



İSTANBUL  
ÜNİVERSİTESİ  
YAYINEVİ

[jmed.istanbul.edu.tr](http://jmed.istanbul.edu.tr)

# İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi



Journal of Istanbul  
Faculty of Medicine



# İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi

## DİZİNLER/INDEXING AND ABSTRACTING

Web of Science - Emerging Sources Citation Index (ESCI)

TÜBİTAK-ULAKBİM TR Dizin

CABI Global Health Database



# İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi

## SAHİBİ/OWNER

Prof. Dr. Tufan TÜKEK

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye  
Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Istanbul, Turkey

## SORUMLU YAZI İŞLERİ MÜDÜRÜ/RESPONSIBLE MANAGER

Prof. Dr. Bülent BAYRAKTAR

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye  
Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Istanbul, Turkey

## YAZIŞMA ADRESİ/CORRESPONDENCE ADDRESS

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Dekanlığı, Yayın Komisyonu  
Turgut Özal Cad. Çapa, Fatih, 34093, İstanbul, Türkiye  
Telefon / Phone: +90 (212) 414 21 61  
E-mail: itfdergisi@istanbul.edu.tr  
<https://dergipark.org.tr/tr/pub/iuitfd>  
<http://iupress.istanbul.edu.tr/tr/journal/jmed>

## YAYINCI/PUBLISHER

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

---

Dergide yer alan yazılardan ve aktarılan görüşlerden yazarlar sorumludur.  
Authors bear responsibility for the content of their published articles.

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

Ocak, Nisan, Temmuz ve Ekim aylarında, yılda dört sayı olarak yayımlanan uluslararası, hakemli, açık erişimli ve bilimsel bir dergidir.  
This is a scholarly, international, peer-reviewed and open-access journal published quarterly in January, April, July and October.

---

**Yayın Türü/Publication Type:** Yaygın Süreli/Periodical

---



# İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi

## DERGİ YAZI KURULU/EDITORIAL MANAGEMENT BOARD

### Baş Editör/Editor-in-Chief

Birsen KARAMAN – İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye – [bkaraman@istanbul.edu.tr](mailto:bkaraman@istanbul.edu.tr)

Ayşe KUBAT ÜZÜM – İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye – [ayse.kubat@istanbul.edu.tr](mailto:ayse.kubat@istanbul.edu.tr)

### Baş Editör Yardımcıları/Co-Editors-in-Chief

Funda GÜNGÖR UĞURLUCAN – İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye – [funda.gungor@istanbul.edu.tr](mailto:funda.gungor@istanbul.edu.tr)

Tzevat TEFİK – İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye – [tztefik@istanbul.edu.tr](mailto:tztefik@istanbul.edu.tr)

### Alan Editörleri/Section Editors

Achmet ALİ – İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye – [achmet.ali@istanbul.edu.tr](mailto:achmet.ali@istanbul.edu.tr)

Aydin AYDOSELİ – İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye – [aydin.aydoseli@istanbul.edu.tr](mailto:aydin.aydoseli@istanbul.edu.tr)

Zafer CEBECİ – İstanbul Türkiye İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye – [zafer.cebeci@istanbul.edu.tr](mailto:zafer.cebeci@istanbul.edu.tr)

Nalan ÇAPAN – İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye – [nalan.capan@istanbul.edu.tr](mailto:nalan.capan@istanbul.edu.tr)

Ali Fuat Kaan GÖK – İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye – [afkgok@istanbul.edu.tr](mailto:afkgok@istanbul.edu.tr)

Mine KARAGÜLLE – İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye – [mkgulle@istanbul.edu.tr](mailto:mkgulle@istanbul.edu.tr)

Çiğdem KEKİK ÇINAR – İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye – [cigdem.kekik@istanbul.edu.tr](mailto:cigdem.kekik@istanbul.edu.tr)

Bengüsu MİRASOĞLU – İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye – [bengusu.mirasoglu@istanbul.edu.tr](mailto:bengusu.mirasoglu@istanbul.edu.tr)

Lütfiye ÖKSÜZ – İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye – [oksuzl@istanbul.edu.tr](mailto:oksuzl@istanbul.edu.tr)

Nuray ÖZGÜLNAR – İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye – [nuray.ozgulnar@istanbul.edu.tr](mailto:nuray.ozgulnar@istanbul.edu.tr)

Bilge Şadan ÖZSAİT SELÇUK – İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul Türkiye – [ozsaitb@istanbul.edu.tr](mailto:ozsaitb@istanbul.edu.tr)

Şule ÖZTÜRK SARI – İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye – [sule.ozturk@istanbul.edu.tr](mailto:sule.ozturk@istanbul.edu.tr)

Ayşe PALANDUZ – İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye – [apalanduz@istanbul.edu.tr](mailto:apalanduz@istanbul.edu.tr)

Beldan POLAT – İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye – [beldanp@istanbul.edu.tr](mailto:beldanp@istanbul.edu.tr)

Zeynep SOLAKOĞLU – İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye – [zaydin@istanbul.edu.tr](mailto:zaydin@istanbul.edu.tr)

İsmail Cem SORMAZ – İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye – [ismail.sormaz@istanbul.edu.tr](mailto:ismail.sormaz@istanbul.edu.tr)

Nermin Görkem ŞİRİN İNAN – İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye – [nermingo@istanbul.edu.tr](mailto:nermingo@istanbul.edu.tr)

Deniz TUĞCU – İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye – [deniz.tugcu@istanbul.edu.tr](mailto:deniz.tugcu@istanbul.edu.tr)

Yasemin YALÇINKAYA – İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye – [yasemin.yalcinkaya.78@istanbul.edu.tr](mailto:yasemin.yalcinkaya.78@istanbul.edu.tr)

Halil YAZICI – İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye – [halildir@istanbul.edu.tr](mailto:halildir@istanbul.edu.tr)

Alev YILMAZ – İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye – [alev.yilmaz@istanbul.edu.tr](mailto:alev.yilmaz@istanbul.edu.tr)

Cafer Sadık ZORKUN – İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye – [zorkun@istanbul.edu.tr](mailto:zorkun@istanbul.edu.tr)

### Dil Editörleri/Language Editors

Elizabeth Mary EARL – İstanbul Üniversitesi, Yabancı Diller Yüksek Okulu, İstanbul, Türkiye – [elizabeth.earl@istanbul.edu.tr](mailto:elizabeth.earl@istanbul.edu.tr)

Alan James NEWSON – İstanbul Üniversitesi, Yabancı Diller Yüksek Okulu, İstanbul, Türkiye – [alan.newson@istanbul.edu.tr](mailto:alan.newson@istanbul.edu.tr)

### İstatistik Editörü/Statistics Editor

Halim İŞSEVER – İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye – [hissever@istanbul.edu.tr](mailto:hissever@istanbul.edu.tr)

### Tanıtım Yöneticisi/Publicity Manager

Tzevat TEFİK – İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye – [tztefik@istanbul.edu.tr](mailto:tztefik@istanbul.edu.tr)

### Editorial Asistan/Editorial Assistant

Birgül TAŞTEMİR – İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Yayın Komisyonu, İstanbul, Türkiye – [itfdergisi@istanbul.edu.tr](mailto:itfdergisi@istanbul.edu.tr)



# İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi

## YAYIN KURULU/EDITORIAL BOARD

---

- Atila ARINCI – İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye – [aarinci@istanbul.edu.tr](mailto:aarinci@istanbul.edu.tr)
- Pınar Bayrak TOYDEMİR – Utah Üniversitesi, Tıp Fakültesi, ARUP Laboratuvarı, Salt Lake USA – [pınar.toydemir@hsc.utah.edu](mailto:pınar.toydemir@hsc.utah.edu)
- Nilgün BOZBUĞA – İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye – [nilgun.bozbuga@istanbul.edu.tr](mailto:nilgun.bozbuga@istanbul.edu.tr)
- Şükrü H. EMRE – Yale Üniversitesi, Yale Tıp Fakültesi, New Haven, CT Amerika – [sukru.emre@yale.edu](mailto:sukru.emre@yale.edu)
- Haluk ERAKSOY – İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye – [eraksoyh@istanbul.edu.tr](mailto:eraksoyh@istanbul.edu.tr)
- Simin GÖRAL – Pennsylvania Üniversitesi, Perelman Tıp Fakültesi, Pennsylvania, Amerika – [simin.goral@uphs.upenn.edu](mailto:simin.goral@uphs.upenn.edu)
- Nilüfer GÖZÜM – İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye – [nilgozum@istanbul.edu.tr](mailto:nilgozum@istanbul.edu.tr)
- Hülya GÜL – İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye – [hulyagul@istanbul.edu.tr](mailto:hulyagul@istanbul.edu.tr)
- Fahrettin KELEŞTEMUR – Yeditepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye – [kelestemur@yeditepe.edu.tr](mailto:kelestemur@yeditepe.edu.tr)
- Abdullah KUTLAR – Augusta Üniversitesi, Georgia, Amerika – [akutlar@augusta.edu](mailto:akutlar@augusta.edu)
- Sacit Bülent OMA – Yale Üniversitesi, Yale Tıp Fakültesi, New Haven, CT, Amerika – [sacit.omay@yale.edu](mailto:sacit.omay@yale.edu)
- Betigül ÖNGEN – İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye – [ongenb@istanbul.edu.tr](mailto:ongenb@istanbul.edu.tr)
- Beyza ÖZÇINAR – İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye – [bozcinar@istanbul.edu.tr](mailto:bozcinar@istanbul.edu.tr)
- Altay SENCER – İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye – [altayser@istanbul.edu.tr](mailto:altayser@istanbul.edu.tr)
- Yasemin ŞANLI – İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye – [yasemin.sanli@istanbul.edu.tr](mailto:yasemin.sanli@istanbul.edu.tr)
- M.Öner ŞANLI – İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye – [sanlio@istanbul.edu.tr](mailto:sanlio@istanbul.edu.tr)
- Reha TOYDEMİR – Utah Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Salt Lake Amerika – [reha.toydemir@hsc.utah.edu](mailto:reha.toydemir@hsc.utah.edu)
- E. Murat TUZCU – Cleveland Clinic, Abu Dhabi, BAE – [tuzcue@ccf.org](mailto:tuzcue@ccf.org)
- Bernd WOLLNIK – Göttingen Üniversitesi, Göttingen, Almanya – [bernd.wollnik@med.uni-goettingen.de](mailto:bernd.wollnik@med.uni-goettingen.de)
- Pınar YAMANTÜRK ÇELİK – İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye – [ymntrkp@istanbul.edu.tr](mailto:ymntrkp@istanbul.edu.tr)
- Mehmet Emin ADİN – Yale Üniversitesi, Yale Tıp Fakültesi, New Haven, CT Amerika – [mehmet.adin@yale.edu](mailto:mehmet.adin@yale.edu)



# İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi

## AMAÇ KAPSAM VE YAYIN STANDARTLARI

İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi (İst Tıp Fak Derg); bağımsız, önyargısız ve çift-kör hakemlik ilkeleri çerçevesinde yayın yapan İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi'nin uluslararası ve açık erişimli bilimsel yayın organıdır. Dergi Ocak, Nisan, Temmuz ve Ekim aylarında olmak üzere üç ayda bir yayınlanır ve dört sayıda bir cildi tamamlanır. Yayın dili İngilizce ve Türkçe'dir.

İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi (İst Tıp Fak Derg), tıbbın tüm alanlarında klinik ve deneysel özgün araştırmalar, ender görülebilecek olgu sunumları, kendi alanında uluslararası literatürde saygın bir yere sahip davetli araştırmacıların yaptığı derleme makaleleri ve editöre mektuplar yayınlamaktadır. Orijinal metot geliştirme, yeni bir girişim tekniği ve orijinal çalışmaların ön sonuçlarını içeren kısa raporlara da dergide yer verilmektedir.

Derginin hedef kitlesi; sağlık alanındaki tüm disiplinlerde çalışan hekimler ve akademisyenlerdir.

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

İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi (İst Tıp Fak Derg), Web of Science-Emerging Sources Citation Index ve TÜBİTAK ULAKBİM TR Dizin tarafından indekslenmektedir.

Makale değerlendirme ve yayın işlemleri için yazarlardan ücret talep edilmemektedir.

Derginin tüm masrafları İstanbul Üniversitesi tarafından karşılanmaktadır.

Dergide yayınlanan makalelerde ifade edilen görüşler ve fikirler İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi Editör, Editör Yardımcıları, Yayın Kurulu ve Yayıncısının değil, yazar(lar)ın bakış açılarını yansıtır. Editör, Editör Yardımcıları, Yayın Kurulu ve Yayıncı bu gibi durumlar için hiç bir sorumluluk ya da yükümlülük kabul etmemektedir. Yayınlanan içerik ile ilgili tüm sorumluluk yazarlara aittir.

Yayınlanan tüm içeriğe ücretsiz olarak erişilebilir.

Editör: Birsen Karaman

Adres: İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Dekanlığı, Turgut Özal Cad. 34093 Çapa, Fatih, İstanbul, Türkiye

Tel.: +90 212 414 21 61

E-posta: itfdergisi@istanbul.edu.tr

Yayıncı: İstanbul Üniversitesi Yayınevi

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

Tel.: +90 212 440 00 00

Faks: +90 212 217 22 92



# İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi

## AIMS SCOPE AND PUBLICATION STANDARDS

Journal of Istanbul Faculty of Medicine (J Ist Faculty Med) an international, scientific, open access periodical published in accordance with independent, unbiased, and double-blinded peer-review principles. The journal is the official publication of Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine and it is published quarterly on January, April, July and October. The publication languages of the journal are English and Turkish.

Journal of Istanbul Faculty of Medicine (J Ist Faculty Med) aims to contribute to the literature by publishing manuscripts at the highest scientific level on all fields of medicine. The journal publishes original experimental and clinical research articles, reports of rare cases, reviews articles by invited researchers who have a reputable place in the international literature in their field, and letters to the editors as well as brief reports on a recently established method or technique or preliminary results of original studies related to all disciplines of medicine from all countries.

The journal's target audience includes researchers, physicians and healthcare professionals who are interested or working in all medical disciplines.

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

Journal of Istanbul Faculty of Medicine is currently indexed in Web of Science-Emerging Sources Citation Index and TUBITAK ULAKBIM TR Index.

Processing and publication are free of charge with the journal. No fees are requested from the authors at any point throughout the evaluation and publication process.

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

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

All published content is available online, free of charge.

