



**T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
GÜLHANE TIP FAKÜLTESİ
GÜLHANE EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**ANNE SÜTÜNÜN
NÖROBLASTOM HÜCRE FARKLILAŞMASINDAKİ ETKİNLİĞİ**

Dr. Kadircan Sarıgöllü

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ANKARA / 2018



**T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
GÜLHANE TIP FAKÜLTESİ
GÜLHANE EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**ANNE SÜTÜNÜN
NÖROBLASTOM HÜCRE FARKLILAŞMASINDAKİ ETKİNLİĞİ**

Dr. Kadircan Sarıgöllü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Erman Ataş

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ANKARA / 2018

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 30.10.2018 tarih ve 46418926 sayılı izni ile Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği'nde Kasım 2018 yılında çalışılmaya başlandı. Bu çalışmada anne sütünün nöroblastom hücre farklılaşmasındaki etkinliği değerlendirildi.

Uzmanlık öğrenciliğim süresince eğitim ve öğrenimime büyük katkıları olan Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Bülent Ünay'a şükran ve saygılarımı sunarım. Uzmanlık eğitimim süresince eğitim ve öğrenimime büyük katkıları olan, tez hazırlama sürecinin her aşamasında bana yardımcı olup yol gösteren tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Erman Ataş' a teşekkürü bir borç bilirim.

Değerli zamanlarını ayırıp bilgileri ve tecrübeleriyle, sabırla, anlayışla yetişmemizi sağladıkları için kliniğimiz öğretim üyelerine, birlikte çalışmaktan her zaman keyif aldığım uzman doktorlara, uzmanlık öğrencilerine ve klinik personeline tez çalışmam süresince gösterdikleri yardımları için Prof. Dr. Barış Baykal ve Uzm. Bio. Meral Sarper'e teşekkürlerimi sunarım.

Hayattaki en değerli varlıklarım babam Engin Sarıgöllü'ye, annem Esine Sarıgöllü'ye, kardeşim Metehan Sarıgöllü'ye destekleri için teşekkürlerimi borç bilirim.

Dr. Kadircan Sarıgöllü

KISALTMALAR

ALL	: Akut lenfoblastik lösemi
BDNF	: Brain-derived neurotrophic factor (Beyin kaynaklı nörotrofik faktör)
cAMP	: Cyclic adenosine monophosphate
DHA	: Dokozahekzaenoik asit
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
GDNF	: Glial cell-derived neurotrophic factor (Glial hücre kaynaklı nörotrofik faktör)
GİS	: Gastrointestinal sistem
HAMLET	: Human α -lactalbumin made lethal to tumor cells
HLA	: Human leukocyte antigen
IGA	: İmmünglobülin A
INSS	: International Neuroblastoma Staging System
IFN-γ	: Interferon- γ
IGF	: Insulin-like growth factor
IL	: İnterlökin
NF1	: Nörofibromatozis Tip 1
NGF	: Nerve growth factor (Sinir büyüme faktörü)
NGFR	: Nerve growth factor receptor (Sinir büyüme faktör reseptörü)
NK	: Natural killer
NT3	: Nörotrofin 3
NTRK	: Neurotrophic Tyrosine Receptor Kinase
MIBG	: Meta-iyodo-benzil-guanidin
PASS	: Power analysis and sample size software
Px	: Piksel
SPSS	: Statistical Package for Social Science
TGF	: Transforming growth factor
TRAIL	: Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand
TRK	: Tirozin reseptör kinaz
VKİ	: Vücut kitle indeksi

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 4.1. Gruplara göre nörin uzamasının karşılaştırılması..... 16

Tablo 4.2. Gruplara göre nörin uzamasının karşılaştırılması..... 17



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 3.1. Hücrelerin çoğaltıldığı inkübatör.....	12
Şekil 3.2. Hücre mediasına anne sütü eklenilmesi.....	13
Şekil 3.3. Hücrelerin görüntülenmesinde kullanılan mikroskop ve kamera.....	13
Şekil 3.4. Nörit uzaması.....	14

ÖZET

Kadircan Sarıgöllü. Anne sütünün nöroblastom hücre farklılaşması üzerine etkinliği

Amaç: Nöroblastom ilk bir yaş içerisinde spontan benign forma dönüşüm gösterebilir veya regrese olabilir. Bebeğin bu dönem içerisinde anne sütü gibi maruz kaldığı bir faktör veya durum buna neden olabilir. Bu çalışmada anne sütünün nöroblastom diferansiyasyonunda etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: SHSY5B nöroblastom hücrelerine *in-vitro* ortamda %1 (Grup 1), %2 (Grup 2) ve %5'lik (Grup 3) konsantrasyonlarda anne sütü verildi ve hücreler diferansiyasyon açısından morfolojik olarak incelendi. Nöron diferansiyasyonu nörit uzaması ile kontrol edildi.

Bulgular: Hücre diferansiyasyonunu değerlendirmek amacıyla ölçülen ortalama nörit uzantısı, gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulundu ($p=0.001$). Kontrol grubu ile Grup 1, 2 ve 3 karşılaştırıldığında anne sütü gruplarında nörit uzantısı daha uzun idi ve aralarında istatistiksel anlamlı farklılık vardı (Kontrol; 31.4 ± 5.7 Px vs. Grup 1; 90.4 ± 14 Px, $p=0.002$; Kontrol; 31.4 ± 5.7 Px vs. Grup 2; 94.9 ± 14.6 Px, $p=0.002$; Kontrol; 31.4 ± 5.7 Px vs. Grup 3; 95.4 ± 14.6 Px; $p=0.002$). Grup 1, 2 ve 3 kendi aralarında nörit uzaması açısından karşılaştırıldığında, nörit uzaması anne sütü konsantrasyonu arttıkça daha uzun bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi (Grup 1: 90.4 ± 14 Px vs. Grup 2: 94.9 ± 14.6 Px; $p=0.41$, Grup 1: 90.4 ± 14 Px vs. Grup 3: 95.4 ± 14.6 Px; $p=0.28$, Grup 2: 94.9 ± 14.6 Px vs. Grup 3: 95.4 ± 14.6 Px; $p=0.95$). Kontrol, Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 gruplarındaki nörit uzaması günlere göre karşılaştırıldığında uzunluk değişimi açısından istatistiksel olarak anlamlı idi (Kontrol; $p=0.001$, Grup 1; $p<0.0001$, Grup 2; $p<0.0001$ ve Grup 3; $p<0.0001$). Gruplar kendi içinde bir, üç ve beşinci günlerdeki ortalama nörit uzaması açısından karşılaştırıldığında, tüm gruplarda beşinci gün birinci ve üçüncü günden, üçüncü günde birinci günden daha uzun olmasına karşılık istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Sonuç: Bulgularımız anne sütünün *in-vitro* şartlarda nöroblastom diferansiyasyonu üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Bu diferansiyasyon etkisi ortamdaki anne sütü konsantrasyonu ve maruz kalınan gün sayısı ile paralel olarak artmaktadır. Bu etki anne sütü içeriğindeki bir madde veya maddeler ile ilgili olabilir. İleride yapılacak çalışmalar ile diferansiyasyon üzerine etkili maddenin ayrıştırılması sonucunda yeni bir tedavi geliştirilebilir.

Anahtar Kelimeler : anne sütü, diferansiyasyon, nöroblastom

Yazar Adı : Dr. Kadircan Sarıgöllü

Danışman : Doç. Dr. Erman Ataş

ABSTRACT

Kadircan Sarigollu. Effect of breast milk on differentiation of neuroblastoma cell.

Objective: Neuroblastoma may be transformed into a spontaneous benign form in the first year of age or may regress. This may be caused by a factor or condition in which the baby is exposed to breast milk during this period. The aim of this study was to evaluate the efficacy of breast milk in neuroblastoma differentiation.

Materials and Methods: SH-SY5B human neuroblastoma cell cultures were treated with breast milk in %1 (Group 1), %2 (Group 2) and %5 (Group 3) concentrations *in vitro*, and cells were examined morphologically for differentiation. Neuronal differentiation was examined by measurement of neurite extension.

Results: Mean neurite extension measured in order to evaluate cell differentiation was statistically significant when compared between groups ($p = 0.001$). When the control group was compared with Group 1, 2 and 3, the neurite extension was longer in the breast milk groups and there was a statistically significant difference between them (Control; 31.4 ± 5.7 Px vs. Group 1; 90.4 ± 14 Px, $p=0.002$, Control; 31.4 ± 5.7 Px vs. Group 2; 94.9 ± 14.6 Px, $p=0.002$; Control; 31.4 ± 5.7 Px vs. Group 3; 95.4 ± 14.6 Px; $p=0.002$). Although neurite extension was longer as breast milk concentration increased, it was not statistically significant. (Group 1: 90.4 ± 14 Px vs. Group 2: 94.9 ± 14.6 Px; $p=0.41$, Group 1: 90.4 ± 14 Px vs. Group 3: 95.4 ± 14.6 Px; $p=0.28$, Group 2: 94.9 ± 14.6 Px vs. Group 3: 95.4 ± 14.6 Px; $p=0.95$). Neurite extension in Control, Group 1, Group 2 and Group 3 groups was statistically significant in terms of length change compared to days (Control; $p=0.001$, Group 1; $p<0.0001$, Group 2; $p<0.0001$ and Group 3; $p<0.0001$). When the groups were compared in terms of mean neurite extension on the first, third and fifth days, the difference was not statistically significant.

Conclusion: Our results show that breast milk is effective on neuroblastoma differentiation under in-vitro conditions. This differentiation effect increases in parallel with the breast milk concentration and the number of days exposed. This effect may be related to a substance or a factor in the content of breast milk. Future studies are required to discover the differentiation inducing factor in the breast milk. A new treatment can be developed as a result of the separation of the active substance on differentiation with future studies.

Key Words : breast milk, differentiation, neuroblastoma

Author : Kadircan Sarigollu, M.D.

Counselor : Erman Atas, M.D. Assoc. Prof.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
KISALTMALAR	ii
TABLO LİSTESİ.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT	vi
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1.NÖROBLASTOM	2
2.1.1.Genel Bilgiler	2
2.1.2.Nöroblastomda Diferansiasyon.....	3
2.1.2.1.Nörotrofin reseptörleri ve regresyon.....	4
2.1.2.2.İmmünolojik Mekanizmalar ve Regresyon.....	5
2.1.2.3.Telomeraz, telomer ve regresyon.....	5
2.1.2.4.Epigenetik regülasyon ve diğer mekanizmalar	6
2.1.3.Diferansiasyonun Tedavi Amaçlı Kullanımı	6
2.2.NÖRİT UZANTISI	8
2.3.ANNE SÜTÜ VE İÇERİĞİ	8
2.3.1.Anne Sütü Çeşitleri	8
2.3.2.Anne Sütü İçeriği	8
3.GEREÇ VE YÖNTEM	10
3.1.KATILIMCILAR.....	10
3.2.MATÜR SÜT.....	11
3.3.SÜT ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI VE SAKLANMASI.....	11

3.4.GRUPLAR	11
3.5.HÜCRE KÜLTÜRÜ VE DİFERANSİASYON	12
3.6.GÖRÜNTÜLEME	13
3.7.ÇIKAR ÇATIŞMASI.....	14
3.7.İSTATİSTİKSEL ANALİZ	14
4.BULGULAR	15
5.TARTIŞMA	18
6.SONUÇLAR	22
7.KAYNAKLAR	23
8.EKLER.....	28
EK 1: ETİK KURUL ONAM BELGESİ.....	28
EK 2: ÖZGEÇMİŞ ve İLETİŞİM BİLGİLERİ	29
EK 3: KATILIMCI ONAM BELGESİ.....	30

