal ve normal olmayan dağılımlarının tanımlanması Kolmogorov-Smirnov testi kullanılarak yapıldı. Ölçüm değerlerinin tümünün tanımlayıcı analizleri, ortalama ve standart sapmaları kullanılarak yapıldı. Cinsiyetler arası karşılaştırma sırasıyla Standart t testi ve Mann-Whitney U testleri kullanılarak gerçekleştirildi. Yaş ile ölçümler sonucunda elde edilen değerlerin araştırılması sırasında, korelasyon katsayısı ve "p" değerinin ortaya konması için Spearman's rho testi uygulandı (%5'lik Tip 1 hata oranı ile). P değeri 0,05'ten küçük olan ölçümler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Çalışma Hacettepe Üniversitesi Etik kurulu tarafından onaylanmıştır (GO 18/779-43).

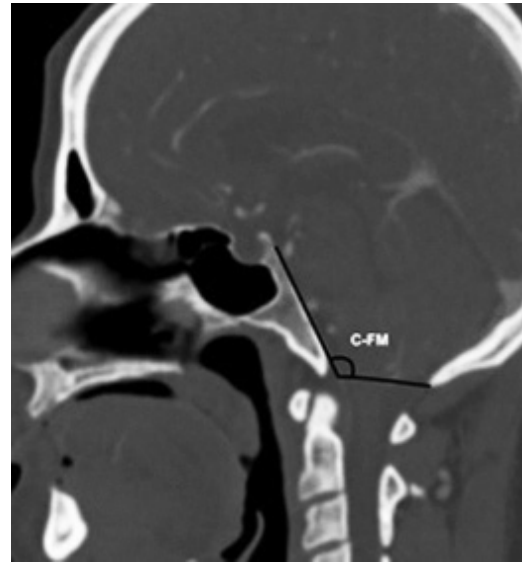
## Sonuçlar

313 hastanın sagittal kesit BTA görüntüleri değerlendirildi. LoC, C-FM, C-D, FMap, FMt ve FMa ortalama değerleri sırasıyla kadın hastalarda ortalama  $3,1 \pm 3,4$  mm,  $153,46^\circ \pm 9,13$ ,  $140,61^\circ \pm 11,93$ ,  $34,72 \pm 2,57$  mm,  $29,25 \pm 2,1$  mm ve  $733,26 \pm 102,09$  mm<sup>2</sup> ve erkek hastalarda ortalama  $35,2 \pm 4$  mm,  $149,93^\circ \pm 8,6$ ,

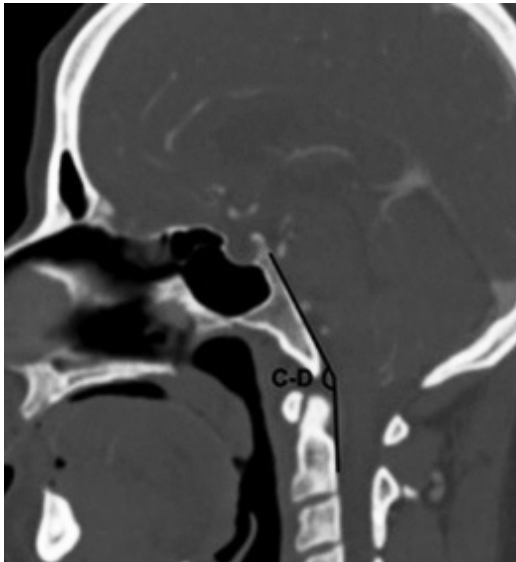




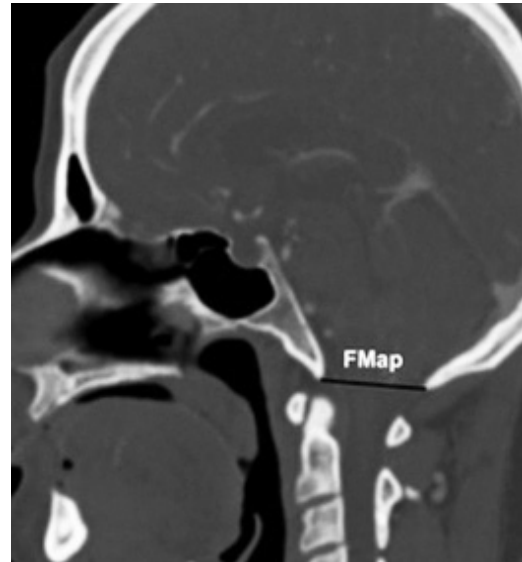
**Şekil 1.** Clivus uzunluğu; LoC.



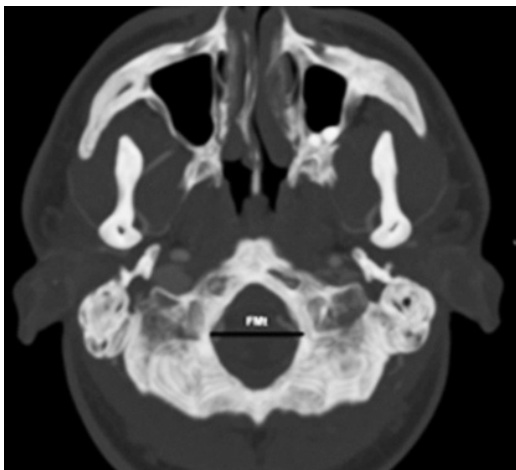
**Şekil 2.** Clivus ile foramen magnum arasındaki açı; C-FM.



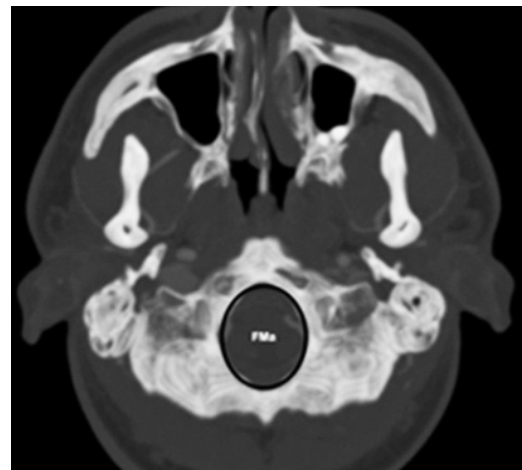
**Şekil 3.** Clivus ile dens axis arasındaki açı; C-D.



**Şekil 4.** Foramen magnum'un antero-posterior çapı; FMap.



**Şekil 5.** Foramen magnum'un transvers çapı; FMt.



**Şekil 6.** Foramen magnum'un yüzey alanı; FMa.

141,28±10,33, 36,29±2,89 mm, 30,79±2,27 mm ve 800,12±110,62 mm<sup>2</sup> olarak ölçüldü (Tablo 1). Erkek hastaların C-FM ve C-D haricindeki ölçümlerinin, kadın hastaların değerlerinden daha büyük olduğu gözlemlendi. C-D dışındaki tüm değerlerde cinsiyetler arası fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0,001) (Tablo 2). Sadece üç değişkenin yaş ile korelasyonu oldukça zayıf olmakla beraber istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 3). Ayrıca C-FM ile FMap (p<0,001, r=-0,16) ve FMt (p=0,03, r=-0,12) arasında istatistiksel olarak anlamlı, ancak zayıf negatif korelasyon olduğu tespit edildi.

## Tartışma

Kafa tabanının morfolometrik ölçümleri, tanı ve uygun cerrahi seçimi sırasında klinisyenler için büyük önem taşımaktadır. Kafa tabanı ile doğrudan ilişkili olan Chiari malformasyonu, hipoplazi, kleftler, ap-lasia, tonsiller herniasyon ve pek çok diğer patoloji ve malformasyonlar bulunmaktadır<sup>1,12,14,16-19</sup>. Bu çalışmada literatürdeki çalışmalar referans alınarak LoC, C-FM, C-D, FMap, FMt ve FMa ölçümleri yapılmıştır<sup>1,5,9-11,16-19</sup>.

Çalışmada 313 hastanın BTA görüntüleri üzerinden LoC ölçüldü ve ortalama değeri kadınlarda 32,1 mm, erkeklerde 35,2 mm olarak tespit edildi. Erkek hasta grubu lehine istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü (p<0,001). Basaran ve ark.<sup>1</sup> ise sağlıklı 50 bireyin MR görüntüleri üzerinden yaptıkları ölçümlerde LoC ortalama değerini 35,742 mm olarak raporlamışlardır. Ayrıca Chiari malformasyonu olan grup ile sağlıklı bireyleri ayırmadan toplam sayı üzerinden cinsiyet sınıflaması yapmışlar ve kadınlarda ortalama değer 34,54 mm, erkeklerde ortalama değer 36,46 mm olarak raporlanmıştır<sup>1</sup>.

Botelho ve ark.<sup>6</sup> Chiari malformasyonu ve basilar invajinasyonu olan hastaların ve sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubunun kraniovertebral bileşke MR görüntülerini değerlendirmişlerdir. Clivus'un arka yüzü ile FMap arasındaki "Boogard Açısı" olarak isimlendirilen açıyı ölçmüşlerdir. Kontrol grubunun ortalama değeri 126±9,40°; minimum ve maksimum ölçümleri sırasıyla 103° ve 148° olarak raporlanmıştır<sup>6</sup>. Chiari malformasyonu, basilar invajinasyon ve kontrol gruplarının "Boogard Açısı" değerlerinin istatistiksel analizleri sonucunda en geniş açı basilar

**Tablo 1.** Kadın ve erkek hasta gruplarında ölçümlerin minimum, maksimum ve ortalama değerleri

	Kadın			Erkek		
	Ortalama	± SD	Min-Maks	Ortalama	± SD	Min-Maks
LoC (mm)	32,1	3,4	21,8-40,2	35,2	4	20,2-43,6
C-FM (°)	153,46	9,13	133,34-175,6	149,93	8,60	129,95-176,24
C-D (°)	140,61	11,93	112,63-169,08	141,28	10,33	109,83-168,97
FMap (mm)	34,72	2,57	27,6-41,0	36,29	2,89	24,8-45
FMt (mm)	29,25	2,1	24,2-35,3	30,79	2,27	23,6-36,8
FMa (mm <sup>2</sup> )	733,26	102,09	431-1024	800,12	110,62	482-1104

LoC, Clivus uzunluğu; C-FM, Clivus ve foramen magnum posterior kenarı arasındaki açı; C-D, Clivus ve dens axis arasındaki açı; FMap, Foramen magnum antero-posterior çapı; FMt, Foramen magnum'un lateral kenarları arasındaki transvers çap; FMa, Foramen magnum alanı.

**Tablo 2.** Bütün parametrelerin erkek ve kadın hastalarda karşılaştırılması

Değişkenler	Ortalama farkları	p değeri	Yorum
LoC	-0,31	p<0,001	E >K
C-FM	3,53	p<0,001	K >E
C-D	-0,67	p=0,59	Fark yok
FMap	-0,154	p<0,001	E >K
FMt	-0,154	p<0,001	E >K
FMa	-0,668	p<0,001	E >K

LoC, Clivus uzunluğu; C-FM, Clivus ve foramen magnum posterior kenarı arasındaki açı; C-D, Clivus ve dens axis arasındaki açı; FMap, Foramen magnum antero-posterior çapı; FMt, Foramen magnum'un lateral kenarları arasındaki transvers çap; FMa, Foramen magnum alanı.

**Tablo 3.** Yaşla anlamlı korelasyon gösteren değişkenler

Değişkenler	Korelasyon Katsayısı (r)	Anlamlılık (p)
C-FM	0,13	0,01
FMap	-0,11	0,03
FMa	-0,35	<0,001

C-FM, Clivus ve foramen magnum posterior kenarı arasındaki açı; FMap, Foramen magnum antero-posterior çapı; FMa, Foramen magnum alanı.

invajinasyon hastalarında ve en dar açı kontrol grubunda ölçülmüştür<sup>6</sup>. Ferreira ve ark.<sup>20</sup> yaptığı çalışmada kontrol grubuna ait ortalama değer  $126,20^{\circ} \pm 9,68$  olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada ise “Boogard Açısı” C-FM olarak isimlendirildi ve ortalama değerler kadın hastalarda  $153,46^{\circ} \pm 9,13$  ve erkek hastalarda  $149,93^{\circ} \pm 8,60$  olarak raporlandı. Literatür ile karşılaştırıldığında daha yüksek değerler ölçülmesinin, toplumsal yapısal farklılıklar sebebiyle olabileceği değerlendirilmektedir ve yüksek değerlere cerrahi yaklaşımlar esnasında dikkat edilmesi gerekmektedir. Bununla birlikte, yine toplumsal farklılıklar göz önüne alındığında, nörolojik patolojiler açısından risk grubu olarak nitelendirilebilecek toplumlar belirlenip, olası bir klinik tabloyu erken evrede yakalayabilmek adına, rutin sağlık taraması prosedürleri içerisine riskli olarak kabul edilebilecek bölgelerin de eklenmesi sağlanmalıdır.

Kranioservikal bileşke instabiliteleri ve malformasyonları sık görülebilen patolojilerdir ve clivus ile dens axis arasındaki açı bu olguların tanı ve tedavisinde oldukça önemlidir. Clivodental açının fleksiyonda  $150^{\circ}$  ve ekstansiyonda  $180^{\circ}$  aralığında olması normal olarak değerlendirilir ve  $150^{\circ}$ 'nin altındaki değerler medulla spinalis ya da beyin sapı basis'i ile ilişkili olabilmektedir<sup>7</sup>. Henderson ve ark.<sup>16</sup> hafif ya da şiddetli baş ağrısı, suboccipital ağrı, bulbar semptomlar, myelopati sebebiyle nörolojik bulgular bulunan 10 erişkin hasta üzerinde yaptıkları çalışmada ortalama C-D ölçümleri  $135,8^{\circ}$  olarak bulunmuştur ve patolojik eşik değeri  $135^{\circ}$  olarak kabul edilmiştir. Nagashima ve ark.<sup>21</sup> nötral pozisyonda çekilen direkt grafilere ortalama C-D değerini kadın hastalarda  $157,4^{\circ} \pm 7,5^{\circ}$  ve erkek hastalarda  $158,2^{\circ} \pm 9,8^{\circ}$  olarak bildirmişler ve nötral pozisyonda C-D değerinin  $130^{\circ}$ 'nin altında olmasının medulla oblongata hasarı ile ilişkili olabileceğini raporlamışlardır. Botelho ve ark.<sup>6</sup> yaptıkları çalışmada C-D değerini Clivus kanal açısı olarak isimlendirmişler ve kontrol grubunun ortalama değerini  $148^{\circ} \pm 9,88^{\circ}$  olarak raporlamışlardır<sup>6</sup>. Ferreira ve ark.<sup>20</sup> da clivus kanal açısı tabirini kullanarak sağlıklı bireylerde ortalama değeri  $148,50^{\circ} \pm 10,10^{\circ}$  olarak bildirmişlerdir Bu çalışmada ortalama C-D değeri kadın hastalarda  $140,61^{\circ}$  ve erkek hastalarda  $141,28^{\circ}$  olarak bulunmuştur. Minimum ve maksimum değerleri ise sırasıyla  $169,08^{\circ} - 112,63^{\circ} \pm 11,93$  ve  $168,97^{\circ} - 109,83^{\circ} \pm 10,33$  olarak ölçülmüştür. Literatür ile karşılaştırıldığında ölçülen değerler eşik değerinin altında bulunmamaktadır ve diğer çalışmalara göre sonuçların daha düşük çıkmasının toplumsal farklılıklara bağlı olabileceği kanısına varılmıştır.

FM'un şekli ve boyutları cerrahi tekniği etkileyebilir ve bu konuda pek çok çalışma yapılmıştır<sup>1,9,10,22</sup>. Basaran ve ark.<sup>1</sup> retrospektif olarak gerçekleştirdikleri MR çalışmasında 91 Chiari malformasyonu olan hasta grubu ve 50 sağlıklı kontrol grubu üzerinde ölçümler yapmışlar ve ortalama FMa'nı  $900,8 \pm 125,5$  mm<sup>2</sup> olarak raporlamışlardır. Gocmen ve ark.<sup>8</sup> 150 adet kuru kafa üzerinde FM ölçümleri yapmışlar ve FMa için literatürde kullanılan 3 farklı yöntemi (Teixeria, Radinsky ve Cavalieri formülleri) karşılaştırmışlardır. Her metodun ortalama değerlerini sırasıyla  $790 \pm 99,86$  mm<sup>2</sup>,  $783 \pm 99,34$  mm<sup>2</sup> ve  $748,06 \pm 100,19$  mm<sup>2</sup> olarak raporlamış ve anlamlı bir fark gözlemlenmemişlerdir. FMap ve FMt ölçümlerinin ortalama değerleri ise sırasıyla  $34,38 \pm 2,38$  mm ve  $28,95 \pm 2,19$  mm olarak raporlanmıştır. Bu çalışmada ise FMa, FMap ve FMt değerleri sırasıyla kadın hastalarda  $733,26 \pm 102,09$  mm<sup>2</sup>,  $34,72 \pm 2,57$  mm,  $29,25 \pm 2,1$  mm ve erkek hastalarda  $800,12 \pm 110,62$  mm<sup>2</sup>,  $36,29 \pm 2,89$  mm,  $30,79 \pm 2,27$  mm olarak ölçülmüştür. Kuru kafalarda demineralizasyon sebebiyle ve çocuklarda boyutların küçük olması sebebiyle ölçümlerin farklı çıkabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Madadin ve ark.<sup>11</sup> BT görüntüleri üzerinden FM ölçümleri değerlendirmişler ve sırasıyla ortalama FMa, FMap ve FMt değerlerini kadın hastalarda  $869,80 \pm 122,75$  mm<sup>2</sup>,  $36,10 \pm 2,65$  mm ve  $30,60 \pm 2,47$  mm; erkek hastalarda  $925,84 \pm 98,20$  mm<sup>2</sup>,  $37,21 \pm 2,15$  mm ve  $31,65 \pm 2,25$  mm olarak bildirmişlerdir. Erkek hastalarda kadın hastalar ile kıyaslandığında bütün ölçümlerin daha büyük olduğunu belirtirken, cinsiyetler arasında FMa arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış, FMap ve FMt farkları anlamlı bulunmuştur<sup>11</sup>. Bu çalışmada erkek hastaların ölçüm değerleri, C-FM ve C-D haricinde, kadın hastalara göre daha büyük ölçüldü. Cinsiyetler arasında C-D değerleri dışında bütün ölçümler istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p > 0,001$ ).

Oldukça karmaşık bir anatomik yapıya sahip olan kafa tabanına yönelik cerrahi girişimler sırasında, olası iyatrojenik yaralanmaların önüne geçmek adına, bu bölgenin radyolojik ve morfolojik anatomisinin çok iyi bilinmesi gerekmektedir. Çalışmamızın amacı yaşadığımız topluma yönelik, kafa tabanı anatomisinin detaylı olarak belirlenip ortaya konmasıydı. Bu kapsamda, retrospektif olarak tamamladığımız morfometrik değerlendirme bulgularımız, cinsiyetler arasındaki farkların da, bu bölgeye yönelik tasarlanacak cerrahi girişim prosedürleri sırasında mutlaka göz önünde bulundurulması gerekliliğini

ortaya koymaktadır. Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz bulguların, farklı toplumlar üzerinde tamamlanan çalışma sonuçlarından farklılıklar göstermesi, toplumlar arasındaki morfometrik farklılıkları açık bir şekilde ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, görüntüleme yöntemleri arasındaki farklılıkların göz önünde bulundurulması, doğru bir cerrahi protokol tasarlanması açısından yararlı olabilecektir. Hedef dokunun belirlenip, uygun görüntüleme yönteminin seçilmesi tanı ve tedavi sırasında istenmeyen yaralanmaların önüne geçebilmek adına büyük önem taşımaktadır.

Toplumlar arasındaki farkların araştırılabilmesi, farklı ülkelerdeki araştırmacılar ile birlikte bir çalışmanın tasarlanması ile mümkün olabilecektir. Böylece, farklı toplumlara ait bireylerin morfometrik olarak farklı olup olmadıkları istatistiksel olarak ortaya konabilecektir.

Kafa tabanı ile ilgili yapıların morfometrik ölçümleri klinisyenler ve radyologlar için tanı ve tedavi sırasında büyük önem taşımaktadır. Farklı ölçüm teknikleri ile bireysel ve toplumsal farklılıklar sebebiyle farklı sonuçlar elde edilebilmektedir ve değerlendirmeler sırasında bu farklılıklar göz önünde bulundurulmalıdır.

Çalışmamız sonucunda ortaya koyduğumuz sonuçlar çerçevesinde, kafa tabanının morfometrik değerlerinin toplumlar arasında farklılıklar gösterdiği ortaya konmuştur. Kafa tabanına yönelik planlanacak cerrahi girişimler öncesinde, cerrahi protokolünün belirlenmesinde bu farklılıkların dikkate alınması, beklenmeyen olumsuzlukların önüne geçebilmek adına büyük önem taşır. Bununla birlikte, toplumlar arasındaki kraniyometrik farklılıkların anlamlılıklarının araştırılması adına, farklı toplumdan bireylerin dahil edileceği ve daha fazla birey sayısına sahip olan yeni çalışmalar planlanması literatüre önemli derecede katkı sağlayabilecektir.

## Sınırlamalar

Çalışmamızın retrospektif olarak tasarlanıp tamamlanmasından dolayı, çalışmaya dahil edilen bireylerin vücut kitle endeksleri ile ilgili verilere ulaşılammış olup, vücut kitle endeksi ile ilgili gruplandırmalar ve gruplar arası karşılaştırmalar gerçekleştirilememiştir.

## Kaynaklar

1. Basaran R, Efendioglu M, Senol M, Ozdogan S, Isik N. Morphometric analysis of posterior fossa and craniocervical junction in subtypes of Chiari malformation. *Clin Neurol Neurosurg* 2018;169:1–11.

2. Kanodia G, Parihar V, Yadav YR, Bhatele PR, Sharma D. Morphometric analysis of posterior fossa and foramen magnum. *J Neurosci Rural Pract* 2012;3(3):261–6.
3. Tubbs RS, Griessenauer CJ, Loukas M, Shoja MM, Cohen-Gadol AA. Morphometric analysis of the foramen magnum: an anatomic study. *Neurosurgery* 2010;66(2):385–8;discussion 8.
4. Murshed KAC, A. E.;Tuncer, I Morphometric Evaluation of the Foramen Magnum and Variations in its Shape: A Study on Computerized Tomographic Images of Normal Adults. *Turk J Med Sci* 2003;33:301–6.
5. Mahajan D. An anatomical perspective of human occipital condyles and foramen magnum with neurosurgical correlates. *Anatomy (International Journal of Experimental and Clinical Anatomy)* 2013;6–7:29–33.
6. Botelho RV, Ferreira ED. Angular craniometry in craniocervical junction malformation. *Neurosurg Rev* 2013;36(4):603–10;discussion 10.
7. Khanna G, Sato Y. Imaging of the Craniocervical Junction. *Operative Techniques in Neurosurgery* 2005;8(3):131–42.
8. Gocmen Mas N, Cirpan S, Aksu F, Yonguc Demirci GN, Lafci Fahrioglu S, Durmaz O, et al. Comparison of Three Methods Used for Estimating Area of Foramen Magnum. *J Craniofac Surg* 2018;29(3):792–5.
9. Govsa F, Ozer MA, Celik S, Ozmutaf NM. Three-dimensional anatomic landmarks of the foramen magnum for the craniocervical junction. *J Craniofac Surg* 2011;22(3):1073–6.
10. Zdilla MJ, Russell ML, Bliss KN, Mangus KR, Koons AW. The size and shape of the foramen magnum in man. *J Craniocervical Junction Spine* 2017;8(3):205–21.
11. Madadin M, Menezes RG, Al Saif HS, Abu Alola H, Al Muhanna A, Gullenpet AH, et al. Morphometric evaluation of the foramen magnum for sex determination: A study from Saudi Arabia. *J Forensic Leg Med* 2017;46:66–71.
12. Rai R, Iwanaga J, Shokouhi G, Loukas M, Mortazavi MM, Oskouian RJ, et al. A comprehensive review of the clivus: anatomy, embryology, variants, pathology, and surgical approaches. *Childs Nerv Syst* 2018;34(8):1451–8.
13. Hofmann E, Prescher A. The clivus: anatomy, normal variants and imaging pathology. *Clin Neuroradiol* 2012;22(2):123–39.
14. Russo VM, Graziano F, Russo A, Albanese E, Ulm AJ. High anterior cervical approach to the clivus and foramen magnum: a microsurgical anatomy study. *Neurosurgery* 2011;69(1 Suppl Operative): ons103–14;discussion ons15–6.
15. Whitney N, Sun H, Pollock JM, Ross DA. The human foramen magnum-normal anatomy of the cisterna magna in adults. *Neuroradiology* 2013;55(11):1333–9.
16. Henderson FC, Sr., Henderson FC, Jr., Wilson WAt, Mark AS, Koby M. Utility of the clivo-axial angle in assessing brainstem deformity: pilot study and literature review. *Neurosurg Rev* 2018;41(1):149–63.
17. Calandrelli R, Panfili M, D'Apolito G, Zampino G, Pedicelli A, Pilato F, et al. Quantitative approach to the posterior cranial fossa and craniocervical junction in asymptomatic children with achondroplasia. *Neuroradiology* 2017;59(10):1031–41.

18. Smoker WR. Craniovertebral junction: normal anatomy, craniometry, and congenital anomalies. *Radiographics* 1994;14(2):255–77.
19. Xu SS, Gong RZ. Clivodens Angle: A New Diagnostic Method for Basilar Invagination at Computed Tomography. *Spine* 2016;41(17):1365–71.
20. Ferreira JA, Botelho RV. The odontoid process invagination in normal subjects, Chiari malformation and Basilar invagination patients: Pathophysiologic correlations with angular craniometry. *Surg Neurol Int* 2015;6:118.
21. Nagashima C, Kubota S. Craniocervical abnormalities. Modern diagnosis and a comprehensive surgical approach. *Neurosurg Rev* 1983;6(4):187–97.
22. Acer N, Sahin B, Ekinci N, Ergur H, Basaloglu H. Relation between intracranial volume and the surface area of the foramen magnum. *Journal of Craniofacial Surgery* 2006;17(2):326–30.