Editor: Birsen Karaman

Address: Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine Deanery, Turgut Özal Cad. 34093, Çapa, Fatih, Istanbul, Turkey

Phone: +90 212 414 21 61

E-mail: itfdergisi@istanbul.edu.tr

Publisher: Istanbul University Press

Address: İstanbul Üniversitesi Merkez Kampüsü, 34452 Beyazıt, Fatih / İstanbul - Turkey

Phone: +90 212 440 00 00

## YAZARLARA BİLGİ

İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi (İst Tıp Fak Derg); bağımsız, önyargısız ve çift-kör hakemlik ilkeleri çerçevesinde yayın yapan İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi'nin uluslararası ve açık erişimli bilimsel yayın organıdır. Dergi Ocak, Nisan, Temmuz ve Ekim aylarında olmak üzere üç ayda bir yayınlanır ve dört sayıda bir cildi tamamlanır. Yayın dili İngilizce ve Türkçe'dir.

İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi (İst Tıp Fak Derg), tıbbın tüm alanlarında klinik ve deneysel özgün araştırmalar, ender görülebilecek olgu sunumları, kendi alanında uluslararası literatürde saygın bir yere sahip davetli araştırmacıların yaptığı derleme makaleleri ve editöre mektuplar yayınlamaktadır. Orijinal metot geliştirme, yeni bir girişim tekniği ve orijinal çalışmaların ön sonuçlarını içeren kısa raporlara da dergide yer verilmektedir.

## EDİTÖRYAL POLİTİKALAR VE HAKEM SÜRECİ

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

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

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

Klinik ve deneysel çalışmalar, ilaç araştırmaları ve bazı olgu sunumları için World Medical Association Declaration of Helsinki "Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects", (amended in October 2013, www.wma.net) çerçevesinde hazırlanmış Etik Komisyon raporu gerekmektedir. Gerekli görülmesi halinde Etik Komisyon raporu veya eşdeğeri olan resmi bir yazı yazarlardan talep edilebilir. İnsanlar üzerinde yapılmış deneysel çalışmaların sonuçlarını bildiren yazılarda, çalışmanın yapıldığı kişilere uygulanan prosedürlerin niteliği tümüyle açıklandıktan sonra, onaylarının alındığına ilişkin bir açıklamaya metin içinde yer verilmelidir. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda ise ağrı, acı ve rahatsızlık verilmemesi için yapılmış olanlar açık olarak makalede belirtilmelidir. Hasta isimleri, Etik Kurul raporunun alındığı kurumun adı, onay belgesinin numarası ve tarihi ana metin dosyasında yer alan Gereç ve Yöntem başlığı altında yazılmalıdır. Hastaların kimliklerinin gizliliğini korumak yazarların sorumluluğundadır. Hastaların kimliğini açığa çıkarabilecek fotoğraflar için hastadan ya da yasal temsilcilerinden alınan imzalı izinlerin de gönderilmesi gereklidir.

Bütün makalelerin benzerlik tespiti denetimi, iThenticate yazılımı aracılığıyla yapılmaktadır.

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

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

ICMJE, yazarların aşağıdaki 4 koşulu karşılamasını önermektedir:

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



## YAZARLARA BİLGİ

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

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

Yazarlık haklarına uygun hareket etmek ve hayalet ya da lütuf yazarlığın önlenmesini sağlamak amacıyla sorumlu yazarlar makale yükleme sürecinde <http://jmed.istanbul.edu.tr/tr/content/makale-gonderme-kilavuzu/makale-gonderme-kilavuzu> adresinden erişilebilen Yazar Katkı Formu'nu imzalamalı ve taranmış versiyonunu yazıyla birlikte göndermelidir. Yayın Kurulu'nun gönderilen bir makalede "lütuf yazarlık" olduğundan şüphelenmesi durumunda söz konusu makale değerlendirme yapılmaksızın reddedilecektir. Makale gönderimi kapsamında; sorumlu yazar makale gönderim ve değerlendirme süreçleri boyunca yazarlık ile ilgili tüm sorumluluğu kabul ettiğini bildiren kısa bir ön yazı göndermelidir.

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

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

Derginin Yayın Kurulu, itiraz ve şikayet vakalarını, COPE rehberleri kapsamında işleme almaktadır. Yazarlar, itiraz ve şikayetleri için doğrudan Yayıncılık Birimi ile temasa geçebilirler. İhtiyaç duyulduğunda Yayın Ku-

ru'nun kendi içinde çözemediği konular için tarafsız bir temsilci atanmaktadır. İtiraz ve şikayetler için karar verme süreçlerinde nihai kararı Baş Editör verecektir.

İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi her makalenin <http://jmed.istanbul.edu.tr/tr/content/makale-gonderme-kilavuzu/makale-gonderme-kilavuzu> adresinden erişebileceğiniz Telif Hakkı Devir Formu ile beraber gönderilmesini talep eder. Yazarlar, basılı ya da elektronik formatta yer alan resimler, tablolar ya da diğer her türlü içerik dahil daha önce yayınlanmış içeriği kullanırken telif hakkı sahibinden izin almalıdırlar. Bu konuda ki yasal, mali ve cezai sorumluluk yazarlara aittir.

Dergide yayınlanan makalelerde ifade edilen görüşler ve fikirler İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi Editör, Editör Yardımcıları, Yayın Kurulu ve Yayıncısının değil, yazar(lar)ın bakış açılarını yansıtır. Editör, Editör Yardımcıları, Yayın Kurulu ve Yayıncı bu gibi durumlar için hiç bir sorumluluk ya da yükümlülük kabul etmemektedir. Yayınlanan içerik ile ilgili tüm sorumluluk yazarlara aittir.

## MAKALE HAZIRLAMA

Makaleler, ICMJE-Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals (updated in December 2015 - <http://www.icmje.org/icmje-recommendations.pdf>) ile uyumlu olarak hazırlanmalıdır. Randomize çalışmalar CONSORT, gözlemsel çalışmalar STROBE, tanısallık değerli çalışmalar STARD, sistematik derleme ve meta-analizler PRISMA, hayvan deneyli çalışmalar ARRIVE ve randomize olmayan davranış ve halk sağlığıyla ilgili çalışmalar TREND kılavuzlarına uyumlu olmalıdır.

Makaleler sadece <http://jmed.istanbul.edu.tr/tr/content/makale-gonderme-kilavuzu/makale-gonderme-kilavuzu> adresinde yer alan derginin online makale yükleme ve değerlendirme sistemi üzerinden gönderilebilir. Diğer mecralardan gönderilen makaleler değerlendirilmeye alınmayacaktır.

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

## YAZARLARA BİLGİ

Yazarların; Telif Hakkı Devir Formu, Yazar Formu ve IC-MJE Potansiyel Çıkar Çatışmaları Formu'nu (bu form, tüm yazarlar tarafından doldurulmalıdır) ilk gönderim sırasında online makale sistemine yüklemeleri gerekmektedir. Bu formlara <http://jmed.istanbul.edu.tr/tr/content/makale-gonderme-kilavuzu/makale-gonderme-kilavuzu> adresinden erişilebilmektedir.

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

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

**Özet:** Editöre Mektup türündeki yazılar dışında kalan tüm makalelerin İngilizce ve Türkçe özetleri olmalıdır. Özgün Araştırma makalelerinin özetleri "Amaç", "Gereç ve Yöntem", "Bulgular" ve "Sonuç" alt başlıklarını içerecek biçimde hazırlanmalıdır. Olgular sunumu ve derleme türündeki yazıların Özet bölümleri alt başlık içermemelidir.

**Anahtar sözcükler:** Tüm makaleler en az 3 en fazla 6 anahtar kelimeyle birlikte gönderilmeli, anahtar sözcükler özetin hemen altına yazılmalıdır. Kısaltmalar anahtar sözcük olarak kullanılmamalıdır. Anahtar söz-

cükler National Library of Medicine (NLM) tarafından hazırlanan Medical Subject Headings (MeSH) veritabanından seçilmelidir.

### Makale Türleri

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

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

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

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

**Davetli derleme:** Yazının konusunda birikimi olan ve bu birikimleri uluslararası literatüre yayın ve atıf sayısı olarak yansıtmış uzmanlar tarafından hazırlanmış davetli yazılar değerlendirmeye alınır. Bir bilgi ya da konunun klinikte kullanılması için vardığı son düzeyi anlatan, tartışan, değerlendiren ve gelecekte yapılacak

**Tablo 1.** Makale türleri için kısıtlamalar

Makale türü	Sözcük limiti	Özet sözcük limiti	Kaynak limiti	Tablo limiti	Resim limiti
Özgün Araştırma	3500	250 (Alt başlıklı)	50	6	7 ya da toplamda 15 görsel
Davetli Derleme	5000	250	50	6	10 ya da toplamda 20 görsel
Olgular Sunumu	1000	200	15	Tablo yok	10 ya da toplamda 20 görsel
Editöre Mektup	500	Uygulanamaz	5	1	1

## YAZARLARA BİLGİ

olan çalışmalara yön veren bir formatta hazırlanmalıdır. Ana metin "Giriş", "Klinik ve Araştırma Etkileri" ve "Sonuç" bölümlerini içermelidir. Davetli Derleme türündeki yazılarla ilgili kısıtlamalar için lütfen Tablo 1'i inceleyiniz.

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

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

### Tablolar

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

### Resim ve resim altyazıları

Resimler, grafikler ve fotoğraflar (TIFF ya da JPEG formatında) ayrı dosyalar halinde sisteme yüklenmelidir. Görseller bir Word dosyası dokümanı ya da ana doküman içerisinde sunulmamalıdır. Alt birimlere ay-

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

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

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

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

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

### REVİZYONLAR

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

## YAZARLARA BİLGİ

munda uzatma taleplerini ilk 30 gün sona ermeden dergiye iletmeleri gerekmektedir.

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

## KAYNAKLAR

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

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

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

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

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

**Toplantıda sunulan yazı:** Bengissson S. Sothemin BG. Enforcement of data protection, privacy and se-

curity in medical informatics. In: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoff O, editors. *MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics*; 1992 Sept 6-10; Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992.p.1561-5.

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

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

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

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

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

## SON KONTROL LİSTESİ

- Editöre mektup
  - Makalenin türü
  - Başka bir dergiye gönderilmemiş olduğu bilgisi
  - Sponsor veya ticari bir firma ile ilişkisi (varsa belirtiniz)
  - İstatistik kontrolünün yapıldığı (araştırma makaleleri için)
  - İngilizce yönünden kontrolünün yapıldığı
  - Yazarlara Bilgide detaylı olarak anlatılan dergi politikalarının gözden geçirildiği
  - Kaynakların NLM referans sistemine göre belirtildiği



## YAZARLARA BİLGİ

- Telif Hakkı Anlaşması Formu
- Yazar Formu
- Daha önce basılmış materyal (yazı-resim-tablo) kullanılmış ise izin belgesi
- İnsan ögesi bulunan çalışmalarda "gereç ve yöntem" bölümünde Helsinki Deklarasyonu prensiplerine uygunluk, kendi kurumlarından alınan etik kurul onayının ve hastalardan "bilgilendirilmiş olur (rıza)" alındığının belirtilmesi
- Hayvan ögesi kullanılmış ise "gereç ve yöntem" bölümünde "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" prensiplerine uygunluğunun belirtilmesi
- Makale kapak sayfası
  - Makalenin kategorisi
  - Makalenin İngilizce ve Türkçe başlığı
  - Makalenin İngilizce ve Türkçe kısa başlığı
  - Yazarların ismi, soyadı, unvanları ve bağlı oldukları kurumlar (üniversite ve fakülte bilgisinden sonra şehir ve ülke bilgisi de yer almalıdır), e-posta adresleri
  - Sorumlu yazarın e-posta adresi, açık yazışma adresi, iş telefonu, GSM, faks nosu
  - Tüm yazarların ORCID'leri
- Makale ana metni dosyasında olması gerekenler
  - Makalenin İngilizce ve Türkçe başlığı
  - Özetler 250 kelime İngilizce ve 250 kelime Türkçe, (olgu sunumunda 200 kelime İngilizce ve 200 kelime Türkçe)
  - Anahtar Kelimeler: 3 -6 İngilizce ve 3 -6 Türkçe
  - Makale ana metin bölümleri
  - Kaynaklar
  - Finansal destek (varsa belirtiniz)
  - Çıkar çatışması (varsa belirtiniz)
  - Teşekkür (varsa belirtiniz)
  - Tablolar-Resimler, Şekiller (başlık, tanım ve alt yazılılarıyla)

Editör: Birsen Karaman

Adres: İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi  
Dekanlığı, Turgut Özal Cad. 34093 Çapa, Fatih,  
İstanbul, Türkiye

Telefon: +90 212 414 21 61

E-mail: itfdergisi@istanbul.edu.tr

Yayıncı: İstanbul Üniversitesi Yayınevi

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

Tel.: +90 212 440 00 00

Faks: +90 212 217 22 92



## INSTRUCTION TO AUTHORS

Journal of Istanbul Faculty of Medicine (J Ist Faculty Med) is an international, scientific, open access periodical published in accordance with independent, unbiased, and double-blinded peer-review principles. The journal is the official publication of Istanbul Faculty of Medicine of Istanbul University and it is published quarterly on January, April, July and October. The publication languages of the journal are English and Turkish.

Journal of Istanbul Faculty of Medicine (J Ist Faculty Med) aims to contribute to the literature by publishing manuscripts at the highest scientific level on all fields of medicine. The journal publishes original experimental and clinical research articles, reports of rare cases, reviews articles by invited researchers who have a reputable place in the international literature in their field, and letters to the editors as well as brief reports on a recently established method or technique or preliminary results of original studies related to all disciplines of medicine from all countries.

## EDITORIAL POLICIES AND PEER REVIEW PROCESS

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

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

with detailed information on the organization, including the name, date, and location of the organization.

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

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

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

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



## INSTRUCTION TO AUTHORS

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

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

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

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

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

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

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

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

Journal of Istanbul Faculty of Medicine requires each submission to be accompanied by a Copyright Transfer Form (available for download at <http://jmed.istanbul.edu.tr/en/content/manuscript-submission-guide/manuscript-submission-guide>). When using previously published content, including figures, tables, or any other material in both print and electronic formats, authors must obtain permission from the copyright holder. Legal, financial and criminal liabilities in this regard belong to the author(s).

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

## INSTRUCTION TO AUTHORS

### MANUSCRIPT PREPARATION

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

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

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

Authors are required to submit the following:

- Copyright Transfer Form,
- Author Form and ICMJE Potential Conflict of Interest Disclosure Form (should be filled in by all contributing authors) during the initial submission. These forms are available for download at <http://jmed.istanbul.edu.tr/en/content/manuscript-submission-guide/manuscript-submission-guide>

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

- The full title of the manuscript as well as a short title (running head) of no more than 50 characters,

- Name(s), affiliations, highest academic degree(s) and ORCID ID(s) of the author(s),
- Grant information and detailed information on the other sources of support,
- Name, address, telephone (including the mobile phone number) and fax numbers, and email address of the corresponding author,
- Acknowledgment of the individuals who contributed to the preparation of the manuscript but who do not fulfil the authorship criteria.