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nöroblastom sempatik gangliyonlar ve/veya adrenal medulladan ortaya çıkabilen çocukluk çağının en sık görülen ekstrakranial solid malign tümördür (1). Nöroblastom diferansiye olabilen bir tümördür. Kemoterapi sırasında veya kemoterapi sonrasında kullanılan retinoik asit gibi dönüştürücü ajanların kullanımı ile gelişen diferansiyasyon patoloji örneklerinde gösterilmiştir (2). Özellikle ilk bir yaş içerisinde spontan olarak benign forma dönüşüm ve regresyon olabilir (3). Spontan benign forma dönüşüm, ilk yaş içerisinde sıklıkla olmakta, yaş ilerledikçe bu oran azalmaktadır (4) Bunun en iyi kanıtı farklı sebeplerden ölen ve nöroblastom tanısı olmayan yenidoğanlarda yapılan otopsi çalışmalarında normalde görülenden 400 kat daha fazla fibrotik nöroblastom kalıntılarının tespit edilmiş olmasıdır (5, 6). Sinir hücrelerinin diğer nöronlar veya kas hücreleri ile iletişim kurmasını sağlayan hücresel uzantılarına nörit denilmektedir. Nörit uzantıları diferansiyasyon sürecini gösteren morfolojik bulgulardan birisidir (7). Nöroblastomun regresyonunda ve diferansiyasyonunda anneden geçen antikolar, bebeğin kendi immünesi, transplental geçen immün hücreler de önemli bulunmuştur (8). Bu nedenle ilk bir yaş içerisinde bebeğin maruz kaldığı bir faktör veya durumdan dolayı bu benign forma dönüşüm veya regresyon olabilir. İlk bir yaş içerisinde bebeklerin en çok tükettiği besin anne sütüdür. Anne sütünün nöroblastom üzerine etkinliği ile ilgili şu ana kadar herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmada anne sütünün nöroblastom diferansiyasyonu üzerinde etkisinin olup olmadığının değerlendirilmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. NÖROBLASTOM

2.1.1. Genel bilgiler

Çocukluk çağının en sık görülen ekstrakraniyal solid tümörüdür. Görülme sıklığı tüm çocukluk çağı tümörlerinin %8-10'unu oluşturur (9-11). İnsidansı tüm dünyada benzer olarak her 8000 canlı doğumda 1'dir. Erkeklerde biraz daha fazla görülmekle beraber erkek/kız oranı 1.2/1'dir (10). Etiyolojisi bilinmemekle birlikte etiyojide rolü gösterilmiş çevresel bir faktör (örneğin radyasyon, virüs, ilaç vb.) tanımlanamamıştır. Genetik predizpozisyonu germinal mutasyonlara bağlı olan otozomal dominant geçişli ailevi nöroblastom olguları vardır. Nörofibromatozis Tip 1, Hirschsprung hastalığı ve santral hipoventilasyon sendromu gibi hastalıkların nöroblastom ile birlikte görülme sıklığı fazla olmakla beraber nöroblastom hücrelerinde NF1 genindeki homozigot inaktivasyonlar gösterilmiştir (12).

Hastalık periferik sempatik sinir sisteminin embriyonal kaynaklı bir tümörüdür ve nöral krest hücrelerinden köken alır (9, 10). Hastalık küçük mavi hücreli nöroblastomdan schwann hücre stroması ve gangliyon hücreleri içeriği ile daha iyi farklılaşma gösteren ganglionöroma kadar değişen derecelerde farklılaşma gösterebilir (12). Ortalama tanı yaşı 22 ay iken %90 hasta ilk 5 yaşta tanı almaktadır (3). Tümör primer yerleşim yerine veya metastaz yaptığı yerlere uygun olarak semptom verebileceği gibi lokalize hastalık durumunda semptomsuz olabilir. Bu durum tanı konulmasını güçleştiren bir durumdur. Klinik olarak hasta periorbital ekimoz, ateş, huzursuzluk, kilo kaybı, kemik ağrıları, mavimsi subkutan nodüller gibi semptom ve bulgular ile gelebileceği gibi, sadece kitle etkisine bağlı bası semptomları (spinal kord basısı, süperior vena kava sendromu vs.) ile de karşımıza çıkabilir (10). Nöroblastom tanısı "Uluslararası nöroblastom evreleme sistemi (INSS)" tanı kriterlerine göre konulmaktadır. Bu kriterlere göre; tümör dokusunun histopatolojik incelemesi ile kesin nöroblastom tanısının konulması veya kemik iliği aspirasyonu ve biyopsisinde nöroblastom tümör hücrelerinin olması yanısıra idrar ve/veya kan katekolamin ve metabolit (özellikle vanil mandelik asit) düzeylerinde artışın gösterilmesi gerekmektedir (10). Hastalığın prognozunda etkili faktörler yaş,

evre, patolojisi, yerleşim yeri, DNA indeks, Shimada histolojisi, 1p veya 11q veya 17q aberasyonları ve N-Myc amplifikasyonudur (9, 12). Hastalık bu kriterlere göre düşük, orta ve yüksek risk gruplarına ayrılarak tedavi edilmektedir. Nöroblastom tedavisinde cerrahi eksizyon, kemoterapi ± radyoterapi birlikte kullanılmaktadır. Yüksek riskli ve nüks olan hastalarda otolog kök hücre transplantasyonu, MIBG ve Lutesyum tedavileri kullanılabilir (13). İdame tedavisinde diferansiye edici ajan olan retinoik asit tedaviye eklenmektedir. Bunun haricinde nöroblastom tarafından eksprese edilen disialogangliozide karşı monoklonal antikor dinutuximab hedef tedavi seçeneği olarak kullanıma girmiştir (14). Standart kemoterapi tedavi rejimleri ile Evre IV hastalar için iki yıllık toplam yaşam hızı % 30 olarak bildirilmiştir (15). Olaysız yaşam hızı karşılaştırılmasında otolog kök hücre transplantasyonu kolu (% 30) konvansiyonel kemoterapi kolundan (% 17) daha iyidir (16). Günümüz şartlarında otolog hematopoetik kök hücre nakli, bakım ve immünoterapiler gibi konsolidasyon tedavileri ile % 50 olaysız yaşam hızına yükseltilmiştir (17). Ancak yine de tedavide en büyük sorun hastaların nüks etmeleridir. Bu yüzden yeni tedavilere ihtiyaç vardır.

2.1.2. Nöroblastomda Diferansiyasyon

Nöroblastom histopatolojik olarak incelendiğinde malign formdan benign forma diferansiyasyon gösterebilen birkaç tümörden biridir. Bu diferansiyasyon özelliği özellikle ilk yaş içerisinde devam etmektedir (1). Spontan benign forma dönüşüm ilk yaş içerisinde sıklıkla olmakta, yaş ilerledikçe bu oran azalmaktadır (3). Bunun en iyi kanıtı otopsi yapılan yenidoğanlarda normalde görülenden 400 kat daha fazla nöroblastom tespit edilmesidir (3, 5). Bu durum ilk bir yaş içerisinde bebeğin maruz kaldığı bir faktör ve durumdan dolayı benign forma dönüşüm olduğu ve tümörlerin 400 kat azaldığı düşüncesini doğurmaktadır. Beckwith ve Perrin'in (6) yaptığı başka bir çalışmada farklı sebeplerden ölen ve nöroblastom olmadığı bilinen 3 aydan küçük infantların adrenal bezleri incelendiğinde her 40 infandan 1'inin adrenal bezinde nöroblastik hücreler içeren odaklar saptanmıştır. Araştırmacılar bu durumun "in-situ nöroblastom" olarak adlandırılmasını önermişlerdir (6). Nöroblastomdaki bu spontan regresyonu açıklayan farklı mekanizmalar mevcuttur. Bunlar :

2.1.2.1.Nörotrofin reseptörleri ve regresyon: Santral ve periferik sinir sisteminin gelişiminde ve devamlılığının sağlanmasında Trk nörotrofin reseptörleri (TrkA/NTRK1, TrkB/NTRK2, TrkC/NTRK3) kritik rol üstlenmektedir. Sinir büyüme faktörü (NGF), beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) ve nörotrofin 3 (NT3) isimli büyüme faktörleri, bu reseptörlerin ligandı olarak çalışmaktadır. Bu reseptörlerin nöroblastom patogenezinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Nöroblastlar embriyonik dönemde sempatik sinir sistemini oluşturmak üzere yola çıkmış özelleşmiş hücrelerdir. Çevreden aldıkları büyüme faktörü uyarıları sonucunda diferansiye olarak sempatik veya parasempatik sinir sistemi hücrelerini oluşturmaktadırlar. Nöroblast diferansiyasyonu NGF uyarımı sonrası olmaktadır. Bu büyüme faktörü hücre yüzeyinde bulunan tirozin reseptör kinaz reseptörlerini uyarmakta ve hücre TrkA, TrkB ve p75 reseptör uyarımına göre farklı hücre içi sinyal yollarına gitmektedir (3, 18, 19). Yüksek TrkA ekspresyonu olumlu klinik, biyolojik özellikler ve iyi sonuçlar ile ilişkilidir (19-21). TrkC nin ek prognostik önemi yoktur ve TrkA ile aynı özelliklere sahiptir. Buna karşılık TrkB'nin BDNF ile birlikte ekspresyonunun arttığı durumlar klinik ve biyolojik olarak agresif tümör ve kötü sonuçlar göstermektedir (22). TrkB-BDNF yolak aktivasyonu invazyon, metastaz, tedaviye direnç ve anjiyogenez ile ilişkilidir (3, 18, 23-26). TrkA ve TrkC'nin ligandlarının yokluğunda reseptörlerin uyarılamaması nedeni ile apoptotik sinyaller oluşturduğu bilinmektedir (27, 28). P75/NGFR reseptörlerinin koekspresyonu ile üç Trk reseptörünün de ligandlarına sensitivite ve spesifiteleri artmaktadır (29, 30). Trk ekspresyonu olmadan oluşan P75/NGFR reseptör aktivasyonu ise hücreyi apoptoza götürmektedir (28, 31). Sonuç olarak, NGF uyarımı sonrasında diferansiyasyon olurken BDNF uyarımı sonrası ise hücre survivalı tetiklenmektedir.

Malign hücre dizilerinde yapılan araştırmalarda nöroblastom hücre hatlarında halen diferansiyasyon özelliğinin devam ettiği ortaya konulmuştur (32). Bu diferansiyasyon özelliği sayesinde malign nöroblastom hücre hatları değişik metotlar ile diferansiye edilerek nöronlara dönüştürülmekte ve nörotoksisite, parkinson hastalığı gibi hastalık modelleri ve ilaç araştırmaları yapılmaktadır (32).

Evre 4S veya düşük evreli tümörler genellikle yüksek oranda TrkA ekspresyonu gösterebilmektedir (20, 21). Bu hastalardan alınan hücreler *in vitro* şartlarda ortamda NGF varlığında diferansiyasyona uğramaktadır, fakat aynı hücreler ortamda NGF olmadığında apoptoza gitmektedir (33, 34). Bu durum bazı hastalardaki nöroblastomun diferansiyasyona gidişini veya spontan regresyonunu açıklar niteliktedir.

2.1.2.2. İmmünolojik Mekanizmalar ve Regresyon: Nöroblastom dahil bazı kanserlerin spontan regresyonu akut enfeksiyonlar ile ilişkili olabilir. Deneysel olarak tümör metastazlarındaki regresyonun immünomodulator sitokinlerle induklendiği gösterilmiştir (35, 36). Farklı çalışmalarda tümörü infiltre eden lenfositler gösterilmiş ve nöroblastom hastalarında tümör hedefli T hücreleri ile antinöronal antikorların varlığı kanıtlanmıştır (37, 38). Bu bilgiler ışığında tümörün immün yanıt ile spontan regrese olabilmesi teorisi daha akla yatkın hale gelmektedir. Bunu destekleyen bir diğer bulgu ise antinöronal antikorlar varlığında oluşan opsomiyoklonus sendromunda nöroblastom hastalarının genellikle daha iyi klinik sonuçlarının olmasıdır (37, 39-41).