# Radiographic Examination of Talocrural Joint Morphometry in Individuals with Normal Joint Anatomy

*Articulatio Talocruralis Morfometrisinin Anatomik Olarak Normal Eklem Yapısına Sahip Bireylerin Radyografilerinde Değerlendirilmesi*

Muhammet Bora Uzuner<sup>1</sup>, Mustafa F. Sargon<sup>2</sup>, Ferhat Geneci<sup>3</sup>, Mert Ocak<sup>2</sup>, Tanzer Sancak<sup>4</sup>, Deniz Demiryürek<sup>2</sup>, Burak Bilecenoğlu<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Department of Anatomy, Kafkas University Faculty of Medicine, Kars; <sup>2</sup>Department of Anatomy, Hacettepe University Faculty of Medicine; <sup>3</sup>Department of Anatomy, Yıldırım Beyazıt University Faculty of Medicine; <sup>4</sup>Department of Radiology, TOBB ETÜ Faculty of Medicine; <sup>5</sup>Department of Anatomy, Ankara University Faculty of Dentistry, Ankara, Turkey

## ABSTRACT

**Aim:** The traumas of the talocrural joint are very common in population. Therefore; the anatomy and morphometry of this joint has a great importance. The aim of this study was to examine the morphometry of talocrural joint in large series of patients according to age and sex in order to add some new knowledge to the literature. At the same time, according to the results of the research, it is aimed to give a way for field-specific prosthesis production to the prosthetic producers.

**Material and Method:** In this study; the talocrural joint radiographs of 274 anatomically normal patients (134 males, 140 females) were examined. The morphometric measurements of the defined parameters were done and their statistical analysis were performed according to age and sex. As far as we know, from our parameters; the mediolateral diameter of tibia (TML), the mediolateral diameter of fibula (FML), surface area of trochlea tali (TTA) and SIGMA angles were firstly defined in this study. Additionally; the innermost distance of talocrural joint (ATI), the outermost distance of talocrural joint (ATD), the angles in between the medial malleolus and talus (DELTA), the lateral malleolus and talus (ALFA) and the sagittal length of trochlea tali (TSU) were also measured.

**Results:** In the comparison of TML, FML, TTA, ATI, ATD measurement and ALFA angle in both sexes; they were found to be higher in males than in females. However; TSU and SIGMA angle were found to be higher in females, when compared with males. The DELTA angle was nearly the same in both sexes.

**Conclusion:** These morphometric analyses were performed in a huge number of anatomically normal patients' radiographs and therefore; we believe that the study will add a new knowledge to the literature, will help to the clinicians who are interested in the ankle joint and will be useful for the companies who are working on implant technology.

**Key words:** talocrural joint; ankle joint; anatomy; morphometry; radiography

## ÖZET

**Amaç:** Articulatio talocruralis travmalarına toplumda çok sık rastlanması nedeniyle bu eklem anatomik yapısı ve morfometrisinin çok iyi bilinmesi gereklidir. Bu çalışmada articulatio talocruralis morfometrisini yaş grupları ve cinsiyet parametrelerine göre geniş serilerde değerlendirerek literatüre katkı sağlamak ve araştırma sonuçlarına göre protez üreticilerine daha spesifik protez üretimi yapılabilmesi için yol göstermek amaçlanmıştır.

**Materyal ve Metot:** Çalışmada, ayak bileği eklemine herhangi bir patolojisi bulunmayan ve eklem anatomik olarak normal olduğunun tespit edildiği 274 bireye ait (134 erkek, 140 kadın) ayak bileği radyografileri incelendi. Tanımlanan parametrelerin morfometrik ölçümleri yapılarak elde edilen sonuçlar yaşa ve cinsiyete bağlı olarak istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Bildiğimiz kadarıyla morfometrik ölçümlerini yaptığımız parametreler arasında yer alan tibia'nın mediolateral çapı (TML), fibula'nın mediolateral çapı (FML), trochlea tali'nin yüzey alanı (TTA) ve SIGMA açısı literatürde ilk defa bizim tarafımızdan tarif edilmiştir. Ayrıca; çalışmada articulatio talocruralis'in en iç noktaları arasındaki mesafe (ATI), articulatio talocruralis'in en dış noktaları arasındaki mesafe (ATD), malleolus medialis ile talus arasındaki açı (DELTA) malleolus lateralis ile talus arasındaki açı (ALFA) ve trochlea tali'nin sagittal uzunluğu (TSU) ölçüldü.

**Bulgular:** Çalışmada, cinsiyetler arasında TML, FML, TTA, ATI, ATD uzunlukları ve ALFA açısı değerlendirildiğinde; erkeklere ait ölçüm sonuçları kadınlardan daha fazla olduğu tespit edildi. Bununla birlikte; kadınlarda TSU ve SIGMA açısının erkeklerden daha yüksek olduğu bulundu. Kadınlarda ve erkeklerde ölçülen DELTA açıları karşılaştırıldığında her iki cinste yaklaşık olarak eşit değerler saptandı.

**Sonuç:** Geniş serilerde ve normal bireylere ait articulatio talocruralis radyografilerinde gerçekleştirilen bu morfometrik analizlerin literatüre katkı sağlayacağını, ayak bileği ile ilgilenen hekimlere yol göstereceğini ve implant üreten firmalara önemli bir katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

**Anahtar kelimeler:** articulatio talocruralis; ayak bileği; anatomi; morfometri; radyografi

Muhammet Bora Uzuner, Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Kars, Türkiye, Tel. 0505 826 96 06 Email: borauzuner1@hotmail.com  
Geliş Tarihi: 28.11.2018 • Kabul Tarihi: 11.12.2018

## Introduction

The talocrural joint is one of the joints in the body that is most frequently exposed to trauma<sup>1</sup>. This joint ensures the unity of the leg area with the foot area and has a great functional importance. Body weight is transmitted to the talus through means of tibia and fibula. The talus then transmits the weight to navicular bone and calcaneus<sup>2,3</sup>. Talocrural joint is a trochlear type joint located between the talus, tibia and fibula. The flexion and extension movements of the foot ankle occur in this joint. Out of all injuries caused by sports, 20% consist in injuries of the talocrural joint, 33%-73% consist in lateral foot ankle twistings and another 20% consists in foot ankle injuries<sup>4</sup>. Injuries of the talocrural joint are generally classical inversion traumas which may occur frequently.

The morphometric structure of the talocrural joint plays a pivotal role because of the fact that this joint is relatively more exposed to traumas than other joints, especially to foot ankle twistings. Furthermore, a good knowledge on the morphometry of the talocrural joint can serve as a helpful guide to doctors who are interested in this area and can also pave the way to the development of new methods in cure planning.

## Material and Method

This study was conducted in the Department of Anatomy at the Faculty of Medicine at Hacettepe University in Ankara. Direct radiographies were selected from among the patients who have been registered at the Radiology Department of the TOBB Economy and Technology University (ETU) Hospital from 2006 through 2016.

Presence of pathologies served as the excluding criterion in the selection of radiographies. Individuals with injuries or ruptures in ligaments; fractures in bones that affect the joint; or individuals suffering from luxation or subluxation and also radiographies that included radiologic artefacts or those where the borders of the joint were not clear due to the low quality of the image were not included in the study.

A total of 274 radiographies were used in this study, out of which 134 male and 140 female radiographies that met the criteria. The radiographies of the individuals have been divided into a total of seven decades, which were formed based on the individuals' age that ranged from 10 to 85 and converted to DICOM format. The selected images in the radiography device were those pertaining to individuals whose manual

basic anteroposterior and lateral positions were in accordance with the standard protocol set forth by the World Health Organization. In this study we used the Film Workstation (v. 3.4) software and CTAn (ver. 1.12.9, Skyscan) software compatible with the PACS system of the TOBB ETÜ Hospital.

### *The parameters that were measured in the study*

**Measurement of the Sagittal Length of the Trochlea Tali (TSU):** After having identified the front and back-most ends of the trochlea tali in the lateral radiographies of the ankle, the sagittal length of the trochlea tali has been measured (Fig. 1a).

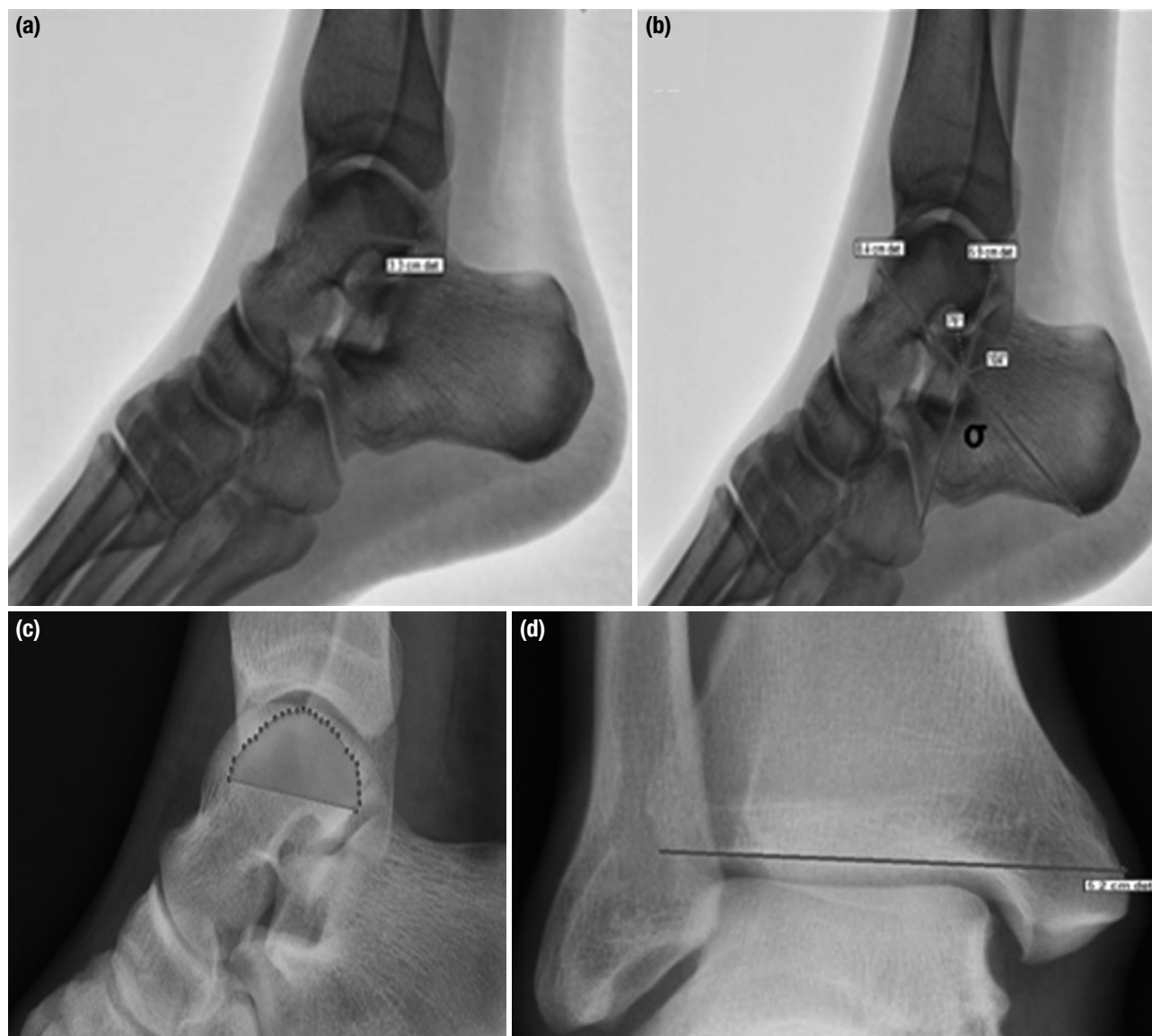
**Measurement of the Angle between the Edges of the Calcaneus and the Edges of the Talus (SIGMA angle):** We measured the lower angle (SIGMA angle) formed between the plane created from the most protruding back point on the lower face of the calcaneus to the most protruding medial front point of the trochlea tali on the one hand, and the plane created from the most protruding front point on the lower face of the calcaneus to the most protruding medial back point of the trochlea tali on the other (Fig. 1b).

**Measurement of the Surface Area of the Trochlea Tali (TTA):** After identifying the trochlea tali, we selected the ROIs (region of interest) and set the histogram half automatically by defining the trochlea tali's bone area existing between the boundaries. The bone surface area was calculated via the CTAn software in two dimensions (Fig. 1c).

**The Measurement of the Mediolateral Diameter of the Tibia (TML):** In the transverse plane, from the anterior edge of the tibial joint surface passing through the ceiling of articulation talocruralis; The mediolateral distance was measured between the most prominent points of the tibia. (Fig. 1d).

**Measurement of the Mediolateral Diameter of the Fibula (FML):** In the transverse plane, from the anterior edge of the tibial joint surface passing through the ceiling of articulation talocruralis; The mediolateral distance was measured between the most prominent points of the fibula. (Fig. 2a).

**Measurement of the distance between the innermost points of the talocrural joint at the medial and lateral malleoli (ATI):** We measured the distance between the innermost points of the talocrural joint by firstly defining the most medial points of the medial and lateral malleoli and in a way that it passed over the upper border of the talar dome (Fig. 2b).



**Figure 1. a-d.** Talocrural ankle measurement. TSU measurement (a); SIGMA angle (b); TTA measurement (c); TML measurement (d). TSU, measurement of the sagittal length of the trochlea tali; TTA, measurement of the surface area of the trochlea tali; TML, the measurement of the mediolateral diameter of the tibia.

Measurement of the distance between the outermost points of the talocrural joint at the medial and lateral malleoli (ATD): We measured the distance between the outermost points of the talocrural joint by firstly defining the most lateral points of the medial and lateral malleoli and in a way that it passes over the upper border of the talar dome (Fig. 2 c).

Measurement of the angles between lateral malleolus and talus: We measured the angle created from the plane formed from the most lateral upper protruding point of the talus parallel to the lateral side of the tibial

cortex on the one hand, and the lowest and upper most medial points of the medial surface of the lateral malleolus (ALFA angle) (Fig. 2 d).

Measurement of the angles between medial malleolus and talus: We measured the angle created from the plane formed from the lowermost medial protruding point of the talus parallel to the uppermost medial protruding point of the trochlea tali and the plane formed from the lower most medial protruding point of the talus to the most lateral point of the medial malleolus (DELTA angle). (Fig. 2e)





**Figure 2. a-e.** Talocrural ankle measurement. FML measurement (a); ATI measurement (b); ATD measurement (c); ALFA angle (d); DELTA angle (e). FML, measurement of the mediolateral diameter of the fibula; ATI, measurement of the distance between the innermost points of the talocrural joint at the medial and lateral malleoli; ATD, measurement of the distance between the outermost points of the talocrural joint at the medial and lateral malleoli.

### Statistical Analysis

The IBM SPSS Statistics 23.0 program was used for the statistical evaluations. Two-way ANOVA (variance analysis) was used to evaluate if the morphometric measurements showed differences based on age, sex and both age and sex. All statistical evaluations in which the p value was calculated as smaller than 0.05 were considered as significant.

All measurements were conducted by two researchers; an anatomist and an expert radiologist. In order to ensure the accuracy of the measurements, accuracy analysis was performed among the measurements held by each researcher and among measurements held by both researchers. To test the accuracy of each of the

measurements repeated by each researcher in four weeks' time, the Wilcoxon matched-pairs signed rank test was used. The accuracy between the two researchers was defined by the interclass correlation coefficient (ICC) and the coefficient of variation (CV) [ $CV = (\text{standard deviation}/\text{mean}) \times 100$ ]. Values of ICC bigger than 0.75 indicates good accuracy, whereas low CV values show a sensitive error and a necessity for repetition<sup>20</sup>.

### Results

No meaningful difference was seen in the consistency of the measurements held by each researcher. The measurements' consistency of Researcher 1 was found to be

93% and 96%, while for Researcher 2 consistency values were found to be 90% and 92%. For both researchers, it was determined that all measurements had a high consistency and no significant difference was observed. Regarding the consistency of measurements between both researchers, the interclass correlation coefficient was found as 0.947 and 0.991; as such it was within the reliability level.

The age distribution of males ranged from 10–85 with the mean age found to be 38.8, while the females' age distribution ranged from 11–79 and the mean age was 40.2. The differences between the mean ages of males and females were found to be not statistically significant (Table 1).

In all of the parameters no difference was observed neither among the age groups ( $p>0.347$ ) nor among the age groups based on sex ( $p>0.453$ ). In all of the

age groups the mean of the male measurements was found to be higher compared to the female measurements. In the examination of all the length measurements, it was identified that males in the 5<sup>th</sup> group and women in the 7<sup>th</sup> group had the highest values of the TML, TTA and ATU. Furthermore, males and females of the 7<sup>th</sup> group demonstrated the highest values in the FML and TSU measurements. Only in the ATI measurement, females of the 6<sup>th</sup> group and males of the 1<sup>st</sup> group showed the highest values. As regards the angle measurements, 3<sup>rd</sup> group males and 2<sup>nd</sup> group females had the highest values in the SIGMA measurements; both 1<sup>st</sup> group males and females had the highest values in the ALFA measurements; 3<sup>rd</sup> group males and 5<sup>th</sup> group females had the highest values in the DELTA measurements (Table 2). According to the correlation analysis, all length parameters were found to be in a positive correlation with each-other. No correlation was found between the length measurements and angular parameters (Table 3).

## Discussion

Talocrural joint is one of the joints most frequently injured by sports activities. The traumas of the talocrural joint caused by sports injuries are observed to be at a high level of 15%-20%. Injuries are especially seen to occur during running activities and anterior-lateral leaps. The frequency of the talocrural joint traumas observed in football, basketball and volleyball constitutes 25%-50% of all the injuries of the muscle skeleton system<sup>4-9</sup>.

Given that the talocrural joint is relatively more exposed to traumas such as foot twisting, the morphometrical evaluation and the anatomical structure of this joint gain a lot of importance. Besides, the movements of the ankle joint are limited to flexion and extension has a lot of impact on the anatomical structure of the joint<sup>10</sup>.

In many emergency rooms of hospitals, diagnoses are made via direct radiography, ultrasonography and computed tomography (CT) scans, which are more easily accessible<sup>11</sup>. In the diagnosis of some pathologies, direct radiographies are used due to being economical and having a sufficient quality of the image. It is known that in order for the anteromedial tibial and talar osteophytes to be clearly seen in direct radiographies, taking anteromedial oblique graphies will be appropriate. In this way the necessity for expensive imaging methods such as CT and Magnetic

**Table 1.** Distribution of individuals by age and sex

Age Groups	N	$\bar{x}\pm s$	Min-Maks.
1. Group (10–19)	29	16.55±2.27	10–19
Male	15	16.467±2.32	10–19
Female	14	16.643±2.30	11–19
2. Group (20–29)	44	24.77±3.07	20–29
Male	22	25.04±2.86	20–29
Female	22	24.50±3.32	20–29
3. Group (30–39)	82	34.52±2.61	30–39
Male	41	34.48±2.69	30–39
Female	41	34.561±2.56	30–39
4. Group (40–49)	52	43.57±3	40–49
Male	26	42.84±3.05	40–49
Female	26	44.30±2.82	40–49
5. Group (50–59)	31	54.25±3.09	50–59
Male	14	54.21±3.30	50–59
Female	17	54.29±3.01	51–59
6. Group (60–69)	24	64.45±3.13	60–69
Male	11	65.27±3.49	60–69
Female	13	63.76±2.74	60–69
7. Group (70–85)	13	77.08±4.07	70–85
Male	6	78.6±5.07	72–85
Female	7	76±3.16	70–79
Total	274	39.49±15.85	10–85
Male	134	38.8±15.73	10–85
Female	140	40.2±15.99	11–79

**Table 2.** The highest measurement values in the age groups based on sex

Measurements	Female			Male		
		% 95 C. I	Min-Max		% 95 C. I	Min-Max
DELTA	15.53±3.34	14.16±16.9	11–23	15.39±2.54	14.51±16.28	11–21
ALFA	35.79±5.54	33.41±38.16	30–49	34.87±4.53	32.57±37.16	30–47
ATD	5.81±0.65	5.51±6.12	5–7.1	6.66±0.63	6.1±7.22	5.8–7.2
ATI	2.99±0.34	2.79±3.18	2.3–3.7	3.38±0.28	3.17±3.6	3–3.8
TTA	514.36±93.03	418.93–609.8	400.02–668.90	669.66±136.4	602.18–737.14	394.50–880.69
TSU	3.77±0.36	3.46–4.08	3.1–4.1	4.12±0.31	3.75–4.49	3.8–4.5
SIGMA	87.95±5.38	85.49–90.41	78–101	85.49±5.87	83.68–87.29	72–97
FML	1.89±0.16	1.70–2.06	1.7–2.1	1.92±0.28	1.70–2.13	1.5–2.2
TML	4.81±0.46	4.39–5.23	4–5.5	5.61±0.5	5.31–5.90	4.5–6.2

ATD, measurement of the distance between the outermost points of the talocrural joint at the medial and lateral malleoli; ATI, measurement of the distance between the innermost points of the talocrural joint at the medial and lateral malleoli; TTA, measurement of the surface area of the trochlea tali; TSU, measurement of the sagittal length of the trochlea tali; FML, measurement of the mediolateral diameter of the fibula; TML, the measurement of the mediolateral diameter of the tibia.

**Table 3.** Relationships among variables

N=274	TML	FML	SIGMA	TSU	TTA	ATI	ATU	ALFA	BETA	DELTA	GAMA
TML	1	<b>0.753**</b>	<b>-0.153*</b>	<b>0.883**</b>	<b>0.833**</b>	<b>0.804**</b>	<b>0.919**</b>	0.105	-0.075	0.010	-0.018
FML	<b>0.753**</b>	1	-0.091	<b>0.700**</b>	<b>0.693**</b>	<b>0.512**</b>	<b>0.731**</b>	0.088	-0.089	-0.020	0.016
SIGMA	<b>-0.153*</b>	-0.091	1	-0.004	0.070	-0.133*	-0.133*	0.019	-0.020	0.065	-0.065
TSU	<b>0.883**</b>	<b>0.700**</b>	-0.004	1	<b>0.853**</b>	<b>0.717**</b>	<b>0.852**</b>	0.077	-0.045	0.020	-0.025
TTA	<b>0.833**</b>	<b>0.693**</b>	0.070	<b>0.853**</b>	1	<b>0.647**</b>	<b>0.793**</b>	0.118	-0.091	0.050	-0.053
ATI	<b>0.804**</b>	<b>0.512**</b>	<b>-0.133*</b>	<b>0.717**</b>	<b>0.647**</b>	1	<b>0.858**</b>	0.032	0.001	0.001	-0.004
ATU	<b>0.919**</b>	<b>0.731**</b>	<b>-0.133*</b>	<b>0.852**</b>	<b>0.793**</b>	<b>0.858**</b>	1	0.048	-0.021	-0.036	0.033
ALFA	0.105	0.088	0.019	0.077	0.118	0.032	0.048	1	<b>-1.000**</b>	<b>0.168**</b>	<b>-0.168**</b>
DELTA	0.010	-0.020	0.065	0.020	0.050	0.001	-0.036	<b>0.168**</b>	<b>-0.164**</b>	1	<b>-1.000**</b>

TML, the measurement of the mediolateral diameter of the tibia; FML, measurement of the mediolateral diameter of the fibula; TSU, measurement of the sagittal length of the trochlea tali; TTA, measurement of the surface area of the trochlea tali; ATI, measurement of the distance between the innermost points of the talocrural joint at the medial and lateral malleoli.

Resonance Imaging) MRI decreases<sup>12,13</sup>. We chose the direct radiographic imaging in this study in order to be able to examine a high number of individuals, to provide more opportunities to the accessibility of retrospective images, due to the correct results these methods give in the morphometric analysis done in the related region and the low cost.

When evaluating parameters related to the body composition such as body weight, age, height and sex, it is known that body weight and age have quite small impacts on the morphometry of the foot ankle in adult populations<sup>14</sup>. Due to this reason, all morphometric measurements and analyses in this study have been conducted in accordance with the age groups and sex.

Similar to studies of Stagni, Kuo and Kwon<sup>15–18</sup>, in our study we named the parameters as follows: Tibial width (TiW) measurement as ATI length, Malleolar width (MalW) length as ATD length and Trochlea tali length (TaAL) as TSU length. By considering also the racial differences, these values were found to be approximately similar to those of other researchers (Table 4). But, the main difference in our study is that the measurements were performed in much more extensive series.

Fessy et al.<sup>19</sup> conducted their measurements according to their definition of the medial malleolar angle which follows: the angle created between the straight line formed from the lowest point of the medial malleolus parallel to the lateral cortex of the tibia on the one hand,

**Table 4.** The comparison of TiW anterior, MalW and TaAL parameters

	Stagni Direct Radiography			Kuo Cadaver CT	Amputated	Kuo BT 3D material CT-3D Modelling		Kwon Retrospektif	Our Study Retrospektif	
	23 M	13F	Mean	10 M-F	32 M	26 F	Mean	100 M-F	134 M	140 F
TiW anterior	33.6 mm	28.6 mm	31.9 mm	31.9 mm	34 mm	31.7 mm	33.3 mm	31.1 mm	3.2±0.37 mm	2.87±0.36 mm
MalW	71 mm	63.5 mm	69 mm	61.5 mm	64.0 mm	59.9 mm	63.1 mm	67.7 mm	6.59±0.65 mm	5.85±0.66 mm
TaAL	43.6 mm	37.9 mm	41.7 mm	32.3 mm	-	-	-	35.3 mm	3.93±0.42 mm	3.46±0.42 mm

TiW, Tibial width; MalW, Malleolar width; TaAL, Trochlea tali length.

and the straight line formed from this point parallel to the lateral cortex of the tibia on the other. Meanwhile, in our study the measurement of the angle between the medial malleolus and talus (Delta angle) follows: the angle created between the plane formed from the lower most medial protruding point of the talus to the upper most medial protruding point of the trochlea tali and the plane formed from the lower most medial protruding point of the talus to the most lateral point of the medial malleolus. We believe that our definition of the angle is more accurate than the definition of the Fessy et al. given that their definition of the angle does not include a clear definition of the tibia cortex's border and it can pave the way to unrealistic results in studies.