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

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

### Manuscript types

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

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



## INSTRUCTION TO AUTHORS

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

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

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

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

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

### Tables

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

### Figures and figure legends

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

**Table 1.** Limitations for each manuscript type

Type of manuscript	Word limit	Abstract word limit	Reference limit	Table limit	Figure limit
Original Article	3500	250 (Structured)	50	6	7 or total of 15 images
Invited Review Article	5000	250	50	6	10 or total of 20 images
Case Report	1000	200	15	No tables	10 or total of 20 images
Technical Note	1500	No abstract	15	No tables	10 or total of 20 images
Letter to the Editor	500	No abstract	5	1	1



## INSTRUCTION TO AUTHORS

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

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

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

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

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

## REVISIONS

When submitting a revised version of a paper, the author must submit a detailed "Response to the reviewers" that states point by point how each issue

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

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

## REFERENCES

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

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

**Book section:** Suh KN, Keystone JS. Malaria and babesiosis. Gorbach SL, Barlett JG, Blacklow NR,

## INSTRUCTION TO AUTHORS

editors. Infectious Diseases. Philadelphia: Lippincott Williams; 2004.p.2290-308.

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

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

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

**Scientific or technical report:** Cusick M, Chew EY, Hoogwerf B, Agrón E, Wu L, Lindley A, et al. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Risk factors for renal replacement therapy in the Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS), Early Treatment Diabetic Retinopathy Study KidneyInt: 2004. Report No: 26.

**Thesis:** Yılmaz B. Ankara Üniversitesindeki Öğrencilerin Beslenme Durumları, Fiziksel Aktivitelerive Beden Kitle İndeksleri Kan Lipidleri Arasındaki İlişkiler. H.Ü. SağlıkBilimleriEnstitüsü, DoktoraTezi. 2007.

**Manuscripts accepted for publication, not published yet:** Slots J. The microflora of black stain on human primary teeth. Scand J Dent Res. 1974.

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

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

## SUBMISSION CHECKLIST

- Cover letter to the editor
  - The category of the manuscript
  - Confirming that "the paper is not under consideration for publication in another journal".
  - Including disclosure of any commercial or financial involvement.
  - Confirming that the statistical design of the research article is reviewed.
  - Confirming that last control for fluent English was done.
  - Confirming that journal policies detailed in Information for Authors have been reviewed.
  - Confirming that the references cited in the text and listed in the references section are in line with NLM.
- Copyright Agreement Form
- Author Form
- Permission of previous published material if used in the present manuscript
  - Acknowledgement of the study "in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional and national) and with the Helsinki Declaration.
  - Statement that informed consent was obtained after the procedure(s) had been fully explained. Indicating whether the institutional and national guide for the care and use of laboratory animals was followed as in "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals".
- Title page
  - The category of the manuscript
  - The title of the manuscript both in Turkish and in English
  - Short title (running head) both in Turkish and in English
  - All authors' names and affiliations (institution, faculty/department, city, country), e-mail addresses
  - Corresponding author's email address, full postal address, telephone and fax number
  - ORCIDs of all authors.



## INSTRUCTION TO AUTHORS

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

Editor: Birsen Karaman

Address: Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine Deanery, Turgut Özal Cad. 34093, Çapa,

Fatih, Istanbul, Turkey

Phone: +90 212 414 21 61

E-mail: itfdergisi@istanbul.edu.tr

Publisher: Istanbul University Press

Address: İstanbul Üniversitesi Merkez Kampüsü,  
34452 Beyazıt, Fatih / İstanbul - Turkey

Phone: +90 212 440 00 00

## İÇİNDEKİLER/CONTENTS

### ARAŞTIRMA/RESEARCH

- 287 SEVERE ACUTE RESPIRATORY SYNDROME CORONAVIRUS-2 ANTIGENS AND ANTIBODIES IN BREAST MILK**  
*ANNE SÜTÜNDE SARS-COV-2 ANTİJENİ VE ANTİKORU*  
Gonca KESKİNDEMİRCİ, Nalan KARABAYIR, Ayşe İSTANBULLU TOSUN, Selda HANÇERLİ TÖRÜN, Ceren Sultan ALTAY, Fatih SEBİRLİ, Özge KABA, Büşra Sultan KİBAR, Gülbin GÖKÇAY
- 293 EXPERIENCE IN CHILDREN IN THE COVID-19 PANDEMIC OF A TERTIARY CENTER, IN ISTANBUL**  
*İSTANBUL'DA ÜÇÜNCÜ BASAMAK BİR MERKEZİN COVID-19 PANDEMİSİNDE ÇOCUKLARDAKİ DENEYİMİ*  
Özge KABA, Mehpere SARI YANARTAŞ, Selda HANÇERLİ TÖRÜN, Kamala ALAKBAROVA, Zuhul BAYRAMOĞLU, Mustafa ÖNEL, Sevim Meşe, Ali AĞAÇFİDAN, Ayper SOMER
- 301 COVID-19 AND COLORECTAL SURGERY: LESSONS LEARNED FROM FIRST CASES**  
*COVID-19 VE KOLOREKTAL CERRAHİ: İLK VAKALARDAN ÖĞRENİLEN DERSLER*  
İlker ÖZGÜR, İrem KARATAŞ, Leman Damla ERCAN, Ali Fuat Kaan GÖK, Alpay MEDETALİBEYOĞLU, Murat KÖSE, Mehmet Türker BULUT, Metin KESKİN
- 307 THE ROLE OF TRACHEOTOMY IN WEANING FROM MECHANICAL VENTILATION IN PATIENTS WITH COVID-19**  
*COVID-19 HASTALARINDA MEKANİK VENTİLYASYONDAN AYRILMADA TRAKEOTOMİNİN ROLÜ*  
Levent AYDEMİR, Hakan KARA, Cömert ŞEN, Kadir Serkan ORHAN, Meryem Nesil KELEŞ TÜREL
- 311 COULD THE R-RATIO BE AN INDICATOR OF ACUTE LIVER INJURY FOR THE TREATMENT OF COVID-19?**  
*R-ORANI, COVID-19 TEDAVİSİNDE AKUT KARACİĞER HASARININ BİR GÖSTERGESİ OLABİLİR Mİ?*  
Yıldırım KAYACAN, Hayrullah YAZAR, Mehmet ÖZDİN
- 318 THE RELATIONSHIP BETWEEN sTREM-1 AND ACTIVATION OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASES**  
*İNFLAMMATUAR BARSAK HASTALIKLARI AKTİVASYONU İLE sTREM-1 ARASINDAKİ İLİŞKİ*  
Yasin KUTLU, İlkin Deniz TOPRAK, Yasemin GÖKDEN, Hasan ERUZUN, Yücel ARMAN, Şengül AYDIN YOLDEMİR, Zeki TOPRAK, Tufan TÜKEK
- 324 AN EVALUATION OF PATIENTS DIAGNOSED WITH OPTIC NEURITIS IN CHILDHOOD**  
*ÇOCUKLUK ÇAĞINDAKİ OPTİK NÖRİT TANILI HASTALARIN DEĞERLENDİRİLMESİ*  
Mahmut ASLAN, Serkan KIRIK, Serdal GÜNGÖR
- 331 GADOLINIUM RETENTION IN HUMANS: SURVEY OF RADIOLOGISTS AND IMPACT ON DAILY PRACTICE**  
*İNSANDA GADOLİNYUM BİRİKİMİ: RADYOLOJİ UZMANLARI VE KLİNİK UYGULAMALAR ÜZERİNDEKİ ETKİSİ*  
Mehmet Emin ADİN, David Mark YOUSEM
- 342 ASSESSMENT OF PAVLIK HARNESS EFFECTIVENESS IN 3-6 MONTHS OLD PATIENTS WITH UNSTABLE HIPS**  
*İNSTABİL KALÇAYA SAHİP, 3-6 AYLIK HASTALARIN TEDAVİSİNDE PAVLİK BANDAJI ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ*  
Tuna PEHLİVANOĞLU, Serkan BAYRAM, Mehmet DEMİREL, Mustafa Abdullah ÖZDEMİR, Yavuz SAĞLAM, Turgut AKGÜL, Fuat BİLGİLİ
- 348 RETROSPECTIVE ANALYSIS OF ALPHA GLOBIN COPY NUMBER VARIATIONS DETERMINED BY MLPA IN THE TRAKYA REGION**  
*TRAKYA BÖLGESİNDE MLPA İLE BELİRLENEN ALFA GLOBİN KOPYA SAYISI DEĞİŞİKLİKLERİNİN RETROSPEKTİF ANALİZİ*  
Selma DEMİR, Hakan GÜRKAN, Damla EKER, Sinem YALÇINTEPE, Emine İkbâl ATLI, Engin ATLI

## İÇİNDEKİLER/CONTENTS

### ARAŞTIRMA/RESEARCH

- 354** DOES SEVERE OBESITY EFFECT EARLY POSTOPERATIVE RECOVERY AND SURGICAL OUTCOMES IN PATIENTS UNDERGOING PERCUTANEOUS NEPHROLITHOTOMY UNDER SPINAL ANESTHESIA?  
*AĞIR OBEZİTE HASTALARIN SPİNAL ANESTEZİ ALTINDA PERKÜTAN NEFROLİTİTOMİ UYGULANMASI POSTOPERATİF ERKEN DÖNEM İYİLEŞME VE CERRAHİ SONUÇLARINI ETKİLER Mİ?*  
Ahmed Ömer HALAT, Muhammet İrfan DÖNMEZ, Murat GÖNEN, Ömer Erkam ARSLAN, Betül BAŞARAN
- 360** VITAMİN D DEFICIENCY DID NOT AUGMENT THE PROGRESSION OF HIGH-FRUCTOSE-INDUCED NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE IN RATS  
*VİTAMİN D EKSİKLİĞİ SIÇANLARDA ALKOLE BAĞLI OLMAYAN YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞININ PROGRESYONUNU ARTTIRMADI*  
İlknur BİNGÜL, Canan KÜÇÜKGERGİN, Abdurrahman Fatih AYDIN, Işın DOĞAN EKİCİ, Semra DOĞRU ABBASOĞLU, Müjdat UYSAL
- 369** TİP 2 DİYABETLİ HASTALARIN TEDAVİSİNDE KILAVUZLARA NE KADAR UYGUN HAREKET EDİYORUZ?  
*HOW DO WE FOLLOW THE GUIDELINES IN THE TREATMENT OF PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES?*  
İlkin Deniz TOPRAK, Özlem KANDEMİR ALİBAKAN, Betül KÖSTEK, Mehmet Alptekin ACAR, İpek Bilge ASLAN, Uğur YILMAZ, Hasan ERUZUN, Yücel ARMAN, Tufan TÜKEK
- 376** GEBELİKTE BESLENME DURUMU İLE GLUKOZ TOLERANSI ARASINDAKİ İLİŞKİLER  
*THE RELATIONSHIP BETWEEN NUTRITIONAL STATUS AND GLUCOSE TOLERANCE IN PREGNANCY*  
Merve YABACI, Cemile İDİZ, Fulya ÇALIKOĞLU, Atıl YÜKSEL, Beyhan ÖMER, Birsen DEMİREL, Emel ÖZER, İlhan SATMAN
- 386** OKUL ÖNCESİ ASTIMLI ÇOCUKLARDA YATMADAN ÖNCEKİ BESLENME: ÜST SOLUNUM YOLU SEMPTOMLARINI VE ASTİM KONTROLÜNÜ ETKİLER Mİ?  
*FEEDING BEFORE BEDTIME IN PRESCHOOL CHILDREN WITH ASTHMA: DOES IT AFFECT UPPER RESPIRATORY SYMPTOMS AND ASTHMA CONTROL?*  
Ayşe SÜLEYMAN, Esra ÖZEK YÜCEL, Zeynep HIZLI DEMİRKALE, Sevgi SİPAHİ ÇİMEN, Cevdet ÖZDEMİR, Zeynep TAMAY, Nermin GÜLER
- 396** İKİNCİ BASAMAK DEVLET HASTANESİ SAĞLIK KURULUNDA BİLİŞSEL DURUM DEĞERLENDİRMESİ YAPILAN ÇOCUKLARIN LABORATUVAR BULGULARI  
*LABORATORY FINDINGS OF CHILDREN ASSESSED IN RELATION TO COGNITIVE STATE BY THE HEALTH COMMITTEE OF A SECOND LEVEL STATE HOSPITAL*  
Fatma Gül DEMİRKAN, Şeyma KARATEKİN
- 402** OKÜLT HEPATİT B VİRÜSÜNÜN GENOTİP, SUBGENOTİP VE SUBTİP ANALİZİ  
*ANALYSIS OF GENOTYPE, SUBGENOTYPE AND SEROTYPE OF OCCULT HEPATITIS B VIRUS*  
Bülent ÇAKAL, Alp ATASOY, Bilger ÇAVUŞ, Aslı ÖRMECİ, Mehveş PODA, Mesut BULAKÇI, Mine GÜLLÜOĞLU, Mehmet Güven GÜNVER, Filiz AKYÜZ

### DERLEME/REVIEW

- 411** HISTORY OF PLASMA THERAPY: A CURRENTLY USED TREATMENT OPTION FOR COVID-19  
*PLAZMA TEDAVİSİNİN TARİHİ: COVID-19 ENFEKSİYONU İÇİN GÜNÜMÜZDE KULLANILMAKTA OLAN BİR TEDAVİ SEÇENEĞİ*  
Esra BİLİR, Emine Elif VATANOĞLU LUTZ, Ayşe Arzu AKALIN
- 415** HEMATOPOETİK KÖK HÜCRE İZOLASYONUNDA GÜNCEL YÖNTEMLER  
*CURRENT METHODS IN ISOLATION OF HEMATOPOIETIC STEM CELL*  
Nilgün OKŞAK, Dürdane Serap KURUCA

## İÇİNDEKİLER/CONTENTS

### DERLEME/REVIEW

- 425** **METASTATİK KOLON KANSERİ TEDAVİSİNDEKİ YENİLİKLER**  
*WHAT'S NEW IN METASTATIC COLON CANCER TREATMENT?*  
Senem KARABULUT, Mehmet KARABULUT, Didem TAŞTEKİN
- 430** **AYNA NÖRON SİSTEMİ VE FONKSİYONLARINA KLİNİK YAKLAŞIM**  
*A CLINICAL APPROACH TO THE MIRROR NEURON SYSTEM AND ITS FUNCTIONS*  
Emre HARI, Canberk CENGİZ, Ferhat KILIÇ, Ertan YURDAKOŞ