Yüksek riskli nöroblastom hastalarında, tümör hücrelerinin HLA sınıf I antijenlerinin down-regülasyonu ile immün yanıtın saklandıkları gösterilmiştir (42). Benzer şekilde evre 4S hastalarının çoğunda ise tümör hücrelerinin normal seviyede HLA sınıf I antijeni eksprese ettiği kanıtlanmıştır (43). *İn-vitro* ortamda nöroblastom hücrelerinin *interferon- γ* (IFN- γ) varlığında HLA sınıf I antijen ekspresyonlarını arttırdığı gösterilmiştir (42). Bu bulgular *in vivo* HLA sınıf I upregülasyonu ile nöroblastom hastalarında immün yanıtın arttırılabileceğini ve hatta tümör regresyonunun sağlanabileceğini düşündürmektedir. Buna karşılık her ne kadar *in vitro* IFN- γ maruziyeti ile HLA sınıf I antijen up-regülasyonunun nöroblastom hücrelerinin sitotoksik T hücreleri tarafından tanınabilirliğini arttırdığı gösterilmiş olsada, bu durum aynı zaman da tümörün doğal killer (NK) hücreleri tarafından tanınıp öldürülmesini azaltmıştır (42).

2.1.2.3. Telomeraz, telomer ve regresyon: Telomerler genomik stabiliteyi sağlayan özelleşmiş yapılardır. Kromozomların sonlanma bölgesinde bulunan telomerler replikasyon ve kromozom stabilitesinden sorumludurlar. Telomerlerin

uzunluğu telomeraz enzimi tarafından kontrol edilmektedir. Bu enzimin seviyesi normal ve yaşlanan hücrelerde düşük iken, kanser hücreleri ve ölümsüz hücrelerde artmıştır (44). Daha önceki çalışmalarda nöroblastom hücrelerinin kötü prognoz ile ilişkili alt tiplerinde ve N-Myc amplifikasyonu yüksek olanlarda telomeraz aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (45). Evre 4S nöroblastom gibi iyi klinik ile gidenlerin çoğunda ise normal yaşlanan hücrelerdeki gibi telomeraz aktivitesinin az olduğu veya telomer uzunluğunun kısa olduğu gösterilmiştir (45). Bu bilgiler nöroblastom gibi tümörlerin spontan regresyonunun altında yatan mekanizmanın telomeraz aktivitesi ile açıklanabileceğini düşündürmektedir. Her ne kadar düşük telomeraz aktivitesi iyi prognoz ile ilişkilendirilse de, düşük telomeraz seviyesi bulunan tümörlerde aynı zamanda yüksek TrkA ekspresyonu, hiperdiploidi, N-Myc amplifikasyonunun olmayışı gibi iyi prognozla ilişkili diğer özellikler de bulunmaktadır (46). Bu nedenle bu iyi prognozun telomeraz aktivitesi sayesinde mi olduğu, yoksa diğer iyi prognostik faktörler sayesinde mi olduğu söylenememektedir.

2.1.2.4. Epigenetik regülasyon ve diğer mekanizmalar: Bir dekattan daha fazla süredir epigenetik değişikliklerin nöroblastom ile ilgili genlerin ekspresyonlarında değişime neden olduğu bilinmektedir (47, 48). Bir çok çalışmada gen metilasyonu ve histon modifikasyonundaki değişikliklerin hastalığın prognozu ile ilgili olduğu gösterilmiştir (49-52). Gelişen teknoloji ile birlikte epigenetik değişikliklerin nöroblastomun klinik davranışı üzerine etkileri daha çok çalışılmaya başlanılmıştır (53, 54). Wilms tümörü ve medulloblastom gibi diğer çocukluk çağı tümörlerinden edinilen bilgilerde epigenetik değişikliklerin anlaşılmasının hastalıkların prezentasyonu ve klinik davranışını anlamada yardımcı olacağını göstermektedirler (55-57).

2.1.3.Diferansiyasyonun Tedavi Amaçlı Kullanımı

Daha önceki çalışmalarda TrkA eksprese eden tümörlerin kültür ortamında NGF varlığında diferansiyasyona uğradığı, NGF yokluğunda ise apoptozise gittiği gösterilmiştir (34). Bu bilgiler göz önünde bulundurulduğunda nöroblastomda apoptoz veya regresyonu başlatacak yaklaşımlar için TrkA nörotrofin reseptör yolağı gelecek vaad etmektedir. Teorik olarak bakıldığında Trk inhibitörleri nöroblastomda spontan regresyon veya apoptozisi başlatabileceklerdir. Eğer

çocuklarda kullanımı güvenli bir preparat bulunur ise kemoterapi veya radyoterapi yerine bu tedavinin kullanılması daha uygun olabilecektir. Bu amaçla geliştirilen lestaurtinib (CEP-701) isimli molekül Trk nörotrofin reseptörlerini (TrkA, TrkB ve TrkC) hedef almaktadır ve bu molekülün TrkB eksprese eden nöroblastom ksenograftları üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (58). Hatta bu molekülün Faz I çalışmasında uygun dozlarda verilmesi ile çocuklarda belirgin klinik aktivite gösterdiği de kanıtlanmıştır (59).

İmmün sistem ve nöroblastom arasındaki ilişkinin tam olarak anlaşılacak yeni tedavi şekillerinin bulunması ihtiyacı gün geçtikçe artmaktadır. HLA I ekspresyonu artırılarak nöroblastom regresyonunun indüklenmesi bir immünoterapi modalitesi olarak değerlendirilebilir. Fakat immün sistem komponentleri üzerinde denenecek bu gibi stratejilerin immün sistemin diğer komponentlerinin etkisini azaltabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu amaçla adaptif immünoterapinin nüks eden tedaviye dirençli hastalarda kullanıldığı çalışmalar başlatılmıştır (60). Disialoganlizid GD2 hedefli kimerik antikorun (ch14.18) kullanıldığı immünoterapi uygulaması yüksek riskli nöroblastom hastalarında kullanılmaya başlanmıştır (61).

Günümüzde halen telomer uzunluğu veya telomeraz aktivitesini hedef alan nöroblastom tedavi yöntemleri bulunmamaktadır. Fakat mevcut tedavi yaklaşımlarına ek olarak diferansiyasyonu indüklemek için farklı yaklaşımlar da denenmektedir. Örneğin retinoidlerin in vitro ortamda diferansiyasyonu indüklediği ve nöroblastom proliferasyonunu azalttığı gösterilmiştir (62). Retinoik asit tedavisi ile tirozin kinaz reseptör ekspresyonu indüklenmektedir (63). Retinoik asit tedavisi ile glial hücre kaynaklı nörotrofik faktör (GDNF) bağımlı Ret geni aktivasyonu ve alt hücre içi sinyal yollarını da içeren bir pozitif otkrin loop oluşmaktadır. Ret stimülasyonu hücre diferansiyasyonunda kritik önem taşımaktadır (19). Bu özellikleri sebebi ile all-trans retinoik asit diferansiye edici ajan olarak nöroblastom standart idame tedavisinde yerini almıştır (64, 65).

2.2. NÖRİT UZANTISI

Nöronal diferansiyasyon değerlendirilmesinde kullanılan farklı morfolojik metotlar mevcuttur. Bunlar; hücre boyutlarının değerlendirilmesi, hücresel uzantı (nörit) oluşturan hücrelerin sayımı, nörit uzatma miktarı veya nörit uzunluğunun ölçülmesidir (7). Bizim çalışmamızda nöroblastom hücrelerindeki diferansiyasyonun göstergesi olarak nörit uzantısının ölçümü kullanıldı. Nörit uzantısı tanım olarak hücre gövde uzunluğunun iki katından daha fazla olan hücre uzantısıdır (19). Daha önceki çalışmalarda nörit uzantısı program yardımı ile ölçülerek kullanıldığı gibi (66), nörit uzantısının olup olmamasının belirlendiği çalışmalar da mevcuttur (19).

2.3. ANNE SÜTÜ VE İÇERİĞİ

2.3.1. Anne sütü çeşitleri

Doğum sonrası ilk 2-3 gün boyunca düşük miktarlarda sekrete edilen süt kolostrum olarak adlandırılmaktadır (67). Kolostrum içerisinde bulunan lökosit ve antikorlar, özellikle IgA, yüksek oranda protein, mineral ve yağda çözünen vitaminler matür süt ile karşılaştırıldığında daha fazladır (68). Bu özellikleri ile kolostrum yenidoğana karşılaşılabileceği mikroorganizmalara karşı önemli bir immünite sağlamaktadır.

Doğum sonrası 2-4 gün aralığında anne sütü miktarı yenidoğanın ihtiyaçları doğrultusunda günlük olarak artış göstermektedir. Doğum sonrası 7 ile 14 gün aralığındaki süte geçiş sütü denilirken. 14. gün sonrasında süt matür süt olarak tanımlanmaktadır (67).

2.3.2. Anne sütü içeriği

Anne sütü yenidoğanların immünitesi gelişirken onları koruyabilmek için geçen binlerce yıl içerisinde evrimleşmiş aşırı derecede kompleks ve bir o kadar da değişkenlik gösteren bir biyomateriyaldir. Bebeğin yaşı ile uyumlu olarak ihtiyaçlarına göre anne sütü içeriği de değişkenlik göstermektedir (69). Bu sebeptendir ki her annenin sütünü içerik olarak kendi çocuğunun ihtiyaçlarına spesifik şekilde değiştirdiğine inanılır (69).

Anne sütü içerisinde bebeğin enteral sinir sistemini geliştirecek nörotrofik faktörler ve antikanser özellikli faktörler bulunmaktadır (70, 71). Anne sütünün antikanser etkilerini araştıran bir araştırmada anne sütü ile beslenen ocuklarda ALL, Hodgkin lenfoma ve nöroblastom gibi kanserlerin daha az görüldüğü belirtilmiş (8). Antimikrobiyal ve immnomodlatuvar komponentler hem infantın immün sistemindeki eksikliklerini kompanse etmekte hem de gastrointestinal sistemden bakteri translokasyonunu engellemektedir (72). Anne sütü alan ve formül mama ile beslenen bebeklerde gaitadan elde edilen GİS epitel hücrelerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada anne sütünün intestinal hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu ve bariyer fonksiyonu üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (73).

İnflamasyonu inhibe eden biyoaktif faktörlerle beraber spesifik antikor üretimini arttıran faktörlerin de anne sütü içerisinde olduğu gösterilmiştir (72). Aynı zamanda B lenfositlerin büyümesini ve diferansiyasyonunu destekleyen faktörler de anne sütünde bulunmaktadır (72).