When comparing the measurements of the lateral malleolar angle, even though the definition is the same in both studies, it is seen that the measurement values of Fessy et al. are smaller (average 14.62°)<sup>12</sup>. The main reason of this difference is thought to be due to the fact that Fessy et al. used mortis graphy, whereas in our study we performed the measurements in the anteroposterior radiographies. In this measurement, given that the anteroposterior radiographies are routinely required from patients, they can be obtained more easily and more practically.

The SIGMA angle we defined is important for revealing the joint deformation and for distinguishing healthy individuals from individuals with pathological joints. Furthermore, we think that it will also serve as a new clinical diagnosis parameter in the literature.

In order to decide on the surgery treatment of the degenerative arthritis that is seen in foot ankle, firstly the symptoms of the patient and the functional necessities need to be understood. For this reason, we believe that

the TTA measurement we have added to the literature, will provide for a better follow up of the recovery period during the cure.

Heybeli et al. maintain that it is critical that during the distraction of the talocrural joint the tilt movement of the talus should not exert pressure to the medial and lateral malleoli, in order for the posterior area of the foot ankle to be displayed better<sup>21</sup>. For this reason we believe that a good knowledge on the ALFA and DELTA angles that we described in this study is important.

In our study statistically significant difference between age groups was found in the ATD measurements and no statistically significant difference was found in the ATI angle. While the longitudinal growth of the bones is finalized with the ossification of the epiphyseal line during the development/growth period, the transverse growth of the bones is possible during the whole lifetime<sup>22</sup>. Following this statement, in our study the distance between bone faces in front of each-other during the transverse growth of the bones, does not change statistically, but statistically significant difference was found in the lateral most protruding points of the bones.

## Conclusion

There exist a limited number of studies related to this topic in the literature. We believe that this study will contribute to the literature and will also have an impact on the increase of the success rate for individuals after surgery due to the possibility of the production of the ankle prosthesis in accordance with the individual's sex and it will provide clinicians with easy, new, practical and measurable methods in the cases of degenerative arthritis, osteoarthritis, subluxation and luxation.

## References

1. Beynon BD, Murphy DF, Alosa DM. Predictive factors for lateral ankle sprains: a literature review. *Journal of Athletic Training* 2002;37(4):376.
2. Hellier CA, Jeffery N. Morphological plasticity in the juvenile talus. *Foot and Ankle surgery* 2006;12(3):139–47.
3. Prasad N, Prasad M. Morphometric study of medial collateral ligaments of ankle. *J Evid Based Med Healthc* 2016;3(46):2296–8.
4. Fong DT-P, Hong Y, Chan L-K, Yung PS-H, Chan K-M. A systematic review on ankle injury and ankle sprain in sports. *Sports Medicine* 2007;37(1):73–94.
5. Boruta PM, Bishop JO, Braly WG, Tullos HS. Acute lateral ankle ligament injuries: a literature review. *Foot & Ankle International* 1990;11(2):107–13.
6. Garrick JG. The frequency of injury, mechanism of injury, and epidemiology of ankle sprains. *The American Journal of Sports Medicine* 1977;5(6):241–2.
7. Hancı E. Fonksiyonel ayak bileği instabilitesi olan bireylerde ayak bileği evertör ve dorsifleksör kas gruplarına uygulanan eksentrik ve konsentrik kombine izokinetik egzersizin kuvvet ve propriosepsiyon üzerine etkisi [Tıpta uzmanlık tezi]. Bursa: Uludağ Üniversitesi; 2014.
8. Peters JW, Trevino SG, Renstrom PA. Chronic lateral ankle instability. *Foot & Ankle* 1991;12(3):182–91.
9. Smith RW, Reischl SF. Treatment of ankle sprains in young athletes. *The American Journal of Sports Medicine* 1986;14(6):465–71.
10. Tekdemir İ. İnsan ayak bileği ekleminin (art. talocruralis) bağlarının (özellikle lig. deltoideum) statik stabilizatör olarak fonksiyonlarının ve kopma dayanımlarının incelenmesi konusunda araştırmalar [Tıpta uzmanlık tezi]. Ankara: Ankara Üniversitesi; 1989.
11. Özdemir ZM, Kerimoğlu Ü. Ekstremitenin travmatik olmayan acilleri. *Türk Radyoloji Seminerleri* 2016;4:323–39.
12. Tuncer K, Topal M. Erişkin ayak-ayak bileğinin değerlendirilmesi. *Derman Tıbbi Yayıncılık* 2015:560–82.
13. Dobbs MB, Walton T. Autosomal dominant transmission of accessory navicular. *The Iowa Orthopaedic Journal* 2004;24:84.
14. Blais MM, Green WT, Anderson M. Lengths of the growing foot. *J Bone Joint Surg Am* 1956;38(5):998–1000.
15. Stagni R, Leardini A, Ensini A, Cappello A. Ankle morphometry evaluated using a new semi-automated technique based on X-ray pictures. *Clinical Biomechanics* 2005;20(3):307–11.
16. Kuo CC, Lu HL, Leardini A, Lu TW, Kuo MY, Hsu HC. Three-dimensional computer graphics-based ankle morphometry with computerized tomography for total ankle replacement design and positioning. *Clinical Anatomy* 2014;27(4):659–68.
17. Kuo C-C, Lee G-Y, Chang C-M, Hsu H-C, Leardini A, Lu T-W. Ankle morphometry in the Chinese population. *Journal of Foot and Ankle Research* 2008;1(1): O11.
18. Kwon DG, Sung KH, Chung CY, Park MS, Lee SH, Kim TW, et al. Preliminary findings of morphometric analysis of ankle joint in Korean population. *The Journal of Foot and Ankle Surgery* 2014;53(1):3–7.
19. Fessy M, Carret J, Bejui J. Morphometry of the talocrural joint. *Surgical and Radiologic Anatomy* 1997;19(5):299–302.
20. Chang P, Liang K, Lim J, Chung M, Chien L. A comparison of the thresholding strategies of micro-CT for periodontal bone loss: a pilot study. *Dentomaxillofacial Radiology* 2014.
21. Heybeli N. Burkulmuş Ayak bileğinin değerlendirilmesi. *Sted* 2002;11(4):129–31.
22. Waschke J, Böckers TM, Paulsen F. *Sobotta Anatomi Konu Kitabı Mustafa Fevzi Sargon Elsevier Health Sciences.* (Çev) 2015, Germany: Elsevier Health Sciences.



# Primer Sezaryen Sırasında Adneksial Torsiyon ve İfundibulo-Pelvik Ligament Yokluğu: Vaka Sunumu

*Adnexial Torsion and Infundibulo-Pelvic Ligament Absence During Primary Caesarean: Case Report*

**Gülten Sağır, Bakiye Akbaş, Özgür Özdemir**

*Medical Park Trabzon Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği, Trabzon, Türkiye*

## ABSTRACT

The purpose of this study is to emphasize the importance of evaluation of adnexal structures and neighboring organs during cesarean operation. It is necessary to evaluate adhesions due to congenital anomalies, ovarian cysts, ovarian premalign masses, teratomas, morgagni cysts, ligamentum latum myoma, endometriosis, and past pelvic inflammatory disease (PID) that may be present during the operation. This evaluation will help prevent the development of acute abdomen due to unexplained pelvic pain or adnexial torsion in the postoperative patient.

The 30 years old patient PK, gravida 1, visited our clinic for the first time at the 36th week. The patient did not have any complaints during the one-month follow-up at our hospital and complications did not develop. During 40 weeks plus 1 day of her pregnancy, head pelvis incompatibility was detected in the examination of the patient and she was admitted to the cesarean operation. The patient who had no history of previous intra-abdominal surgery, was underwent intraabdominal control after the uterus was closed during cesarean operation. Left tuba, over and tuba-ovarian relation were normal. The right tuba was torsioned 3 times around itself and was lack of right infundibulo-pelvic ligament, and also, over was at the distal end of the tuba. The fimbrial tip of tuba and over adhered to the sacrouterin ligament in the posterior uterus via a fibrous band without avascularity. Adhesion was opened and right adnexial detorsion was performed. Since the overlying tissue at the end of the tuba was mobil, the right adnexal was fixed again to the adhesion zone. The patient was discharged on the second postoperative day without any complications.

Adnexal structures and neighboring organs should be checked during cesarean section. This control will prevent the unexplained abdominal pain and acute abdomen that may occur after the operation, and will help early detection of possible additional pathologies.

**Key words:** pregnancy; adnexial torsion; detorsion; infundibulo-pelvic ligament

## ÖZET

Bu çalışmanın amacı, sezaryen operasyonu sırasında adneksial yapıların ve komşu organların değerlendirilmesinin önemini vurgulamaktır. Operasyon sırasında olması muhtemel konjenital anomaliler,

ovaryan kistler, overin premalign kitleleri, teratom, morgagni kistleri, ligamentum latum miyomu, endometriosis, geçirilmiş pelvik inflamatuvar hastalık (PID)'e bağlı adezyonların değerlendirilmesi gereklidir. Bu değerlendirme postoperatif dönemdeki hastada açıklanamayan pelvik ağrı ya da adneksiyal torsiyon gibi nedenlere bağlı akut batin tablosunun gelişmesinin önlenmesine yardımcı olacaktır.

Hasta PK 30 yaşında, gravida 1, kliniğimize ilk defa 36. haftada kontrol amacıyla başvurdu. Hastanın hastanemizdeki bir aylık takibi boyunca herhangi bir şikayeti olmadı ve komplikasyon gelişmedi. 40 hafta 1 günlük gebelik mevcut iken gün aşımı şikâyetiyle başvuran hastanın muayenesinde baş pelvis uygunsuzluğu tespit edilerek sezaryen operasyonuna alındı. Daha önce geçirilmiş batin içi cerrahi öyküsü bulunmayan hastada, sezaryen operasyonu sırasında uterus kapatıldıktan sonra batin kontrolü yapıldı. Sol tuba, over ve tuba-ovaryan ilişki normaldi. Sağ tuba kendi etrafında 3 kez torsiye olmuştu, sağ infundibulo-pelvik ligament izlenmedi, over tubanın distal ucunda idi. Tubanın fimbriyal ucu ile over damar içermeyen bir fibröz bant aracılığıyla uterus posteriorunda sacrouterin ligamentin üstüne yapıştı. Adezyon açılarak sağ adneksial detorsiyon yapıldı. Tuba ucunda over dokusu mobil olduğundan yeniden sağ adneks, adezyon bölgesine fikse edildi. Hasta postoperatif ikinci günde herhangi bir komplikasyon olmadan taburcu edildi.

Sezaryen sırasında adneksial yapılar ve komşu organlar kontrol edilmelidir. Bu kontrol operasyon sonrası oluşabilecek nedeni açıklanamayan karın ağrısı ve akut batin tablosunu önleyecek ve olası başka ek patolojilerin erken teşhisine yardımcı olacaktır.

**Anahtar kelimeler:** gebelik; adneksial torsiyon; detorsiyon; infundibulo-pelvik ligament

## Giriş

Adneksial torsiyon, nadir görülmesine rağmen akut abdominal ağrının en önemli nedenlerinden biridir. Jinekolojik cerrahi acillerin %2,7'sini oluşturmaktadır<sup>1</sup>. Adneksial torsiyonun etiolojisi bilinmemektedir. Normal boyutlardaki bir overde torsiyon olabileceği gibi, genellikle beraberinde overde bir kitle mevcuttur. Gebelik risk faktörleri arasındadır. Gebelik sırasında adneksial torsiyon oldukça nadir görülür ve insidansının 1–5/100,000 arasında olduğu bildirilmektedir<sup>2</sup>.

Gülten Sağır, Medical Park Trabzon Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği, Trabzon, Türkiye, Tel. 0530 416 24 23 Email. gultensgr@hotmail.com  
Geliş Tarihi: 01.06.2018 • Kabul Tarihi: 17.07.2018

Adneksial torsiyon; adneksial yapıların, overin, nadiren de sadece tuba uterinanın infundibulo-pevik ligament ve tubo-ovaryan ligamentlerden oluşan merkez hat boyunca en az bir kez tam rotasyonu olarak tanımlanır<sup>3</sup>. Torsiyon sonucunda oluşan venöz staz nedeni ile over boyutunda büyüme ve over içerisine hemoraji meydana gelebilir. Torsiyonun devam etmesi halinde arteriyel tromboza bağlı olarak dokuda nekroz ortaya ortaya çıkarılabilir<sup>4,5</sup>. Adneksial torsiyon; destekleyici bağlar olan ovaryan ve infundibulo-pelvik ligamanların mobilitesi nedeniyle meydana gelmektedir. Torsiyon durumunda her iki bağ da parsiyel olarak strangüle olmakta ve kan akımı bozulmaktadır. İlk olarak venöz kan akımı ve daha sonra arteriyel kan akımı bozulmaktadır. Sonuç olarak adneksial ödem, iskemi, nekroz gelişmektedir. Adneksial hasar irreversibl olabilmektedir. Ama overin şiddetli hasarlandığı torsiyon olgularında bile, takipte overin fonksiyonlarının korunabildiği izlenmiştir. Bu da arteriyel kan akımının tam olarak kesilmediğini gösterir. Adneksin iskemik hemarajik, siyahımsı, mavimsi, kötü görüntüsü gangrenden ziyade adneksdeki lenfatik ve venöz stazın sonucu oluşmaktadır. İskeminin irreversibl hasara yol açabileceği süre konusunda ortak olarak kabul edilen bir birliği yoktur<sup>6</sup>.

Tedavide iskemik ve ödemli adneksi detorsiyone etmenin tromboembolik olayları artırmadığı bildirilmiştir. Adneksial torsiyon sonrası pulmoner emboli insidansı %2'dir ve detorsiyon sonrası bu riskte bir artış gözlenmemektedir<sup>7</sup>. Ovaryan torsiyonun tekrarlaması nadir bir durumdur. Bu nedenle ovaryan fiksasyon rutin bir prosedür olarak uygulanmamaktadır<sup>8</sup>. Eğer torsiyon tekrarlar ise özellikle polikistik overler gibi büyük overlerin olduğu durumlarda fiksasyon önerilmektedir. Fonksiyonel over kistleri nedeniyle torsiyone olan olgularda kistin tekrarlanmasını önlemek için oral kontraseptifler verilmelidir<sup>8</sup>.

## Olgu Sunumu

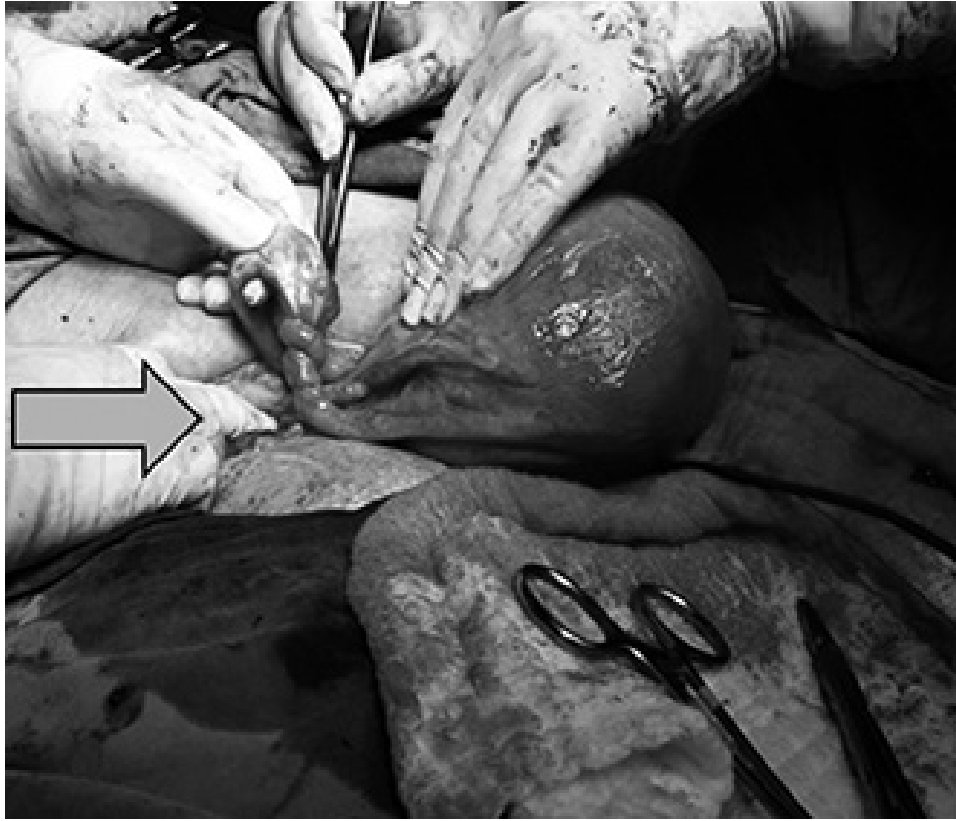
30 Yaşında primigravida gebe, kliniğimize ilk defa 36. gebelik haftasında başvurdu. Son adet tarihini bilmeyen hastanın ilk ultrasonografi (USG) sonuçları kontrol edilerek, hastanın beklenen doğum tarihi belirlendi. Hastanın hastanemizdeki bir aylık takibi boyunca herhangi bir şikayeti olmadı ve komplikasyon gelişmedi. USG'de tahmini fetal ağırlık (EFW), yaklaşık 4200 gr belirlendi. Rh uygunsuzluğu bulunan hastanın özgeçmiş ve soy geçişinde özellik yok idi. Tam kan sayımında hemoglobin 12,2 gr/dl, platelet 214000, hematokrit 35,5 %olarak normal sınırlarda bulundu.

Diğer tüm laboratuvar tetkikleri normal idi. Hastanın muayenesinde baş pelvis uygunsuzluğu tespit edilerek sezaryen operasyonuna alındı.

Sezaryen operasyonu ile apgar skoru 7/9 olan 4165 gram ölçüsünde bir kız bebek komplikasyonsuz olarak doğurtuldu. Daha önce geçirilmiş batın içi cerrahi operasyonu olmayan hastada, sezaryen esnasında uterus kapatıldıktan sonra her iki adneksial alan, alt ve üst batın kontrolü yapıldı. Uterus, sol tuba, over, tuba-ovaryan ilişki, infundibulo-pelvik ligament normaldi. Sağ tuba, ampuller bölgenin yaklaşık 1 cm distalinden başlayarak kendi etrafında 3 kez torsiyone olmuş olarak izlendi, sağ infundibulo-pelvik ligament izlenmedi, sağ over sağ tubanın distal ucunda tubaya yapışık halde idi (Şekil 1). Sağ tubanın fimbriyal ucu ve over damar içermeyen bir fibröz bant ile uterus posteriorunda sağ sacrouterin ligament üzerine yapıştı. Sağ tuba ve overin makroskopik görünümü normaldi; ödem, konjesyon, nekroz, gangren bulgusu izlenmedi. Olgu izole asemptomatik adneksial torsiyon olarak değerlendirildi. Adezyolisiz yapıldı ve tuba detorsiyone edildi (Şekil 2). Detorsiyone edilen tubanın uzunluğunun normalden fazla ve yaklaşık 15 cm olduğu görüldü (normal ortalama tuba uzunluğu: 10 cm). Tubanın ucunda tubanın fimbriyal bölgesine yapışık olan over dokusunun mobil olması nedeniyle adneksial torsiyon nüksünü önlemek amacıyla sağ adneks adezyon bölgesine iki adet multiflaman polyglactin (vicryl) 2/0 absorblabl sütür ile fikse edildi. Hasta postoperatif ikinci günde herhangi bir komplikasyon olmadan taburcu edildi. Hastanın 4 aydır yapılan takibinde jinekolojik bir şikayet ve komplikasyon gelişmedi.

## Tartışma

Adneksial torsiyon reproduktif dönemde kadınlarda görülen akut klinik bir tablodur. Genellikle over torsiyonlarına tuba eşlik ettiği için adneksial torsiyon olarak tanımlanmaktadır. Adneksial torsiyon, değişik derecelerde ağrı ile birlikte olabilen ciddi bir durumdur. Genellikle adneksial yapılarda mevcut over kisti veya hidrosalpinks gibi over ve adneks boyutunu büyüten bir lezyona sekonder torsiyon meydana gelir. Ancak özellikle prepubertal kızlarda olmak üzere normal overlerde de torsiyon gelişebilmektedir. Predispozan faktörler olarak hidrosalpinks, geçirilmiş tubal cerrahi, pelvik konjesyon, ovaryan veya paraovaryan kitleler, travma sayılabilir<sup>9</sup>. Adneksial torsiyonda çeşitli derecede arteriyel, venöz, lenfatik oklüzyon olur. Erken evrelerde persiste arteriyel akım vardır. Akım varlığı



**Şekil 1.** Bir kez detorsiyon yapıldıktan sonrası.



**Şekil 2.** Detorsiyondan ve adezyolisizden sonrası.



torsiyonu ekarte ettirmez. Bizim vakamızda klinik olarak semptom ve şikâyet yoktu. Sezaryen sırasında uterus kapatıldıktan sonra adneksial yapıların kontrolü sırasında sağ adneksiyal torsiyon görüldü. Sağ tuba ve over kendi etrafında 3 kez torsiyon olmuştu. Sağ adneksde kan akımı bozukluğunu düşündüren bulgu yoktu yalnızca fallop tüpü normalden uzundu.

Gebelik sırasında adneksial torsiyon nadir görülür ve görülme sıklığı yüzbinde 1–5 arasında olduğu bilinmektedir<sup>2</sup>. Adneksial torsiyonu olan hastaların yaklaşık olarak %20'si gebedir. Adneksiyal torsiyon gebeliğin herhangi bir döneminde görülmesine rağmen en sık birinci trimester de izlenir ve üçüncü trimester de ise oldukça nadirdir<sup>10</sup>. Sağ adneksin torsiyonu sol adnekse göre daha sıktır. Bunun nedeni solda sigmoid kolon varlığının torsiyonu engellemesidir ve sağ infundibulo-pelvik ligamentin fizyolojik olarak daha uzun olmasıdır. Bizim olgumuz literatürde torsiyonun oldukça nadir olduğunun bildirildiği gebelik trimesteri olan üçüncü trimesterde idi ve literatür bilgileri ile uyumlu olarak torsiyon sağ adneksteydi.

Adneksial torsiyon klinik olarak hipoksi ve nekrozun şiddetiyle doğru orantılı olarak bulantı kusma, alt batusunda hassasiyet ağrı ile seyreden akut batın tablosuna neden olabilir. Adneksial torsiyonun spesifik bir klinik ve laboratuvar bulgusunun olmaması diğer akut batın yapan patolojilerden ayırımı güçleştirmektedir. Yine gebelik varlığı nedeni ile uterusun büyüklüğünün artması, adnekslerin anatomik pozisyonunun değişmesi, gebelik nedeniyle görüntüleme yöntemlerinin uygulanmasında çekinceler olması ve visualisasyon güçlüğünün meydana gelmesi tanı ve ayırıcı tanıyı zorlaştırılmaktadır. Bizim olgumuzda adneksial torsiyon ile ilgili olabilecek bir şikâyet veya klinik ve laboratuvar bulgu mevcut değildi. Olgumuzda insidental olarak sezaryen operasyonu esnasında uterus kapatıldıktan sonra adneksial yapıların kontrolü sırasında sağ adneksial torsiyon tesbit edildi. Sağ tuba kendi etrafında üç kez torsiyone olmuş idi. Sağ infundibulo-pelvik ligament atrezik idi ve sağ over, tubanın distalinde serbest olarak bulunuyordu. Sağ adnekste kan akımı bozukluğunu düşündüren bulgu izlenmemekte idi ve fallop tüpü normalden uzun olarak tesbit edildi.

Adneksial torsiyon vakalarının patognomik bir görüntüleme yöntemi, spesifik semptomları ve karakteristik bir laboratuvar bulgusu olmadığından preoperatif tanısı zordur<sup>11</sup>. Adneksial torsiyon özellikle alta yatan bir adneksial kitle olmadığından tanı koymanın zor olduğu bir antidedir. Kitle ya da kist olmaksızın adneksial

torsiyon oluşmasıyla ilgili ortaya atılan bir kaç teori mevcuttur. Adneksial torsiyon mezosalpinks, mezo-ovariumun anormal uzunluğu ya da hiperlaksitesine bağlı olabilir. Bir diğer teoriye göre ise perimenarşal aktivite veya vücudun sarsıcı hareketleri ile adneksial venöz konjesyon oluşmasıdır<sup>12,13</sup>.

Olgumuzda infundibulo-pelvik ligamentin olmayışının ve overin serbest bulunmasının adneksi sabit tutacak güçlerde kayba sebep olabileceğini ve bu nedenle torsiyona predispozisyon meydana getirebileceğini düşünüyoruz. Ayrıca gebeliğin kendisinin de izole tuba torsiyonuna neden olabileceği bilinmektedir.

Nullipar kadınlarda overler, ovaryan fossada (walldeyer fossası) yer alır. Ovaryan fossa lateral pelvik duvarda yer alır. Ligamentum suspensorium ovarii (infundibulo-pelvik ligament), pelvik yan duvardan overlere uzanan ovaryan damar ve sinirleri içeren bir periton katlantısıdır. Bizim vakamızda hem asemptomatik adneksial torsiyon hem de konjenital olarak infundibulo-pelvik ligament atrezisi mevcuttu. Over dokusu ovaryan fossada değil idi ve tuba uterinanın ucunda serbest olarak bulunuyordu. Torsiyonun akut bulgularının sezaryen öncesi görülmemesinin muhtemel sebebinin, tubanın izole olarak torsiyon olmuş olması ve utero-ovaryan ligament (ligamentum ovarii proprium)'in sağlam olması nedeniyle over ve tubanın arteriyel ve venöz kanlanmasının ciddi düzeyde bozulmamasına bağlı olabileceğini düşünüyoruz.