### OLGU SUNUMU/CASE REPORT

- 439** **TWO CASE REPORTS OF COVID-19 PATIENTS WITH CONCURRENT INTRACRANIAL HEMORRHAGE**  
*İki OLGU SUNUMU: İNTRAKRANİYAL KANAMANIN EŞLİK ETTİĞİ COVID-19 VAKALARI*  
Pınar VARGÜN, Musa KAYA
- 443** **MULTIPLE FRACTURES IN A SINGLE UPPER EXTREMITY: HUMERAL SHAFT, OLECRANON, DISTAL RADIUS AND FOURTH METACARPAL BONE FRACTURES IN AN ELDERLY PATIENT AFTER A FALL: A CASE REPORT**  
*BASİT DÜŞME SONRASI YAŞLI HASTADA AYNI TARAF EKSTREMİTEDE MULTİPL KIRIK; HUMERUS ŞAFT, OLEKRANON, DİSTAL RADİUS VE DÖRDÜNCÜ METAKARPAL KEMİK KIRIĞI-OLGU SUNUMU*  
Serkan BAYRAM, Lezgin MERT, Mehmet EKİNCİ, Turgut AKGÜL, İrfan ÖZTÜRK
- 448** **GIANT SIZED EXTRAVESICAL BLADDER LEIOMYOMA MIMICKING UTERINE CERVICAL LEIOMYOMA: A CASE REPORT WITH 8 YEARS' POSTOPERATIVE FOLLOW-UP AND A REVIEW OF THE LITERATURE**  
*UTERİN SERVİKAL LEİOMYOMU TAKLİT EDEN DEV EKSTRAVEZİKAL MESANE LEİOMYOMU: 8 YILLIK POSTOPERATİF TAKİBİ VE LİTERATÜRÜN GÖZDEN GEÇİRİLMESİ*  
Şebnem ALANYA TOSUN, Hamdullah SOZEN, Tzevat TEFİK, Ahmet Cem İYİBOZKURT, Yavuz SALİHOĞLU
- 454** **HİPO VE HİPERGLİSEMİNİN NADİR BİR NEDENİ; GLİKOJEN DEPO HASTALIĞI TİP 0: OLGU SUNUMU**  
*A RARE CAUSE OF BOTH HYPO AND HYPERGLYCEMIA; GLYCOGEN STORAGE DISEASE TYPE 0: A CASE REPORT*  
Meryem KARACA, Halil ASLAN

# SEVERE ACUTE RESPIRATORY SYNDROME CORONAVIRUS-2 ANTIGENS AND ANTIBODIES IN BREAST MILK

## ANNE SÜTÜNDE SARS-COV-2 ANTİJENİ VE ANTİKORU

Gonca KESKİNDEMİRÇİ<sup>1,2</sup>, Nalan KARABAYIR<sup>3</sup>, Ayşe İSTANBULLU TOSUN<sup>4</sup>, Selda HANÇERLİ TÖRÜN<sup>5</sup>, Ceren Sultan ALTAY<sup>6</sup>, Fatih SEBİRLİ<sup>6</sup>, Özge KABA<sup>5</sup>, Büşra Sultan KİBAR<sup>7</sup>, Gülbin GÖKÇAY<sup>8</sup>

<sup>1</sup>Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Department of Pediatrics, Division of Social Pediatrics, Istanbul, Turkey

<sup>2</sup>Istanbul University, Health Science Institute Child Health Institute, Social Pediatrics PhD Program, Istanbul, Turkey

<sup>3</sup>Istanbul Medipol University, International School of Medicine, Department of Pediatrics, Division of Social Pediatrics, Istanbul, Turkey

<sup>4</sup>Istanbul Medipol University, Faculty of Medicine, Department of Microbiology, Istanbul, Turkey

<sup>5</sup>Istanbul University Istanbul Faculty of Medicine, Department of Pediatrics, Division of Child Infection Diseases, Istanbul, Turkey

<sup>6</sup>Istanbul Medipol University, Faculty of Medicine, Department of Pediatrics, Istanbul, Turkey

<sup>7</sup>Yalova Government Hospital, Kocaeli, Turkey

<sup>8</sup>Istanbul University, Child Health Institute, Department of Social Pediatrics, Istanbul, Turkey

**ORCID IDs of the authors:** G.K. 0000-0003-1797-2802; N.K. 0000-0002-8003-1952; A.İ.T. 0000-0003-3952-1914; S.H.T. 0000-0002-3216-2413; C.S.A. 0000-0002-5439-192X; F.S. 0000-0001-6465-0449; Ö.K. 0000-0002-8381-3255; B.S.K. 0000-0002-6535-1034; G.G. 0000-0003-1042-0407

**Cite this article as:** Keskindemirci G, Karabayir N, Istanbulu Tosun A, Hancerli Torun S, Altay CS, Sebrili F, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 antigens and antibodies in breast milk. J Ist Faculty Med 2021;84(3):287-92. doi: 10.26650/IUITFD.2021.928835

### ABSTRACT

**Objective:** This study aimed to determine the presence of severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) antigens and IgM and IgG antibodies in breast milk of mothers diagnosed with Coronavirus disease-19 (COVID-19).

**Methods:** The study was conducted in 11 mother-child pairs. Breastfeeding mothers who were either positive according to a PCR test or those who were negative but had COVID symptoms were included in the study. Expressed milk was stored at -20/-80°C until analysis. Breastmilk SARS-CoV-2 antigens and IgM and IgG antibodies were measured. The infants were followed for at least 15 days.

**Results:** SARS-CoV-2 PCR tests using a nasopharyngeal swab was positive in 10 of 11 mothers. Nine mothers had symptoms of COVID-19. Breast milk samples were taken, on average, 15 days after symptom onset or a positive PCR result. SARS-CoV-2 PCR tests using a nasopharyngeal swab was positive in seven infants. The SARS-CoV-2 antigen was not detected in the breast milk of any of the mothers. However, SARS-CoV-2 IgG and IgM antibodies were detected in the breast milk of two mothers, who had a positive PCR test and experienced clinical symptoms. The children of these two mothers experienced no symptoms.

### ÖZET

**Amaç:** Koronavirüs hastalığı-19 (COVID-19) tanısı almış annelerin anne sütünde Şiddetli Akut Solunum Sendromu koronavirüs-2 (SARS-CoV-2) antijeni ile IgM ve IgG antikorlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışma 11 anne-çocuk çifti ile gerçekleştirildi. Çalışmaya PCR testine göre pozitif olan veya negatif olup ancak COVID semptomları olan emziren anneler dahil edildi. Sağlıklı anne sütü, analiz aşamasına kadar -20/-80°C'de saklandı. Anne sütü SARS-CoV-2 antijeni ve IgM ve IgG antikorları ölçüldü. Bebekler en az 15 gün takip edildi.

**Bulgular:** Nazofarengal sürüntüde SARS-CoV-2 PCR testleri 11 annenin 10'unda pozitif idi. Dokuz annede COVID-19 semptomları vardı. Annelerin semptomlarından veya pozitif PCR sonuçlarından ortalama 15 gün sonra anne sütü örneği alındı. Nazofarengal sürüntü testlerinde SARS-CoV-2 PCR testleri 11 anne bebeğinin 7'sinde pozitif idi. SARS-CoV-2 antijeni hiçbir annenin anne sütünde saptanmadı. Ancak PCR testi pozitif olan ve klinik semptomlar yaşayan iki annenin sütünde SARS-CoV-2 IgG ve IgM antikorları tespit edildi. Bu iki annenin çocukları hiçbir belirti göstermedi.

**Corresponding author/İletişim kurulacak yazar:** keskindemirci@hotmail.com

**Submitted/Başvuru:** 28.04.2021 • **Accepted/Kabul:** 09.05.2021 • **Published Online/Online Yayın:** 17.05.2021



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



**Conclusion:** Official institutions have recommended and supported breastfeeding during the SARS-CoV-2 pandemic. Our findings support this recommendation. The promotion and protection of breastfeeding under emergency conditions is of great importance for the health of children, mothers, and society.

**Keywords:** Breast milk, COVID-19, breastfeeding

**Sonuç:** SARS-CoV-2 salgınında resmi kurumlar tarafından emzirme tavsiye edilmiş ve desteklenmiştir. Bulgularımız bu öneriyi desteklemektedir. Emzirmenin acil koşullarda teşviki ve korunması, çocuğun, annenin ve toplumun sağlığı açısından çok önemlidir.

**Anahtar Kelimeler:** Anne sütü, COVID-19, emzirme

## INTRODUCTION

Coronavirus disease-19 (COVID-19) is caused by a severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2), which first emerged in China in December 2019, and was declared as a pandemic by the World Health Organization (WHO) in March 2020 (1, 2). The disease has been reported to be mild in children (3). At the start of the pandemic, a negative opinion on breastfeeding was reported by a group of experts in China (4). Nevertheless, the importance of continuing breastfeeding was emphasized by official institutions dealing with child health, and breastfeeding has continued to be promoted during the COVID-19 pandemic (5). Current information suggests that the virus is transmitted via respiratory droplets (6). There is currently no study that has reported transmission via breast milk, and the WHO has highlighted that active COVID-19 transmission through breast milk has not been demonstrated (7). Given the short- and long-term benefits of breastfeeding for the mother and child, the well-documented antimicrobial properties and immune-enhancing structure of breast milk, the epidemiological data on respiratory viruses (e.g., SARS-CoV-2, Middle East respiratory syndrome coronavirus, and influenza), and evaluations based on recent publications, it is important to protect and maintain breastfeeding during the epidemic (8, 9).

In this study, we aimed to investigate the presence of virus antigens and immunoglobulin M (IgM) and immunoglobulin-G (IgG) antibodies against SARS-CoV-2 in breast milk of mothers diagnosed with COVID-19. Our findings will contribute to the development of national and global evidence-based guidelines and provide valuable epidemiological data.

## MATERIAL AND METHOD

This cross-sectional, descriptive study was conducted in Istanbul University Istanbul Faculty of Medicine and Istanbul Medipol University International School of Medicine between June 15, 2020 and August 30, 2020. Lactating mothers who tested positive for SARS-CoV-2 using a nasopharyngeal swabs (NS) polymerase chain reaction (PCR) test, who were symptomatic or asymptomatic and had received or were receiving treatment, and those who had COVID-19-like symptoms but tested negative for SARS-CoV-2 based on a NS PCR test and had received or were receiving treatment were included in the study.

Mothers were given specific instructions on how to express milk. They were asked to wash their hands for at least 20 seconds and clean their breasts with water and soap before expression. Milk stream was initiated by manual expression, and approximately the first 3 mL were discarded to obtain a midstream breast milk sample (10). At least 10 mL of milk was obtained and stored in milk storage sterile containers. Breast milk samples were stored at -20°C or below until analysis.

Mode of delivery, mothers' SARS-CoV-2 NS PCR test results, mothers' clinical symptoms, treatment received for COVID-19, day milk expressed after diagnosis, children's age, children's NS PCR results, children's symptoms, presence of SARS-CoV-2 antigen in breast milk, presence of SARS-CoV-2 IgM and IgG antibodies in breast milk, and follow-up period after milk supply were recorded. The infants of the mothers, whose breast milk samples were collected within the first 15 days of diagnosis, were followed for at least 15 days. Retrospective information was collected on the children of the mothers, who had recovered or completed treatment.

The stored breast milk samples were thawed at room temperature and analyzed for the presence of SARS-CoV-2 antigens using COVID-19 Ag FIA (Standard F-Sd Biosensor, Republic of Korea; fluorescent immunoassay to detect SARS-CoV-2) and SARS-CoV-2 antibodies using COVID-19 IgM/IgG Combo FIA (Standart F-Sd Biosensor, Republic of Korea).

The study was approved by the ethics committee of Medipol University (Date: 10.16.2020, No: 457), and the Turkish Ministry of Health was informed. All mothers gave informed consent to participate in the study. The study was supported by Savaş Medical Company.

## RESULTS

The study was carried in 11 child-mother pairs. NS PCR tests showed that 10 of the 11 mothers were positive for SARS-CoV-2, and nine mothers had symptoms. Eight infants were born by cesarean section and three were born by spontaneous vaginal delivery. Three of the 11 mothers were not receiving or had not received any treatment for COVID-19, four had completed treatment, and four were still receiving treatment. Seven mothers had received only hydroxychloroquine as treatment, and one was receiving hydroxychloroquine and lopinavir-ritonavir treat-

**Table 1:** SARS-CoV-2 PCR, antigen and antibody results of mother-child pairs and breast milk

Mother-Child pair (no)	SARS-CoV-2 PCR result of mother *	Symptoms of mother	Breastmilk milk sample collecting time**	Age of child (day)	SARS-CoV-2 PCR result of child*	Symptoms of child	SARS-CoV-2 antigen in breastmilk	SARS-CoV-2 IgM antibody in breastmilk	SARS-CoV-2 IgG antibody in breastmilk
1	Positive	+	4	4	Not done	-	Negative	Negative	Negative
2	Positive	+	3	59	Positive	-	Negative	Negative	Negative
3	Positive	-	2	16	Positive	+	Negative	Negative	Negative
4	Positive	+	15	47	Positive	-	Negative	Positive	Positive
5	Positive	+	11	14	Negative	-	Negative	Negative	Negative
6	Positive	-	2	3	Negative	+	Negative	Negative	Negative
7	Positive	+	3	252	Positive	+	Negative	Negative	Negative
8	Positive	+	24	70	Negative	-	Negative	Negative	Negative
9	Positive	+	60	475	Positive	-	Negative	Negative	Negative
10	Negative	+	24	38	Positive	+	Negative	Negative	Negative
11	Positive	+	31	142	Positive	-	Negative	Positive	Positive

\*in nasofarengal swab, \*\*after the diagnosis of mother with COVID-19

ment. Breast milk samples were collected, on median, 11 days (range 2–60 days) after diagnosis of COVID-19. Samples were collected within the first 15 days of the disease in seven mothers (five samples were collected in the first five days). Infants (n=7) were followed up for at least 15 days. Retrospective information about the history of the children (n=4), whose mothers had recovered or completed treatment, were collected. The median age of children was 47 days (range 3–475 days). NS PCR tests showed that seven children were positive for SARS-CoV-2. Four had symptoms and two were hospitalized and received treatment. SARS-CoV-2 antigens were not identified in the breast milk of any of the mothers. SARS-CoV-2 IgM and IgG antibodies were positive in milk samples of two mothers. All children were breastfed throughout the study period. Findings are summarized in Table 1.

**Mother-child pair 1:** The NS PCR test showed the mother was positive for SARS-CoV-2, and she displayed COVID-19 symptoms. The infant had no symptoms. The breast milk sample was collected four days after the mother was diagnosed with COVID-19. The infant was followed up for one month. No additional problems were observed during the follow-up period. There were no other cases with a positive PCR test in the household.

**Mother-child pair 2:** The NS PCR test showed the mother was positive for SARS-CoV-2, and she displayed COVID-19 symptoms. The NS PCR test result of the infant was also positive, but they showed no symptoms. The breast milk sample was collected three days after the mother was diagnosed with COVID-19. The grandparents in the same household both tested positive for SARS-CoV-2 following a PCR test. The infant was followed up for 15 days and no additional problems were observed during the follow-up period

**Mother-child pair 3:** The NS PCR test showed the mother was positive for SARS-CoV-2, but she showed no COVID-19 symptoms. The NS PCR test result of the infant was also positive and he experienced fever. The breast milk sample was collected two days after the mother was diagnosed with COVID-19. The child was hospitalized in the neonatal intensive care unit for 10 days and received antibiotics for sepsis. The father and brother also tested positive for SARS-CoV-2. The infant was discharged from hospital after 15 days and made a full recovery.