Bunlara ek olarak, anne sütünde intestinal trakt, vasküler sistem, sinir sistemi ve endokrin sisteme çeşitli etkileri bulunan bir çok büyüme faktörü de bulunmaktadır (74). Ayrıca gerek sütün sentezi sırasında oluşan gerekse infantın büyümesi için gerekli olan birçok protein de vardır. α -Laktalbumin sütün protein içeriğinin %25-30'unu oluşurmaktadır (75). Gram negatif bakteri duvarına etkinliği olan lizozim de bir diğer majör proteindir. Demire karşı yüksek afinitesi ile bakterilerin demiri kullanmasını engelleyen laktoferrin, vitamin B12'yi bağlamakla görevli haptokorrin ve transkobalamin II, infantın süt lipidlerini sindiriminde yardımcı olan safra tuzu ile aktive olan lipaz, süt içeriğindeki kazeinin büyük kısmını oluşturan β -kazein ve az da olsa bulunan K-kazein, anne sütündeki majör immünglobulin olan sekretuvar immünglobulin A, bir proteaz inhibitörü olan α 1-Antitripsin ve çeşitli büyüme faktörleri ile sitokinler anne sütünün içeriğindeki proteinlere örnek olarak verilebilir (32). İnsülin-like growth factor (IGF) I ve II, transforming-growth faktör β (TGF- β) I ve II, interlökin (IL)-1 β , IL-6, IL-8 ve IL-10 da son dönem çalışmalar ile anne sütü içerisinde bulunduğu gösterilen büyüme faktörleri ve sitokinlerdir (32). Bu proteinlerin bazıları infant sindirim sisteminden proteolize uğramadan geçebildikleri gibi birçok farklı işlevleri de bulunmaktadır (32). Bu büyüme faktörlerinden BDNF ve GDNF enteral sinir sisteminin gelişiminde önemli rol oynamaktadır (76). Anne

sütü kaynaklı BDNF'nin insan sinir hücrelerinde hayatta kalımı arttırıp büyümeyi desteklediği gösterilmiştir (77).

İnfantı enfeksiyonlardan koruyan, immün sisteminin gelişmesini uyararak ve tüm sistemlerinin gelişiminde etkisi olan anne sütü aynı zamanda sinir sistemi gelişiminde ve sinir hücresi çoğalmasında önemli rolleri olan BDNF, GDNF ve S100B'yi de içermektedir (71). S100B protein konsantrasyonu doğum sonrası 30 günde pik seviyeye ulaşmakta ve annenin vücut kitle indeksi (VKİ) ile korelasyon göstermektedir. Fakat BDNF veya GDNF seviyelerinde zaman içerisinde bir değişiklik olmamaktadır (71).

3. GEREÇLER VE YÖNTEM

3.1. KATILIMCILAR

Bu çalışma prospektif, randomize ve kontrollü bir kohort çalışmasıdır. Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 30.10.2018 tarih ve 46418926 sayılı etik kurul onayı alındı. Anneler için bilgilendirilmiş onam formu hazırlandı. Bu çalışmada nöroblastom hücreleri üzerinde anne sütünün diferansiye etme etkisi incelendi. Çalışmaya başlanmadan önce PASS 11 Sample Size Software (2016, NCSST, LLC. Kaysville, Utah, USA. www.ncss.com) programı ile güç analizi yapıldı ve çalışmaya alınacak anne sayısı belirlendi. Kontrol ve üç farklı konsantrasyonda anne sütü kullanılacak grupların çoklu karşılaştırmalı analizinde yapılan Dunnett testine göre 3 anne sütü grubu ve bir kontrol grubu ile tek yönlü bir tasarım, ortalama grup örnek büyüklüğüne sahip olup güç (1-Beta) 82 için toplam 14 anne sütü kullanıldı.

Çalışmaya alma kriterlerini sağlayan yenidoğan polikliniğine gelen 14 anne random sayı randomizasyon yöntemi ile belirlenip çalışma hakkında bilgi verilip onamları alındıktan sonra çalışmaya alındı. Annelerin ortalama yaşı $28,5 \pm 4,7$ yıl ve ortalama gestasyon haftası $38,8 \pm 1,4$ hafta idi. Çalışmadan hariç tutma kriterleri gestasyonel hipertansiyon, diabetes mellitus, aktif enfeksiyon, ateş, metabolik hastalık, memeyi ilgilendiren hastalıklar, santral sinir sistemi hastalıkları, malnütrisyon, alerji, sigara alışkanlığı ve fetal anomalili çocuğu olan anneler idi.

3.2. MATÜR SÜT

Çalışmaya katılan tüm annelerden matür süt örnekleri alındı. Doğum sonrası 2-4 gün aralığında anne sütü miktarı yenidoğanın ihtiyaçları doğrultusunda günlük olarak artış göstermektedir. Doğum sonrası 7 ile 14 gün aralığındaki süte geçiş sütü denilirken. 14. gün sonrasında süt matür süt olarak tanımlanmaktadır (67). Anne sütü içeriğindeki nöronal büyüme faktörlerinin kolostrum ve matür sütte de bulunduğu daha önce gösterilmiştir (71). Bu durum göz önüne alınarak çalışmada ulaşım kolaylığı açısından matür süt kullanımı tercih edildi.

3.3. SÜT ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI VE SAKLANMASI

Matür süt örnekleri postnatal 15. günde gönüllü ve çalışma kriterlerini sağlayan annelerden elle sağılarak toplandı. Elle sağılarak 5 ml lik tüplere alınan anne sütleri 4°C de buzdolabında buz içeren kaplara konuldu. Toplanan tüm örnekler aynı gün içerisinde Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi Araştırma ve Geliştirme Merkez Başkanlığı Kanser ve Kök Hücre Araştırma Merkezi bünyesindeki laboratuvara transfer edilerek -20°C de saklandı. Saklanan örnekler çalışma esnasında her gün medialara eklenmeden hemen önce çözülerek oda sıcaklığına gelmesi sonrası kullanıldı.

3.4. GRUPLAR

Anne sütü mevcut media içerisinde seyreltilerek %1, 2 ve 5 konsantrasyonlarda hazırlandı. Örnek olarak, %1'lik anne sütü konsantrasyonu elde etmek için hücrelerin içerisinde bulunduğu 4000 µl lik medianın (DMEM, Biological Industries, Israel) 40 µl si anne sütü olacak şekilde ayarlandı. Diğer konsantrasyonlar için de aynı şekilde uygun oranlarda anne sütü media içerisinde seyreltildi.

Kontrol : Anne sütü ve/veya herhangi bir sıvı–madde kullanılmayan grup

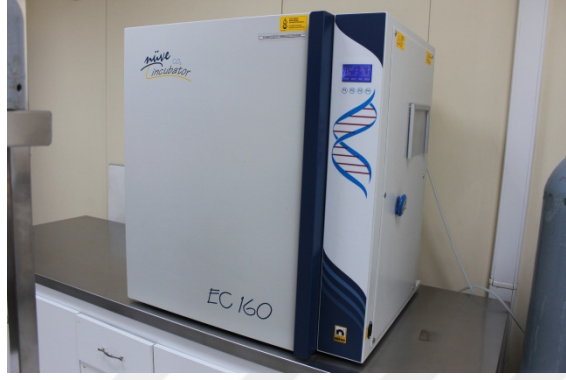
Grup 1 : %1 konsantrasyonda anne sütü kullanılan grup

Grup 2 : %2 konsantrasyonda anne sütü kullanılan grup

Grup 3 : %5 konsantrasyonda anne sütü kullanılan grup

3.5.HÜCRE KÜLTÜRÜ VE DİFERANSİYASYON

SH-SY5Y nöroblastom hücre serisi Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) içerisinde çoğaltıldı. Hücreler 37°C %95 hava ve %5 CO₂'li uygun nem ortamındaki inkübatörde (Nüve, EC 160 CO2 Incubator) inkübe edildi (**Şekil 3.1.**).



Şekil 3.1. Hücrelerin çoğaltıldığı inkübatör.

Hücreler daha sonra her kuyucukta 1×10^3 hücre olacak şekilde kültür plate'lerine ekildi (Corning, Corning, NY, U.S.A.) Bu plateler daha önceden 0.05 mg/ml kollagen ile kaplandı. Nöroblastom hücreleri platelere ekildikten sonraki üç gün boyunca hücrelerin plate'lere tutunması için beklenildi. Üçüncü gün sonunda %1, %2 ve %5 konsantrasyonda olacak şekilde anne sütü mevcut media içerisine dilüe edildi. Hücrelerin içerisinde bulunduğu 4000 μ l'lik her bir media ve anne sütü karışımında, %1'lik konsantrasyon oluşturulmasında 40 μ l, %2'lik konsantrasyon için 80 μ l ve %5'lik konsantrasyon için de 200 μ l anne sütü kullanıldı. Toplam anne sütü ve media miktarı her bir plate için 4000 μ l olacak şekilde ayarlandı. Anne sütü mevcut medium içerisine herhangi bir işlem (pastörizasyon veya filtrasyon) yapılmadan ilave edildi. Kontrol grubu mediası anne sütü içermeyecek şekilde 4000 μ l olarak platelere konuldu. Hücreler her gün anne sütü ile muamele sonrasında anne sütü içeren medium değiştirildi (**Şekil 3.2.**). Tekrar anne sütü eklenilmeden önce hücreler faz-kontrast mikroskobu ile morfolojik olarak incelendi ve nöron diferansiyasyonu nörit uzaması ile kontrol edildi. Her anne sütü için tüm gruplarda işlem üçer kez yinelemeli olarak gerçekleştirildi ve beş gün günlük izlenerek ölçüm yapıldı.



Şekil 3.2. Hücre mediasına anne sütü eklenmesi.

3.6. GÖRÜNTÜLEME

Kültüre edilen hücreler faz-kontrast mikroskobu (TS100 ECLIPSE, Nikon) ile incelendi. Dört grubun üçer kez yinelemeli işlemlerindeki nörit uzunluğu resimleri 5 gün boyunca her gün fotoğraf makinesi (XCAM1080PHA, ToupCam) kullanılarak bilgisayara bağlantılı olarak çekildi ve kaydedildi (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Hücrelerin görüntülenmesinde kullanılan mikroskop ve kamera.

Fotoğraf makinesinin bilgisayardan kontrolü ve fotoğrafların çekilebilmesi için ToupView (ToupTek TopuView, Versiyonx86, 3.7.6701, Hangzhou ToupTek Photonics Co. Zhejiang, P.R.China) yazılımı kullanıldı. Nörit uzaması ImageJ (Fiji-ImageJ, version 1.52h) programında NeuronJ plug-ını kullanılarak değerlendirildi. Ölçümler piksel (Px) olarak kaydedildi (Şekil 3.4.). Analiz esnasında gruplardaki 3 tekrar ölçümlerin ortalaması alındıktan sonra beş günlük ortalamalarda alınarak istatistiksel olarak analize alındı.



Şekil 3.4. Nörit uzaması.

3.7. ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlardan tezi yazan, tez danışmanı ve tez yazım süresince katkı sağlayan ve ilerde bilimsel makale olarak yazılırken isminin yer alacağı kişiler arasında karar vermelerini uygunsuz biçimde etkileyebilecek tarzda yazı ile ilgili maddi ve manevi çıkar çatışması yoktur. Yazı için herhangi bir firmadan destek alınmamıştır. Çalışma uzmanlık tezi kapsamında yürütülmüştür.