Adneksial torsiyonun tedavisinde; adneksial detorsiyon, kistektomi, salpingooferektomi uygulanabilir<sup>14,15</sup>. Adneksial detorsiyon organ koruyucu bir cerrahi olup, 36–48 saati geçmeyen torsiyon olgularında uygulanması önerilmektedir<sup>4</sup>. 48 saatten uzun süreli torsiyon olgularında overdeki hasarın irreversible olduğu düşünülmele beraber bu vakalarda da detorsiyonun yapılmasını öneren çalışmalar vardır<sup>16</sup>. Önceden detorsiyon sonrası oluşabilecek tromboemboli ve hipoksiye bağlı oluşabilen toksik maddelerin sistemik dolaşıma geçmesi endişesiyle detorsiyondan kaçınılmaktaydı. Ancak son dönem çalışmalarda; detorsiyon ve salpingooferektomi yapılan hasta sonuçlarının karşılaştırılmasında tromboemboli açısından risk olmadığı gösterilmiştir<sup>17</sup>. Bizim vakamızda, adneksial torsiyon olmasına rağmen arteriyel ve venöz dolaşım etkilenmemişti. Detorsiyon yapmamızın amacı; postoperatif dönemdeki hastada oluşabilecek açıklanamayan karın ağrısı veya akut batın tablosunun gelişmesini önlemek ve torsiyon nüksünün önüne geçmek idi.

Sonuç olarak gerek sezaryen gerekse diğer batın içi cerrahi operasyonlar sırasında adneksial yapılar ve komşu organların mutlaka kontrol edilmesi gerektiğini düşünüyoruz. Bu kontrol, operasyon sonrası oluşabilecek nedeni açıklanamayan karın ağrısı ve akut batın tablosunu önleyecek ve olası ek patolojilerin erken teşhisine yardımcı olacaktır.

## Kaynaklar

1. Bayer AI, Wiskind AK. Adnexal torsion: can the adnexa be saved? *Am J Obstet Gynecol* 1994;171(6):1506–10.
2. Incebiyik A, Camuzcuoglu A, Hilali NG, Vural M, Camuzoglu H. Plasma Ddimer level in the diagnosis of adnexal torsion. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2015;28:1073–1076.
3. Hasiakos D, Papakonstantinou K, Kontoravdis A, Gogas L, Aravantinos L, Vitoratos N. Adnexal torsion during pregnancy: Report of four cases and review of the literature. *J Obstet Gynaecol Res* 2008;4:683–687.
4. Kolluru V, Gurumurthy R, Vellanki V, Gururaj D. Torsion of ovarian cyst during pregnancy: a case report. *Cases J* 2009;2:9405–9407.
5. Oelsner G, Cohen SB, Soriano D, Admon D, Mashiach S, Carp H. Minimal surgery for the twisted ischaemic adnexa can preserve ovarian function. *Hum Reprod* 2003;18(12):2599–602.
6. Oelsner G, Shashar D. Adnexal torsion. *Clin Obstet Gynecol* 2006;49(3):459–63.
7. Silja A, Gowri V. Torsion of a normal ovary in the third trimester of pregnancy: a case report. *J Med Case Rep* 2008;2:378. doi:10.1186/1752-1947-2-378.
8. Hoover K, Jenkins TR. Evaluation and management of adnexal mass in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2011;205(2):97–102.
9. Huchon C, Fauconnier A. Adnexal torsion: a literature review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010;150(1):8–12.
10. Born C, Wirth S, Stabler A, Reiser N. Diagnosis of adnexal torsion in the third trimester of pregnancy: a case report. *Abdom Imaging* 2004;29:123–7. doi:10.1007/s00261-003-0079-x.
11. Chang HC, Bhatt S, Dogra VS. Pearls and pitfalls in diagnosis of ovarian torsion. *Radiographics* 2008;28(5):1355–68.
12. Darrell L. Ovarian torsion. *Semin Pediatr Surg* 2005;14:86–92. <http://dx.doi.org/10.1053/j.sempedsurg.2005.01.003>.
13. Celik A, Ergun O, Aldemir H, et al. Long-term results of conservative management of adnexal torsion in children. *J Pediatr Surg* 2005;40:704–708.
14. Ashwal E, Krissi H, Hiersch L, Less S, Eitan R, Peled Y. Presentation, diagnosis, and treatment of ovarian torsion in premenarchal girls. *J Ped Adoles Gynecol* 2015;28:526–529.
15. Vijayalakshmi K, Reddy GM, Subbiah VN, Sathya S, Arjun B. Clinicopathological profile of adnexal torsion cases: a retrospective analysis from a tertiary care teaching hospital. *J Clin Diagn Res* 2014;8:OC04–7.
16. Rabinerson D, Tohar M, Pomerantz M, Haimovich L. Persistence of a normal pregnancy after an early luteectomy. A report of two cases. *J Reprod Med* 1992;37:749–752.
17. Vural F, Vural B, Çakıroğlu Y. A Case of adnexal torsion during pregnancy: shortcomings in Doppler ultrasonography. *CausaPedia* 2015;4:978–982.



# Klippel-Feil Sendromu ile Bağlantılı Doğumsal Brakiyal Pleksus Hasarı Olgusu

*A Case of Obstetrical Brachial Plexus Injury Associated with Klippel-Feil Syndrome*

Yeşim Garip<sup>1</sup>, Bledjan Çuni<sup>2</sup>, Özgül Bozkurt Tuncer<sup>3</sup>

<sup>1</sup>SBÜ Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Kliniği; <sup>2</sup>Pınar Fizik Tedavi Merkezi, Ankara; <sup>3</sup>Medipol Üniversitesi, Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı, İstanbul

## ABSTRACT

Klippel-Feil's Syndrome (KFS) is a congenital malformation which is characterized by insufficient segmentation of two or more vertebrae. Low hair line, short neck and restriction of neck motions form classical triad of the disease. KFS may be accompanied by skeletal system and urogenital system anomalies, hearing loss and congenital heart disease.

In this case, we report a 38-year-old male patient who has brachial plexus injury associated with type 1 KFS. Patient was admitted to our outpatient clinic with complaints of neck pain and restriction of neck motions, and further examinations revealed fusion in C2-C6 and C7-T4 vertebrae, butterfly vertebra anomaly of C7 vertebral body and unilateral renal agenesis.

**Key words:** Klippel-Feil syndrome; brachial plexus neuropathies; hereditary renal agenesis

## ÖZET

Klippel-Feil Sendromu (KFS) iki veya daha fazla vertebranın yetersiz segmentasyonu ile karakterize bir konjenital malformasyondur. Düşük posterior saç çizgisi, kısa boyun ve boyun hareketlerinde kısıtlılık hastalığın klasik triyadını oluşturmaktadır. KFS'ye iskelet sistemi ve genitouriner sistem anomalileri, işitme kaybı, konjenital kalp hastalığı gibi çeşitli anomaliler eşlik edebilir.

Bu olguda tip 1 KFS ilişkili doğumsal brakiyal pleksus hasarı olan 38 yaşında bir erkek hasta sunmaktayız. Hasta polikliniğimize boyun ağrısı, boyun hareketlerinde kısıtlılık şikayetleri ile başvurmuş, ileri incelemelerde C2-C6 ve C7-T4 vertebralarda füzyon, C7 vertebra korpusunda kelebek vertebra anomalisi ve tek taraflı renal agenezi tespit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Klippel-Feil sendromu; brakiyal pleksus nöropatileri; kalıtsal renal agenezis

## Olgu Sunumu

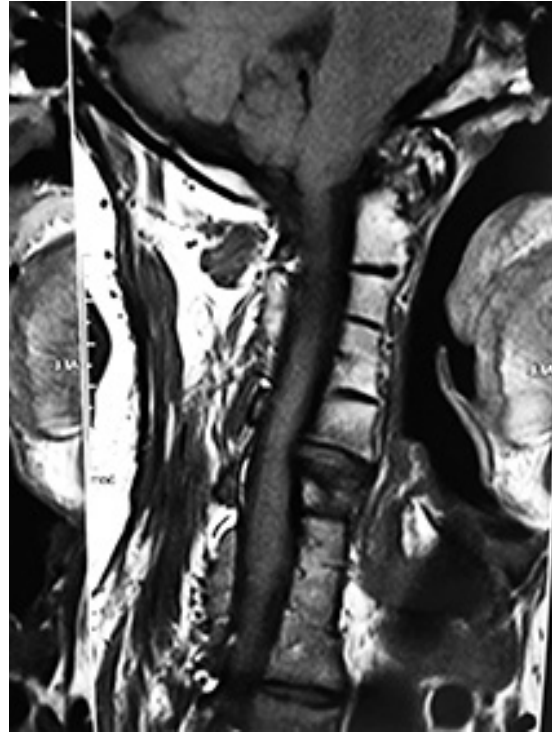
Otuz sekiz yaşında erkek hasta polikliniğimize 10 yıldır devam eden boyun ağrısı ve boyun hareketlerinde kısıtlılık yakınmaları ile başvurdu. Hastanın ağrıları hareketle artmakta, istirahatte azalmaktaydı. Hastanın özgeçmişinde doğumsal brakiyal pleksus lezyonu öyküsü mevcuttu. Hastanın vital bulguları stabil, sistemik muayenesi ise doğaldı. Yüzde asimetri mevcuttu. Fizik muayenesinde ise; hastanın boynu kısa, saç çizgisi düşük idi. Hastada torakal kifoz artışı ve torakal bölgede açıklığı sola bakan skolyozu vardı. Servikal hareketleri her yönde eklem hareket açıklığı ortasında kısıtlıydı. Sağ elde pençe el görünümü ve tenar, hipotenar ve interosseal kaslarda atrofi (Şekil 1) mevcuttu. Motor muayenesinde omuz çevresi kasları 5/5, dirsek fleksiyonu 5/5, dirsek ekstansiyonu 3/5, sağ el bileği ve tüm parmakların ekstansiyonu 0-1/5, tüm parmakların abduksiyon, adduksiyon, fleksiyonu ve başparmak oppozisyonu 1/5 motor kuvvetinde idi. Duyu muayenesinde sağ üst ekstremitte C7, C8, T1 dermatomlarında hipoestezi mevcuttu. Sağ brakiyal tendon refleksi azalmıştı. Magnetik rezonans görüntüleme (MRG) servikal vertebralarda açıklığı sağa bakan ve üst torakal düzeyde açıklığı sola bakan skolyoz, C2-C6 ve C7-T4 vertebralarda sağ yarıda füzyon, C7 vertebra korpusunda kelebek vertebra anomalisi, T1 vertebra laminada füzyon defekti tespit edildi (Şekil 2). Abdominal ultrasonografide sağ renal agenezi saptandı (Şekil 3). Hastanın ekokardiyografik incelemesi normal olarak değerlendirildi. Yapılan diğer laboratuvar incelemelerinde herhangi bir patolojiye rastlanmadı. Olgu klinik ve radyolojik veriler ışığında renal agenezinin eşlik ettiği tip 1 Klippel Feil Sendromu (KFS) olarak değerlendirildi.

Hastadan bilgilendirilmiş onam formu alınmıştır.

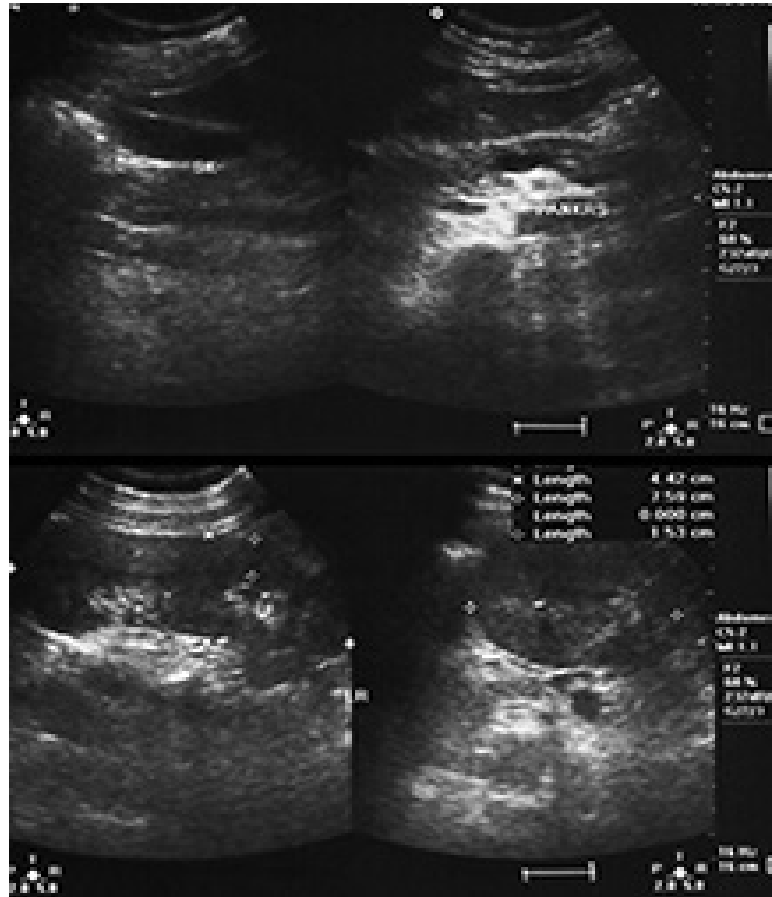
Yeşim Garip, Yasamkent Mah. 3250. Cad. Kareler B blok no:10, Ankara  
Tél. 0533 610 88 64 Email. dryesimgarip@gmail.com  
Geliş Tarihi: 03.04.2018 • Kabul Tarihi: 13.09.2018



Şekil 1. Sağ elde pençe görünümü.



Şekil 2. Manyetik rezonans görüntüleme.



Şekil 3. Abdominal ultrasonografi.

## Tartışma

KFS iki veya daha fazla vertebranın konjenital füzyonu olarak tanımlanır. İlk olarak Maurice Klippel ve Andre Feil tarafından 1912 yılında tanımlanan hastalığın klasik triyadı düşük posterior saç çizgisi, kısa boyun ve boyun hareketlerinde kısıtlılıktır. KFS'ye kas iskelet sistemi anomalileri, yüzde şekil bozuklukları, işitme kaybı, genitoüriner sistem anomalileri ve konjenital kalp hastalığı gibi çeşitli anomaliler eşlik edebilir<sup>1-3</sup>.

Vertebral füzyonun lokalizasyonu ve derecesine göre üç tipe ayrılır. Tip 1'de servikal ve üst torakal vertebralarda füzyon mevcuttur. Sistemik anomali görülme sıklığı diğer tiplere göre daha fazladır. Tip 2'de servikal vertebrada bir veya iki bölgede füzyon vardır, hemivertebra ve atlantookspital füzyon gibi anomaliler eşlik eder. Bu tip en sık görülen tiptir, genellikle asemptomatik seyrederek. Tip 3'de ise servikal füzyona ek olarak alt torakal veya lomber bölgede de füzyon vardır. KFS'de C2-3 ve C5-6 en sık tutulan bölgelerdir<sup>5</sup>. Bizim hastamız servikal ve üst torakalde füzyonu olması nedeni ile tip 1 KFS olarak değerlendirilmiştir.

KFS'li hastalarda en sık görülen kas-iskelet sistemi anomalileri kifoz ve skolyozdur ve hastaların yarısından fazlasında görülür<sup>3</sup>. Çin'de 516 konjenital skolyozlu hastada yapılan bir çalışmada KFS sıklığı %5,42 olarak tespit edilmiştir<sup>4</sup>. Bunun yanında Sprengel deformitesi<sup>5</sup>, tortikollis<sup>6</sup>, kelebek vertebra<sup>7</sup>, hemivertebra<sup>8</sup>, servikal kot<sup>9</sup> ve polidaktili<sup>10</sup> de eşlik edebilir. Bizim hastamızda kas-iskelet sistemi anomalilerinden kifoz, skolyoz ve kelebek vertebra anomalisi mevcuttu.

KFS'li hastalarda kafatasında ve yüzde şekil bozuklukları da yaygın olarak gözlenir. En sık yüzde asimetri görülür. Olgularda brakisefali, platibazi ve baziler invaginasyon da tanımlanmıştır<sup>2</sup>. Bizim hastamızın yüzünde asimetri mevcuttu.

KFS'li olgularda genitoüriner sistem anomalileri sıklığı %30-64 olarak bildirilmiştir. Bunların içerisinde en sık görüleni renal agenezidir<sup>11</sup>. Bununla birlikte at nalı böbrek<sup>12</sup>, renal ektopi<sup>13</sup> ve hidronefroz<sup>14</sup> da eşlik edebilmektedir. Bizim olgumuzda KFS'ye renal agenezi eşlik etmiştir.

KFS'li olguların yaklaşık üçte birinde iç ya da dış kulak anomalileri görülebilir. İşitme kaybı görülme sıklığı ise %30'dur ve kadınlarda daha sık görülür. KFS'deki yüksek işitme kaybı insidansı nedeniyle hastalara rutin işitme testleri ve kulak muayenesi yapılması önerilmektedir<sup>15</sup>. Olgumuzda işitme kaybı ya da diğer kulak anomalileri tespit edilmemiştir.

Kardiyovasküler sistem anomalileri KFS'li olguların %4,2-14'ünde görülmektedir. En sık görülen kardiyovasküler anomali ventriküler septal defektidir. KFS'li olgularda görülebilen diğer kardiyovasküler sistem anomalileri arasında atrial septal defekt, aort koarktasyonu, mitral valv prolapsusu, pulmoner stenoz, patent duktus arteriosus, aort yetmezliği sayılabilir<sup>16</sup>. Bizim hastamızın kardiyoloji konsültasyonunda herhangi bir kardiyovasküler sistem patolojisi tespit edilmemiştir.

KFS'de segmentlerin açılmasıyla oluşan hipermobilité ile ilişkili olarak daha çok erişkin dönemde nörolojik semptomlar ortaya çıkabilir. Spinal kordu etkileyerek üst ve alt ekstremitelerde ağrı, parestezi, spastisite ve hiperrefleksiye neden olabilir. Nadiren minör travmalara bağlı kuadrupleji oluşabilir<sup>17</sup>. Bizim hastamızda doğumsal total brakial pleksus lezyonu ve buna bağlı olarak sağ üst ekstremitelerde kuvvet kaybı mevcuttu. Literatürdeki ilk olgu olması açısından önemlidir.

Doğumsal brakial pleksus yaralanmaları, doğum sırasında brakial pleksusun kök (C4, C5, C6, C7, C8 ve T1), trunkus, divizyon ve dallarında oluşan zedelenmeye bağlı gelişen üst ekstremitenin çeşitli derecelerde motor ve duyu fonksiyon bozuklukları ile karakterize klinik bir tablodur. Her 1000 canlı doğumda 1-3 arasında görülür. Üst trunkus (C5-6) etkilendiğinde supraspinatus, infraspinatus, deltoid, brakioradialis, biceps ve supinator; orta trunkus (C7) etkilendiğinde ekstansör digitorum kommunis ve triseps; alt trunkus (C8-T1) etkilendiğinde ise pektoral, fleksor karpi ulnaris, abduktör digiti minimi, abduktör pollisis, fleksör digitorum superfisyialis, abduktör pollisis brevis ve opponens pollisis kasları etkilenir<sup>18</sup>. Bizim hastamızda orta-alt trunkus lezyonu mevcuttu. Yapılan elektronöromiyografide orta trunkusun kronik süreçte parsiyel lezyonu ve alt trunkusun total lezyonu rapor edildi (Tablo 1 ve 2). Alınan öyküde termde vajinal yolla baş gelişi ile doğduğu öğrenilen hastanın gelişen brakial pleksus lezyonunun servikal vertebra füzyonu nedeniyle boynun yeterince fleksiyona gelememesine bağlı olabileceği düşünüldü.

Olgumuz brakial pleksus lezyonunun eşlik ettiği ilk KFS olgusudur. Literatürdeki KFS olgularının hiçbirinde brakial pleksus lezyonu raporlanmamış olması bu durumun rastlantısal olabileceği ihtimalini de akla getirmektedir. Ayrıca literatürde etiyojide servikal füzyondan da bahsedilmemiştir. Hastada obstetrikal brakial pleksus lezyonuna sebep olabilecek KFS ile ilintili başka bir patoloji olabilir.

**Tablo 1.** Elektronörografi (ENG) bulguları

İncelenen sinir	Latans (ms)	Mesafe (cm)	Hız (m/sn)	Amplitüd
N. Ulnaris motor (iğne elektrod)	BKAP elde edilemedi			
Kayıt: ADM				
Uyarı: Bilek				
N. Ulnaris duyu				
Kayıt: Bilek	DAP elde edilemedi			
Uyarı: 5. parmak				
N. Medianus motor (iğne elektrod)	BKAP elde edilemedi			
Kayıt: APB				
Stim: Bilek				
N. Medianus duyu				
Kayıt: Bilek				
Uyarı: 2. parmak	DAP elde edilemedi			
Uyarı: Avuç içi	DAP elde edilemedi			
N. radialis duyu				
Kayıt: 1. web aralığı	DAP elde edilemedi			
Uyarı: Distal önkol laterali				
N. radialis (iğne elektrod)	BKAP elde edilemedi			
Kayıt: EİP				
Uyarı: Ön kol				

N, Nervus; DAP, Duyusal Aksiyon Potansiyeli; BKAP, Birleşik kas aksiyon potansiyeli; EİP, Ekstansör indisis proprius; APB, Abduktor pollisis brevis; ADM, Abduktor digiti minimi.

**Tablo 2.** Elektromyografi (EMG) bulguları

İncelenen kaslar (sağ)	Tam kası	MÜP	Polifazi	Fibrilasyon	PKD
APB	Aktivite Yok	0	-	-	-
ADM	Aktivite Yok	0	-	-	-
EİP	Aktivite Yok	0	-	-	-
EDK	Aktivite azalmış	2	↑	-	-
Triceps	Aktivite azalmış	3	↑↑	-	-
Biceps	i	N	N	-	-
Deltoid	i	N	N	-	-

i, interferans; MÜP, motor ünite potansiyeli; PKD, pozitif keskin dalga; APB, abduktor pollisis brevis; ADM, abduktor digiti minimi; EİP, ekstansör indisis proprius; EDK, ekstansör digitorum communis.

Başka bir ihtimal de literatürde gözden kaçmış bir bra-kiyal pleksus lezyonu-KFS ilişkisinin varlığıdır. Bunun nedeni olarak günümüzde prenatal tanı sayesinde riskli olgularda sezaryen uygulanmasına bağlı olarak obstetrikal brakiyal pleksus lezyonunun nadiren gözlemlenmesi düşünülebilir.

Obstetrikal brakiyal pleksus lezyonu için fetal makrozomi, artmış doğum ağırlığı, omuz distozisi, maternal boy kısalığı, gestasyonel diyabet, enstrümantal (forceps

ve vakum) doğum ve makat prezentasyonu dahil olmak üzere birçok iyi bilinen risk faktörü bulunmaktadır<sup>19</sup>. Jennett ve ark.<sup>20</sup> gözden geçirdikleri olguların neredeyse yarısında bu etiyolojik nedenlerin olmadığını söylemişler ve bunun doğum travması değil intrauterin maladaptasyondan kaynaklanabileceği sonucuna varmışlardır. Bu bağlamda KFS ve brakiyal pleksus lezyonunun ortak bir etiyolojik nedene bağlı ortaya çıkmış olabileceği ihtimali de söz konusu olabilir.

KFS çok sayıda anomalinin eşlik ettiği ve çeşitli komplikasyonların görülebildiği klinik ve radyolojik bir antitedir. Kısa boyun, düşük saç çizgisi ve boyun hareketlerinde kısıtlılık bulunan hastalarda KFS tanısı atanmamalı, beraberinde eşlik eden çeşitli sistemlere ait anomaliler araştırılmalıdır. Ayrıca doğumsal brakial pleksus lezyonu ile kliniğe gelen hastalarda KFS olabileceği de akla getirilmelidir.

## Kaynaklar

1. Klippel M, Feil A. The classic: A Case of Absence of Cervical Vertebrae with the Thoracic Cage Rising to the Base of the Cranium (Cervical Thoracic Cage). *Clin Orthop Relat Res* 1975;109:3–8.
2. Nagib MG, Maxwell RE, Chou SN. Klippel-Feil syndrome in children: clinical features and management. *Childs Nerv Syst* 1985;1(5):255–63.
3. Kaya E, Kayar AH, Ozyurek S, Dursun M. Olgu sunumu: Klippel-Feil Sendromu ve dektrokardi. *Archives Rheumatol* 2009;24(3):163–5.
4. Xue X, Shen J, Zhang J, Tian Y, Zhao H, Wang Y, et al. Klippel-Feil syndrome in congenital scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)*2014;39(23): E1353–8.
5. Samartzis D, Herman J, Lubicky JP, Shen FH. Sprengel's deformity in Klippel-Feil syndrome. *Spine (Phila Pa 1976)*2007;32(18): E512–6.
6. Brougham DI, Cole WG, Dickens DR, Menelaus MB. Torticollis due to a combination of sternomastoid contracture and congenital vertebral anomalies. *J Bone Joint Surg Br* 1989;71(3):404–7.
7. Fernandes T, Costa C. Klippel-Feil syndrome with other associated anomalies in a medieval Portuguese skeleton(13th-15th century). *J Anat* 2007;211(5):681–5.
8. Samartzis D, Kalluri P, Herman J, Lubicky JP, Shen FH. Cervical scoliosis in the Klippel-Feil patient. *Spine (Phila Pa 1976)*2011;36(23): E1501–8.
9. Tubbs RS, Salter EG, Oakes WJ. Klippel-Feil anomaly with associated rudimentary cervical ribs in a human skeleton: case report and review of the literature. *Folia Morphol (Warsz)*2006;65(1):92–4.
10. Ruzic-Barsic A, Kovacic S, Mijatovic D, Miletic D, Antulov R. Coexistence of left internal carotid agenesis, klippel-feil syndrome and postaxial polydactyly. *Pol J Radiol* 2015;80:128–30.
11. Moore WB, Matthews TJ, Rabinowitz R. Genitourinary anomalies associated with Klippel-Feil syndrome. *J Bone Joint Surg Am* 1975;57(3):355–7.
12. Hita Pérez J, Barreiro Tella P, Martín Herrera L, Vázquez Rodríguez JJ. Klippel-Feil's syndrome associated with horseshoe kidney and brown and white spots. *Rev Clin Esp* 1970;119(3):263–8.
13. Gómiz León JJ, Rodríguez-Miñón y Cinfuentes JL, Piñango L, Alférez Villalobos C. Unilateral renal agenesis and renal ectopia in Klippel-Feil syndrome. *Actas Urol Esp* 198;9(1):95–8.
14. Legius E, Frys JP, Eggermont E. Patient with the combination of Klippel-Feil anomaly, partial agenesis of the sacrum, bladder incontinence, and unilateral hydronephrosis. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1989;9(4):397, 399–400.
15. McGaughran JM, Kuna P, Das V. Audiological abnormalities in the Klippel-Feil syndrome. *Arch Dis Child* 1998;79:352–5.
16. Mahiroğullari M, Ozkan H, Yildirim N, Cilli F, Güdemez E. Klippel-Feil syndrome and associated congenital abnormalities: evaluation of 23 cases. *Acta Orthop Traumatol Turc* 2006;40(3):234–9.
17. Ucar S, Zorlu P, Sahin G, Yildirim M. Üriner anomali ve işitme kaybının eşlik ettiği Klippel-Feil Sendromu. *Yeni Tıp Dergisi* 2008;25:113–115.
18. Ertekin C. Pleksopatiler. Sentral ve periferik EMG Anatomi-Fizyoloji-Klinik. İzmir: Meta Basım Matbaacılık; 2006. p.343–85.
19. Jennett RJ, Tarby TJ, Kreinick CJ. Brachial plexus palsy: An old problem revisited. *Am J Obstet Gynecol* 1992;166:1673–6.
20. Al-Quattan M. Obstetrical brachial plexus injuries. *Journal of the American Society for Surgery of the Hand* 2003;3(1):41–53.