**Mother-child pair 4:** The NS PCR test showed the mother was positive for SARS-CoV-2, and she displayed COVID-19 symptoms. The NS PCR test results of the infant were also positive but showed no symptoms. The child was followed up in the hospital without treatment. The breast milk sample was collected 15 days after the mother was diagnosed with COVID-19. Although antigens were not detected, SARS-CoV-2 IgG and IgM antibodies were present in the breast milk. The father and

two brothers in the same household had positive PCR test results. The infant was followed up for 45 days and had no problems during the follow-up period.

**Mother-child pair 5:** The NS PCR test showed the mother was positive for SARS-CoV-2, and she displayed COVID-19 symptoms. The NS PCR test showed the infant was negative, and they showed no symptoms. The breast milk sample was collected 11 days after the mother was diagnosed with COVID-19. The father in the same household tested positive for SARS-CoV-2. The infant was followed up for 15 days and no problems were observed during the follow-up period.

**Mother-child pair 6:** The NS PCR test showed the mother was positive for SARS-CoV-2, but she showed no COVID-19 symptoms. The NS PCR test results of the infant were negative for SARS-CoV-2 but was kept under observation for suspected fever. Because no fever was observed during follow-up and acute phase reactants were negative, the infant was discharged without treatment. The breast milk sample was collected two days after the mother was diagnosed with COVID-19. The father in the same household tested positive for SARS-CoV-2. The infant was followed up for one month and no additional problems were observed during the follow-up period.

**Mother-child pair 7:** The NS PCR test showed the mother was positive for SARS-CoV-2, and she experienced COVID-19 symptoms. The NS PCR test result of the infant was also positive for SARS-CoV-2 PCR and was kept under observation without treatment, but no fever was detected. The breast milk sample was collected three days after the mother's COVID-19 diagnosis. The father and grandmother in the same household were index cases who had positive PCR tests. The infant was followed up for 15 days and no problems were observed during the follow-up period.

**Mother-child pair 8:** The NS PCR test showed the mother was positive for SARS-CoV-2, and she displayed COVID-19 symptoms. The NS PCR test result of the infant was negative and they showed no symptoms. The father and grandmother in the same household also tested positive for SARS-CoV-2. The breast milk sample was collected 24 days after the mother was diagnosed with COVID-19. Based on history of the infant, no problems developed.

**Mother-child pair 9:** The NS PCR test showed the mother was positive for SARS-CoV-2, and she showed COVID-19 symptoms. The NS PCR test result of the child was positive, but the child had no symptoms. The father in the same household was an index case who had a positive PCR test result. The breast milk sample was collected 60 days after the mother's COVID-19 diagnosis. The history of the child indicated no problems.

**Mother-child pair 10:** The NS PCR test showed the mother was negative for SARS-CoV-2, but she experienced COVID-19 symptoms. The infant was hospitalized for 10 days in the newborn intensive care unit because of a positive NS PCR test result and fever and was discharged on day 14 and made a full recovery. The aunt and cousin in the same household both tested positive for SARS-CoV-2. The breast milk sample was collected 24 days after the mother's COVID-19 diagnosis. The history of infant indicated no additional problems following discharge from the hospital.

**Mother-child pair 11:** The NS PCR test showed the mother was positive for SARS-CoV-2, and she displayed COVID-19 symptoms. The NS PCR test results of the infant were positive, no symptom was observed. The breast milk sample was collected 31 days after the mother's COVID-19 diagnosis. Although antigens were not present, SARS-CoV-2 IgG and IgM antibodies were detected in the breast milk. The father and brother in the same household tested positive for SARS-CoV-2. The history of the child indicated no additional problems.

## DISCUSSION

Our study investigated the breast milk and breastfed children of mothers who have been followed with the diagnosis of COVID-19. Using a rapid antigen test, no SARS-CoV-2 antigens were identified in breast milk samples of mothers who tested positive for SARS-CoV-2 or who tested negative for SARS-CoV-2 but experienced clinical symptoms. However, SARS-CoV-2 IgG and IgM antibodies were both detected in two breast milk samples. All mothers continued to breastfeed their babies despite testing positive for SARS-CoV-2 or having symptoms (in those with a negative PCR test result). This is the first study investigating SARS-CoV-2 in breast milk using a rapid antigen test.

The antiinfection properties of breast milk have been reemphasized by our findings. Antibodies (particularly secretory IgA), soluble components, cellular components, and bioactive factors, such as microorganisms, have an important role in the antiinfection properties of breast milk (10). Chan et al. also suggested that lactoferrin found in breast milk has a protective effect against COVID-19 (11).

In a study on the transmission of the virus via breast milk, a nucleic acid test of breast milk showed a positive presence of the virus, though contamination could not be ruled out (12). In our study, measures were taken to prevent contamination. The virus was not identified in the breast milk of any of the mothers despite 10 of 11 mothers testing positive for SARS-CoV-2, which demonstrated that the virus is not transmitted by breast milk.

In our study, the presence of SARS-CoV-2 in breast milk was investigated using a rapid antigen test. There are currently two different diagnostic tests for SARS-CoV-2: molecular and antigen tests. Genetic material is detected by molecular tests, which are known as PCR tests. The process takes several hours to several days to obtain results. In contrast, antigen tests detect specific proteins belonging to the virus and produce results in less than an hour. Although PCR tests are specific and sensitive, antigen tests have been reported to perform best in cases with a high viral load and within five days from symptom onset. Moreover, they are less sensitive compared to molecular tests but their specificity is high. Rapid antigen tests are easy to use, economical, and faster at obtaining results (13-15). In our study, five of the 11 mothers' breast milk samples were collected in the first five days after diagnosis, and of these, three had symptoms. Although milk was obtained earlier in five mothers, no antigens were detected. In previous studies, PCR tests have been used to determine the presence of SARS-CoV-2 virus in breast milk. To the best of our knowledge, this is the first study to investigate the presence of SARS-CoV-2 in breast milk using an antigen test.

Although no SARS-CoV-2 antigens were identified in any of the breast milk samples, SARS-CoV-2 antibodies were positive in two breast milk samples. In a study by Demers-Mathieu et al. antibodies against SARS-CoV-2 S1 and S2 subunits and nucleocapsid were detected in breast milk, and the authors emphasized that these antibodies would protect the child (16). In a study by Gao et al. that involved 14 mothers who had received treatment for COVID-19 and had recovered without sequelae, no nucleic acid belonging to SARS-CoV-2 was identified in their breast milk, and neutralizing antibodies targeting SARS-CoV-2 were observed in the breast milk of three mothers (17). In addition, Dong et al. reported the presence of IgG and IgA antibodies but no SARS-CoV-2 detection in the breast milk of a mother (18). Deeks et al. reported that IgG, IgM, and IgA antibody positivity in breast milk had low sensitivity in the first week following the onset of COVID-19 symptoms in mothers, whereas sensitivity gradually increased in the second week and reached the highest level in the third week. They showed that the probability of detecting IgM and IgG antibodies together was 30.1% on days 1-7, 72.2% on days 8-14, and 91.4% on days 15-21 (19). In our study, breast milk samples were collected on median, 11 days following the onset of symptoms. We speculate that the identification of antibodies in the two breast milk samples was associated with the time of sample collection.

The mothers participating in the study were informed about the continuation of breastfeeding in light of official recommendations and epidemiological data, and continuation of breastfeeding was ensured under preventive measures, and no problems were observed. Our findings

support the recommendation that women infected with COVID-19 should be encouraged to continue breastfeeding, given the evidence for the protective effects of breastfeeding on the health of the mother and child.

In our study, eight mothers had received or were receiving treatment for COVID-19. Mothers receiving treatment for COVID-19 were informed that current treatment did not pose an obstacle for breastfeeding in light of scientific data, and all continued to breastfeed (20).

The absence of a control group in our study is a limitation. However, our aim was to evaluate the presence of the virus in the breast milk of infected mothers and examine the effect on children. The low sample size, the use of an antigen test with low sensitivity, and not investigating IgA antibodies are also limitations. Nevertheless, our findings provide important contributions regarding the epidemiology of SARS-CoV-2 in breast milk.

In conclusion, our results indicated that there is no virus transmission via breast milk, and no problems were observed among children who had been breastfed by mothers who were diagnosed with COVID-19. As stated by the WHO, United Nations Children's Fund, and numerous other official health organizations in Turkey, breastfeeding should be maintained and encouraged even under extraordinary conditions, given the short- and long-term benefits for the mother and child.

---

**Ethics Committee Approval:** This study was approved by the Istanbul Medipol University, Non-Interventional Clinical Research Ethics Committee (Date:10.06.2020, No:457).

**Informed Consent:** Written consent was obtained from the participants.

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

**Author Contributions:** Conception/Design of Study- G.K., G.G., N.K., A.İ.T., S.H.T.; Data Acquisition- G.K., N.K., C.S.A., F.S., Ö.K., B.S.K.; Data Analysis/Interpretation- G.K., G.G., N.K., A.İ.T.; Drafting Manuscript- G.K., N.K., G.G.; Critical Revision of Manuscript- G.K., N.K., G.G., S.H.T., A.İ.T.; Final Approval and Accountability- G.K., N.K., A.İ.T., S.H.T., C.S.A., F.S., Ö.K., B.S.K., G.G.

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

**Financial Disclosure:** The study was supported by Savaş Medical Company.

---

**Etik Komite Onayı:** Bu çalışma için etik komite onayı İstanbul Medipol Üniversitesi, Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Tarih:10.06.2020, No:457).

**Bilgilendirilmiş Onam:** Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Çalışma Konsepti/Tasarım- G.K., G.G., N.K., A.İ.T., S.H.T.; Veri Toplama- G.K., N.K., C.S.A., F.S., Ö.K., B.S.K.; Veri Analizi/Yorumlama- G.K., G.G., N.K., A.İ.T.; Yazı Taslağı- G.K., N.K., G.G.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- G.K., N.K., G.G., S.H.T., A.İ.T.; Son Onay ve Sorumluluk- G.K., N.K., A.İ.T., S.H.T., C.S.A., F.S., Ö.K., B.S.K., G.G.

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

**Finansal Destek:** Çalışma Savaş Medikal A.Ş tarafından desteklenmiştir.

## REFERENCES

1. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA* 2020;323(13):1239-42. [CrossRef]
2. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. Available at: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19--11-march-2020>
3. Children in Coronavirus in children. Available at <https://www.nhs.uk/conditions/coronavirus-covid-19/symptoms/coronavirus-in-children/>. Last accessed date: 25.11.2020
4. Wang L, Shi Y, Xiao T, Fu J, Feng X, Mu D, et al. Chinese expert consensus on the perinatal and neonatal management for the prevention and control of the 2019 novel coronavirus infection. *Annals of Translational Medicine* 2020;8(3):47. [CrossRef]
5. World Health Organization Q&A on COVID-19, pregnancy, childbirth and breastfeeding. World Health Organization. Geneva Available at: <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/q-a-on-covid-19-pregnancy-childbirth-and-breastfeeding>. Last accessed: date: 25.11.2020.
6. Coronavirus disease (COVID-19): How is it transmitted? How does COVID-19 spread between people Available at: [www.who.int/coronavirus/spread](https://www.who.int/coronavirus/spread). Last accessed date: 26.11.2020.
7. World Health Organisation. Coronavirus disease (COVID-19): Pregnancy and childbirth. Available at: <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/coronavirus-disease-covid-19-pregnancy-and-childbirth>
8. World Health Organisation. Rapid advice note on home care for patients with Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) infection presenting with mild symptoms and management of contacts. Available at: [https://www.who.int/csr/disease/coronavirus\\_infections/MERS\\_home\\_care.pdf?ua](https://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/MERS_home_care.pdf?ua). Last accessed dat: 09.12.2020.
9. Lubbe W, Botha E, Niela-Vilen H, Reimers P. Breastfeeding during the COVID-19 pandemic - a literature review for clinical practice. *Int Breastfeed J* 2020;15(1):82. [CrossRef]
10. Lawrence RA, & Lawrence R. M. Breastfeeding. A Guide For the Medical Profession. Eighth Edition. Elsevier Health Sciences. 2016, Philadelphia, USA p:573
11. Chang R, Zen Sun W, & Bun Ng T. Lactoferrin as potential preventative and treatment for COVID-19. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2020;56(3):106118. [CrossRef]
12. Tam PCK, Ly KM, Kernich ML, Spurrier N, Lawrence D, Gordon DL, Tucker EC. Detectable severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in human breast milk of a mildly symptomatic patient with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Clin Infect Dis*. 2020 May 30:ciaa673. doi: 10.1093/cid/ciaa673. [CrossRef]
13. Food and Drug Administration. A Closer Look at Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Diagnostic Testing. Available at: <https://www.fda.gov/media/143737/download>. Last accessed date: 14.12.2020.
14. Options for the use of rapid antigen tests for COVID-19 in the EU/EEA and the UK. Available at: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Options-use-of-rapid-antigen-tests-for-COVID-19.pdf>. Last accessed date: 14.12.2020.
15. Center for Disease Control and Prevention. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Interim Guidance for Antigen Testing for SARS-CoV-2 Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antigen-tests-guidelines.html#table1>. Last accessed date: 14.12.2020.
16. Demers-Mathieu V, Do DM, Mathijssen GB, Sela DA, Seppo A, Järvinen KM, et al. Difference in levels of SARS-CoV-2 S1 and S2 subunits- and nucleocapsid protein-reactive SIgM/IgM, IgG and SIgA/IgA antibodies in human milk. *J Perinatol*. 2020:1-10. [CrossRef]
17. Gao X, Wang S, Zeng W, Chen S, Wu J, Lin X, et al. Clinical and immunologic features among COVID-19-affected mother-infant pairs: antibodies to SARS-CoV-2 detected in breast milk. *New Microbes New Infect* 2020;37:100752. [CrossRef]
18. Dong Y, Chi X, Hai H, Sun L, Zhang M, Xie WF, et al. Antibodies in the breast milk of a maternal woman with COVID-19. *Emerg Microbes Infect* 2020;9(1):1467-9. [CrossRef]
19. Deeks JJ, Dinnes J, Takwoingi Y, Davenport C, Spijker R, Taylor-Phillips S, et al. Cochrane COVID-19 Diagnostic Test Accuracy Group. Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2. *Cochrane Database Syst Rev* 2020;6(6):CD013652. [CrossRef]
20. Drugs and Lactation Database (LactMed). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK501541/>

# EXPERIENCE IN CHILDREN IN THE COVID-19 PANDEMIC OF A TERTIARY CENTER, IN ISTANBUL

## İSTANBUL'DA ÜÇÜNCÜ BASAMAK BİR MERKEZİN COVID-19 PANDEMİSİNDE ÇOCUKLARDAKİ DENEYİMİ

Özge KABA<sup>1</sup> , Mehpare SARI YANARTAŞ<sup>1</sup> , Selda HANÇERLİ TÖRÜN<sup>1</sup> , Kamala ALAKBAROVA<sup>2</sup> ,  
Zuhal BAYRAMOĞLU<sup>3</sup> , Mustafa ÖNEL<sup>4</sup> , Sevim Meşe<sup>4</sup> , Ali AĞAÇFİDAN<sup>4</sup> , Ayper SOMER<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Department of Pediatrics, Division of Pediatric Infectious Disease, Istanbul, Turkey

<sup>2</sup>Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Department of Pediatrics, Istanbul, Turkey

<sup>3</sup>Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Department of Radiology, Division of Pediatric Radiology, Istanbul, Turkey

<sup>4</sup>Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Department of Microbiology, Istanbul, Turkey

**ORCID IDs of the authors:** Ö.K. 0000-0002-8381-3255; M.S.Y. 0000-0002-7035-6673; S.H.T. 0000-0002-3216-2413; K.A. 0000-0001-8942-9986; Z.B. 0000-0002-1695-3290; M.Ö. 0000-0002-3987-6611; S.M. 0000-0001-5944-0180; A.A. 0000-0002-5470-296X; A.S. 0000-0002-7827-1113

**Cite this article as:** Kaba O, Sari Yanartas M, Hancerli Torun S, Alakbarova K, Bayramoglu Z, Onel M, et al. Experience in children in the COVID-19 pandemic of a tertiary center, in Istanbul. J Ist Faculty Med 2021;84(3):293-300. doi: 10.26650/IUITFD.2021.806433

### ABSTRACT

**Objective:** The SARS-CoV-2 virus, which unexpectedly has affected the whole world, continues to infect millions of people and causes the death of hundreds of thousands of people. There has been no consensus on the pediatric age group yet. For this reason, it was aimed to share the pediatric group experience of our center.