3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analizler Statistical Package for Social Science (SPSS) versiyon 15 (SPSS for Windows, Version 15, 2007, SPSS Inc. Chicago, USA) yazılımı kullanılarak yapıldı. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilks testleri kullanılarak incelendi. Tanımlayıcı analizler değişkenler için ortalama, ortanca; standart deviasyon ve minimum ve maksimum aralık kullanıldı. Nörit uzaması normal dağılım göstermediğinden kontrol, Grup 1, Grup 2, Grup 3 grupları Kruskal-Wallis testi kullanılarak karşılaştırıldı. İkişerli karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı ve Bonferroni düzeltmesi kullanılarak değerlendirildi. İstatistik anlamlılık için toplam tip-1 hata düzeyi %5 olarak kullanıldı. Bonferroni düzeltmesine göre p değeri <0.0083 ikili karşılaştırmalarda anlamlı olarak kabul edildi. Kontrol, Grup 1, Grup 2 ve Grup 3

gruplarındaki nörit uzantısının günlere göre uzunluk değişimi Friedman testi kullanılarak karşılaştırıldı. İkişerli karşılaştırmalar Wilcoxon testi kullanılarak yapıldı ve Bonferroni düzeltmesi kullanılarak değerlendirildi. İstatistik anlamlılık için toplam tip-1 hata düzeyi %5 olarak kullanıldı. Bonferroni düzeltmesine göre p değeri <0.005 ikili karşılaştırmalarda anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Hücre diferansiasyonunu değerlendirmek amacıyla ölçülen ortalama nörit uzantısı, gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık bulundu ($p=0.001$). Kontrol grubu ile Grup 1, 2 ve 3 karşılaştırıldığında anne sütü gruplarında nörit uzantısı daha uzun idi ve aralarında istatistiksel anlamlı farklılık vardı (Kontrol; 31.4 ± 5.7 Px vs. Grup 1; 90.4 ± 14 Px, $p=0.002$; Kontrol; 31.4 ± 5.7 Px vs. Grup 2; 94.9 ± 14.6 Px, $p=0.002$; Kontrol; 31.4 ± 5.7 Px vs. Grup 3; 95.4 ± 14.6 Px; $p=0.002$). Grup 1, 2 ve 3 kendi aralarında nörit uzaması açısından karşılaştırıldığında, nörit uzaması anne sütü konsantrasyonu arttıkça daha uzun bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi (Grup 1: 90.4 ± 14 Px vs. Grup 2: 94.9 ± 14.6 Px; $p=0.41$, Grup 1: 90.4 ± 14 Px vs. Grup 3: 95.4 ± 14.6 Px; $p=0.28$, Grup 2: 94.9 ± 14.6 Px vs. Grup 3: 95.4 ± 14.6 Px; $p=0.95$) (**Tablo 4.1.**). Kontrol, Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 gruplarındaki nörit uzaması günlere göre karşılaştırıldığında uzunluk değişimi açısından istatistiksel olarak anlamlı idi (Kontrol; $p=0.001$, Grup 1; $p<0.0001$, Grup 2; $p<0.0001$ ve Grup 3; $p<0.0001$). Gruplar kendi içinde bir, üç ve beşinci günlerdeki ortalama nörit uzaması açısından karşılaştırıldığında, tüm gruplarda beşinci gün birinci ve üçüncü günden, üçüncü gün de birinci günden daha uzun olmasına karşılık istatistiksel olarak anlamlı değildi (**Tablo 4.2.**).

Tablo 4.1. Gruplara göre nörit uzantılarının karşılaştırılması.

		Kontrol			Grup 1			Grup 2			Grup 3			P*	P**	
Unit		Ortanca/ Ortalama	SD	Aralık	Ortanca/ Ortalama	SD	Aralık	Ortanca/ Ortalama	SD	Aralık	Ortanca/ Ortalama	SD	Aralık			
Nörit Uzantısı	Px	30,4/31,4	±5,7	(24,6-40,1)	87,5/90,4	±14	(70,2-115,9)							0,002		
		30,4/31,4	±5,7	(24,6-40,1)				95,9/94,9	±14,6	(74,2-120,1)					0,002	
		30,4/31,4	±5,7	(24,6-40,1)							94,9/95,4	±14,6	(69-117,7)		0,002	0,001
					87,5/90,4	±14	(70,2-115,9)	95,9/94,9	±14,6	(74,2-120,1)					0,41	
					87,5/90,4	±14	(70,2-115,9)				94,9/95,4	±14,6	(69-117,7)		0,28	
							95,9/94,9	±14,6	(74,2-120,1)	94,9/95,4	±14,6	(69-117,7)		0,95		

*: Mann Whitney U testine göre Bonferroni düzeltmesi sonrası $p < 0.0083$ istatistiksel olarak anlamlı, **: Kruskal-Wallis testine göre $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı, **SD**: Standard deviasyon, **Px**: Piksel.

Tablo 4.2. Günlere göre gruplarda nörit uzantılarının karşılaştırılması.

Ünite	Gruplar	Günler															P*	P**
		1.gün			2.gün			3.gün			4.gün			5.gün				
		Ortanca/ Ortalama	SD	Aralık	Ortanca/ Ortalama	SD	Aralık	Ortanca/ Ortalama	SD	Aralık	Ortanca/ Ortalama	SD	Aralık	Ortanca/ Ortalama	SD	Aralık		
Nörit uzantısı	Kontrol	26,3/28,2	±5,1	(22,6-37,4)	25,6/27	±4,8	(20,3-34,5)	27,4/31,1	±6,4	(25,1-41,4)	26,1/31,4	±11,9	(20,7-49,8)	30,9/39,1	±27,9	(19-101,5)		0.001
		26,3/28,2	±5,1	(22,6-37,4)				27,4/31,1	±6,4	(25,1-41,4)							0.043	
		26,3/28,2	±5,1	(22,6-37,4)				27,4/31,1	±6,4	(25,1-41,4)				30,9/39,1	±27,9	(19-101,5)	0.49	0.40
	Grup 1	72,3/68,8	±16,5	(45,1-86,4)	88,8/92,8	±22,6	(65,2-133)	88,1/90,7	±20,4	(57,2-118,4)	93,7/93,4	±5,8	(85,7-102,1)	97,5/106,2	±19,4	(84-139,5)		<0.0001
		72,3/68,8	±16,5	(45,1-86,4)				88,1/90,7	±20,4	(57,2-118,4)							0.018	
		72,3/68,8	±16,5	(45,1-86,4)				88,1/90,7	±20,4	(57,2-118,4)				97,5/106,2	±19,4	(84-139,5)	0.018	0.06
	Grup 2	75,9/75,4	±20,8	(42,1-101,1)	92,1/92,7	±11,9	(79,3-112,3)	90/90	±12,2	(74,1-108,9)	92/99,7	±17,2	(85,6-135)	117,7/116,7	±21,7	(86,7-143,2)		<0.0001
		75,9/75,4	±20,8	(42,1-101,1)				90/90	±12,2	(74,1-108,9)							0.043	
		75,9/75,4	±20,8	(42,1-101,1)				90/90	±12,2	(74,1-108,9)				117,7/116,7	±21,7	(86,7-143,2)	0.018	0.018
	Grup 3	85,2/76,5	±20,6	(43,5-102,8)	88,6/85,4	±11,1	(66,4-100,4)	95,8/96,2	±18,3	(64-121,9)	97,3/99,2	±19,4	(75,5-137,5)	115,1/119,5	±21,8	(95,7-154)		<0.0001
		85,2/76,5	±20,6	(43,5-102,8)				95,8/96,2	±18,3	(64-121,9)							0.018	
		85,2/76,5	±20,6	(43,5-102,8)				95,8/96,2	±18,3	(64-121,9)				115,1/119,5	±21,8	(95,7-154)	0.018	0.043

*: Wilcoxon testine göre Bonferroni düzeltmesi sonrası p <0.005 istatistiksel olarak anlamlı, **: Friedman testine göre p <0.05 istatistiksel olarak anlamlı,

SD: Standard deviasyon, Px: Piksel.

5. TARTIŞMA

Bu randomize kontrollü farklı grupların karşılaştırıldığı çalışmada anne sütünün nöroblastom hücre diferansiyasyonu üzerine etkinliği incelendi. Nörit uzunluğu diferansiyasyonu gösterdiğinden karşılaştırmada kullanılacak belirteç olarak belirlendi (7). Bunun için nörit uzunluğu değişimleri farklı konsantrasyonda anne sütü kullanılan gruplar arasında karşılaştırıldı.

Sempatik gangliyonlar ve/veya adrenal medulladan ortaya çıkabilen nöroblastom ilk bir yaş içerisinde spontan olarak benign forma dönüşüm veya regresyon gösterebilir (3). Nöroblastomdaki bu spontan regresyonu açıklayan farklı mekanizmalar mevcuttur (76, 78). Bunlar nörotrofin reseptörleri ve ligandları, telomeraz aktivitesi, immünolojik ve epigenetik mekanizmalar üzerinden gerçekleşebilir (78). Bu mekanizmalarda Trk-A ve C ekspresyonu, NGF uyarımı, tirozin kinaz reseptör uyarımı, hücre içi cAMP artışı, HLA sınıf I up-regulasyonu, IFN-gama varlığı, T ve NK hücrelerinin antinöral aktivasyonu nöroblastom regresyon ve diferansiyasyonunda kilit noktalar (78). Bu mekanizmalar üzerinden retinoik asit, lestaurtinib, prostoglandin E1, papaverin ve monoklonal antikor olan ch14.18disialogangliozid GD2 gibi tedaviler denenmiş ve denenmektedir (58, 61, 79). Nöroblastom diferansiyasyon ve regresyonu konusunda çalışmalar devam etmektedir. Ancak özellikle yaşam hızları çok düşük olan yüksek riskli hastalarda ve kötü prognostik özellikler gösteren diğer hastalarda hala yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi açısından arayış devam etmektedir. Nöroblastomda etkili yeni moleküllerin tespiti tedavide daha yüksek başarılar sağlayabilir ve daha toksik olan kemoterapi tedavilerinin tercih edilmemesine olanak verebilir. Bu yüzden biz de çalışmamızda bu maksatla gelişime açık, daha önce nöroblastomda çalışılmayan anne sütünün diferansiye edici özelliğini araştırdık.

Sinir hücrelerinin diğer nöronlar veya kas hücreleri ile iletişim kurmasını sağlayan hücresel uzantılarına nörit denilmektedir. Nörit uzantıları diferansiyasyon sürecini gösteren morfolojik bulgulardan birisidir (7). Nörit uzaması NGF, nörotrofin-3 veya nörotrofin-4 gibi büyüme faktörleri tarafından başlatılmaktadır (80). Büyüme faktörleri dışında retinoik asit ve nitrik oksit varlığında da nöroblastom hücrelerinde nörit uzantısı saptanmıştır (23, 81). Retinoik asitin bu diferansiyasyon

özelliğine hücre içi taurin, β -katenin ve doku transglutaminazı seviyelerinde artışın eşlik ettiği gösterilmiştir (82-84). Çalışmamızda anne sütünün anti kanser özelliklerini göz önünde bulundurarak insan nöroblastom hücre kültürü olan SH-SY5Y hücrelerine *in vitro* ortamda anne sütü ekleyerek diferansiyasyonu arttırdığını gözlemledik. Elde ettiğimiz verilerde, anne sütünün insan nöroblastom hücre kültüründe nörit uzantısı belirteci kullanılarak diferansiyasyonu indüklediği, hem artan anne sütü konsantrasyon yoğunluğunda hem de artan maruz kalınan gün sayısına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde gösterildi. Bu etki istatistik olarak anlamlı olmasa da doz bağımlı olarak artan konsantrasyon ve gün sayısı ile birlikte artış gösterdi. Sonuçlarımız daha büyük örneklerde çalışıldığında anne sütünün artan konsantrasyonları ile diferansiyasyon derecesinin de artacağı fikrini destekler nitelikte olup herhangi bir yan etkisi bulunmayan, erişimi ve elde etmesi kolay bir tedavi yöntemi için yol göstericidir. Ancak yine de anne sütü içerisinde nöroblastom diferansiyasyonunu indükleyen molekülün bulunması için ek çalışmalar gerekmektedir. Çalışmamızda anne sütü hücrelerin bulunduğu media ortamına herhangi bir işlemle geçirilmeden konulduğu için bununla ilgili veri elimizde bulunmamaktadır.