# Genom Düzenlemede CRISPR/Cas9 Çağı ve Lösemideki Uygulamaları

## CRISPR/Cas9 Age in Genome Editing and Leukemia Applications

Nurcan Gümüş, Burçin Tezcanlı Kaymaz

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

### ABSTRACT

The CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated nuclease-9) system which adapted from the prokaryotic immune system, is the latest RNA/protein complex to be included among genomic engineering tools. CRISPR/Cas9 technology catalyzes the formation of double-strand breaks in DNA, according to the Watson-Crick base pairing in a interested region of the genome, via endonuclease Cas9 and guide RNA (sgRNA). Genomic regulation is performed by repairing these fractures using (Homologous Recombination or HDR: Homology-Directed Repair) and (NHEJ: Non-Homologous End-Joining) DNA repair mechanisms. CRISPR/Cas9 technology is used on a wide range of platforms, starting from identification of bacterial strains, identification of gene and miRNA functions, genomic DNA fragment insertion/deletion, gene silencing, transcriptional and epigenetic targeting to creation of disease models. Leukemia, a malignancy characterized by leukocytosis in the blood/bone marrow, is caused by chromosomal rearrangements or mutations. Nowadays, genomic engineering is gaining an accelerating importance in order to elucidate the pathogenesis and molecular biology of leukemia; thus to provide more effective and personalised treatment opportunities in the future. The widely used CRISPR/Cas9 genome design technology represent a new functional object for treatment of leukemia as the beginning of a therapeutic new era by being applied in areas such as creation of disease models, gene insertion and silencing, epigenetic regulation. In this review, CRISPR/Cas9 technology; locus components, subtypes, stages of development of the adaptive immune response, Cas9 specificity and therapeutic gains obtained via using this technology in various types of leukemia will be discussed. Also In this review, the evaluation of CRISPR/Cas9 technology in terms of ethics will be included.

**Key words:** CRISPR/Cas9; genome editing technology; leukemia; ethics

### ÖZET

Prokaryotik canlıların immün sistemden adapte edilmiş olan CRISPR/Cas9 (Düzenli aralıklarla bölünmüş kısa palindromik tekrar kümeleri/CRISPR ilişkili nukleaz 9) sistemi genom mühendisliği araçlarının arasına en son eklenen RNA/protein kompleksidir. CRISPR/

Cas9 teknolojisi, endonukleaz Cas9 ve kılavuz RNA (sgRNA) aracılığı ile genomun istenen bir bölgesinde çift zincir kırıklarının oluşumunu katalizler. Bu kırıkların (HR: Homolog Rekombinasyon [Homologous Recombination ya da HDR: Homology-Directed Repair]) ve (NHEJ: Non-Homolog Uç Birleşmesi [Non-Homologous End-Joining]) DNA tamir mekanizmaları kullanılarak, genom düzenlemesi gerçekleştirilmektedir. CRISPR/Cas9 teknolojisi; bakteri suşlarının tanımlanması, gen ve miRNA fonksiyonlarının belirlenmesi, genoma DNA fragmenti eklenmesi/çıkartılması, gen susturma, transkripsiyonel ve epigenetik hedefleme ya da hastalık modellerinin oluşturulması gibi çok geniş bir platformda kullanılmaktadır. Kan/Kemik iliği hastalıklarında lökositöz ile karakterize olan malignite gösteren lösemiler, kromozomal yeniden düzenlemeler ya da mutasyonlar sonucunda gelişmektedir. Günümüzde lösemnin moleküler biyolojisi ile patogenezinin anlaşılması, gelecekte çok daha etkin ve kişiye özgül tedavi imkanları sağlayacağından; genom mühendisliği bu noktada önem kazanmaktadır. Çok geniş kullanım alanına sahip olan CRISPR/Cas9 genom tasarımı teknolojisi, hastalık modellerinin oluşturulması, gen ekleme ve susturulması, epigenetik regülasyon gibi alanlarda kullanılarak, lösemi tedavisinde yeni bir fonksiyonel hedef ve tedavi çağı başlangıcı olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu derlemede, CRISPR/Cas9 teknolojisinin; tarihçesi, lokus birleşenleri, alt tipleri, adaptif bağışıklık yanıtının oluşum aşamaları, Cas9 özgüllüğü ile bu teknolojinin çeşitli lösemi tiplerinde kullanımıyla elde edilen tedavi kazanımları ele alınacaktır. Ayrıca bu derlemede CRISPR/Cas9 teknolojisinin, etik açısından değerlendirilmelerine de yer verilecektir.

**Anahtar kelimeler:** CRISPR/Cas9; genom düzenleme teknolojisi; lösemi; etik

### CRISPR/Cas Araştırmalarının Kısa Tarihçesi

Bakteri ve arkealar çeşitli koşullarda yaşayabilen canlılar olmalarına rağmen; fajlar tarafından enfekte edilmekte<sup>1,2</sup> ve bunların %4-%50'sinin ölümüne sebep olmaktadır<sup>3,4</sup>. Bakteri ve arkealar, fajların bu yıkıcı etkisinden korunmak için çok sayıda direnç mekanizması geliştirmişlerdir. Bakteriye direnç mekanizmaları sıklıkla; adsorbsiyon inhibisyonu, faj genomunun alınmasının engellenmesi, restriksiyon modifikasyonu ve abortif enfeksiyonlar<sup>5</sup> gibi çok sayıda doğal bağışıklık

Nurcan Gümüş, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye, Tel. 0232 390 22 60 Email. nrcn.gumus@gmail.com  
Geliş Tarihi: 16.08.2018 • Kabul Tarihi: 16.11.2018



sağlayan sistemlerden oluşmaktadır. Bu bağışıklık sistemlerinin yanısıra küçük RNA temelli CRISPR/Cas sistemi<sup>6,7</sup> ile bakterilerin virüs ve plazmitlere karşı kazanılmış bağışıklık sistemi geliştirdikleri tespit edilmiştir. Bu bağışıklık sistemi; RNA (CRISPR: Düzenli Aralıklarla Bölünmüş Kısa Palindromik Tekrar Kümeleri [*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*]) ve protein (Cas: CRISPR İlişkili Genler [*CRISPR Associated*]) bileşenlerinden oluşmaktadır<sup>8</sup>.

CRISPR/Cas olarak adlandırılan bu sistem, arkeaların %84, bakterilerin ise yaklaşık %45'inde bulunan<sup>9</sup>, birbirinin tekrarı olan DNA dizilerinden oluşan özel bir DNA ailesidir. Bu diziler ilk kez 1987'de Ishino ve ark.<sup>10</sup> tarafından *E.coli* K12 suşunda alkalik fosfatazın izoenzim dönüşümünden sorumlu olan (IAP: Apoptoz İnhibitör Proteinin [*The Inhibitory Of Apoptosis Protein*]) gen dizisi çalışılırken tanımlanmıştır. IAP geninin dizi analizi sırasında, akış aşağı (*downstream*) bölgede 29 nükleotit (nt) uzunluğunda 14 tane tekrar kümeleri ile bu tekrarların arasında 32–33 nt. lik ara DNA bölgelerinin olduğu belirlenmiş ancak fonksiyonları tanımlanamamıştır. Daha sonraki yıllarda benzer tekrar dizileri *Mycobacterium tuberculosis*, *Haloferax mediterranei*, *Methanocaldococcus jannaschii*, *Thermotoga maritima* ve diğer bakteri-arkealarda da bulunmuştur<sup>2</sup>. Mojica ve ark., 2000 yılında, 9 tane arkea ve 11 tane bakteri olmak üzere toplamda 20 farklı prokaryotun genomunda tekrar dizilerini tanımlamışlardır<sup>11</sup>. 2002 yılında Jansen ve ark., Mojica'nın çalışma ekibi ile anlaşma sağlayarak, literatürde oluşabilecek karışıklığı önlemek amacıyla bu tekrar dizilerini CRISPR olarak adlandırmışlardır<sup>12</sup>. Yaptıkları çalışmalarla Cas genlerini Cas 1–4 olarak tanımlayarak, bu genlerin CRISPR bölgeleriyle ilişkili olduğunu göstermişler, Cas 3 geninin helikaz ve Cas 4 geninin ise endonukleaz gen ailelerine benzer diziler içerdiğini tespit etmişlerdir.

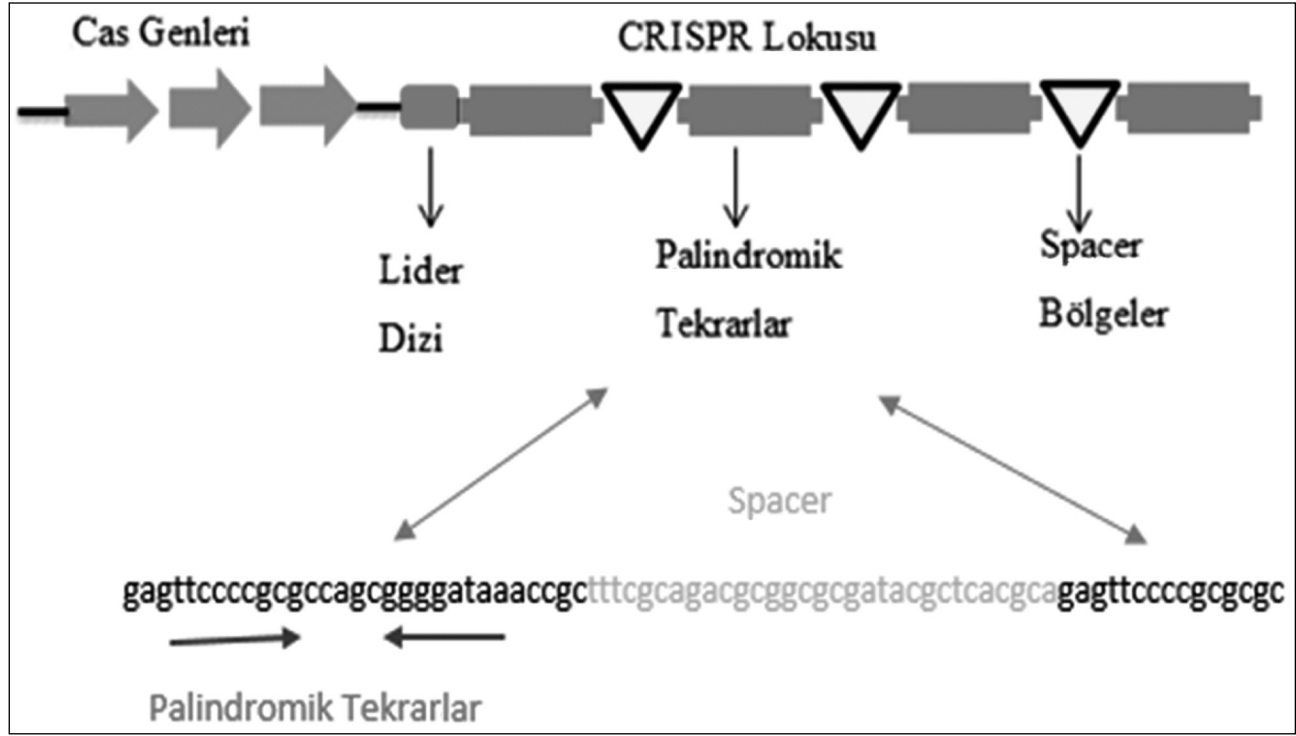
CRISPR'ın biyolojik fonksiyonları 2005 yılına kadar net olarak saptanamamış olmakla birlikte; farklı araştırma grupları arasında işlevsellik tartışmaları da devam etmiştir<sup>13</sup>. Aynı yıl bağımsız üç araştırma grubu, çoğu CRISPR aralayıcı (spacer) bölgenin; bakteriyofaj DNA'sı, plazmit ya da transpozonlar gibi hareketli genetik elemanlarla homolog olduğunu göstermiştir<sup>14–16</sup>. Bu bulgular CRISPR/Cas sisteminin RNA aracılı bir savunma sistemi olabileceği hipotezini doğrulamıştır<sup>17,18</sup>. CRISPR'lerin kazanılmış bağışıklık ile bağlantılı olduğuna ilişkin ilk deneysel çalışma ise

2007 yılında bildirilmiştir. Barrangou ve ark., yoğurt ve peynir üretiminde kullanılan *Streptococcus thermophilus* suşları üzerinde yaptıkları çalışmada, bu suşları fajlarla enfekte ettiklerinde CRISPR1 lokusunda 1–4 yeni aralayıcı DNA kazanımının olduğunu tespit etmişlerdir<sup>1</sup>. Ayrıca, aralayıcı DNA sayısı ile suşun faja karşı direnci arasında bir korelasyon olduğunu bildirmişlerdir. Böylece CRISPR dizilerinin ve ilişkili Cas proteinlerinin bakteriyofaj enfeksiyonuna karşı etkin bir prokaryotik bağışıklık sistemi olduğu kanıtlanmış<sup>1</sup>; yabancı genomlara karşı savunmanın CRISPR lokusundan transkribe edilen RNA'lar vasıtasıyla gerçekleştiği ortaya konmuştur<sup>19</sup>.

2008'de Brouns ve ark., yaptıkları çalışmada, *E. coli* de CRISPR lokusundan ilk olarak ~120–180 nt. lik büyük öncül RNA'ların (pre-crRNA) sentezlendiğini ve bunların Cas genlerinin etkinliğiyle ~57 nt. lik küçük olgun RNA'lara (crRNA) kesildiklerini belirlemişlerdir<sup>20</sup>. İlerleyen yıllarda yapılan çalışmalarla CRISPR/Cas sisteminin tipleri ve işleyiş mekanizmaları araştırılmaya devam edilmiştir.

2010 yılında, Garneau ve ark., *Streptococcus thermophilus* bakterisinde faj ve plazmit kullanarak yaptıkları çalışmada, daha önce Cas5 ve csn1; ancak günümüz literatüründe Cas9 olarak tanımlanmış genin; Cas genleri arasında hedef DNA'nın kesimini gerçekleştirebilen bir enzimi kodladığını bildirmişlerdir<sup>21</sup>. CRISPR/Cas9 sisteminde genetik kompozisyon ve Cas geni spesifitesine göre yapılan tiplendirmelerden; Tip II sistemindeki (tracrRNA: trans-aktif edici crRNA'nın) varlığını 2011 yılında Deltcheva ve ark. tanımlamıştır<sup>22</sup>. Aynı yıl Sapranaukas ve ark., ise *S.thermophilus*'un Tip II CRISPR bölgesinin *E.coli*'ye transferini gerçekleştirecek, CRISPR/Cas sistemlerinin bakteriler arasında aktarılabilirliğini ilk kez göstermişlerdir<sup>23</sup>.

2012 yılına kadar yapılan çalışmalarla Cas proteinlerinin, crRNA'ların hedefi tanımasında ve yabancı genomlara ait dizilerin susturulmasında görev yaptığı belirlenmiştir<sup>24</sup>. Bu bilgiler ışığında Jinek ve ark., CRISPR Tip II sisteminde, hedef DNA'nın özgül olarak tanınması için; RNase III'ün gerekli olmadığını, Cas9, tracrRNA ve crRNA'ların bir arada olmasının yeterli olduğunu tespit etmişlerdir<sup>25</sup>. Bunun üzerine çalışma ekibi tracrRNA ve crRNA'lardan oluşan RNA hairpin (saç tokası) yapısında, kimerik (single-guided RNA-sgRNA) yeni bir RNA oluşturmuşlardır. Cas9 kimerik RNA'yı tanıyıp bağlandıktan sonra, hedef DNA'ya yönlendirebilmektedir. Böylece Cas9 endonukleazının, ilgili herhangi (dsDNA: çift zincirli DNA



Şekil 1. CRISPR/Cas lokusu.

[*double-stranded DNA*]) dizisini hedeflemek için artık tek bir transkript olarak tasarlanmış klavuz/rehber RNA'ya (sgRNA) ihtiyacı vardır. Sistemin sgRNA'daki DNA hedef bağlama dizisini değiştirerek programlanabilir olması, gen hedefleme ve genom düzenleme uygulamalarının önünü açmıştır<sup>25</sup>.

Bilim insanları çalışmaları ile CRISPR/Cas sistemiyle ilgili bilinmeyenleri birer birer ortaya çıkarırken, sistemin 2013 yılına kadar genom düzenleme aracı olarak kullanılabileceği tam anlamıyla aydınlatılmamıştır<sup>26</sup>. 2013 yılında, *Streptococcus pyogenes* SF370'nun Tip II CRISPR/Cas sisteminin 4 bileşeninden (SpCas9, SpRNase III, tracrRNA ve pre-crRNA) oluşan kombinasyonları, insan embriyonik böbrek hücre hattı olan 293FT hücrelerinde, EMX1 (*Empty Spiracles Homeobox 1*) lokusunu hedeflemeye kullanılmıştır. İlk kez CRISPR/Cas sistemi ile memeli hücresinde genom düzenlenmesi yapılan bu çalışmada, SpRNase III olmadan da sistemin çalıştığı ve EMX1 lokusunun hedeflendiği belirlenmiştir. Böylece genom düzenleme için, SpCas9, tracrRNA ve pre-crRNA şeklinde 3 bileşenin yeterli olduğu kesin olarak ortaya konmuştur. Bunun üzerine hem insan hem de fare hücrelerinde kimerik RNA'lar (crRNA: tracrRNA) ile hedef DNA'da

delesyonlar oluşturulmuştur. Çalışma ekibi hem *S.pyogenes* hem de *S.thermophilus* CRISPR sistemleri ile memeli genomunun düzenlenmesinin yapılabileceğini göstermişlerdir<sup>27</sup>. 2013 yılında Mali ve ark., yaptıkları çalışmalar ile, Tip II CRISPR/Cas sisteminin; memeli hücrelerinde RNA rehberliğinde, özgül genom düzenleme aracı olduğunu raporlamışlardır<sup>28</sup>. Bu çalışmalar sonrasında CRISPR/Cas9, sadece adaptif bağışıklık sistemi olmaktan çıkmış ve bir genom düzenleme aracı olarak bilim dünyasında yerini alarak; günden güne etkinliğini ve spesifitesini arttıran bir proses olarak kabul görmüştür.

### CRISPR Lokusunun Bileşenleri

CRISPR/Cas sistemi bakteri ve arkealarda adaptif bağışıklık sisteminden geliştirilmiş olup, genom mühendisliği araçlarının arasına en son eklenen özel bir RNA/protein kompleksidir<sup>26,29</sup>. Mikrobiyal türler arasında CRISPR dizileri ve Cas genleri büyük farklılıklar göstermesine rağmen<sup>2</sup> CRISPR lokusu; i) Palindromik tekrar sekaları, ii) Aralayıcı (spacer) DNA bölgeleri, iii) Lider dizisi için açık okuma çerçevesinin (ORF) bulunmayışı ve iv) Cas genlerinin varlığı ile evrensel bir anatomiye sahiptir<sup>13</sup> (Şekil 1).

### i) Palindromik tekrar dizileri

Belirli bir CRISPR lokusunda palindromik tekrar dizilerinin dizi uzunluğu ve dizi içeriği büyük oranda korunmuş olmasına rağmen; türler arasında farklılık gösterebilmektedir<sup>2,4,12</sup>. Tekrar dizilerinin uzunlukları 24–47 baz çifti (bç) arasında değişmekte<sup>2,30</sup> ve içeriğinde çoğunlukla kısa 5–7 nt. lik palindromik tekrar dizileri bulunmaktadır<sup>31</sup>. Palindromik diziler, RNA stem-loop ikincil yapısının (*hairpin*) oluşumuna katkıda bulunan stabil, yüksek oranda korunmuş diziler<sup>18,31,32</sup> iken; CRISPR bölgesindeki tekrar bölgeleri birkaç tane veya yüzlerce olabilmektedir<sup>13</sup>.

### ii) Aralayıcı (Spacer) DNA bölgeleri

Tekrar dizileri “Aralayıcı DNA” olarak isimlendirilen özgül benzersiz dizilerce birbirinden ayrılmaktadır<sup>2,13</sup>. CRISPR lokusunun hiper değişken elemanları olan<sup>18</sup> bu dizilerin uzunluğu 26–72 bç arasında değişmektedir<sup>2,30</sup>. Aralayıcı DNAlerin kaynağı plazmitlerin veya virüslerin nükleik asitleridir<sup>14–16</sup>; bu proto-aralıklar tipik olarak, korunmuş kısa 2–5 nt. lik PAM (*Protospacer Adjacent Motif*) dizilerine bitişiktir<sup>32</sup>. Bir genomda bulunan aralayıcı DNA lokusu, tek veya daha fazla sayıda olabilmektedir<sup>33</sup>. Bu aralayıcı DNA’lar prokaryotlardaki adaptif bağışıklık sisteminin merkezi bileşenidir; özgül DNA dizilerinden oluşurlar ve kazanılmış bağışıklık mekanizmasının belleğini oluştururlar. Özelleşmiş bir genetik bellek olarak işlev yapan aralayıcı DNA dizileri, tanıma dizisi bulunan virüslerin, konakçıyı enfekte etmesini engellemekle yükümlüdür<sup>20</sup>.

### iii) Lider dizisi

Lider dizisi, kodlanmayan, yaklaşık 500 nt içeren CRISPR lokusunun 5’ ucunda bulunan Adenin ve Timin nükleotidlerce zengin bir dizidir; dolayısıyla transkripsiyonun başlama noktasıdır<sup>35</sup>. Lider dizisinin açık okuma çerçevesi yoktur ve türler arasında korunmaz<sup>12,33</sup>. CRISPR lokusuna yeni eklenecek olan Aralayıcı DNAleri, lider dizisinin bulunduğu proksimal uçtan eklenmektedir<sup>1,34</sup>.

### iv) Cas genleri

Cas genleri genellikle CRISPR dizilerinin yakınında konumlanmış olup, Cas proteinlerini kodlarlar. Cas proteinleri endonukleaz, ekzonukleaz, helikaz özellikleri ve nükleik asit bağlanma bölgeleri (*domainleri*) taşımaları sayesinde, DNA dizilerini açıp kesebilirler<sup>23,32</sup>. Cas genleri, aralayıcı DNA’ların CRISPR lokusuna entegrasyonu, crRNA’ların transkripsiyonu ve

işlenmesi, crRNA’ların hedef DNA’ya yönlendirilmesi ve sonuç olarak istilacı hedef DNA’yı degrade etmesi gibi CRISPR aracılı immünitinin çeşitli basamaklarında görev alırlar<sup>32,36</sup>.