**Material and Method:** After the pandemic announcement, 1076 pediatric cases admitted to our center with suspected COVID-19 disease were discussed. Eighty-five children who were positive in the SARS-CoV-2 polymerase chain reaction test, were evaluated retrospectively with epidemiological, clinical, laboratory and imaging data.

**Results:** Half of the patients were male and about half of them were between 60-179 months. The household contact/exposure was 80% of the patients. The most common complaints were cough and fever, with the rates of 51.8% and 47.1%, respectively. There was a milder clinic 72.9% of patients and critical illness only 2.4% of the patients. The most striking laboratory finding was lymphopenia. Imaging results showed that abnormal thorax CT rate was 10.6%. Isolation at home was administered on 80% of the patients. Various specific treatments were used only in 4.7% of the hospitalized patients. One of these patients who received hydroxychloroquine, intravenous immunoglobulin and tocilizumab died. The mortality rate was 1.5%.

**Conclusion:** In the absence of reliable diagnostic tests and specific antiviral treatments appropriate for children, it was conclu-

### ÖZET

**Amaç:** Beklenmedik bir anda tüm dünyayı etkileyen SARS-CoV-2 virüsü milyonlarca insanı enfekte etmeye ve yüzbinlerce insanın da ölüme neden olmaya devam etmektedir. Pediyatrik yaş grubuna dair görüş birliği henüz sağlanamamıştır. Bu nedenle merkezimize ait pediyatrik grup deneyiminin paylaşılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Pandemi ilanından sonra merkezimize COVID-19 hastalığı şüphesiyle başvuran 1076 çocuk olgu ele alındı. SARS-CoV-2 polimeraz zincir reaksiyon testinde pozitif olan 85 çocuk, epidemiyolojik, klinik, laboratuvar ve görüntüleme verileri ile retrospektif olarak değerlendirildi.

**Bulgular:** Hastaların yarısı erkek ve yaklaşık yarısı 60-179 ay arasıydı. Hastaların %80'inde ev içi temas/maruziyet mevcuttu. En sık şikayetler sırasıyla %51,8 ve %47,1 oranlarıyla öksürük ve ateşti. Hastaların %72,9'unda daha hafif klinik tablo ve sadece %2,4'ünde kritik hastalık vardı. En çarpıcı laboratuvar bulgusu lenfopeniydi. Görüntüleme sonuçları, anormal toraks BT oranının %10,6 olduğunu gösterdi. Hastaların %80'ine evde izolasyon uygulandı. Hastanede yatan hastaların sadece %4,7'sinde çeşitli spesifik tedaviler uygulandı. Hidroksiklorokin, intravenöz immünglobulin ve tosilizumab alan bu hastalardan biri öldü. Mortalite oranı %1,5 idi.

**Sonuç:** Güvenilir tanısal testlerin ve çocuklar için uygun spesifik antiviral tedavilerin yokluğunda, COVID-19 enfeksiyonunu daha

**Corresponding author/İletişim kurulacak yazar:** ozgekabamd@gmail.com

**Submitted/Başvuru:** 06.10.2020 • **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 15.03.2021 •

**Last Revision Received/Son Revizyon:** 23.03.2021 • **Accepted/Kabul:** 09.04.2021 • **Published Online/Online Yayın:** 29.06.2021



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

ded that we need more virological, epidemiological, clinical, laboratory and imaging studies to better understand and manage COVID-19 infection.

**Keywords:** COVID-19, child, management, treatment

iyi anlamak ve yönetmek için daha virolojik, epidemiyolojik, klinik, laboratuvar ve görüntüleme çalışmalarına ihtiyaç olduğu fikrine varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** COVID-19, çocuk, yönetim, tedavi

## INTRODUCTION

The severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) virus, which appeared in China in December 2019, spread rapidly and was declared as a pandemic by the World Health Organization (WHO) on March 11, 2020 (1). The virus, which has been seen in 235 countries to date, has caused 34,804,348 people to become infected and 1,030,738 people to die (2). It is manifested by symptoms such as fever, dry cough, and dyspnea in the adult age group, leading to serious diseases, especially pneumonia (3). Articles published to date show that the COVID-19 disease is milder in childhood (4). In addition, there are small case series and case reports that include quite different approaches with treatment procedures, and management and treatment is also continuing. Based on this, it is aimed to present the data of the pediatric patients who followed-up in our center.

## MATERIAL AND METHOD

As of the announcement of the first case in our country, in accordance with the pandemic preparations at our facility, a service area where possible cases are evaluated in terms of COVID-19 disease and a service area where suspicious patients can be monitored has been organized. One-thousand-seventy-six children between 1 and 216 months who were admitted to our hospital between the dates of 11 March, 2020 and 1 June, 2020 and who conformed to the possible case definition in accordance with the Ministry of Health COVID-19 (SARS-CoV-2 infection) guideline were evaluated by pediatric infectious disease specialists (5). Epidemiological, demographic, laboratory, imaging, treatment and follow-up data of 85 patients, whose SARS-CoV-2 polymerase chain reaction (PCR) was positive in the combined nasal and nasopharyngeal swab samples taken were obtained by examining the files retrospectively. Patients less than a month were not included in the study.

Patients were divided into 5 categories according to clinical data. These categories are listed below (6). 1) Asymptomatic infection: Normal imaging features and nucleic acid test positivity without symptoms. 2) Mild disease: Acute upper respiratory infection with symptoms like fever, sore throat, cough and/or myalgia. 3) Moderate disease: Pneumonia, which does not require oxygen, manifested by symptoms such as fever and cough (mostly dry). 4) Severe disease: Pneumonia, which requires oxygen, manifested by symptoms such as fever and cough and signs of hypoxia. 5) Critical disease: Respiratory failure requiring mechanical ventilation, acute respiratory distress

syndrome (ARDS), shock, and multiple organ failure. In addition, cases similar to Kawasaki syndrome were reported in many countries, firstly in England, in April 2020, and it was named as multisystemic inflammatory syndrome in children (MIS-C). In accordance with the symptoms, imaging results such as direct radiography or thorax computer tomography (CT) applied to children were re-evaluated together with the pediatric radiology specialist.

Molecular tests of pediatric patients with suspected COVID-19 disease were studied in the COVID-19 Laboratory authorized by the Ministry of Health, within the Department of Virology and Basic Immunology of our hospital. Combined nasal and nasopharyngeal swab samples taken from patients were sent in viral transport medium (VTM) together with patient information forms in accordance with cold chain rules with triple transport system.

In our laboratory, viral nucleic acid isolation kit (Biospeedy, Catno: BS-NA-109-1000) and reverse transcriptase (RT), real-time (q) PCR kit (Biospeedy, BS-SY-WCOR-305-1000) available from the Ministry of Health is used for the molecular diagnosis of COVID-19. Viral nucleic acid isolation process is run manually in the BSL-2 cabinet. RT-qPCR is performed on the Rotor Gene Q (QIAGEN, Germany) device. In the RT-qPCR kit, RNA-dependent RNA polymerase (*RdRp*) gene region is targeted specifically for SARS-CoV-2. In the working principle of this kit, the human ribonuclease P gene is used as internal control. The positivity of RNase P for the PCR procedure indicates that the test is working correctly. By determining the amplification curves of the *RdRp* gene region, COVID-19 positive result is obtained.

The collected data were studied in the 23.0 version of the SPSS programme using descriptive statistical methods, and values were expressed as percentage, mean, and standard deviation. It was planned to compare the asymptomatic patient group and the symptomatic patient group with the non-parametric tests using the chi-square test and, if necessary, to support Fisher's Exact test. Data without normal distribution of two independent groups were evaluated by Mann-Whitney U test.

Since it was a retrospective study based on file scanning, the informed consent form was not needed. Approval was received for the application numbered 2020-05-11T13\_00\_56 to the scientific committee of the Ministry of Health. Approval was also obtained from our hospital's ethics committee (Date: 15.05.2020, No: 10).

## RESULTS

One-thousand-seventy-six of the patients who applied to the pandemic areas established in our institution to combat the COVID-19 disease were evaluated in accordance with the COVID-19 (SARS-CoV-2 infection) guideline prepared by the Ministry of Health. SARS-CoV-2 was detected in 85 patients' swab samples. Male gender of the patients with the diagnosis of the COVID-19 disease was 49.4%. The average age of the patients included in the study was 119.01±61.82 (range 4-204) months. Detailed data regarding the demographic and epidemiological in-

formation of the patients are presented in Table 1. These data were also compared between the asymptomatic and symptomatic groups, but no significant value was found.

Comorbid diseases in our patients were reactive airway disease, malignancy, cerebral palsy, Hashimoto thyroiditis, hypertension, newly diagnosed diabetes mellitus, carboxylase deficiency, cyclic neutropenia and De-Barys syndrome (1, 2, 3).

Considering the complaints, 51.8% cough, 47.1% fever, 18.8% myalgia and 12.9% sore throat were present.

**Table 1:** Demographic and epidemiological data distribution of patients with SARS-CoV-2<sup>†</sup>

	n (%)			p value
	Total	Asymptomatic	Symptomatic	
<b>Gender</b>				0.745
Male	42 (49.4)	9 (10.6)	33 (38.8)	
Female	43 (50.6)	8 (9.4)	35 (41.2)	
<b>Age group ranges</b>				0.176**
1-11 months	3 (3.5)	2 (2.4)	1 (1.2)	
12-59 months	17 (20.0)	2 (2.4)	15 (17.6)	
60-179 months	39 (42.4)	9 (10.6)	30 (35.3)	
180 months and over	26 (30.6)	4 (4.7)	22 (25.9)	
<b>Presence of exposure/contact</b>	68 (80)	15 (17.6)	53 (62.4)	0.504**
<b>Number of individuals with exposure/contact</b>				0.000**
One	50 (58.8)	11 (13.0)	39 (45.9)	
Two	11 (13.0)	3 (3.5)	8 (9.4)	
Three and over	7 (8.3)	0 (0.0)	7 (8.3)	
<b>Presence of comorbidity</b>	12 (14.1)	2 (2.4)	10 (11.8)	1.000**
<b>Clinical case status</b>				0.000**
Asymptomatic	17 (20.0)	17 (20.0)	0 (0.0)	
Mild disease	62 (72.9)	0 (0.0)	62 (72.9)	
Moderate disease	3 (3.5)	0 (0.0)	3 (3.5)	
Severe disease	1 (1.2)	0 (0.0)	1 (1.2)	
Critical disease	2 (2.4)	0 (0.0)	2 (2.4)	
<b>Follow-up decision</b>				0.738**
At home	68 (80.0)	13 (15.2)	55 (64.7)	
At hospital	17 (20.0)	4 (4.8)	13 (15.2)	
<b>Follow-up with specific treatment</b>	5 (5.8)	0 (0.0)	5 (5.8)	0.578**
<b>Outcome</b>				0.265**
Discharge	16 (18.8)	3 (3.5)	13 (15.2)	
Complication	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
Mortality	1 (1.2)	0 (0.0)	1 (1.2)	

N: Number of cases. \* chi-square test, \*\* Fisher's Exact Test; <sup>†</sup> Percentages may not total 100 because of rounding



The symptoms of runny nose, diarrhea and shortness of breath observed in the application were also evaluated. The mean duration of symptoms, clinical disease groups and follow-up decision in patients with symptoms are presented in Table 2. In addition, 7 (8.2%) of the patients who suggested respiratory tract infection with the current symptoms had a swab sample to detect other viral respiratory viruses, but any viruses could be detected.

The most striking finding was the presence of lymphopenia in 32 patients. In addition, leukocytosis in nine patients, leukopenia in nine patients, thrombocytopenia in seven patients, neutropenia in eight patients were among the abnormal blood counts. There were slightly increased C-reactive protein, D-dimer and liver function tests. The increase of procalcitonin has been detected only in three patients. The evaluations of the patients for their laboratory and imaging are presented in Table 3. Laboratory investigations and imaging results were evaluated, and 80% of the patients were isolated at home.