Anne sütü doğal olarak içeriğinde proteinler lipitler, büyüme faktörleri, spesifik antikolar ve sitokinler bulduran bir biyomateryaldir (71, 77). Nörotrofik ve antikanser faktörler içerir. İntestinal hücre diferansiyasyonunda ve içeriğindeki BDNF, GDNF ve S100B sayesinde sinir hücre gelişiminde etkilidir. Dokozahekzaenoik asitin (DHA) nöronlar üzerine etkisini araştıran farklı bir çalışma ise *in vitro* DHA verilen nöron hücrelerinde hayatta kalımın arttığı ve nörit uzantılarının indüklendiği saptanmıştır (85). Anne sütünün antikanser etkilerini araştıran bir çalışmada ise anne sütü ile beslenen çocuklarda ALL, Hodgkin lenfoma ve nöroblastom gibi kanserlerin daha az görüldüğü belirtilmiştir (8). Bu sonucu destekleyen farklı çalışmalar da mevcuttur (86, 87). Anne sütünün anti kanser özelliğini daha ayrıntılı araştıran bir çalışma süt içeriğindeki laktoferrin, tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) ve Human α -lactalbumin made lethal to tumor cells (HAMLET) moleküllerinin antikanser özelliğinin olduğunu bildirmektedir (70). Farklı bir çalışma süt içerisindeki α -laktalbumin türevi olan HAMLET molekülünün *in vitro* ortamda lenfoid tümörler, gliomlar ve

karsinomları içeren kırktan fazla kanser türünde etkili olduğunu ve hücreleri apoptozise götürdüğünü göstermiştir (88). Mevcut çalışmalar anne sütündeki antikanser özelliklerin önemini yeterince vurgulamakta iken nöroblastom üzerine anne sütünün etkinliğini gösteren spesifik bir çalışma yapılmamıştır. Bu sebeple biz çalışmamızda anne sütünün insan nöroblastom hücre serisi SH-SY5Y üzerine olan etkisini araştırdık. Anne sütü içeriğindeki nöronal büyüme faktörlerinin kolostrum ve matür sütte de bulunduğu daha önce gösterilmiştir (71). Bu durum göz önüne alınarak çalışmada ulaşım kolaylığı açısından matür süt kullanımını tercih edildi.

Süt bankalarında saklanan sütler her ne kadar süt ile geçen viral etmenlere karşı taransa da burada yapılan pastörizasyon işlemi ile süt içeriğindeki büyüme faktörleri gibi önemli etkenlerin miktarı azalmaktadır (89). Bu bilgiler neticesinde çalışmamızda kültür ortamına anne sütü eklenilirken herhangi bir pastörizasyon veya filtrasyon işlemi uygulanmadı.

Anne sütünün çevresel etkiler nedeni ile kurşun, civa gibi materyaller ile kontamine olabildiği, annenin kullandığı ilaçlar, alkol ve kafein gibi maddelerin de süte geçtiği gösterilmiştir (90). Zaten immünsüprese tedavi alan bir hastada bu tarz nörotoksik etkili materyallerin etkisinden kaçınmak veya olası viral bulaşı engellemek adına anne sütü içerisindeki antikanser etkili ajanın izolasyonu önem arz etmektedir. Çalışmamızda bu durumdaki anneler çevresel bias oluşturmaması açısından çalışma dışı bırakıldı ve çalışmaya dahil olma kriterlerine dikkat edildi. Çalışmamızda daha önce bu konuda çalışılmamış anne sütünün nöroblastom hücre diferansiyasyonuna etkili olduğunu göstererek daha ileri izolasyon çalışmalarına ışık tutacağını düşündük.

Çalışmamızda bazı kısıtlamalar vardır. Anne sütleri herhangi bir işlemde geçirilmeden çalışıldığı için içerik analizleri bilinmemektedir. Anne sütünün içeriğinin dinamik olduğu ve çocuğun ihtiyaçlarına göre değiştiği bilinmektedir. Hatta aynı anneden alınan kolostrum, geçiş sütü ve matür süt arasında bile immünolojik faktörler, protein yapı ve miktarı, immünglobülinler açısından belirgin farklılıklar olduğu gösterilmiştir (69). Bu bilgiler de göz önünde bulundurulduğunda laktasyonun farklı dönemlerindeki sütlerin diferansiyasyon üzerine etkisi daha farklı olabilir. Bizim çalışmamız elde edilmesi kolay olduğu ve nöronal büyüme faktörleri kolostruma karşılık matür sütte de bulunduğu için matür süt ile gerçekleştirilmiş

olup, olası farklılıklar açısından veri toplanmadı. Buna ek olarak preterm yeni doğan ile term yenidoğanı olan annelerin süt içeriklerinin de farklılık gösterdiği bilinmektedir. Bu içerik değişimine neden olan etmenlerin de nöroblastom diferansiyasyonu açısından önem arz edeceği göz ardı edilememelidir.

Sonuç olarak bu çalışma, ulaşımı kolay ve yan etkisi olmayan bir biyomateryal olan anne sütünün *in-vitro* ortamda nöroblastom hücrelerinde diferansiyasyon üzerine etkili olduğunu gösterdi. Bu etki artan süt konsantrasyonu ve maruz kalınan gün sayısı ile beraber daha da artmaktadır. Bebeğin ilk aşısı kabul edilen anne sütünün içeriğinin öneminin gösterildiği bu çalışma ile emzirmenin desteklenmesi gerektiğini ve içeriğinden elde edilecek molekül ve yapılacak ilaçlar ile nöroblastom gibi hastalıkların tedavisinde yeni bir yol açacağını düşünüyoruz. Ancak anne sütünden etkili bir tedavi elde edebilmek için halen ek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Anne sütünün nöroblastom hücreleri üzerine diferansiyasyon etkisi vardır.
2. Anne sütünü konsantrasyonlarına göre anne sütünü grupları arasında fark saptanmadı.
3. Anne sütünü konsantrasyonu arttıkça nörit uzantısı daha uzun bulundu.
4. Anne sütününe maruz kalınan gün sayısı arttıkça nörit uzantısı daha uzun bulundu.
5. Bu durum anne sütünü içindeki bazı madde ve moleküller ile ilgili olabilir.
6. Bunların araştırılması ve ayrıştırılması yeni tedavi olanakları sunacaktır.
7. Ayrıca term ve prematür bebek sahibi annelerin matür sütün, kolostrumları, inek sütünü ve hazır mamanın karşılaştırılması çalışmayı bir üst basamağa taşıyacaktır.

7.KAYNAKLAR

1. Brodeur G, Maris J. Principles and practice of pediatric oncology. Philadelphia: JB Lippincott. 1993:739-767.
2. Reynolds CP, Matthay KK, Villablanca JG, Maurer BJ. Retinoid therapy of high-risk neuroblastoma. *Cancer letters*. 2003;197:185-192.
3. Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nature reviews cancer*. 2003;3:203.
4. Moroz V, Machin D, Faldum A, Hero B, Iehara T, Mosseri V, et al. Changes over three decades in outcome and the prognostic influence of age-at-diagnosis in young patients with neuroblastoma: a report from the International Neuroblastoma Risk Group Project. *European journal of cancer*. 2011;47:561-571.
5. Segal RA. Selectivity in neurotrophin signaling: theme and variations. *Annual review of neuroscience*. 2003;26:299-330.
6. Beckwith JB, Perrin EV. In situ neuroblastomas: a contribution to the natural history of neural crest tumors. *The American journal of pathology*. 1963;43:1089.
7. Das KP, Freudenrich TM, Mundy WR. Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth: a comparison of morphological and neurochemical measures. *Neurotoxicology and teratology*. 2004;26:397-406.
8. Schack-Nielsen L, Michaelsen KF. Breast feeding and future health. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 2006;9:289-296.
9. Ahmed AA, Zhang L, Reddivalla N, Hetherington M. Neuroblastoma in children: Update on clinicopathologic and genetic prognostic factors. *Pediatric hematology and oncology*. 2017;34:165-185.
10. Park JR, Eggert A, Caron H. Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2010;24:65-86.
11. Kutluk MT, Yeşilipek A. Turkish National Pediatric Cancer Registry 2002-2008 (Turkish Pediatric Oncology Group and Turkish Pediatric Hematology Society). *J Clin Oncol*. 2013;31.
12. Ahmed AA, Zhang L, Reddivalla N, Hetherington M. Neuroblastoma in children: Update on clinicopathologic and genetic prognostic factors. *Pediatr Hematol Oncol*. 2017;34:165-185.
13. Pinto NR, Applebaum MA, Volchenboum SL, Matthay KK, London WB, Ambros PF, et al. Advances in Risk Classification and Treatment Strategies for Neuroblastoma. *J Clin Oncol*. 2015;33:3008-3017.
14. Greenwood K, Foster J. Dinutuximab for the treatment of pediatric patients with neuroblastoma. *Drugs of today (Barcelona, Spain: 1998)*. 2017;53:469-476.
15. Canete A, Gerrard M, Rubie H, Castel V, Di Cataldo A, Munzer C, et al. Poor survival for infants with MYCN-amplified metastatic neuroblastoma despite intensified treatment: the International Society of Paediatric Oncology European Neuroblastoma Experience. *J Clin Oncol*. 2009;27:1014-1019.
16. Matthay KK, Reynolds CP, Seeger RC, Shimada H, Adkins ES, Haas-Kogan D, et al. Long-term results for children with high-risk neuroblastoma treated on a randomized trial of myeloablative therapy followed by 13-cis-retinoic acid: a children's oncology group study. *J Clin Oncol*. 2009;27:1007-1013.
17. Ladenstein R, Potschger U, Pearson AD, Brock P, Luksch R, Castel V, et al. Busulfan and melphalan versus carboplatin, etoposide, and melphalan as high-dose chemotherapy for high-risk neuroblastoma (HR-NBL1/SIOPEN): an international, randomised, multi-arm, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2017;18:500-514.
18. Schramm A, Schulte JH, Astrahantseff K, Apostolov O, van Limpt V, Sieverts H, et al. Biological effects of TrkA and TrkB receptor signaling in neuroblastoma. *Cancer letters*. 2005;228:143-153.
19. Esposito CL, D'Alessio A, De Franciscis V, Cerchia L. A cross-talk between TrkB and Ret tyrosine kinases receptors mediates neuroblastoma cells differentiation. *PLoS One*. 2008;3:e1643.
20. Kogner P, Barbany G, Dominici C, Castello MA, Raschellá G, Persson H. Coexpression of messenger RNA for TRK protooncogene and low affinity nerve growth factor receptor in neuroblastoma with favorable prognosis. *Cancer research*. 1993;53:2044-2050.