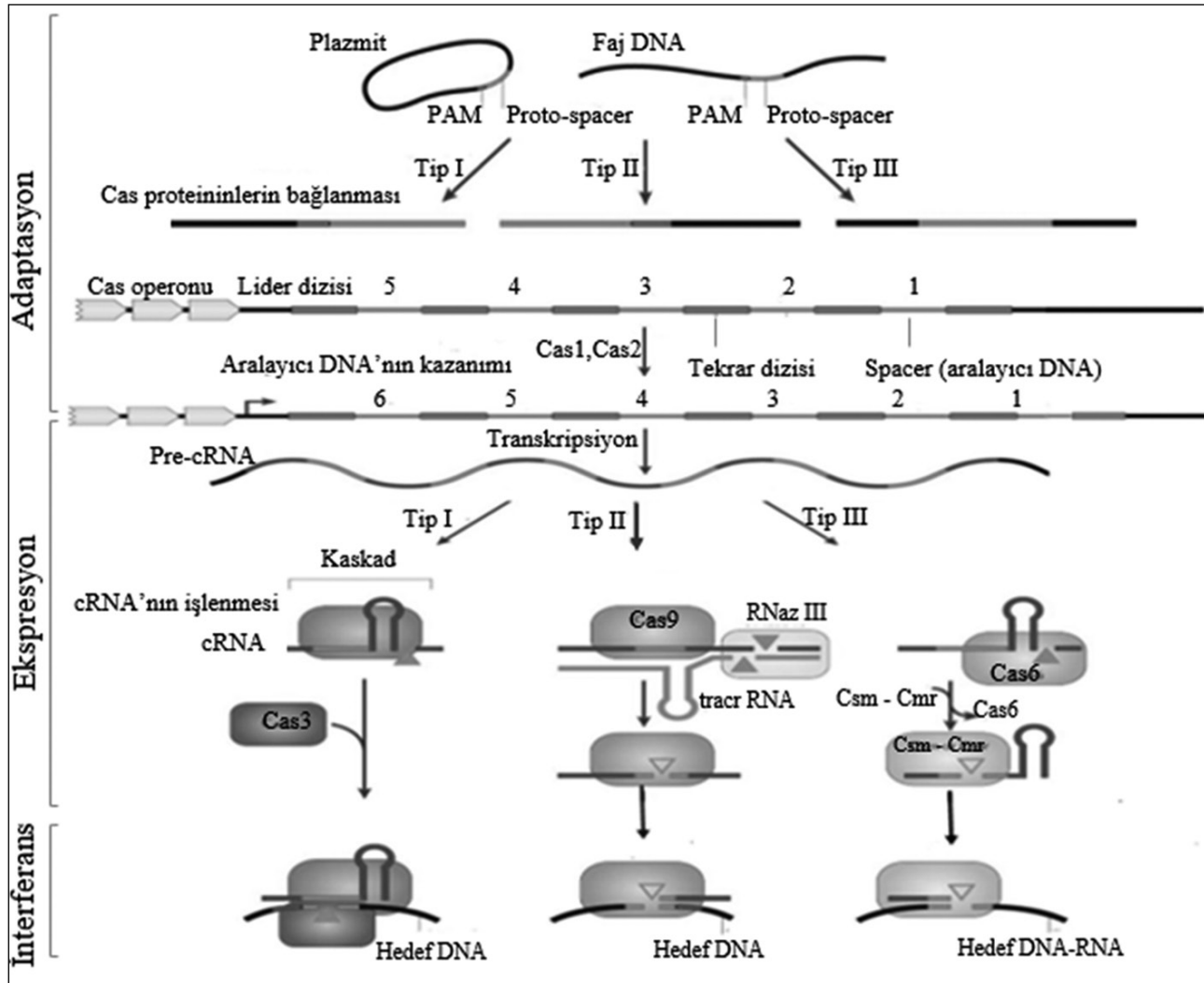
2002 yılında Jansen ve ark., ilk 4 Cas genini tanımlamışlar<sup>12</sup>, sonraki yıllarda Haft ve Makarova çalışma ekipleri ile bu sayıyı 45’in üzerine çıkarmıştır<sup>37,38</sup>. CRISPR/Cas sistemleri, genetik birleşenlere ve Cas genlerinin farklılığına göre, Tip I, Tip II ve Tip III olmak üzere üç ana ve 11 alt tip (I-A/I-F, II-A/II-C, III-A/III-B) olarak sınıflandırılmaktadır<sup>6,39,40</sup>.

## CRISPR/Cas Sisteminin Alt Tipleri

Adaptif bağışıklık yanıtının oluşum basamaklarından birincisi olan ‘Adaptasyon’ sürecinde görevli<sup>41</sup> olan Cas1 ve Cas2 genleri, tüm CRISPR/Cas sistemlerinde bulunmaktadır<sup>39</sup>. CRISPR/Cas sistemlerinde bu iki Cas genin dışında, o tipe özgü Cas genleri de bulunabilmektedir<sup>13,37</sup>. CRISPR/Cas sistemi tiplerinin crRNA işleme mekanizmaları birbirinden farklıdır<sup>42</sup>. Bu sistemlerden Tip II sistemi sadece bakterilerde bulunurken, Tip I ve III sistemleri hem bakterilerde hem de arkealarda bulunmaktadır<sup>6,39</sup>.

Tip I ve III sistemleri benzerlik sergilemektedir. Her iki sistemde de pre-crRNA’dan olgun crRNA’ların elde edilmesinde, endonukleaz özelliğine sahip olan Cas6 proteini kullanılmaktadır<sup>20,41,42</sup>. Tip I sistemine özgül olarak ise, saldırgan yabancı genomu parçalamak için helikaz ve DNaz domainleri içeren Cas3 proteini kullanılmaktadır<sup>6,20,42</sup>. CRISPR/Cas Tip III sistemi; Tip III-A ve Tip III-B olmak üzere iki alt tipe ayrılmakta<sup>40</sup>; Tip III-A DNA moleküllerini parçalarken, Tip III-B ise RNA molekülünü parçalamakla yükümlüdür. Her iki durumda da hedefleme, RAMP süper ailesi üyesi (*Repeat-Associated Mysterious Proteins Super Family*), özel bir Cas gen grubuna dahil olan Csm-Cmr proteinleriyle gerçekleşmekte<sup>37</sup>; Tip III-A’da Cas10-Csm kompleksi görev alırken, Tip III-B’de Cas RAMP modüle (CMR) kompleksi görev yapmaktadır<sup>32,43,44</sup>.

Tip II sistemi, diğer tiplerin aksine daha az bileşene ihtiyaç duymakta ve pre-crRNA’dan olgun crRNA’ların oluşum aşamaları da diğer iki tipe göre farklılık göstermektedir. pre-crRNA’lardan olgun crRNA’lar oluşturulması için, pre-crRNA’daki tekrar dizilerine komplementer olan tracrRNA, pre-crRNA’nın ve tracrRNA’nın oluşturduğu hibrit yapıyı tanıyarak bağlanan bir ribonukleaz olan RNazIII<sup>22</sup> ve Cas9 proteini gerekmektedir<sup>39,45,46</sup>.



**Şekil 2.** CRISPR/Cas sistemi, adaptasyon, ekspresyon, interferans olmak üzere üç temel aşamadan oluşmaktadır<sup>49</sup>. CRISPR/Cas tüm sistemlerinde Cas1, Cas2 bulunur. Tip I sisteminde DNA'yı kesen özgül gen Cas3 iken; Tip II'de Cas9, Tip III'te Cas10'dur<sup>47</sup>. Cas6 proteini Tip I ve Tip III sisteminde pre-crRNA'dan olgun crRNA'ların elde edilmesinde görevlidir<sup>20,41,42</sup>.

Tüm bu veriler ışığında Cas9'un yabancı DNA'nın crRNA rehberliğinde degrade edilmesinden sorumlu tek protein olduğunun anlaşılması<sup>25</sup>, Tip II sisteminin genom düzenleme aracı olarak kullanılmaya başlanmasına olanak vermiştir.

### CRISPR-Cas Sisteminde Adaptif Bağışıklık Yanıtının Oluşum Aşamaları

CRISPR/Cas sisteminin dizi özgül olarak istilacı DNA veya RNA'yı tanıyıp, parçalayarak etkisiz hale getirdiği savunma mekanizması, (i) adaptasyon (ii) ekspresyon ve (iii) interferans olmak üzere 3 aşamada gerçekleşmektedir<sup>48,49</sup> (Şekil 2).

(i) **Adaptasyon:** İstilacı nükleik asitlerden yeni aralayıcı DNA bölgelerinin CRISPR lokusuna kazandırılması basamağıdır. CRISPR adaptasyonunun gerçekleşmesi için; birer nükleaz olan Cas1 ve Cas2 proteinleri gerekmektedir<sup>48,50</sup>. Tip II-A sisteminde, adaptasyon için Csn2, Cas9 ve tracrRNA, Tip II-B sisteminde ise Cas4 fonksiyoneldir<sup>48</sup>. 2-5 bç. lik kısa diziler olan PAM dizileri hem adaptasyon hem de interferans basamağı için önemli ve gereklidir<sup>51</sup>. Cas9'un PAM dizisini tanıma domaini, yeni aralayıcı DNA'nın seçiminden sorumludur<sup>48</sup>. PAM dizileri; Tip I sisteminde protoaralık 5' ucunda 2-3 nt ve Tip II sisteminde protoaralık 5' ucunda 2-5 nt arasında değişen korunmuş dizi

motifleridir<sup>6</sup>. Bu PAM dizisi sayesinde hedef dizi analiz edilerek, genomun kendinden olan ve olmayan ayrımının yapılarak, yeni aralayıcı bölgenin seçilebilmesi mümkün olmaktadır. CRISPR'in adaptasyon basamağı, ekspresyon ve interferans aşamaları öncesinde genetik belleğin oluşturulması için vazgeçilmezdir.

(ii) *Ekspresyon*: Temel olarak CRISPR bölgesinden pre-crRNA sentezi sonrasında, Cas genlerinin aktivasyonu ile pre-crRNA'dan olgun ve fonksiyonel crRNA oluşturulması basamağıdır. Bu bağlamda öncelikle CRISPR lokusundan uzun transkript formu olan pre-crRNA sentezlenir ve işlendikten sonra, hedef DNA'nın tanınmasında rolü olan CRISPR ile ilişkili antiviral savunma kompleksi kaskadı (*CRISPR-associated complex for antiviral defense cascade*)<sup>32</sup> sayesinde olgun crRNA'nın oluşturulduğu crRNA biyogenezi gerçekleştirilir<sup>49</sup>. Bu basamak CRISPR/Cas sistemlerine göre, crRNA biyogenezinde yer alan enzimatik mekanizmalar ve gerekli olan proteinler bakımından farklılıklar gösterebilmektedir.

Tip II sisteminde daha farklı seyreden ekspresyon basamağında, CRISPR lokusundan üretilen pre-crRNA ile 89 veya 171-nt olan tracrRNA, 25 nt. lik baz eşleşmesi yaparak RNA-RNA hibritini oluştururlar. İki RNA da birlikte işlenir; tracrRNA işleme sonrasında ~75 nt uzunluğuna gelir<sup>22</sup>. dsRNA'yı 3'ucundan bir endoribonukleaz olan RNaz III tanıır ve Cas9 eşliğinde pre-crRNA'daki tekrar dizilerini keserek, içerisinde 20 nt aralayıcı DNA içeren 39–42 nt uzunluğunda olgun crRNA'ları oluştururlar<sup>55</sup>.

(iii) *İnterferans*: Ekspresyon basamağında oluşturulan olgun crRNA'nın Cas proteinleri ile oluşturduğu ribonükleoprotein yapısı crRNP'nin<sup>52,53</sup>, hedef DNA'daki PAM dizisini ve aralayıcı DNA'nın 5'ucundaki 7–8 bç. lik bir bölgeyi ifade eden çekirdek dizisini (*seed sequence*) tanımasıyla, hedef dizinin parçalanıp degrade edildiği basamaktır<sup>53</sup>. Başarılı bir interferans için PAM dizisinin varlığı ve proto-aralayıcı DNA=crRNA komplementerliği mutlaka gerekmektedir. PAM dizisi, DNA bağlanması için kritik önem taşımaktadır; çünkü Tip I ve Tip II sistemlerinde PAM dizisinin varlığı, kendi CRISPR bölgelerine saldırılmaktan korumakla yükümlüdür. PAM dizisi yokluğunda, kılavuz RNA dizisi ile tamamen eşleşen hedef diziler olsa bile Cas9 tarafından tanınmaz<sup>54</sup> ve kesim gerçekleşmez. Çekirdek dizisinin dışında birkaç eşleşmemiş baz tolere edilebilir ve daha sonra baz eşleşmesi yolu ile crRNA hedef DNA'ya bağlanır ve Cas proteinleri (Tip I: Cas3 Tip II: Cas9 ve Tip III: Cas 10) hedef DNA'nın hem kodlanan

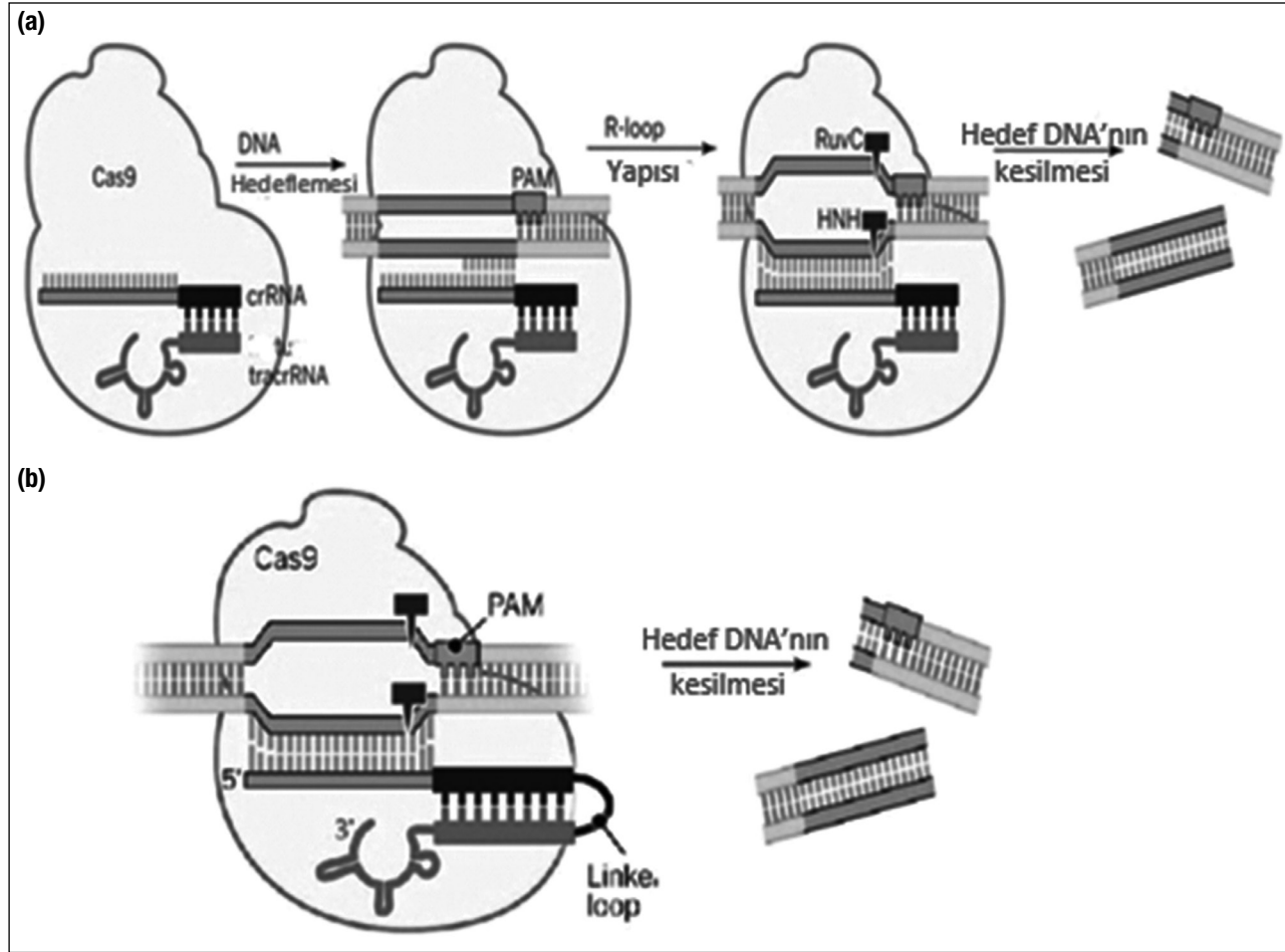
hem de kodlanmayan dizisinde çentikler oluşturur<sup>55</sup>. Tip III sistemi için ise PAM dizisi tespit edilememiş ve sistem kendini degradasyondan korumak için, olgun crRNA'nın 5'ucundaki etiketten yararlanmaktadır<sup>9,52</sup>.

Tip II sisteminin interferans aşamasında, işlenerek fonksiyonel hale getirilmiş olgun crRNA: tracrRNA: Cas9 kompleksinin; hedef DNA dizisini PAM dizisinin yakınından tanımasıyla, RNA-DNA kompleksinin oluşumu gerçekleşir. Memeli gen düzenlenmesi için sık kullanılan PAM dizisi 5'-NGG-3'dir<sup>29</sup>. Bunun yanı sıra çok verimli olmamakla birlikte, Cas9 5'-NAG-3' veya 5'-NGA-3' PAM dizilerini de tanıır<sup>56,57</sup>. Kesim, tamamlayıcı yani komplementer olan DNA ipliğinde PAM dizisinin 3 nt akış yukarı (*upstream*) dizisinden gerçekleşirken; komplementer olmayan DNA ipliğinde PAM dizisinin 3–8 nt akış yukarı dizisinin birçok bölgesinden olmaktadır<sup>25</sup>. DNA ipliklerindeki kesim işlemleri büyük bir protein olan Cas9 tarafından gerçekleştirilmektedir. Cas9 proteini,  $\alpha$ -heliks yapıda olup, hedef diziyi tanımada görevli REC ilmeği ve endonukleaz özellik gösterip HNH-RuvC alt domainleri bulunan NUC ilmeğinden oluşmaktadır<sup>47</sup>. Hedef DNA'nın komplementer ipliğini HNH keserken, komplementer olmayan DNA ipliklerini RuvC kesmekle yükümlüdür<sup>32,47,58</sup> (Şekil 3A).

Cas9'un sgRNA ile programlanarak hedef bölgede çentikler oluşturabileceği, Jinek ve ark. nın, crRNA'nın 3'ucunu tracrRNA'nın 5'ucuna etkili bir şekilde birleştirerek oluşturdukları çift-RNA; yani sgRNA veya grRNA yapısının interferans basamağıyla aydınlatılmıştır<sup>25</sup>. Buna göre, kimerik RNA'nın 3'ucundaki çift sarmal yapıya Cas9 bağlanır ve sgRNA'yı yönlendirerek 5'uç ile hedef DNA dizisi arasında 20 nt. lik baz eşleşmesi gerçekleştirir. Cas9 enziminin hedefi tanınması için gerekli olan, hem crRNA'daki çekirdek dizi hem de hedef DNA ile crRNA-bağlama bölgesine bitişik GG dinükleotidi içeren PAM dizisinin (NGG) varlığıdır. DNA-RNA arasındaki eşleşme gerçekleştikten sonra, Cas9'un HNH ve NUC domainleri PAM dizisinin 3 nt yukarisından hedef DNA'yı keserek çift zincir kırığı oluştururlar<sup>25,54</sup> (Şekil 3B).

### **Efektif Bir Genom Dizayını: Tip II CRISPR/Cas9 Sistemi**

CRISPR/Cas sistemi temelde, RNA yönlendirmeli bir DNA hedefleme sistemidir. Aslında CRISPR/Cas sisteminin DNA zincirini kesmek için kullanılması bilimsel bir araştırma değildir. Bunun yerine, CRISPR'in DNA ipliklerindeki nükleotidlerin genetik dizilimini

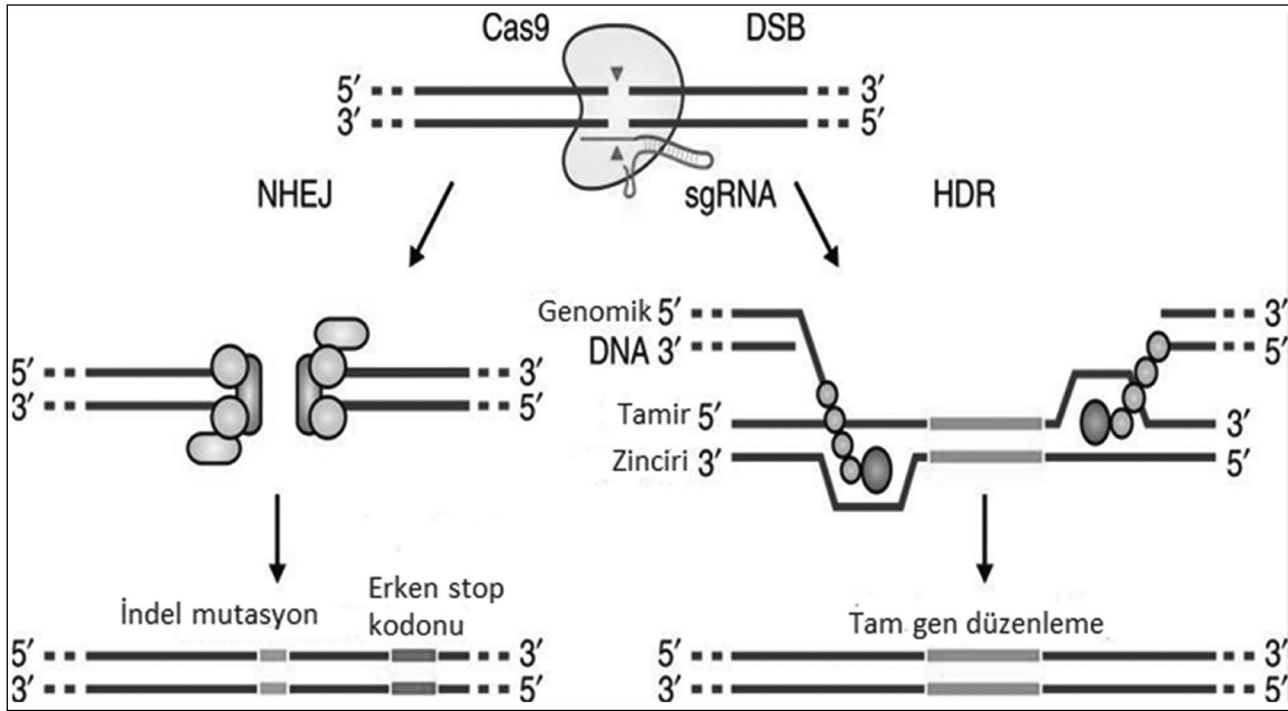


**Şekil 3. a, b.** Cas9 crRNA: tracrRNA tarafından programlanarak hedef bölgede çentikler oluşturulabilir (a). Cas9 sgRNA tarafından programlanarak hedef bölgede çentikler oluşturulabilir (b). R loop yapısı RNA-DNA kompleksinin sağlamlığını sağlamaktadır<sup>64</sup>.

değiştirmek için kullanılması asıl teknolojidir<sup>59</sup>. Hedeflenen DNA dizilerinde değişiklikler yapılabilmesi için, NHEJ ve HR DNA tamir mekanizmaları kullanılmaktadır<sup>60</sup>. Bu mekanizmalar genomun bütünlüğüne en büyük zararı verecek çift zincir kırıklarının tamirinde kullanılmaktadır. Çift iplik kırıklarının DNA'nın her iki ipliğini de etkilemesinden dolayı, hasarlı bölgenin karşısındaki komplementer DNA zincirinden sentezi gerçekleştiren mekanizmalar ile tamir yapılamaz. Bunun yerine çift iplik kırıkları, kırık iplikleri birleştiren rekombinasyonel tamir mekanizmasıyla onarılır. Çift zincir kırıklarının hangi yöntem seçilerek tamir edileceği ise, hücre döngüsünün hangi evresinde bulunduğuyla ilişkilidir:  $G_0/G_1$  evresinde henüz sentez fazı gerçekleşmeyip kardeş kromatidler oluşmadığından HR aktive edilmez ve NHEJ kullanılır. Kardeş

kromatidlere kolayca erişilebildiği hücre döngüsünün S ve G2 evrelerinde homolog rekombinasyon kullanılır. Kardeş kromatidler birbirlerinin tam bir kopyası olduklarından homolog rekombinasyon için ideal birer substrattır.

NHEJ'nin temelde çalışma prensibi, kırık olan iki DNA ipliğinin direkt olarak ligazlarla birbirine bağlanmasıdır. Tamir esnasında kırık iki uç Ku, XLF: XRCC4, DNA ligaz IV<sup>61</sup> gibi çeşitli proteinlerle işlenerek rastgele birleştirilirken, bazı nükleotidlerin kaybı sonucu orijinal DNA dizisinin kalıcı olarak değişmesi gerçekleşebilmektedir. Delesyon sonucu kaybolan nükleotidler kontrol edilemediği için NHEJ hataya meyilli bir sistemdir ve dolayısıyla, bu tamir mekanizmasında beklenmedik mutasyonlar oluşabilir<sup>59,62</sup> (Şekil 4).



**Şekil 4.** Cas9 tarafından indüklenen çift zincir kırıkları (DSB) iki farklı mekanizma ile tamir edilebilir. NHEJ hata eğilimli bir mekanizma iken, HR kalıp dizi sayesinde doğru ve hassas düzenleme olanağı sunar<sup>63</sup>.

NHEJ'in basit, sade ve rastgele olmasının aksine, HDR daha karmaşık ve hedeflenen organizmanın genetik dizilimini düzenlemek için daha doğru bir araçtır. Düzenlenmenin doğruluğunu sağlayan, kullanılacak belirli bir kalıp dizisinin yani kardeş kromatidlerin varlığıdır<sup>27,59</sup>. Bu tamir mekanizmasında çift zincir kırığı (DSB: *Double Strand Break*) hazırlanmış olan kalıp diziyeye göre yeniden sentezlenir. Böylece hedef bölge, istenilen nükleotit dizisine çevrilmiş olur<sup>59</sup>.

Cas9 enzimi ile oluşturulan çift zincir kırıklarında iki ucun rastgele birleştirildiği hata eğilimli NHEJ sistem, *insersiyon* (ekleme) ve *delesyon* (silme): indel mutasyonlara neden olmaktadır. İndel mutasyonları, bir genin kodlama bölgesi içinde meydana gelirse çerçeve kaymasına neden olarak ya da erken stop kodunu oluşturarak genlerin susuturulmasını sağlamaktadır<sup>63</sup>. Gen düzenleme aracı olarak çift zincir kırıklarının kullanıldığı çalışmalarda, nakavt mutasyonları oluşturmak için NHEJ kullanılırken, gen düzeltilmesi ve *knock-in* (dizi ekleme) çalışmalarında daha hassas olan HR kullanılmaktadır<sup>60</sup> (Şekil 4).