After the first evaluation 33 (38.8%) of patients were imaged with low dose thorax CT because of reasons such as abnormal graphy, comorbidity. Parenchymal findings compatible with COVID-19 were present in nine of the symptomatic patients. Only 11 patients had an abnormal chest X-ray. In none of these patient groups, recurrent thorax CT

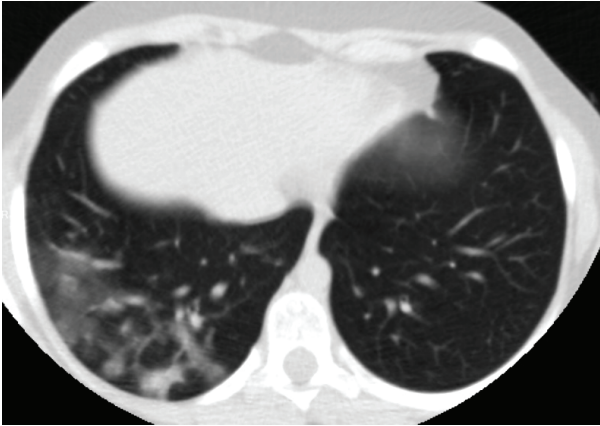
**Table 2:** Data distribution of the symptoms and clinical disease status of the patients evaluated after the admission

Symptoms	Number of cases (% value)	Duration of symptoms (day) (mean±SD)
Cough	44 (51.8)	2.34±1.68
Fever	40 (47.1)	1.80±1.12
Myalgia	16 (18.8)	2.31±1.40
Sore throat	11 (12.9)	1.82±0.98
Dyspnea	6 (7.1)	2.17±1.60
Diarrhea	5 (5.9)	2.20±0.83
Runny nose	5 (5.9)	2.00±1.22

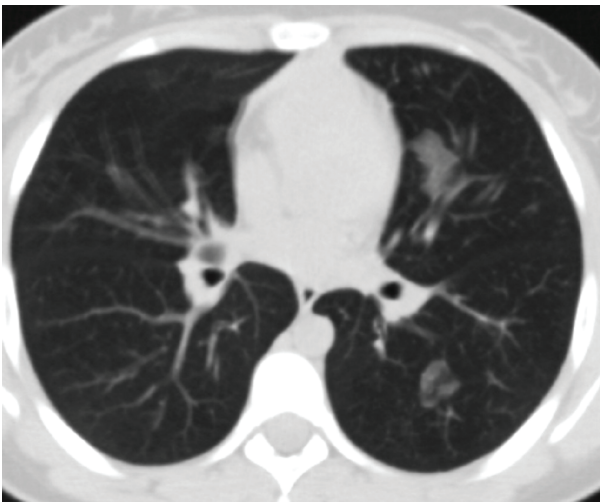
**Table 3:** Comparison of laboratory and imaging parameters by patient groups<sup>‡</sup>

	n (%)			p value
	Total	Asymptomatic	Symptomatic	
<b>WBC count</b>				0.576**
Leukocytosis	9 (10.6)	3 (3.5)	6 (7.1)	
Leukopenia	9 (10.6)	1 (1.2)	8 (9.4)	
Neutropenia	8 (9.4)	3 (3.5)	5 (5.9)	0.620**
Lymphopenia	32 (37.6)	7 (8.2)	25 (29.4)	0.421**
Thrombocytopenia	7 (8.2)	1 (1.2)	6 (7.1)	1.000**
Increased C-reactive protein	24 (28.2)	4 (4.7)	20 (23.5)	0.768**
Increased procalcitonin	3 (3.5)	0 (0.0)	3 (3.5)	1.000**
Increased alanine transaminase	5 (5.9)	1 (1.2)	4 (4.7)	1.000**
Increased aspartate transaminase	14 (16.4)	3 (3.5)	11 (13.0)	1.000**
Increased lactate dehydrogenase	6 (7.1)	0 (0.0)	6 (7.1)	0.342**
Increased D-dimer	16 (18.8)	5 (5.9)	11 (13.0)	0.296**
Increased troponin	4 (4.7)	0 (0.0)	4 (4.7)	0.579**
<b>Imaging</b>				
<b>Direct graphy</b>				0.526**
Normal	68 (80.0)	14 (16.4)	54 (63.6)	
Anormal	11 (13.0)	1 (1.2)	10 (11.8)	
<b>Thorax CT</b>				0.256**
Normal	24 (28.2)	4 (4.7)	20 (23.6)	
Appropriate with COVID-19 disease	9 (10.6)	0 (0.0)	9 (10.6)	

N, number of cases; WBC, white blood cell; NA, non-available; CT, computer tomography; <sup>‡</sup>Percentages may not total 100 because of rounding; \*chi-square test, \*\*Fisher's Exact Test



**Figure 1a:** Chest CT images of children with COVID-19 axial section. Peribronchovascular involvement of right lower lobe with ground glass opacity and accompanying consolidation in a 10 years old male patient



**Figure 1b:** Chest CT images of children with COVID-19 axial section. Patchy ground glass infiltrations in the left upper and lower lobe in a 15 year old female patient

imaging was required. The most common findings in our patient group were glass ground opacities. Images of two of our patients can be seen in Figure 1a and 1b.

In symptomatic patients hydroxychloroquine treatment with ratio 3.5% (n=3) was preferred at the beginning of the pandemic. One of these patients had a diagnosed malignancy, one had multisystemic inflammatory syndrome, and the other had poor adult-type thorax CT findings. Tocilizumab was also administered to the patient with critical illness who was taking hydroxychloroquine. Plasmapheresis was applied together with favipiravir treatment in another critically ill patient who was admitted in the later period of the pandemic. Except for these four patients, all patients were followed up with symptomatic treatment. No side effects or complications

were observed during the treatment process. After the treatment, all patients were discharged except one. One of the patients with critical disease who applied on the 4<sup>th</sup> day of the symptoms and administered tocilizumab, intravenous immunoglobulin and hydroxychloroquine died because of multisystemic inflammatory syndrome.

## DISCUSSION

SARS-CoV-2 is an emerging pathogen causing upper respiratory system infection and pneumonia all over the world. At the pediatric age group, it is known that the number of cases is less than the adult age group, the clinical course is less severe, and the mortality is lower. When only the pediatric patients who applied to our institution and the patients with epidemiological data, fever and respiratory symptoms were evaluated, the positivity ratio was found 7.89%. This rate, which was determined as 12% with the evaluation of 1391 children in Wuhan, was lower in our study (7). Considering the date of our country, including adult patients, the rate of pediatric cases have been determined to be 1% as of the end of March 2020 (8). However, this rate was similar to Italy with the rate of 1%, Spain with the rate of 0.8% (9, 10). At the onset of the pandemic, the rate of children reported as 1.7% in the United States increased to 4% for the 0-9 age group, and 11.5% for the 10-19 age group in August (11). In the study, in which 72,314 cases were evaluated in China, cases belonging to the pediatric group were reported at the rate of approximately 2.2% (12). Fifty percent of male gender ratio contrasted with the predominance of female gender data from the studies of Parri et al. and Tagarro et al. (9, 10). In the publication of Lue et al which 171 patients were evaluated, this rate increased to 60.8% (8). The mean age of the patients included in the study was 119.01 months, which was approximately 9.8 years compatible with our country data (8). In the age distribution data of the studied patients, it was observed that the 60-179 months group was the first with 45.9%, and the group of 180 months and over was the second with 30.6%. When the studies involving a large number of patients were examined, it was seen that the case density was clustered especially at the age of six years and over like our study (9).

The coronavirus epidemic, which appeared later in our country compared to Asian and European countries, had a serious effect on the public's decision to travel. Of our positive cases, only three patients belonging to the same family had a travel history. After the first case was seen on the 11<sup>th</sup> of March, 2020 in our country, the schools were closed just a day later in order to prevent the child age group, thought to be a super carrier, to spread the disease (13). That situation resulted in a household contact rate, similar to Centers for Disease Control (CDC) data, as seen in our data. Considering the number of individuals exposed to pre-infection, an individual contact was 60%, and as the number of individuals increased, this rate was

expressed in numbers, suggesting the isolation success provided within the home. When we look at the number of contact individuals discussed in the study by Zhang et al. contrary to our study, it was observed that as the number of individuals increased, the rate of exposure increased correspondingly (14).

Considering positive cases with PCR test results that were evaluated as possible cases, 12 patients had comorbid disease. The new diagnosis of diabetes in one of these patients, malignancy in two, and the presence of hypertension in one coincided with the risk factors of the adult age group (15). Although four patients with comorbidity were asymptomatic, they were hospitalized and followed-up. Immunosuppression, chronic lung diseases and cardiovascular diseases have been identified as risk factors that worsen the disease, and all risk factors are still uncertain (16).

The most common symptoms detected in our patients included in the study were cough and fever symptoms with 51.8% and 47.1%. These rates were in line with the 100 case studies published by Parri et al. and the 2.572 case study published by the CDC (9, 16). One of the remarkable differences was that our rate of dyspnea and diarrhea was lower compared to the ones in the literature (9). In the study of Lu et al. the average duration of fever, which was observed as 3 days, was found to be 1.74 day in our study, which was associated with the ease of access to the healthcare services of symptomatic patients (8).

It was determined that 72.9% of the cases evaluated according to clinical disease classifications were in mild disease class. This rate was higher than 50.4%, which is the mild disease rate determined according to the data of our country (7). Likewise, Dong et al. also stated the mild disease rate of confirmed cases to be 43.1% (6). The fact that the presence of asymptomatic and mild clinical disease was predominant in the age groups they included, at the age of six years and above made sense of the current clinical disease classifications with the average age in our study. The rate of asymptomatic cases confirmed in the same study was reported as 12.9%, and the rate in our study was higher with 27%.

In this group of patients, there is one patient who fits the multisystemic inflammatory syndrome which has been reported in the literature in April 2020 (17). That patient had poor prognostic factors such as lymphopenia, increased liver enzymes, increased inflammatory markers (C-reactive protein, ferritin), increased D-dimer, increased troponin and acute kidney injury. She died on the 20<sup>th</sup> hour of her hospital admission.

When laboratory results were evaluated, lymphopenia was the most striking result with a rate of 37.6%. In a meta-analysis compiling of 93 pediatric patients examined in seven

studies, the rate of lymphopenia was reported as 41% (18). In the publication of Henry et al. where nine case reports and three studies were discussed, the rate of lymphopenia found to be 3% contradicts our study. In fact, the presence of lymphopenia has been shown to reach up to 83.2% in the studies belonging to the adult age group (19). The relationship between lymphopenia and clinical disease shown in adult studies could not be demonstrated in our study because of our cases' mild clinic ( $p=0.457$ ). However, when patients were grouped as under 5 and over 5, there was a significant difference when compared to the presence of lymphopenia ( $p=0.001$ ).

When the asymptomatic and symptomatic groups were compared in terms of increased C-reactive protein, there was no significant difference ( $p=0.768$ ). The increase of procalcitonin has been detected only for one patient. In the adult age group studies, the results of these parameters associated with the severe clinical picture and poor prognosis were associated with the mild clinic and absence of concomitant bacterial infections (15). D-dimer, another factor associated with poor prognosis, was compared between two groups and was found not significant ( $p=0.296$ ). This situation can be explained by the fact that the clinical classification of our patients is 72.9% milder.

Direct imaging may be normal, as well as bilateral ground glass opacities at younger age and consolidations at older age. There is no clear recommendation for the pediatric age group for CT, which is seen as an important tool in the recognition of COVID-19 related pneumonia in the adult age group (20). Four of asymptomatic patients were imaged with thorax CT due to the need for surgical intervention and malignancy. In our study, normal imaging results were obtained in 24 (28.2%) of 33 patients who needed CT imaging. This rate is similar to the study by Steinberger et al. evaluating radiological imaging of PCR positive patients (21). Considering patients with a confirmed diagnosis, the normality rate of imaging results was higher in the pediatric group than in the adult group (22).

In 80% of the patients, who were evaluated with existing radiology and laboratory tests, were provided with isolation at home and followed up by tele-visits. Control examinations were performed at the end of the first and the second weeks. The compatibility of our rate of hospitalization with rates reported in the literature (6-20%) was explained by the presence of comorbid diseases (23).

Supportive treatment was administered to all patients. In addition to supportive treatment provided to each patient in need, targeted viral therapy was used in only three patients (4.5%) in total. In the study compiled by Shekerdemiyan et al. this rate was reported to be 17% in the intensive care unit due to the severe clinical condition of the patients, and it was stated that other targeted antiviral treatments were needed (24). In a multicenter study, the use of

hydroxychloroquine has been proposed in the absence of specific antiviral treatments such as remdesivir (25).

Patients who were followed up for three days without fever and did not have respiratory distress or need for oxygen were discharged. The mean duration of hospitalization was 4.8 days. Our mortality rate was 1.5%.

**Limitations:** There are results in our study that contradict some studies and overlap with others. Our data comparison may have been insufficient since we did not have any patients with a severe or critical clinical picture. In addition, the smallness of our sample group is our most important limitation. More studies are needed to obtain exact data.

In the absence of reliable diagnostic tests and specific antiviral treatments appropriate for children, we need more virological, epidemiological, clinical, laboratory and imaging studies for understanding and managing better COVID-19 infections.

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

**Ethics Committee Approval:** : This study was approved by the Ethical Committee of the Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine (Date:15.05.2020, No: 29624016-050.99- 686).

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

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

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

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Etik Komite Onayı:** Bu çalışma için etik komite onayı İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Tarih:15.05.2020, Sayı: 29624016-050.99- 686).

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

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

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

## REFERENCES

1. World Health Organization (WHO). Emergencies. Diseases. Coronavirus disease (COVID-19). Situation reports. Situation report-51. Available at [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200311-sitrep-51-covid-19.pdf?sfvrsn=1ba62e57\\_10](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200311-sitrep-51-covid-19.pdf?sfvrsn=1ba62e57_10) Accessed on 5 Oct, 2020
2. World Health Organization (WHO). Emergencies. Diseases. Coronavirus disease 2019. Available at <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>. Accessed on 5 Oct, 2020.
3. Rodriguez-Morales AJ, Cardona-Ospina JA, Gutiérrez-Ocampo E, Villamizar-Peña R, Holguin-Rivera Y, Escalera-Antezana JP, et al. Clinical, laboratory and imaging features of COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Travel Med Infect Dis* 2020;34:101623. [CrossRef]
4. Ludvigsson JF. Systematic review of COVID-19 in children shows milder cases and a better prognosis than adults. *Acta Paediatr* 2020;109(6):1088-1095. [CrossRef]
5. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, COVID-19 Bilgilendirme Sayfası, COVID-19 Rehberi Çocuk Hasta Yönetimi ve Tedavi. Available at <https://covid19.saglik.gov.tr/Eklenti/38596/0/covid-19rehbericocukhastayonetimivetedavipdf.pdf> Accessed on 5 Oct, 2020.
6. Dong Y, Mo X, Hu Y, Qi X, Jiang F, Jiang Z, et al. Epidemiology of COVID-19 Among Children in China. *Pediatrics* 2020;145(6):e20200702. [CrossRef]
7. Lu X, Zhang L, Du H, Zhang J, Li YY, Qu J, et al. SARS-CoV-2 infection in children 2020. *N Engl J Med* 2020;382(17):1663-5. [CrossRef]
8. Tezer H, Bedir Demirdağ T. Novel coronavirus disease (COVID-19) in children. *Turk J Med Sci* 2020;50(SI-1):592-603. Published 2020 Apr 21. [CrossRef]
9. Parri N, Lenge M, Buonsenso D. Coronavirus Infection in Pediatric Emergency Departments (CONFIDENCE) Research Group. Children with Covid-19 in Pediatric Emergency Departments in Italy. *N Engl J Med* 2020;383(2):187-90. [CrossRef]
10. Tagarro A, Epalza C, Santos M, Sanz-Santaeufemia FJ, Otheo E, Moraleda C, et al. Screening and Severity of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in Children in Madrid, Spain. *JAMA Pediatr* 2020 Apr 8:e201346. [CrossRef]
11. Centers for Disease Control and Prevention, Coronavirus Disease (COVID-19), Cases&Data, MMWR COVID-19 Reports, Changing Age Distribution of the COVID-19 Pandemic—United States, May–August 2020. Available at <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/69/wr/pdfs/mm6939e1-H.pdf>. Accessed on 5 Oct, 2020.
12. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA* 2020;323(13):1239-42. [CrossRef]
13. Chowell G, Abdirizak F, Lee S, Lee J, Jung E, Nishiura H, et al. Transmission characteristics of MERS and SARS in the healthcare setting: a comparative study. *BMC Med* 2015;13:210. [CrossRef]
14. Zhang B, Liu S, Zhang J, Xiao J, Zhu S, Dong Y, et al. Children hospitalized for coronavirus disease 2019 (COVID-19): A multicenter retrospective descriptive study. *J Infect* 2020;81(2):e74-5. [CrossRef]
15. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet* 2020;395(10229):1054-62. [CrossRef]