21. Suzuki T, Bogenmann E, Shimada H, Stram D, Seeger RC. Lack of high-affinity nerve growth factor receptors in aggressive neuroblastomas. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 1993;85:377-384.
22. Nakagawara A, Azar CG, Scavarda NJ, Brodeur GM. Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Molecular and cellular biology*. 1994;14:759-767.
23. Brodeur GM, Minturn JE, Ho R, Simpson AM, Iyer R, Varela CR, et al. Trk receptor expression and inhibition in neuroblastomas. *Clinical cancer research*. 2009;15:3244-3250.
24. Thiele CJ, Li Z, McKee AE. On Trk—the TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology. *Clinical cancer research*. 2009;1078-0432. CCR-1008-0651.
25. Nakagawara A, Azar CG, Scavarda NJ, Brodeur GM. Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol Cell Biol*. 1994;14:759-767.
26. Nakamura K, Martin KC, Jackson JK, Beppu K, Woo CW, Thiele CJ. Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB induces vascular endothelial growth factor expression via hypoxia-inducible factor-1alpha in neuroblastoma cells. *Cancer Res*. 2006;66:4249-4255.
27. Goldschneider D, Mehlen P. Dependence receptors: a new paradigm in cell signaling and cancer therapy. *Oncogene*. 2010;29:1865.
28. Rabizadeh S, Ye X, Wang J, Bredesen D. Neurotrophin dependence mediated by p75 NTR: contrast between rescue by BDNF and NGF. *Cell death and differentiation*. 1999;6:1222.
29. Hantzopoulos PA, Suri C, Glass DJ, Goldfarb MP, Yancopoulos GD. The low affinity NGF receptor, p75, can collaborate with each of the Trks to potentiate functional responses to the neurotrophins. *Neuron*. 1994;13:187-201.
30. Ho R, Minturn JE, Simpson AM, Iyer R, Light JE, Evans AE, et al. The effect of P75 on Trk receptors in neuroblastomas. *Cancer letters*. 2011;305:76-85.
31. Bamji SX, Majdan M, Pozniak CD, Belliveau DJ, Aloyz R, Kohn J, et al. The p75 neurotrophin receptor mediates neuronal apoptosis and is essential for naturally occurring sympathetic neuron death. *The Journal of cell biology*. 1998;140:911-923.
32. Lönnerdal B. Bioactive proteins in human milk: mechanisms of action. *The Journal of pediatrics*. 2010;156:S26-S30.
33. Nakagawara A, Arima-Nakagawara M, Scavarda NJ, Azar CG, Cantor AB, Brodeur GM. Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma. *New England Journal of Medicine*. 1993;328:847-854.
34. Nakagawara A, Brodeur G. Role of neurotrophins and their receptors in human neuroblastomas: a primary culture study. *European journal of cancer*. 1997;33:2050-2053.
35. Salcedo R, Stauffer JK, Lincoln E, Back TC, Hixon JA, Hahn C, et al. IL-27 mediates complete regression of orthotopic primary and metastatic murine neuroblastoma tumors: role for CD8+ T cells. *The Journal of Immunology*. 2004;173:7170-7182.
36. Salcedo R, Hixon JA, Stauffer JK, Jalah R, Brooks AD, Khan T, et al. Immunologic and therapeutic synergy of IL-27 and IL-2: enhancement of T cell sensitization, tumor-specific CTL reactivity and complete regression of disseminated neuroblastoma metastases in the liver and bone marrow. *The Journal of Immunology*. 2009;182:4328-4338.
37. Antunes NL, Khakoo Y, Matthay KK, Seeger RC, Stram DO, Gerstner E, et al. Antineuronal antibodies in patients with neuroblastoma and paraneoplastic opsoclonus-myoclonus. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 2000;22:315-320.
38. Valteau D, Scott V, Carcelain G, Hartmann O, Escudier B, Hercend T, et al. T-cell receptor repertoire in neuroblastoma patients. *Cancer research*. 1996;56:362-369.
39. Cooper R, Khakoo Y, Matthay KK, Lukens JN, Seeger RC, Stram DO, et al. Opsoclonus myoclonus ataxia syndrome in neuroblastoma: Histopathologic features—A report from the children's cancer group. *Medical and Pediatric Oncology: The Official Journal of SIOP—International Society of Pediatric Oncology (Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique)*. 2001;36:623-629.
40. Pranzatelli M, Travelstead A, Tate E, Allison T, Moticka E, Franz D, et al. B- and T-cell markers in opsoclonus–myoclonus syndrome Immunophenotyping of CSF lymphocytes. *Neurology*. 2004;62:1526-1532.
41. Rudnick E, Khakoo Y, Antunes NL, Seeger RC, Brodeur GM, Shimada H, et al. Opsoclonus myoclonus ataxia syndrome in neuroblastoma: Clinical outcome and antineuronal antibodies—a report from the children's cancer group study. *Medical and Pediatric Oncology: The Official Journal of SIOP—International Society of Pediatric Oncology (Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique)*. 2001;36:612-622.

42. Raffaghello L, Prigione I, Bocca P, Morandi F, Camoriano M, Gambini C, et al. Multiple defects of the antigen-processing machinery components in human neuroblastoma: immunotherapeutic implications. *Oncogene*. 2005;24:4634.
43. Squire R, Fowler CL, Brooks SP, Rich GA, Cooney DR. The relationship of class I MHC antigen expression to stage IV-S disease and survival in neuroblastoma. *Journal of pediatric surgery*. 1990;25:381-386.
44. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PdL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 1994;266:2011-2015.
45. Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Matsuura Y, Piatyszek MA, Shay JW. Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nature medicine*. 1995;1:249-255.
46. Brodeur GM. Do the ends justify the means? *Nature medicine*. 1995;1:203-205.
47. Astuti D, Agathangelou A, Honorio S, Dallol A, Martinsson T, Kogner P, et al. RASSF1A promoter region CpG island hypermethylation in pheochromocytomas and neuroblastoma tumours. *Oncogene*. 2001;20:7573.
48. Takita J, Yang HW, Bessho F, Hanada R, Yamamoto K, Kidd V, et al. Absent or reduced expression of the caspase 8 gene occurs frequently in neuroblastoma, but not commonly in Ewing sarcoma or rhabdomyosarcoma. *Medical and Pediatric Oncology: The Official Journal of SIOP—International Society of Pediatric Oncology (Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique)*. 2000;35:541-543.
49. Barbieri E, De Preter K, Capasso M, Chen Z, Hsu DM, Tonini GP, et al. Histone chaperone CHAF1A inhibits differentiation and promotes aggressive neuroblastoma. *Cancer research*. 2014;74:765-774.
50. Grau E, Martinez F, Orellana C, Canete A, Yanez Y, Oltra S, et al. Epigenetic alterations in disseminated neuroblastoma tumour cells: influence of TMS1 gene hypermethylation in relapse risk in NB patients. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2010;136:1415-1421.
51. Yang Q, Kiernan CM, Tian Y, Salwen HR, Chlenski A, Brumback BA, et al. Methylation of CASP8, DCR2, and HIN-1 in neuroblastoma is associated with poor outcome. *Clinical cancer research*. 2007;13:3191-3197.
52. Decock A, Ongenaert M, Vandesompele J, Speleman F. Neuroblastoma epigenetics: from candidate gene approaches to genome-wide screenings. *Epigenetics*. 2011;6:962-970.
53. Pugh TJ, Morozova O, Attiyeh EF, Asgharzadeh S, Wei JS, Auclair D, et al. The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. *Nature genetics*. 2013;45:279.
54. Molenaar JJ, Koster J, Zwijnenburg DA, van Sluis P, Valentijn LJ, van der Ploeg I, et al. Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neuritogenesis genes. *Nature*. 2012;483:589.
55. Batora N, Sturm D, Jones D, Kool M, Pfister S, Northcott P. Transitioning from genotypes to epigenotypes: why the time has come for medulloblastoma epigenomics. *Neuroscience*. 2014;264:171-185.
56. Feinberg AP, editor *The epigenetics of cancer etiology*. *Seminars in cancer biology*; 2004: Elsevier.
57. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nature reviews cancer*. 2004;4:143.
58. Iyer R, Evans AE, Qi X, Ho R, Minturn JE, Zhao H, et al. Lestaurtinib enhances the antitumor efficacy of chemotherapy in murine xenograft models of neuroblastoma. *Clinical cancer research*. 2010;1078-0432. CCR-1009-1531.
59. Minturn JE, Evans AE, Villablanca JG, Yanik GA, Park JR, Shusterman S, et al. Phase I trial of lestaurtinib for children with refractory neuroblastoma: a new approaches to neuroblastoma therapy consortium study. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2011;68:1057-1065.
60. Louis CU, Savoldo B, Dotti G, Pule M, Yvon E, Myers GD, et al. Anti-tumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor positive T-cells in patients with neuroblastoma. *Blood*. 2011;blood-2011-2005-354449.
61. Yu AL, Gilman AL, Ozkaynak MF, London WB, Kreissman SG, Chen HX, et al. Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *New England Journal of Medicine*. 2010;363:1324-1334.
62. Yuza Y, Agawa M, Matsuzaki M, Yamada H, Urashima M. Gene and protein expression profiling during differentiation of neuroblastoma cells triggered by 13-cis retinoic acid. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 2003;25:715-720.

63. Bunone G, Borrello MG, Picetti R, Bongarzone I, Peverali FA, de Franciscis V, et al. Induction of RET proto-oncogene expression in neuroblastoma cells precedes neuronal differentiation and is not mediated by protein synthesis. *Experimental cell research*. 1995;217:92-99.
64. Masetti R, Biagi C, Zama D, Vendemini F, Martoni A, Morello W, et al. Retinoids in pediatric onco-hematology: the model of acute promyelocytic leukemia and neuroblastoma. *Advances in therapy*. 2012;29:747-762.
65. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata Ji, Joshi VV, Roald B, et al. The international neuroblastoma pathology classification (the Shimada system). *Cancer*. 1999;86:364-372.
66. Shiohira H, Kitaoka A, Shirasawa H, Enjoji M, Nakashima M. Am80 induces neuronal differentiation in a human neuroblastoma NH-12 cell line. *International journal of molecular medicine*. 2010;26:393-399.
67. Organization WH. Infant and young child feeding: model chapter for textbooks for medical students and allied health professionals. *Infant and young child feeding: model chapter for textbooks for medical students and allied health professionals*. 2009.
68. Lawrence RA, Lawrence RM. *Breastfeeding e-book: a guide for the medical professional*: Elsevier Health Sciences; 2010.
69. Andreas NJ, Kampmann B, Le-Doare KM. Human breast milk: a review on its composition and bioactivity. *Early human development*. 2015;91:629-635.
70. Kutty PK. Breastfeeding counsel against cancers. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2016;6:422-428.
71. Li R, Xia W, Zhang Z, Wu K. S100B protein, brain-derived neurotrophic factor, and glial cell line-derived neurotrophic factor in human milk. *PLoS One*. 2011;6:e21663.
72. Hanson LA, Korotkova M, editors. *The role of breastfeeding in prevention of neonatal infection*. *Seminars in neonatology*; 2002: Elsevier.
73. Donovan SM, Wang M, Monaco MH, Martin CR, Davidson LA, Ivanov I, et al. Noninvasive molecular fingerprinting of host–microbiome interactions in neonates. *FEBS letters*. 2014;588:4112-4119.
74. Ballard O, Morrow AL. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatric Clinics*. 2013;60:49-74.
75. Lönnerdal B, Lien EL. Nutritional and physiologic significance of α -lactalbumin in infants. *Nutrition reviews*. 2003;61:295-305.
76. Rodrigues D, Li A, Nair D, Blennerhassett M. Glial cell line derived neurotrophic factor is a key neurotrophin in the postnatal enteric nervous system. *Neurogastroenterology & Motility*. 2011;23:e44-e56.
77. Fichter M, Klotz M, Hirschberg DL, Waldura B, Schofer O, Ehnert S, et al. Breast milk contains relevant neurotrophic factors and cytokines for enteric nervous system development. *Molecular nutrition & food research*. 2011;55:1592-1596.
78. Brodeur GM, Bagatell R. Mechanisms of neuroblastoma regression. *Nature reviews Clinical oncology*. 2014;11:704.
79. Lazo JS, Ruddon RW. Neurite extension and malignancy of neuroblastoma cells after treatment with prostaglandin E1 and papaverine. *Journal of the National Cancer Institute*. 1977;59:137-143.
80. Hensel N, Ratzka A, Brinkmann H, Klimaschewski L, Grothe C, Claus P. Analysis of the fibroblast growth factor system reveals alterations in a mouse model of spinal muscular atrophy. *PLoS One*. 2012;7:e31202.
81. Maden M. Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*. 2007;8:755.
82. Chen X-C, Pan Z-L, Liu D-S, Han X. Effect of taurine on human fetal neuron cells: proliferation and differentiation. *Taurine 3*: Springer; 1998. p. 397-403.
83. Sangkhathat S, Nara K, Kusafuka T, Yoneda A, Fukuzawa M. Artificially accumulated β -catenin inhibits proliferation and induces neurite extension of neuroblastoma cell line NB-1 via up-regulation of trkA. *Oncology reports*. 2006;16:1197-1203.
84. Tucholski J, Lesort M, Johnson G. Tissue transglutaminase is essential for neurite outgrowth in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neuroscience*. 2001;102:481-491.
85. Cao D, Xue R, Xu J, Liu Z. Effects of docosahexaenoic acid on the survival and neurite outgrowth of rat cortical neurons in primary cultures. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2005;16:538-546.