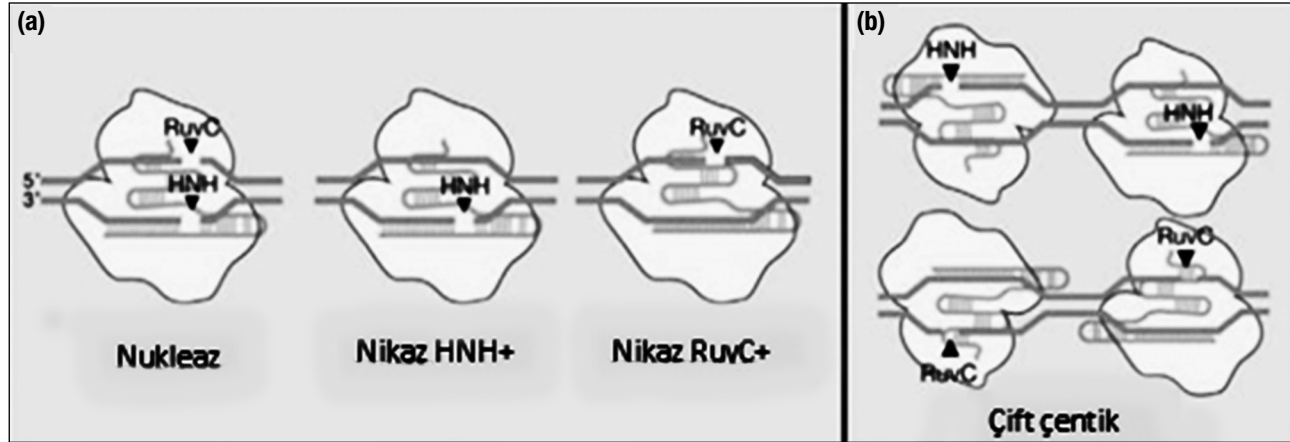
CRISPR genom düzenleme teknolojisi ile NHEJ ya da HR DNA onarım mekanizmalarının herhangi bir

organizmada istenilen bölgede knock out, knock in gibi düzenlemeler yapılabilmesi için<sup>59</sup>; düzenleme yapılacak bölgeye özgül olarak tasarlanmış olan sgRNA ile viral, non-viral, plazmit gibi farklı transfeksiyon yöntemlerinin kullanılabilmesi Cas9 vektörleri ile<sup>64</sup> verilmesi gerekmektedir.

### Cas9 Özgüllüğü

CRISPR/Cas9 sistemi bakterilere direnç kazandırmada, biyotiplendirmede, tarımda, hastalık modelleri oluşturmada, tedavide, gen düzenlenmesi gibi birçok alanda uygulanıyor olmasına rağmen; Cas9 özgüllüğünün eksikliği nedeniyle hedeflenen genomik bölgenin haricinde, istenmeyen hedef dışı DNA bölgelerinin kesime uğraması (*off-target effect*) ve etik problemler sistemin kısıtlayıcılığını oluşturmaktadır<sup>59</sup>.

Genom düzenleme teknolojisi, genomda kalıcı değişikliklere neden olduğundan, özellikle klinik uygulamalar ve gen tedavisi için Cas9 nukleazlarının hedefleme özgüllüğü oldukça önemlidir; hedefe yönelik kesim yapılmalıdır<sup>47</sup>. Cas9 hedef bölgelerinin seçiminde tek ihtiyaç, hedef bölgenin hemen akış aşağısında bulunan PAM motifinin varlığıdır. Son zamanlarda yapılan



Şekil 5. a, b. Cas9 nükleaz, RuvC ve HNH domainlerinin nükleaz aktivitesi sayesinde DNA'yı keserek DSB'leri oluşturur. RuvC ve HNH domainlerinden birisinin katalitik aktivitesi inhibe edilerek tek iplik DNA kırıklarına neden olan nickaz mutantları üretilir (a). Hedef dizilerine sahip iki Cas9 nickaz kompleksi birlikte DNA'da çift zincir kırıkları oluşturabilir (b); kesim verimliliğinde düşüş olmaksızın, hedefi tanıma süresi iki katına çıkmaktadır<sup>47</sup>.

çalışmalarda, Cas9 özgüllüğünü genel olarak rehber diziyile PAM dizisinin 5' ucunun ilk 8–12 nt. i arasındaki tam eşleşmenin (baz komplementerliği) belirlediği tespit edilmekle birlikte<sup>27</sup>, hedef bölgede ilk 20 nt.'in özgüllüğe farklı derecelerde katkıda bulunduğu tespit edilmiştir<sup>47</sup>. Cas9 özgüllüğünde PAM'ın 5' ucuna yani proksimal dizilerine göre daha az efektif olan PAM distal dizilerinin de spCas9 aracılı DNA kesiminin özgüllüğüne katkıda bulunduğu bildirilmiştir<sup>47,56</sup>.

Cas9'un hedef DNA'da kesim yapabilmesi için, rehber RNA ve hedef DNA arasında geniş bir homoloji gerektirmektedir<sup>47</sup>. Bununla birlikte, rehber RNA ile hedef DNA dizisi arasındaki birden fazla baz uyumsuzluğunun, eşleşmemiş bazların konumuna, sayısına ve dağılımına bağlı olarak tolere edilebileceği de gösterilmiştir<sup>65</sup>. Özgüllükte daha az öneme sahip rehber dizinin PAM distal bölgesindeki tekli baz uyumsuzlukları PAM proksimal bölgede olanlara kıyasla daha iyi tolere edilmektedir. Bu bölgedeki hatalı eşleşmeler nedeni ile özgüllük azalsa da, Cas9 aktivitesi yok olmaz. Genel olarak, rehber RNA ve hedef DNA arasında 5 baza kadar eşleşmemenin tolere edilebildiği rapor edilmekle birlikte; bu baz uyumsuzlukları hedef dışı etkilere ivme kazandırıp, çift zincir kırıklarına ve indel oluşumuna sebep olmakta<sup>56</sup>, genomda instabilite ve istenmeyen mutasyon oluşumu ile sonuçlanmaktadır.

Bu istenmeyen mutasyonlar, in vivo ve ex vivo genom düzenleme temelli tedavi stratejilerin geliştirilmesi ya da genetik varyasyonları taşıyan izogenik hücre hatlarının üretilmesi gibi, yüksek düzeyde Cas9 özgüllüğü ve

hassasiyeti gerektiren genom düzenleme uygulamalarının kullanımını sınırlayabilmektedir. Mutasyonların engellenmesi, Cas9 spesifitesinin artırılması, yüksek etkinlikte hedef DNA'nın kesilmesi ve hedef dışı etkilerin azaltılması amacı ile gerçekleştirilen diğer bir strateji, *S. pyogenes*'ten izole edilen modifiye Cas9'un (SpCas9) kullanılmasıdır<sup>66</sup>. Bu bağlamda yapılan çalışmalar şu şekildedir: Yabancıl tip Cas9'un RuvC ve HNH domainlerinin nükleaz aktivitesi aracılığıyla, hedef DNA'da çift zincir kırıkları oluşturur. Bu çift zincir kırıkları önceden de açıklandığı gibi NHEJ ve HR tamir mekanizmalarınca onarılmaktadır<sup>60</sup>. Cas9 özgüllüğünü artırmak için, RuvC veya HNH nükleaz domainlerinden birinin katalitik aktivitesini nokta mutasyonu yolu ile inaktive ederek, DNA tek sarmal kırıklarını (SSB: *single strand break*) oluşturan Cas9 nickazlar [nickase Cas9n-D10ACas9, (Şekil 5A)] elde edilmiştir<sup>25,27</sup>. Çift sgRNA tarafından yönlendirilen iki Cas9n enzimi, DNA'nın karşılıklı ipliklerinde çentikler oluşturarak, çift zincir kırıklarına benzer şekilde etkili bir indel mutasyon oluşumunu da sağlamaktadır<sup>66</sup>. Hedef dışı oluşan çentik bölgeleri, yüksek spesifiteye sahip baz eksizyon tamiri (BER) yolu ile tam olarak tamir edildiğinden<sup>47</sup>; bu multipleks çentikleme stratejisi, yabancıl tip Cas9'lara göre spesifiteyi 1,500× kat artırmaktadır (Şekil 5B).

Fu ve ark., nın yaptıkları çalışmada; 17–18 nt uzunluğundaki sgRNA'ların, hedefleme verimliliğinde değişim olmaksızın; 20 nt uzunluğundaki sgRNA'lara göre 5000 kata kadar daha az hedef dışı bölgeye bağlanarak,



çok daha özgül etkinlik gösterdikleri belirlenmiştir<sup>67</sup>. Cho ve ark., diğer çalışma ekiplerinden farklı olarak sgRNA'ların hem nükleotit sayısını hem de başlangıç nükleotid tipini değiştirerek Cas9'un özgüllüğü üzerine çalışmalar yapmışlardır<sup>68</sup>. Bu çalışmanın sonucunda, genelde kullanılan sgRNA'ya (5'-GX19) kıyasla, tercih ettikleri 5'-GGX20 veya 5'-GGGX19 sgRNA'ların, hedef dışı bölgeleri efektif bir şekilde ayırt ettiği ancak; hedefleme verimliğinde düşüş olduğu tespit edilmiştir. Hsu ve ark., nin 2013 yılında yaptıkları çalışmada ise, yüksek özgüllük için enzim miktarının da önemli olduğu bildirilmiştir. Çalışmalarında SpCas9-sgRNA kompleksinin miktarını azalttıklarında, spesifitenin 4-7 kat arttığı belirlenirken; hedef DNA üzerindeki kesimin ise azaldığı saptanmıştır<sup>56</sup>.

Diğer çalışmalarda; sgRNA üzerinde yapılan değişikliklerin yanı sıra Cas9-sgRNA'nın hücreye verilmiş yöntemlerine göre de özgüllüğün değiştiği tespit edilmiştir. Bu bağlamda, Cas9 kodlayıcı plazmidten ziyade, rekombinant DNA teknolojisi ile Cas9 ve sgRNA'nın birleştirilmesiyle oluşturulan RNP kompleksinin kullanımının, hedef dışı etkiler nedeniyle oluşan mutasyonları azalttığı belirlenmiştir<sup>57</sup>. Kim ve ark., elektroporasyon yoluyla ve Ramakrishna ekibi ise hücre penetrant peptidler (CPP: *Cell Penetrating Peptides*) kullanarak hücreleri RNP kompleksi ile transfekte ettikleri çalışmalarında Koo ve ark., sonuçlarını destekler nitelikte veriler elde etmişlerdir<sup>69,70,57</sup>.

Yapılan çalışmalar ışığında elde edilen verilere göre, RNP kompleksleri plazmitlerin aksine konak hücrenin genomunda istenilmeyen yerlere entegre olmamakta<sup>69,70</sup> ve bu nedenle, insan embriyonik kök hücre çalışmaları için plazmit transfeksiyonundan daha az sitotoksik ve en az iki kat daha fazla koloni oluşumu sağladığından, tercih edilecek bir kompleks olarak yerini almıştır<sup>69</sup>. Spesifitenin artırılması için Cas9 ve sgRNA'nın modifiye edilmesi çalışmalarının yanı sıra, potansiyel hedef dışı bölgelerin tahmin edilerek, hedef dışı etkilerin minimale indirilmesi amacı ile, Off-Spotter (<https://cm.jefferson.edu/Off-Spotter>)<sup>71</sup>, Cas-Offinder (<http://www.rgenome.net/Casoffinder>)<sup>72</sup>, CHOP-CHOP (<https://chopchop.rc.fas.harvard.edu/>)<sup>73</sup> ve COSMID (<http://crispr.bme.gatech.edu/>)<sup>74</sup> gibi web tabanlı bilgisayar yazılımları geliştirilmiştir<sup>57</sup>. Bu programlarla tüm hedef dışı bölgeler saptanamıyor olsa da, tespit ettiği birçok hedef dışı bölge deneysel olarak da gösterilerek, veri tabanlarının güvenilirliğinin artması sağlanmıştır<sup>17</sup>.

Cas9 proteininde gerçekleştirilen modifikasyonlar sadece CRISPR/Cas9 sisteminin spesifitesini

artırmamış; aynı zamanda genomu istenilen baz dizisinin eklenip çıkartılmasını sağlamış, hatta transkripsiyonel ve epigenetik hedefleme ile düzenlemeyi sağlayabilen ucuz, kullanışlı, etkin bir sistem haline getirmiştir. Genomdaki epigenetik düzenlemeler, dead Cas9 (dCas9) ile gerçekleştirilmiştir. dCas9, Cas9 endonukleaz enziminin RuvC (D10A) ve HNH (H840A) katalitik bölgelerinin mutasyona uğratarak inaktifleştirilmiş biçimidir. Katalitik olarak inaktif olmasına rağmen, DNA'ya bağlanma özelliğini korumaktadır. dCas9 ile oluşturulan CRISPR/Cas9 sistemi, CRISPR interferans (CRISPRi) olarak adlandırılmıştır<sup>75,76</sup>. Modifiye edilmiş bu sistem, genom dizaynı yerine RNA rehberliğinde transkripsiyon regülasyonu amacı ile kullanılmaktadır<sup>77</sup>. Transkripsiyon regülasyonunu dCas9 iki şekilde gerçekleştirmektedir: (i) RNA polimeraz'ı engelleyip onun yerine promotör bölgeye bağlanarak, transkripsiyonun başlamasını durdurur (ii) açık okuma çerçevesine bağlanarak, transkripsiyonu uzama basamağında durdurarak gen ekspresyonunu baskılar. Bunun yanı sıra, transkripsiyonun tetiklenmesinin amaçlandığı başka çalışmalarda, RNA Polimeraz alt birimi omega ( $\omega$ ) ile dCas9'un füzyonu ile oluşturulan dCas9- $\omega$  yapısının, promotör bölgeye optimal bir mesafede bağlanması ile gen ekspresyonunun indüklendiği rapor edilmiştir<sup>78</sup>.

Epigenetik regülasyon bazında yapılan çalışmaların etkin olanlarından birisi, Vojta ve ark. nin özgül olarak CpG metilasyonunu sağlayan CRISPR/Cas9 tabanlı epigenom düzenleme aracı dCas9-DNMT3A'yı oluşturarak, human embriyonik böbrek hücre hattı HEK293'te BACH2 ve IL6ST genlerinin promoterini hedefledikleri çalışmadır<sup>79</sup>. Çalışmalarının sonucunda; BACH2 ve IL6ST genlerinin promoterlerinde artmış metilasyona bağlı olarak, hedef genlerin ekspresyon seviyesinde 2'şer kat azalma saptanmıştır. Böylelikle, dCas9-DNMT3A ile DNA metilasyonunu artırıp, gen susturulmasının indüklenebileceğini göstermişlerdir.

dCas9, epigenetik uygulamaların yanı sıra spesifitenin artırılması için de kullanılmıştır. dCas9 ile FokI nukleaz dan 'fCas9' füzyonları üretilmiştir. Sistemin aktivitesi için iki adet fCas9 gerekmektedir. Oluşturulan fCas9, HEK293 hücrelerinde *CLTA*, *EMX* ve *VEGF* genlerini hedef alarak, yabancı tip Cas9 ve nick Cas9'a göre spesifitesi kıyaslanmış ve değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda, fCas9'un hedef dışı bölgeleri hedefleme kapasitesinin Cas9'a göre 140 kat, nCas9'a göre 1,3-8,8 kat daha düşük olduğu tespit edilmesi<sup>80</sup>

sonucunda, fCas9'un daha özgül bir enzim olduğu belirlenmiştir<sup>80,81</sup>. dCas9'a farklı foksiyonel domainler eklenerek, onu sadece gen ekspresyonu düzenleme aracı olmaktan çıkarıp, farklı alanlarda da kullanılabilir mi düşüncesiyle yeni çalışmalar planlanmıştır. Buna göre, dCas9'a GFP domainin eklenmesi ile kromozom içindeki özgül lokusların görüntülenmesi hedeflenmiştir. Metiletazlar, rekombinazlar, ve histon modifiye edici enzimler gibi diğer proteinlerin de dCas9'la birleştirilmesinin, bu teknoloji için yeni fırsatlar yaratacağı öngörülmektedir<sup>6</sup>.

## Etik Problemler

Özgüllüğün yanı sıra, CRISPR/Cas9 sisteminin karşı karşıya kaldığı diğer bir sorun da etik problemidir. Birçok ülke tarım ve diğer biyolojik alanlarda genom dizayn teknolojisinin önünü açmak için organizmalar üzerinde genetik düzenlemelere izin verirken; sistemin insan genomunda düzenleme yapmak için kullanılması hala çok tartışmalıdır<sup>59</sup>. Tartışmalı olmasının sebebi, sistemin faydasının risklerinden daha fazla olması gerekliliğidir<sup>82</sup>. Bu risklerin en başında, insanlarda genom düzenleme için yapılan tüm tedavi müdahalelerinin somatik hücrelerde gerçekleştirilmiş olması ve çalışmalarda hedef dışı mutasyonların gelişmiş olması gelmektedir<sup>82</sup>.

Yakın zamana kadar yapılan çalışmalarda insan embriyolarında CRISPR/Cas9 sistemiyle nasıl veriler elde edileceği bilinmiyordu. 2015 yılında Çin araştırma grubu, insan embriyosunda CRISPR/Cas9 aracılı gen düzenlenmesini gerçekleştirmişlerdir. Ekip çalışmalarını, etik problemleri sınırlandırmak için, normalde hayatta bağdaşmayan iki spermle döllenmiş yumurta yani triploid (triponuklear) zigotlar kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada hedef olarak,  $\beta$ -talasemide mutant olan  $\beta$ -globin (HBB) geni seçilmiştir. Çalışmalarının sonucunda, düşük genom düzenleme etkinliği, hedef dışı kesim, mutasyon gelişimi ve son olarak da mozaik embriyoların oluşumu bildirilmiştir<sup>83</sup>. Hedef dışı kesimler, genomda istenmeyen mutasyonlara sebep olabilir ve bu mutasyonlar zararlı etkiler oluşturarak, hücrenin transforme olmasına ve hatta hücre ölümüne sebep olabilir<sup>84</sup>. Bunun dışında, germ hücrelerinde yapılan modifikasyonlar gelecek kuşaklara aktarılacaktır. İstem dışı oluşan bu mutasyonlar, gelecek nesillerde bugün öngörülemeyen değişikliklere ve modifikasyonlara neden olabilir<sup>82</sup>. Araştırmanın henüz prematüre aşamalarında bile, yöntemin insanda uygulanmasını engelleyecek ve uzak durulmasını sağlayacak birçok

sorun ile karşılaşmıştır<sup>7</sup>. Embriyolar ile yapılan çalışmalarda son güncel durum, ilk defa canlı insan embriyolarının kullanıldığı Mart 2017'de yayınlanan çalışmadır. Bu çalışmada Çin'de yaygın görülen Favizm hastalığıyla ilişkilendirilmiş G6PD genindeki G1376T mutasyonu taşıyan sperm donörü kullanılarak oluşturulan embriyolardan birinde mutasyon başarılı şekilde tamir edilirken; diğer embriyoda bazı hücrelerde mutasyon düzeltilmiş, bazı hücrelerde ise G6PD geni tamamen inaktif hale gelmiş; mozaik bir embriyo elde edilmiştir<sup>85</sup>. Yine 2017 yılında Çin dışında ilk kez ABD'de yapılan çalışmada, insan embriyolardaki hipertrofik kardiyomyopati hastalığına neden olan MYBPC3 genindeki  $\Delta$ GAGT mutasyonunun düzeltilmesi hedeflenmişti. Yöntemsel açıdan önceki Çin bazlı çalışmalardan farklı yapılan, CRISPR bileşenlerinin embriyonun gelişiminin ilk aşamalarında değil de; daha erken yani döllenme öncesinde sperm ile birlikte M fazı oosite intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu yöntemiyle yerleştirilmesidir. Bu sayede mozaizm oluşumunun azaltılması ya da önlenmesi hedeflenmiş; oluşturulan 58 embriyodan 42'sinde (%72,4) MYBPC3 genindeki mutasyonu düzeltildiği, rapor edilmiştir. Ancak yine de klinik uygulamaları iyi tasarlanması ve planlanması gerektiği, tekniğin hala başka heterozigotik mutasyonlar oluşturduğu sonucuna varılmıştır<sup>86</sup>. Bu nedenle CRISPR/Cas9 aracılı gen düzenlenmesi insan embriyoları için henüz tam mükemmellikte bir teknoloji değildir.

CRISPR/Cas9 insan embriyolarında genom düzenleme aracı olarak kullanılmasını Almanya ve İtalya yasaklamışken; bildirildiği üzere Çin hükümeti ve ABD izin vermektedir<sup>7</sup>.

Ülkemizde ise doğrudan CRISPR/Cas9 teknolojisinin organizmalar üzerinde kullanımına dair bir düzenleme bulunmamasına rağmen, 2010 yılında düzenlenen 27671 sayılı genetik yapısı değiştirilmiş organizmalar ve ürünlerine dair yönetmeliğin 5. Maddesinin c fıkrasında Genetiği değiştirilmiş bitki ve hayvanların üretiminin yasaklandığı belirtilmiştir<sup>87</sup>.

Bir başka etik problem ise, CRISPR/Cas9 sisteminin germ hücrelerinde kullanımının toplumsal çatışmaya neden olabileceği öngörüsüdür<sup>59</sup>. İnsanların çocuklarını kendi istekleri doğrultusunda tasarlamaları sonucunda, bu çocukların diğerlerine kıyasla daha uzun yaşam süresine sahip olma, fiziksel ve zihinsel üstünlükte olma gibi istenmeyen sorunlarla karşılaşılabilir. Bu durum bireyler hatta toplumlar arasında pozitif ayrımcılık problemlerine neden olabilir<sup>59,84</sup>. Bunun dışında,

germ hücrelerinde genom düzenleme aslında maliyeti oldukça yüksek bir süreçtir ve gelişmiş ülkelerde yaşayan aileler bu maliyeti karşılayabilirken, gelişmekte olan ülkelerdeki aileler bunu karşılayamayacaktır. Bu durum, refah düzeyi yüksek ülkelerde doğan çocukların, diğer ülkelerdeki çocuklara karşı avantaj sağlarken, dünya güç dengesizliğini de artırabilecektir<sup>84</sup>. Gerçekte, genler üzerinde değişiklik ile daha zeki, daha kaslı ya da renkli gözlü insanlar oluşturmak şu anki teknoloji ile gerçekleştirilmesi çok mümkün olmayan düşüncelerdir. Çünkü zeka ve güç gibi multifaktöryel kalıtılan özellikler tek bir gen ile değil yüzlerce genin karmaşık etkileşimi ile meydana gelmektedir. Genomik alandaki bilgi ve tecrübe, bu tür karmaşık yapıda yönlendirmeler yapmaktan şu an için oldukça uzaktadır. Yine de etik bilimciler, CRISPR teknolojisi ile insan genom dizaynına izin verilmesi için hala süre gerekli olduğunu ve toplumun, CRISPR ile getirilen yeniliklere yavaş yavaş uyum sağlaması gerektiğini düşünmektedirler<sup>59</sup>.

### Lösemide CRISPR/Cas9 Uygulamaları

Lösemi, kan ve/veya kemik iliği'nde artmış lökosit sayısı ile karakterize malign hastalıkların genel ismidir<sup>88</sup>. Lösemiler, hastalığın biyolojik davranışına göre akut ve kronik, hücrelerin morfolojik, immünofenotipik ve sitogenetik özelliklerine göre lenfoid veya miyeloid lösemiler olarak sınıflandırılır<sup>89</sup>. Bunlar da kendi aralarında; akut lenfoid (ALL), akut miyeloid (AML), kronik lenfoid (KLL), kronik miyeloid lösemiler (KML) olarak gruplara ayrılır. Lösemi çeşitlerinin her biri çeşitli kromozomal yeniden düzenlemeler ve mutasyonlar sonucunda gelişmektedir. Kromozomal yeniden düzenlemeleri; resiprokal translokasyonlar, inversiyonlar, insensiyonlar oluşturmaktadır<sup>90</sup>. Bu düzenlemelerin tümörigenezde erken, hatta başlatıcı mekanizmalar olduğuna dair önemli kanıtlar bulunmaktadır<sup>90,91</sup>. Genetik yeniden düzenlenmelerin en sık görülen tiplerinden olan resiprokal translokasyonlar, tüm hematolojik malignitelerin %50'sinden fazlasında<sup>92</sup> bulunmakla birlikte; çok sayıda gen mutasyonu, gen ekspresyonu düşüklüğü ya da aşırı gen amplifikasyonu da lösemilerin etiolojisindedir.

Günümüzde lösemi patogenezinin etki eden mekanizmaların anlaşılması ve kişiye özgül tedavi stratejilerinin geliştirilebilmesi için, genom tasarımı teknolojisi çağı oldukça önem kazanmaktadır. Bu bağlamda yapılan çalışmalar ve CRISPR/Cas9 teknolojisinin, çeşitli lösemi tiplerinde kullanımıyla rapor edilen tedavi kazanımları aşağıda özetlenmektedir.

Genom dizaynı çalışmaları kapsamında hastalıkların seyrinin ve patogenezinin daha iyi anlaşılabilmesi için, etiolojisinde yer alan translokasyonları ve mutasyonları barındıran hastalık modellerinin oluşturulması gerekmektedir<sup>92</sup>. Torres ve ark., çalışmalarında, CRISPR/Cas9 teknolojisiyle non-homolog kromozomlarda çift zincir kırıkları oluşturarak, HEK293A embriyonik böbrek hücre hattı ile insan mezenkimal ve hematopoietik kök hücrelerinde t (11; 22) Ewing Sarkomu ve CD34+ insan hematopoietik kök hücrelerinde t (8; 21) AML'yi indüklemeyi başarmışlardır<sup>92</sup>. Mutasyonlara sahip hastalık modellerini geliştirmek için ilk çalışmalar ise Heckl ve Brabetz'in ekipleri tarafından yapılmıştır. Heckl ve ark.<sup>93</sup> CRISPR/Cas9 teknolojisi kullandığı çalışmalarının sonucunda; kemik iliği histolojisi verileri AML ile tutarlı olan, *Dnmt3a*, *Ezh2*, *Smc3* ve *Nf1* genleri mutasyonlu olan AML fare modelleri geliştirmişlerdir (Tablo 1). Brabetz ve ark., ise AML olgularında sık görülen IDH2 (İzositrat dehidrogenazlar) genindeki R140Q mutasyonunu CRISPR/Cas9 teknolojisi kullanılarak K562 hücrelerinde oluşturmuşlardır<sup>94</sup>.