86. Daniels JL, Olshan AF, Pollock BH, Shah NR, Stram DO. Breast-feeding and neuroblastoma, USA and Canada. *Cancer Causes & Control*. 2002;13:401-405.
87. Holmes AV, Jones HG, Christensen BC. *Breastfeeding and Cancer Prevention*. 2017.
88. Svanborg C, Ågerstam H, Aronson A, Bjerkvig R, Düringer C, Fischer W, et al. HAMLET kills tumor cells by an apoptosis-like mechanism—cellular, molecular, and therapeutic aspects. *Advances in cancer research*. 2003;88:1-29.
89. Peila C, Coscia A, Bertino E, Li Volti G, Galvano F, Visser GH, et al. Holder pasteurization affects S100B concentrations in human milk. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2018;31:513-517.
90. Yum J. The effects of breast milk versus infant formulae on cognitive development. *J Dev Disabil*. 2007;13:135-164.



EK 1: ETİK KURUL ONAM BELGESİ



T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 46418926

Konu : Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurul Kararları

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

TOPLANTI TARİHİ : 30 EKİM 2018 SALI
TOPLANTI NO : 2018/12
ROJE/ KARAR NO : 18/236 (Değerlendirilme Tarihi: (25.09.2018-16.10.2018))

Üniversitemiz Gülhane Eğitim ve Araştırma hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalında görevli Doç. Dr. Erman ATAŞ'ın sorumlu araştırmacı olduğu, Uzm. Öğr. Kadircan SARIGÖLLÜ Prof. Dr. Barış Baykan ve Uzm. Bio. Meral SARPEL'in yardımcı araştırmacı oldukları, 18/236 kayıt numaralı, "**Anne Sütünün Nöroblastom Hücre Farklılaşmasındaki Etkinliği**" başlıklı tıpta uzmanlık tezi önerisi, araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

BAŞKAN

Ahmet COŞAR
Prof. Dr.

ÜYE

Alper GÖZÜBÜYÜK
Prof. Dr.

ÜYE

Ayhan KILIÇ
Prof. Dr.

ÜYE

Levent KENAR
Prof. Dr.

ÜYE

Cumhur AYDIN
Prof. Dr.

ÜYE

Cemal Nuri ERÇİN
Prof. Dr.

ÜYE

Kazım Emre KARAŞAHİN
Prof. Dr.

ÜYE

Murat ÇELİK
Doç. Dr.

ÜYE

Ceyhan ALTUN
Doç. Dr.

ÜYE

Dilek YILDIZ
Doç. Dr.

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu
Etik-Ankara
Telefon: 0 (312) 304 6135

EK 2: ÖZGEÇMİŞ ve İLETİŞİM BİLGİLERİ

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı : Kadircan SARIGÖLLÜ

Doğum yeri ve tarihi : Ankara – 22 Mayıs 1987

Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti

Medeni durumu : Bekar

İletişim adresi ve telefonu : Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD, Etlik/Keçiören/Ankara, +90 536 246 8091

Email: kadircansarigollu@hotmail.com

Yabancı dili : İngilizce

II- Eğitimi

- Gülhane Askeri Tıp Fakültesi (2005-2011)
- Kocatepe Mimar Kemal Lisesi (2001-2005)
- Fatih İlköğretim Okulu (1998-2001)
- Gazi Osman Paşa İlkokulu (1993-1998)

III- Ünvanları

- Tıp doktoru (2011)

IV- Mesleki Deneyimi

- 16 ncı Mekanize Piyade Tugayı 1 nci Mekanize Piyade Taburu- Diyarbakır (2011-2014)
- Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD (2014-2018)

EK 3: KATILIMCI ONAM BELGESİ



T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ “GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR” İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Araştırma Projesinin Adı: “Anne Sütünün Nöroblastom Hücre Farklılaşmasındaki Etkinliği”
Sorumlu Araştırmacının Adı: Doç. Dr. Erman ATAŞ
Diğer Araştırmacıların Adı: Dr. Kadircan SARIGÖLLÜ
Destekleyici (varsa):

“Anne Sütünün Nöroblastom Hücre Farklılaşmasındaki Etkinliği” isimli bir çalışmada yer almak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmaya davet edilmenizin nedeni anne sütünün araştırma amacı ile nöroblastom hücreleri üzerinde kullanılacak olmasıdır. Bu çalışma, araştırma amaçlı olarak yapılmaktadır ve katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Çalışmaya katılma konusunda karar vermeden önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Çalışma hakkında tam olarak bilgi sahibi olduktan sonra ve sorularınız cevaplandıktan sonra eğer katılmak isterseniz sizden bu formu imzalamanız istenecektir. Bu araştırma, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalında, Doç. Dr. Erman ATAŞ sorumluluğu altındadır.

Çalışmanın amacı nedir; benden başka kaç kişi bu çalışmaya katılacak?

Nöroblastom sempatik gangliyonlar ve/veya adrenal medulladan ortaya çıkabilir ve ilk bir yaş içerisinde spontan olarak benign forma dönüşüm gösterebilir ve regrese olabilir. Spontan benign forma dönüşüm ilk yaş içerisinde sıklıkla olmakta, yaş ilerledikçe bu oran azalmaktadır. Bunun en iyi kanıtı otopsi yapılan yenidoğanlarda normalde görülenden 400 kat daha fazla nöroblastom tespit edilmesidir. Bu durum ilk bir yaş içerisinde bebeğin maruz kaldığı; bebeğin immünesinin gelişmesi, maternal antikolar, transplasental geçen immün hücreler gibi faktörlerden dolayı benign forma dönüşüm olduğu ve tümörlerin 400 kat azaldığı düşüncesini doğurmaktadır. İlk bir yaş içerisinde bebeğin en çok tükettiği besinin anne sütü olması sebebi ile anne sütünün bu dönüşüm üzerinde etkisinin olabileceğini düşünüyoruz. Bu sebeple nöroblastom hücrelerinin malign den benign forma diferansiasyonunda anne sütünün etkisi veya katkısı araştırılacak bu amaçla nöroblastom hücre hatlarına değişen konsantrasyonlarda anne sütü verilecektir. Anneler gönüllülük esasına göre çalışmaya alınacaktır. Çalışmadan ayrılmak isteyen anneler, onay verip sonrasında onay çeken anneler, hastalığı olan anneler çalışmadan çıkarılacaktır. Gönüllük esasına göre olduğu için çalışmadan çıkan annelerin sütleri



T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

iyade edilecektir. Nöroblastom hücre farklılaşması ile ilgili daha önceden yapılan çeşitli çalışmalar olmakla beraber anne sütünün etkileri üzerine daha önce hiç bir çalışma yapılmamıştır ve bu konu tarafımızca ilk defa araştırılacaktır. Bu çalışma ile anne sütünün nöroblastom diferansiyasyonundaki etkisi ortaya konulacaktır. Burada gözlemlenecek değişimler ile malignenden benign forma farklılaşma sağlanırsa anne sütünün tedavi seçeneği olarak kullanılabilceği düşünülmektedir.

Bu araştırma tek merkezli olarak yürütülecek olup başka annelerden de süt temini yapılabilecektir, çalışma kapsamında elde edilen veriler hiçbir şekilde sizin isminiz belirtilerek açıklanmayacaktır. Araştırmaya katılmama ya da kabul ettikten sonra vazgeçme hakkına sahipsiniz. Forma isminizi ve telefon numaranızı yazmanızı sizlere daha kolay ulaşabilmemiz açısından önemle rica ediyoruz. Teşekkürler.

Bu çalışmaya katılmamalı mıyım?

Bu çalışmada yer alıp almamak tamamen size bağlıdır. Şu anda bu formu imzalarsanız bile istediğiniz herhangi bir zamanda bir neden göstermeksizin çalışmayı bırakmakta özgürsünüz. Eğer katılmak istemez iseniz veya çalışmadan ayrılırsanız, doktorunuz tarafından sizin için en uygun tedavi planı uygulanacaktır. Aynı şekilde çalışmayı yürüten doktor çalışmaya devam etmeniz sizin için yararlı olmayacağına karar verebilir ve sizi çalışma dışı bırakabilir, bu durumda da sizin için en uygun tedavi seçilecektir.

Bu çalışmaya katılırsam beni ne bekliyor?

Bu başlık altında aşağıdaki bilgiler yer almalıdır:
Süt örnekleri term bebeği olan gönüllü annelerden elle sağılarak toplanılacaktır. Doğum sonrası en az 5 gün geçtikten sonra alınan matür süt bu çalışmada kullanılacaktır. 5 gün süre ile bu sütler kanser hücrelerine verilecek ve kanser hücrelerinde sütün meydana getirdiği değişiklikler gözlemlenecektir.

Çalışmanın riskleri ve rahatsızlıkları var mıdır?

1. Çalışmaya katılmanız nedeni ile oluşabilecek herhangi bir risk veya gelişebilecek rahatsızlık söz konusu değildir.
2. Araştırmadan dolayı göreceğiniz olası bir zararda gerekli her türlü tıbbi girişim tarafımızdan yapılacaktır; bu konudaki tüm harcamalar da tarafımızdan karşılanacaktır



T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Çalışmada yer almamın yararları nelerdir?

Araştırmadan elde edilebilecek bilgiler çocuk çağının önemli kanser tiplerinden biri olan nöroblastom tedavisi için önem arz etmektedir. Belkide yeni tedavi yöntemi geliştirilebilecektir.

Bu çalışmaya katılmamın maliyeti nedir?

Çalışmaya katılmakla parasal yük altına girmeyeceksiniz ve size de herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

Kişisel bilgilerim nasıl kullanılacak?

Çalışma doktorunuz kişisel bilgilerinizi, araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır ancak kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Yalnızca gereği halinde, sizinle ilgili bilgileri etik kurullar ya da resmi makamlar inceleyebilir. Çalışmanın sonunda, kendi sonuçlarınızla ilgili bilgi istemeye hakkınız vardır. Çalışma sonuçları çalışma bitiminde tıbbi literatürde yayınlanabilecektir ancak kimliğiniz açıklanmayacaktır. Çalışma bitiminde kalan sütler imha edilecektir.

Daha fazla bilgi için kime başvurabilirim?

Çalışma ile ilgili ek bilgiye gereksiniminiz olduğunuzda aşağıdaki kişi ile lütfen iletişime geçiniz.

ADI :
GÖREVİ :
TELEFON :

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

..... Anabilim dalında, Dr. tarafından tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı ve ilgili metni okudum. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakıma ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir neden göstermeden araştırmadan çekilebilirim. *(Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağına bilincindeyim)*. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.



T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

Araştırmadan elde edilen benimle ilgili kişisel bilgilerin gizliliğinin korunacağını biliyorum.

Araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karŐılaŐtıđımda; herhangi bir saatte, Dr.....(Doktor ismi),(telefon ve adres) ‘ten arayabileceğimi biliyorum. (Doktor ismi, telefon ve adres bilgileri mutlaka belirtilmelidir)

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamıŐ bulunmaktayım. Bu koŐullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiç bir baskı ve zorlama olmaksızın, gönüllülük içerisinde katılmayı kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Katılımcı : **Adı Soyadı**
İletişim adresi ve tel:
İmza ve tarih

Görüşme tanığı : **Adı Soyadı**
İletişim adresi ve tel:
İmza ve tarih

Katılımcı ile görüşen hekim: **Adı Soyadı**
İletişim adresi ve tel:
İmza ve tarih

AYDINLATMA ve KATILIMCININ BEYANI KESİNLİKLE BİRBİRLERİNİN DEVAMI ŐEKLİNDE OLACAKTIR. AYRI AYRI SAYFALARDA YER ALMAYACAKTIR.