Hastalık modellerinin oluşturulmasının yanı sıra CRISPR/Cas9 teknolojisi gen susturulması, genin yeniden işlevsel hale getirilmesi, gen ekleme, genin ve miRNA'ların hücredeki görevini belirleme gibi çeşitli biyolojik prosesler için de kullanılmaktadır. Gen mutasyonu tamiri yapılan bir çalışmada, fonksiyonel yabancı tip *ASXL1* proteinini eksprese edemeyen KML hücre hattı KBM5 kullanılmıştır. Mutasyon tamiri için, CRISPR/Cas9 aracılı homolog rekombinasyon kullanılarak, KBM5 hücrelerinde *ASXL1* proteini yeniden sentezlenmeye başlamıştır. Böylece CRISPR/Cas9 teknolojisi ile işlevliğini kaybetmiş olan herhangi bir genin tekrardan fonksiyonel olabileceği gösterilmiştir<sup>95</sup> (Tablo I). Tuñón ve ark., Boff-p210 hücre hattında KML'de hiperaktif olan *p210* onkoproteininde CRISPR/Cas9 sistemi ile delesyon oluşturmuşlardır. Bu sayede onkoprotein ekspresyonu inhibe edilmiş ve lösemik hücre apoptozu indüklenmiştir<sup>96</sup>. B-ALL hücre hattı olan NALM6 ile yapılan bir başka çalışmada, yüksek düzeyde eksprese edilen CXCR4 kemokin reseptörünün, CRISPR/Cas9 teknolojisi ile susturulmasıyla; lösemik proliferasyon azalmış, kemosenesizasyon gelişmiş ve fare ksenograftlarında yaşam süresi artmıştır<sup>97</sup>. KML hücreleri ile yapılan epigenetik faktörlerin dahil olduğu farklı bir çalışma, lösemi kök hücrelerinin koloni oluşturmada ve hayatta kalmasında gerekli olan Polycomb Baskılayıcı Kompleks 2 (PRC2) geninin katalitik altbirimi olan EZH2'i ekspresyon

**Tablo 1.** CRISPR-Cas9 sistemiyle hematolojik maliniterde gerçekleştirilmiş bazı uygulamalar<sup>112</sup>

Hedef genler	Hücre tipi	Gen düzenleme	Sonuçlar/yorumlar	Referanslar
Runx1, etc.	Fare HSPCs	NHEJ ile knock-out	CRISPR-Cas9 ile AML fare modeli geliştirilmesi	93
KMT2C (MLL3)	Fare HSPCs	NHEJ ile knock-out	AML'de tümör supresör bir gen olarak görev yapan KMT2C (MLL3) geninin keşfi	100
EPAS1 (HIF-2 $\alpha$ )	İnsan AML Hücre hattı	NHEJ ile knock-out	EPAS1'in tek başına kaybının, hipoksik koşullar altında insan AML hücreleri üzerinde etkisi gözlemlenmemiştir	104
Ly6 c2, etc.	Murin AML Hücre hattı	NHEJ ile knock-out	AML'de sitarabin direnci ile ilişkili genlerin belirlenmesi	105
Cebpa (enhancer)	Murin miyeloid Hücre hattı	HDR ile knock-in	Enhansırda oluşmuş mutasyon C/EBPa geninin ekspresyonunu azaltmaktadır. Böylece, miyeloid Cebpa gen regülasyonu için enhansırların önemi tespit edilmiştir.	106
ASXL1	İnsan KML Hücre hattı	HDR ile düzeltme	ASXL1 proteini yeniden sentezlenmeye başlanması, fare ksenograftlarının sağkalımını artırmıştır	95
TAL1	İnsan T-ALL Hücre hattı	HDR ile knock-in	TAL1 geninde epigenetik düzenlemeler	107
TRIB1	İnsan T-ALL Hücre hattı	NHEJ-ile knock-out	TRIB1'in kaybı interleukin-2 ekspresyonunu azaltmıştır	108
CNB1, CNB2	İnsan T-ALL, AML, KML Hücre hattı	NHEJ ile knock-out	THC'nin pro-apoptotik etkinliğinin değerlendirilmesi	109
sgRNAs pool	İnsan miyeloid lösemi Hücre hattı	NHEJ ile knock-out	İnsan hücrelerinde tam genom analizi için sgRNA aracılı kütüphaneler oluşturulması	110
sgRNAs pool	Murin AML Hücre hattı	NHEJ ile knock-out	Protein bölgelerinin CRISPR-Cas9 taraması ile murin AML hücrelerinde bilinen 6 ilaç hedefi ve 19 yeni bağlama alanı belirlenmesi	111

miktarı fazlalığı üzerinedir. Bu çalışmada KML hastalık modeli oluşturulmuş farelerde, CRISPR/Cas9 yöntemi ile EZH2'nin ekspresyonel inaktivasyonu gerçekleştirildiğinde, BCR/ABL1 mutasyonel statüsünden bağımsız olarak lösemi kök hücreleri kaynaklı hastalığın başlaması ve devam etmesi engellenmiş, KML hücre sayısı azalmış ve farelerin sağkalım süresi uzamıştır<sup>98</sup>. CRISPR/Cas9 aracılı epigenetik regülasyon araştırmaları kapsamında Tzelepis ve ark., nın AML için tedavi hedef genlerini belirlemek için yaptıkları çalışmalarında, transkripsiyon aktivatörü bir HAT (*Histon Asetil Transferaz*) olan *KAT2A*'nın, sgRNA ile hedeflenerek inhibe edilmesi ile myeloid farklılaşması ve lösemik hücre apoptoz indükleyerek anti-AML aktivitesi gösterilmiş, farelerde hayatta kalım süresi artmıştır<sup>99</sup>.

2014 yılında Chen ve ark., CRISPR/Cas9 teknolojisi ile 7. Kromozomun q koluna lokalize, tümör baskılayıcı gen olan *MLL3* (*Mixed Lineage Leukemia 3 Gene*) genini keşfettiler. Bir histon metil transferaz olan ve *KMT2C* (*Lizin Metiltransferaz 2C*) olarak isimlendirilen *MLL3*'ün ekspresyonundaki azalma, belirli AML formlarının daha agresif hale gelmesine neden olmaktadır<sup>100</sup> (Tablo I). Farklı bir çalışmada, akut monositik lösemi hücre hatları olan MOLM-13

ve MV4-11 hücrelerinde *ENL* geninin CRISPR-Cas9 ile inhibe edilmesi hedeflenmiştir. Bunun sonucunda, bir miyeloid farklılaşma belirteci olan Integrin alfa M'nin (ITGAM veya CD11b) yüzey ekspresyonu artmış ve makrofaj benzeri yapılar oluşmuş, *in vitro in vivo*'da lösemik hücre proliferasyonu azalmıştır. Çalışma ekibi *ENL* genini, AML'de onkogenik transkripsiyonel prosesleri düzenleyen bir histon asetilasyon okuyucusu olarak tanımlamışlardır<sup>101</sup>.

miRNA'larla yapılan çalışmalar, genom tasarım teknolojisinde geline en heyecan verici yaklaşımlardandır. KML hücre hattı K-562'de miR182-5p'nin, tirozin kinaz inhibitörlerine (TKI) karşı gelişen direnç üzerine etkisi araştırmak amacı ile CRISPR/Cas9 teknolojisi ile miR182 lokusu homozigot olarak inhibe edilerek; miR182-5p ekspresyonu azaltılmıştır. Böylelikle, miyeloid hücre proliferasyonu engellenerek, hücre farklılaşması sağlanmış, eritrosit çoğalması indüklenmiş ve kemoterapi direnci kırılarak, TKI sensitizasyonu sağlanmıştır<sup>102</sup>. Akut monositik lösemi hücre hattı MV4-11 ile yapılan farklı bir çalışmada, lösemi hücre büyümesi üzerinde etkili miRNA'ları belirlemek için CRISPR/Cas9 kütüphanesi (lentiCRISPRv2 kütüphanesi) oluşturulmuştur. Ekip miR-155'in, hücre

büyümesini çoğaltan bir miRNA olduğunu bildirmiştir<sup>103</sup>. Bunların dışında, CRISPR-Cas9 sistemi ile hematolojik maliniterde gerçekleştirilmiş uygulamalar, Tablo I'de özetlenmektedir.

Sonuç olarak, CRISPR/Cas9 teknolojisi hematolojik hastalıkların moleküler patogenezinin anlaşılmasında ve henüz bilinmeyenlerin aydınlatılmasında potent ve heyecan verici bir faktör olarak hayatımıza girmiştir. Daha ileri hedef olarak ise hem hastalık modellerinin oluşturulabilmesi hem de genetik ve epigenetik düzenlemelerle, henüz üstesinden net olarak gelinmeyen ve kemoterapi etkinliğinin en büyük kısıtlayıcısı olan ilaç dirençliliğinin aydınlatılmasında kullanılacak bir metodoloji haline gelecektir. Bununla birlikte, bir gen düzenleme teknolojisi olarak CRISPR/Cas9, bilim dünyasında çığır açan bir gelişme olmasına rağmen, insan embriolarında kullanımının etik boyutu ve sonuçları aktif olarak tartışılmalı ve değerlendirilmelidir.

## Kaynaklar

- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, et al. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science*(80-)2007;315(5819):1709–12.
- Sorek R, Kunin V, Hugenoltz P. CRISPR — a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat Rev Microbiol* 2008;6(3):181–6.
- Breitbart M, Rohwer F. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends Microbiol* 2005;13(6):278–84.
- Karginov F V., Hannon GJ. The CRISPR System: Small RNA-Guided Defense in Bacteria and Archaea. *Mol Cell.*;2010;37(1):7–19.
- Hyman P, Abedon ST. Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Advances in applied microbiology*. Elsevier Inc.;2010;70:217–48.
- Barrangou R, Marraffini LA. CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Molecular Cell* 2014;54(2):234–44.
- Singh V, Braddick D, Dhar PK. Exploring the potential of genome editing CRISPR-Cas9 technology. *Gene* 2017;599:1–18.
- Terns MP, Terns RM. CRISPR-based adaptive immune systems. *Curr Opin Microbiol* 2011;14(3):321–7.
- Rath D, Amlinger L, Rath A, Lundgren M. The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Biochimie* 2015;117:119–28.
- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol* 1987;169(12):5429–33.
- Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol* 2000;36(1):244–6.
- Jansen R, Embden JD, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol* 2002;43(6):1565–75.
- Al-Attar S, Westra ER, Van Der Oost J, Brouns SJJ. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs): The hallmark of an ingenious antiviral defense mechanism in prokaryotes. *Biol Chem* 2011;392(4):277–89.
- Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* 2005;151(8):2551–61.
- Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol* 2005;60(2):174–82.
- Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology* 2005;151(3):653–63.
- Bozok Çetintaş V, Kotmakçı M, Tezcanlı Kaymaz B. From the Immune Response to the Genome Design; CRISPR-Cas9 System: Review. *Türkiye Klin J Med Sci* 2017;37(1):27–42.
- Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea. *Science* 2010;327(5962):167–70.
- Hale CR, Zhao P, Olson S, Duff MO, Graveley BR, Wells L, et al. RNA-Guided RNA Cleavage by a Cris RNA-Cas Protein Complex. *Cell* 2009;139(5):945–56.
- Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuys RJH, Snijders AP, et al. Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes. *Science* 2008;321(5891):960–4.
- Garneau JE, Dupuis M-È, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* 2010;468(7320):67–71.
- Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K. CRISPR RNA maturation by trans -encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 2011;471(7340):602–7.
- Sapranaukas R, Gasiunas G, Fremaux C, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 2011;39(21):9275–82.
- Zhang J, Rouillon C, Kerou M, Reeks J, Brugger K, Reimann J, et al. Structure and mechanism of the CMR complex for CRISPR-mediated antiviral immunity. *Mol Cell* 2012;45(3):303–13.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* 2012;337(6096):816–21.
- Ju X Da, Xu J, Sun ZS. CRISPR Editing in Biological and Biomedical Investigation. *J Cell Biochem* 2018;119(1):52–61.

27. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Hsu PD, et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science* 2013;339(6121):819–23.
28. Mali PL, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, Dicarolo JE, et al. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science* 2013;339(6121):823–6.
29. Osborn MJ, Belanto JJ, Tolar J, Voytas DF. Gene editing and its application for hematological diseases. *Int J Hematol* 2016;104(1):18–28.
30. Grissa I, Vergnaud G, Pourcel C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics* 2007;8(1):172.
31. Kunin V, Sorek R, Hugenholtz P. Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. *Genome Biol* 2007;8(4): R61.
32. Barrangou R. CRISPR-Cas systems and RNA-guided interference. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2013;4(3):267–78.
33. Lillestøl R, Redder P, Garrett RA, Brügger K. A putative viral defence mechanism in archaeal cells. *Archaea* 2006;2(1):59–72.
34. Hale CR, Majumdar S, Elmore J, Pfister N, Compton M, Olson S, et al. Essential Features and Rational Design of CRISPR RNAs that Function with the Cas RAMP Module Complex to Cleave RNAs. *Mol Cell* 2012;45(3):292–302.
35. Pul Ü, Wurm R, Arslan Z, Geissen R, Hofmann N, Wagner R. Identification and characterization of *E. coli* CRISPR-Cas promoters and their silencing by H-NS. *Mol Microbiol* 2010;75(6):1495–512.
36. Spilman M, Cocozaki A, Hale C, Shao Y, Ramia N, Terns R, et al. Structure of an RNA Silencing Complex of the CRISPR-Cas Immune System. *Mol Cell* 2013;52(1):146–52.
37. Haft DH, Selengut J, Mongodin EF, Nelson KE. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol* 2005;1(6):474–83.
38. Makarova KS, Grishin N V, Shabalina SA, Wolf YI, Koonin E V. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct* 2006;16(1):7.
39. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 2011;9(6):467–77. 1
40. Jiang F, Doudna JA. The structural biology of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Struct Biol* 2015;30:100–11.
41. Makarova KS, Wolf YI, Koonin E V. The basic building blocks and evolution of CRISPR-Cas systems. *Biochem Soc Trans* 2013;41(6):1392–400.
42. Hatoum-Aslan A, Maniv I, Marraffini LA. Mature clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats RNA (crRNA) length is measured by a ruler mechanism anchored at the precursor processing site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108(52):21218–22.
43. Staals RHJ, Agari Y, Maki-yonekura S, Zhu Y, David W Taylor, Duijn E Van, et al. Structure and activity of the RNA-targeting Type III-B CRISPR- Cas complex of *Thermus thermophilus*. *Molecular Cell* 2013;52(1):135–45.
44. Hatoum-Aslan A, Samai P, Maniv I, Jiang W, Marraffini LA. A ruler protein in a complex for antiviral defense determines the length of small interfering CRISPR RNAs. *J Biol Chem* 2013;288(39):27888–97.
45. Karvelis T, Gasiunas G, Miksys A, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. crRNA and tracrRNA guide Cas9-mediated DNA interference in *Streptococcus thermophilus*. *RNA Biol* 2013;10(5):841–51.
46. Carte J, Christopher RT, Smith JT, Olson S, Barrangou R, Moineau S, et al. The three major types of CRISPR-Cas systems function independently in CRISPR RNA biogenesis in *Streptococcus thermophilus* 2014;93(1):98–112.
47. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell* 2014;157(6):1262–78.
48. Hille F, Charpentier E. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2016 5;371(1707).
49. Oost J, Jore MM, Westra ER, Lundgren M, Brouns SJ. CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes. *Trends Biochem Sci* 2009;34(8):401–7.
50. Fineran PC, Charpentier E. Memory of viral infections by CRISPR-Cas adaptive immune systems: Acquisition of new information. *Virology* 2012;434(2):202–9.
51. Yosef I, Goren MG, Qimron U. Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 2012;40(12):5569–76.
52. Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* 2012;482(7385):331–8.
53. Barrangou R, Horvath P. CRISPR. *New Horizons in Phage Resistance and Strain Identification. Annu Rev Food Sci Technol* 2012;3(1):143–62.
54. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 2014;346(6213):1258096.
55. Westra ER, Swarts DC, Staals RHJ, Jore MM, Brouns SJJ, van der Oost J. The CRISPRs, They Are A-Changin': How Prokaryotes Generate Adaptive Immunity. *Annu Rev Genet* 2012;46(1):311–39.
56. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol* 2013;31(9):827–32.
57. Koo T, Lee J, Kim JS. Measuring and Reducing Off-Target Activities of Programmable Nucleases Including CRISPR-Cas9. *Mol Cells* 2015;38(6):475–81.
58. Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* 2014;156(5):935–49.
59. Shen S, Loh TJ, Shen H, Zheng X, Shen H. CRISPR as a strong gene editing tool. *BMB Rep* 2017;50(1):20–4.

60. Tsai SQ, Joung JK. Defining and improving the genome-wide specificities of CRISPR-Cas9 nucleases. *Nat Rev Genet* 2016;17(5):300–12.
61. Riballo E, Woodbine L, Stiff T, Walker SA, Goodarzi AA, Jeggo PA. XLF-Cernunnos promotes DNA ligase IV-XRCC4 re-adenylation following ligation. *Nucleic Acids Res* 2009;37(2):482–92.
62. Chu VT, Weber T, Wefers B, Wurst W, Sander S, Rajewsky K, et al. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nat Biotechnol* 2015;33(5):543–8.
63. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 2013;8(11):2281–308.
64. Gori JL, Hsu PD, Maeder ML, Shen S, Welstead GG, Bumcrot D. Delivery and Specificity of CRISPR/Cas9 Genome Editing Technologies for Human Gene Therapy. *Hum Gene Ther* 2015;26(7):443–51.
65. Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol* 2013;31(9):822–6.
66. Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* 2013;154(6):1380–9.
67. Fu Y, Sander JD, Reyon D, Cascio VM, Joung JK. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol* 2014;32(3):279–84.
68. Cho SW, Kim S, Kim Y, Kweon J, Kim HS, Bae S, et al. Analysis of off-target effects of CRISPR Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res* 2014;24(1):132–41.
69. Kim S, Kim D, Cho SW, Kim J, Kim J-S. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res* 2014;24(6):1012–19.
70. Ramakrishna S, Kwaku Dad AB, Beloor J, Gopalappa R, Lee SK, Kim H. Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA. *Genome Res* 2014;24(6):1020–7.
71. Pliatsika V, Rigoutsos I. “Off-Spotter”: very fast and exhaustive enumeration of genomic lookalikes for designing CRISPR/Cas guide RNAs. *Biol Direct* 2015;10(1):4.
72. Bae S, Park J, Kim JS. Cas-OFFinder: A fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics* 2014;30(10):1473–5.
73. Montague TG, Cruz JM, Gagnon JA, Church GM, Valen E. CHOPCHOP. A CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. *Nucleic Acids Res* 2014;42(W1):401–7.
74. Cradick TJ, Qiu P, Lee CM, Fine EJ, Bao G. COSMID. A Web-based Tool for Identifying and Validating CRISPR/Cas Off-target Sites. *Mol Ther - Nucleic Acids* 2014;3: e214.
75. Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell* 2013;152(5):1173–83.
76. Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu Z, Brar GA, Torres SE, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell* 2013;154(2):442–51.
77. Khatodia S, Bhatotia K, Passricha N, Khurana SMP, Tuteja N. The CRISPR/Cas Genome-Editing Tool: Application in Improvement of Crops. *Front Plant Sci* 2016;7:1–13.
78. Bikard D, Jiang W, Samai P, Hochschild A, Zhang F, Marraffini LA. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Res* 2013;41(15):7429–37.
79. Vojta A, Dobrinic P, Tadic V, Bockor L, Korac P, Julg B, et al. Repurposing the CRISPR-Cas9 system for targeted DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 2016;44(12):5615–28.
80. Guilinger JP, Thompson DB, Liu DR. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nat Biotechnol* 2014;32(6):577–582.
81. Wyvekens N, Topkar V V., Khayter C, Joung JK, Tsai SQ. Dimeric CRISPR RNA-Guided FokI-dCas9 Nucleases Directed by Truncated gRNAs for Highly Specific Genome Editing. *Hum Gene Ther* 2015;26(7):425–31.
82. Rodriguez E. Ethical Issues in Genome Editing using CRISPR/Cas9 System. *J Clin Res Bioeth* 2016;7(2):7–10.
83. Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell* 2015;6(5):363–72.
84. Otieno MO. CRISPR-Cas9 Human Genome Editing: Challenges, Ethical Concerns and Implications. *J Clin Res Bioeth* 2015;06(06):5–7.
85. Tang LE. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human zygotes using Cas9 protein. *Molecular Genetics and Genomics* 2017;292, 525–533.
86. Ma, H. Gutierrez NM, Park ZW. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature* 2017;548, 413–419.
87. T. C. Resmi Gazete <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2010/08/20100813-4.htm>;2018 [accessed 04 11 18]
88. Juliusson G, Hough R. Leukemia. *Prog Tumor Res* 2016;43:87–100.
89. Wagner G, Fenchel K, Back W, Schulz A, Sachse MM. Leukemia cutis - epidemiology, clinical presentation, and differential diagnoses. *J Dtsch Dermatol Ges* 2012;10(1):27–36.
90. Fröhling S, Döhner H. Chromosomal Abnormalities in Cancer. *N Engl J Med* 2008;359(7):722–34.
91. Mitelman F, Johansson B, Mertens F. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer* 2007;7(4):233–45.
92. Torres R, Martin MC, Garcia A, Cigudosa JC, Ramirez JC, Rodriguez-Perales S. Engineering human tumour-associated chromosomal translocations with the RNA-guided CRISPR-Cas9 system. *Nat Commun* 2014;5:3964.
93. Heckl D, Kowalczyk S M, Yudovich D, Belizaire RP, Rishi VP, McConkey EM, et al. Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing 2014;32(9):941–6.

94. Brabetz O, Alla V, Angenendt L, Schliemann C, Berdel WE, Arteaga MF, et al. RNA-Guided CRISPR-Cas9 System-Mediated Engineering of Acute Myeloid Leukemia Mutations. *Mol Ther - Nucleic Acids* 2017;6:243–8.
95. Valletta S, Dolatshad H, Bartenstein M, Yip BH, Bello E, Gordon S, et al. ASXL1 mutation correction by CRISPR/Cas9 restores gene function in leukemia cells and increases survival in mouse xenografts. *Oncotarget* 2015;6(42):44061–71.
96. García-Tuñón I, Hernández-Sánchez M, Ordoñez JL, Alonso-Pérez V, Álamo-Quijada M, Benito R, et al. The CRISPR/Cas9 system efficiently reverts the tumorigenic ability of BCR/ABL in vitro and in a xenograft model of chronic myeloid leukemia. *Oncotarget* 2017;8(16):26027–40.
97. Randhawa S, Cho BS, Ghosh D, Sivina M, Koehrer S, Müschen M, et al. Effects of pharmacological and genetic disruption of CXCR4 chemokine receptor function in B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2016;174(3):425–36.
98. Xie H, Peng C, Huang J, Li BE, Kim W, Smith EC, et al. Chronic myelogenous leukemia-initiating cells require polycomb group protein EZH2. *Cancer Discov* 2016;6(11):1237–47.
99. Tzelepis K, Koike-Yusa H, De Braekeleer E, Li Y, Metzakopian E, Dovey OM, et al. A CRISPR Dropout Screen Identifies Genetic Vulnerabilities and Therapeutic Targets in Acute Myeloid Leukemia. *Cell Rep* 2016;17(4):1193–205.
100. Chen C, Liu Y, Rappaport AR, Kitzing T, Schultz N, Shroff AS, et al. MLL3 Is a Haploinsufficient 7q Tumor Suppressor in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell* 2014;25(5):652–65.
101. Wan L, Wen H, Li Y, Lyu J, Xi Y, Hoshii T, et al. ENL links histone acetylation to oncogenic gene expression in acute myeloid leukaemia. *Nature* 2017;543:265–9.
102. Arya D, Sachithanandan SP, Ross C, Palakodeti D, Li S, Krishna S. MiRNA182 regulates percentage of myeloid and erythroid cells in chronic myeloid leukemia. *Cell Death Dis* 2017;8(1):e2547.
103. Wallace J, Hu R, Mosbrugger TL, Dahlem TJ, Stephens WZ, Rao DS, et al. Genome wide CRISPR-Cas9 screen identifies microRNAs that regulate myeloid leukemia cell growth. *PLoS One* 2016;11(4):1–11.
104. Vukovic M, Guitart A V., Sepulveda C, Villacreces A, O'Duibhir E, Panagopoulou TI, et al. Hif-1 $\alpha$  and Hif-2 $\alpha$  synergize to suppress AML development but are dispensable for disease maintenance. *J Exp Med* 2015;212(13):2223–34.
105. Rathe SK, Moriarity BS, Stoltenberg CB, Kurata M, Aumann NK, Rahrman EP, et al. Using RNA-seq and targeted nucleases to identify mechanisms of drug resistance in acute myeloid leukemia. *Sci Rep* 2014;4:1–9.
106. Cooper S, Guo H, Friedman AD. The +37 kb Cebpa enhancer is critical for Cebpa myeloid gene expression and contains functional sites that bind SCL, GATA2, C/EBP $\alpha$ , PU 1, and additional Ets factors. *PLoS One* 2015;10(5):1–18.
107. Navarro JM, Touzart A, Pradel LC, Loosveld M, Koubi M, Fenouil R, et al. Site- and allele-specific polycomb dysregulation in T-cell leukaemia. *Nat Commun* 2015;6.
108. Miyajima C, Itoh Y, Inoue Y, Hayashi H. Positive Regulation of Interleukin-2 Expression by a Pseudokinase, Tribbles 1, in Activated T Cells. *Biol Pharm Bull* 2015;38(8):1126–33.
109. Kampa-Schittenhelm KM, Salitzky O, Akmut F, Illing B, Kanz L, Salih HR, et al. Dronabinol has preferential antileukemic activity in acute lymphoblastic and myeloid leukemia with lymphoid differentiation patterns. *BMC Cancer* 2016;16(1):1–12.
110. Wang T, Wei J, Sabatini D, Lander E. Genetic screens in human cells using the CRISPR/Cas9 system. *Science* 2014;343(6166):80–4.
111. Shi J, Wang E, Milazzo JP, Wang Z, Kinney JB, Vakoc CR. Discovery of cancer drug targets by CRISPR-Cas9 screening of protein domains 2015;33(6):661–7.
112. Zhang H, McCarty Nami. CRISPR-Cas9 technology and its application in haematological disorders. *Br J Haematol* 2016 Oct; 175(2):208–25.