16. CDC COVID-19 Response Team. Preliminary Estimates of the Prevalence of Selected Underlying Health Conditions Among Patients with Coronavirus Disease 2019 - United States, February 12-March 28, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2020;69(13):382-386. [\[CrossRef\]](#)
17. Deza Leon MP, Redzepi A, McGrath E, Abdel-Haq N, Shawaqfeh A, Sethuraman U, et al. COVID-19 Associated Pediatric Multi-System Inflammatory Syndrome. *J Pediatric Infect Dis Soc* 2020;9(3):407-8. [\[CrossRef\]](#)
18. Chang TH, Wu JL, Chang LY. Clinical characteristics and diagnostic challenges of pediatric COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *J Formos Med Assoc* 2020;119(5):982-9. [\[CrossRef\]](#)
19. Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, Liang WH, Ou CQ, He JX, et al. China Medical Treatment Expert Group for Covid-19. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med* 2020;382(18):1708-1720. [\[CrossRef\]](#)
20. Ma H, Hu J, Tian J, Zhou X, Li H, Laws MT, et al. A single-center, retrospective study of COVID-19 features in children: a descriptive investigation. *BMC Med* 2020;18(1):123. Published 2020 May 6. [\[CrossRef\]](#)
21. Steinberger S, Lin B, Bernheim A, Chung M, Gao Y, Xie Z, et al. CT Features of Coronavirus Disease (COVID-19) in 30 Pediatric Patients. *AJR Am J Roentgenol* 2020;215(6):1303-11. [\[CrossRef\]](#)
22. Chen A, Huang J, Liao Y, Liu Z, Chen D, Yang C, et al. Differences in clinical and imaging presentation of pediatric patients with COVID-19 in comparison with adults. *Radiol Cardiothrac Imaging* 2020;2(2):e200117. [\[CrossRef\]](#)
23. Chen ZM, Fu JF, Shu Q, Chen YH, Hua CZ, Li FB, et al. Diagnosis and treatment recommendations for pediatric respiratory infection caused by the 2019 novel coronavirus. *World J Pediatr* 2020;16(3):240-6. [\[CrossRef\]](#)
24. Shekerdemian LS, Mahmood NR, Wolfe KK, Riggs BJ, Ross CE, McKiernan CA, et al. Characteristics and Outcomes of Children With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Infection Admitted to US and Canadian Pediatric Intensive Care Units. *JAMA Pediatr* 2020;174(9):868-73. [\[CrossRef\]](#)
25. Chiotos K, Hayes M, Kimberlin DW, Jones SB, James SH, Pinninti SG, et al. Multicenter initial guidance on use of antivirals for children with coronavirus disease 2019/severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *J Pediatric Infect Dis Soc* 2020;9(6):701-15. [\[CrossRef\]](#)

# COVID-19 AND COLORECTAL SURGERY: LESSONS LEARNED FROM FIRST CASES

## COVID-19 VE KOLOREKTAL CERRAHİ: İLK VAKALARDAN ÖĞRENİLEN DERSLER

İlker ÖZGÜR<sup>1</sup> , İrem KARATAŞ<sup>1</sup> , Leman Damla ERCAN<sup>1</sup> , Ali Fuat Kaan GÖK<sup>1</sup> , Alpay MEDETALİBEYOĞLU<sup>2</sup> ,  
Murat KÖSE<sup>2</sup> , Mehmet Türker BULUT<sup>1</sup> , Metin KESKİN<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Department of General Surgery, Istanbul, Turkey

<sup>2</sup>Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Department of Internal Medicine, Istanbul, Turkey

**ORCID IDs of the authors:** İ.Ö. 0000-0003-1499-0503; İ.K. 0000-0002-2973-429X; L.D.E. 0000-0001-9637-571X; A.F.K.G. 0000-0002-3203-1253; A.M. 0000-0002-5829-9186; M.K. 0000-0002-7487-9287; M.T.B. 0000-0003-3311-3581; M.K. 0000-0002-5390-2185

**Cite this article as:** Ozgur I, Karatas I, Ercan LD, Gok AFK, Medetalibeyoglu A, Kose M, et al. COVID-19 and colorectal surgery: lessons learned from first cases. J Ist Faculty Med 2021;84(3):301-6. doi: 10.26650/IUITFD.2021.821064

### ABSTRACT

**Objective:** This study aimed to examine the preoperative, perioperative, and postoperative colorectal surgery experience during the initial stage of the pandemic outbreak of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) later named COVID-19 disease in Turkey and to assess conditions and needs.

**Material and Method:** Seven early cases of colorectal disease patients are described and lessons learned from these cases are reported. All patients' preoperative workup included two nasopharyngeal polymerase chain reaction (PCR) swabs for SARS-CoV-2 taken at a three-day interval preoperatively and a thorax computerized tomography scan taken on a preoperative day.

**Results:** COVID-19 infection occurred before and after surgery despite all measures taken, including isolation. It became complicated to manage surgical complications such as stoma complication, surgical site infection, and small bowel obstruction. Nonetheless, while patients with underlying health conditions have a high mortality rate from COVID-19 infection, no death was observed in this small case series.

**Conclusion:** Medical centers must be well organized to perform colorectal surgery under pandemic conditions. Patients may initially test negative or become positive for COVID-19 at any stage during this disease outbreak. Multidisciplinary teamwork with the infectious disease department and anesthesiologists can prevent mortality from COVID-19 infection during colorectal surgery and subsequent hospitalization.

**Keywords:** Colorectal surgery, COVID-19 pandemic, laparoscopic surgery

### ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı, sonralarda COVID-19 pandemisi olarak adlandırılan, şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2 (SARS-CoV-2) pandemi salgınının ilk yayılım aşamasında ameliyat süreçlerinde kolorektal cerrahi deneyimini incelemek, koşulları ve ihtiyaçları değerlendirmektir.

**Gereç ve Yöntem:** Salgının erken döneminde ameliyat edilen yedi kolorektal hastalık vakası tanımlandı ve öğrenilen dersler rapor edildi. Tüm hastalarda ameliyat öncesi tarama, SARS-CoV-2 için üç gün arayla alınan iki nazofaringeal sürüntü polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) testi ve toraks bilgisayarlı tomografi ile yapıldı.

**Bulgular:** İzolasyon dâhil alınan tüm önlemlere rağmen, COVID-19 enfeksiyonu ameliyattan önce de, sonra da gelişti. Hastalarda ameliyat sonrası gelişen stoma komplikasyonu, cerrahi yara yeri enfeksiyonu ve ileus gibi komplikasyonları yönetmek karmaşık hale geldi. Bununla birlikte, COVID-19 enfeksiyonu varlığında altta yatan sağlık sorunu olan hastalar için bildirilen yüksek ölüm oranına rağmen, bu küçük vaka serisinde herhangi bir hasta kaybı olmadı.

**Sonuç:** Pandemi koşullarında kolorektal cerrahi yapan ve sağlık hizmeti veren merkezler iyi organize edilmelidir. Hastaların COVID-19 testleri ameliyat öncesi dönemde negatif olmasına rağmen, ameliyat sürecinin herhangi bir aşamasında pozitif dönüşebilir. Multidisipliner ekip çalışması, başlıca enfeksiyon hastalıkları, anestezi ve reanimasyon ekibi ve kolorektal cerrahlar ile COVID-19 enfeksiyonundan ölümler önenebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Kolorektal cerrahi, COVID-19 pandemisi, laparoskopik cerrahi

**Corresponding author/İletişim kurulacak yazar:** dr.ilkerozgur@gmail.com

**Submitted/Başvuru:** 09.11.2020 • **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 14.12.2020 •

**Last Revision Received/Son Revizyon:** 18.01.2021 • **Accepted/Kabul:** 19.01.2021 • **Published Online/Online Yayın:** 02.07.2021



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

## INTRODUCTION

A severe respiratory disease caused by a new coronavirus was first identified in Wuhan, China, and reported on December 31, 2019 (1). The virus was subsequently named severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and the resulting disease was named COVID-19. After a rapid spread all over the world, the World Health Organization (WHO) declared the disease a pandemic (2). As health systems became overloaded due to pandemic disease conditions, governments and hospitals all over the world, as well as in Turkey, declared a state of emergency and postponed all non-emergency surgeries to maximize health and intensive care unit capacity. Various centers and several surgical boards and societies published preliminary guidelines on the management of patients based on the possibility of COVID-19 infection (2-6). Surgeons were obliged to adapt to new hospital conditions and find the means to perform colorectal surgeries that couldn't be delayed when the pandemic lasted longer than initially expected.

## MATERIAL AND METHOD

The index case of COVID-19 in Turkey was reported on March 11, 2020 (7), and on March 17, 2020, the Dean's Office of the Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine issued recommendations for pandemic disease conditions and postponed all elective surgeries. Patients who tested both negative and positive for COVID-19 were localized in a separate building with accessibility to a separate CT, endoscopy unit, intensive care unit, and operating rooms. A pandemic ward was organized in the main surgery building, and the emergency services building was reorganized as a virus-free location. Once it became clear that the pandemic would be of long duration, the Dean's Office decided to slowly restart elective cancer surgeries on April 21, 2020. Regardless of patient symptoms, all were tested twice for SARS-CoV-2 with polymerase chain reaction (PCR) testing and a chest CT scan before surgery.

This article describes the initial experience with seven consecutive cases of patients who underwent surgery during the COVID-19 pandemic. All of the surgeries were conducted under the recommendations for aerosol-generating procedures, such as operating rooms equipped with negative-pressure systems. This article was written following the ethical standards of the institutional review board and the principles outlined in the Helsinki Declaration and was approved. Informed consent was obtained from the patients for surgery and COVID-19 disease.

### Patients

#### First case

A 68-year-old man who was diagnosed with proximal rectum cancer (cT2N0) underwent lower anterior resection with a diverting ileostomy on March 16, 2020. The patient's histo-

ry revealed hypertension, previous segmental small bowel resection due to emboli in the 1980s, and a prostatectomy after radiotherapy for prostate cancer in 2009. The patient developed subileus after surgery and was followed clinically with 600-1100 cc stoma discharge. He had fever on the 25<sup>th</sup> postoperative day and computerized tomography (CT) was performed to determine the cause. Though there were no symptoms of lung infection, the CT scan revealed stoma torsion related ileus and concomitant typical findings of COVID-19 pneumonia (Figure 1). The patient had a low arterial oxygen saturation rate (85-90%), which resulted in a recommendation for surgery under local anesthesia due to the low rate of extubation of COVID-19 pneumonia patients, particularly the elderly. A stoma revision was performed under local anesthesia using personal protective equipment (PPE) to avoid intubation (Figure 2). The patient was sent to the pandemic ward after surgery. Pneumonia treatment for COVID-19, consisting of hydroxychloroquine, oseltamivir, and azithromycin, was administered. The newly formed stoma had retracted from the skin but not the abdomen on the third postoperative day, and it was decided to observe the patient conservatively as an enterocutaneous fistula had formed (Figure 3). Since the general condition of the patient was not good and the nurses of the pandemic ward did not have experience in stoma care, it was too difficult to manage the stoma-related complications in the initial location. The patient was transferred to another pandemic service where nurses were familiar with stoma care. He also developed bilateral pleural effusions due to a low mobilization status at the pandemic wards and unwillingness to do pulmonary exercises. His pulmonary effusions regressed and he was discharged on the 9<sup>th</sup> postoperative day following the second surgery after 2 negative PCR test results for SARS-CoV-2.

#### Second case

A 54-year-old female diagnosed with ulcerative colitis and in follow-up for 18 years with the Gastroenterohepatology Unit of the Department of Internal Medicine was admitted with acute exacerbation of the condition on



**Figure 1:** Chest tomography of the first patient with ground-glass opacities and parenchymal consolidation bilaterally

April 7, 2020. She reported the passage of bloody diarrhea 15 to 20 times per day. A colonoscopy revealed moderate disease with a disease activity index score of 10. Following the colonoscopy, there was a positive PCR test result for the cytomegalovirus (CMV). Her CT scan had typical COVID-19 findings. She was hospitalized in the pandemic ward and treatment for ulcerative colitis, CMV colitis, and COVID-19 pneumonia was initiated. Her general condition improved after resuscitative therapy and surgery were delayed. Her second COVID-19 PCR test was negative on day 10 after admission and she was transferred to the gastroenterohepatology inpatient clinic. Despite treatment for severe colitis, her signs and symptoms flared up again and she couldn't be discharged. A total abdominal colectomy was recommended in a multidisciplinary meeting despite the COVID-19 pandemic. A total abdominal colectomy was performed using PPE. The postoperative period was uneventful, aside from pleural effusion on the right side and depletion of essential nutrients. Wernicke's encephalopathy developed, and vitamin B supplementation was administered. She was discharged on day 8 after the surgery.

### Third case

The surgery of a 53-year-old man diagnosed with partially obstructing sigmoid colon cancer was initially postponed

for two months due to the pandemic. Once elective surgeries were permitted, preoperative preparation was conducted, which consisted of blood tests, a CT scan, and COVID-19 PCR testing. He had no obvious signs or symptoms of COVID-19 infection, and the CT scan was normal. The PCR test results were negative and he was admitted for laparoscopic anterior resection on May 5, 2020. The procedure was performed under the recommendations for laparoscopic surgery and was uneventful. A control COVID-19 PCR test taken the day of surgery yielded a positive result on the second postoperative day. Though his CT scan was negative for infection, he was transferred to the pandemic ward and COVID-19 treatment (hydroxychloroquine, azithromycin, and low-molecular-weight heparin) was administered. He was discharged on day five without any complications and continued COVID-19 treatment.

### Uneventful four cases

The surgery of a 73-year-old man diagnosed with a partially obstructing middle rectal mass had been postponed for two weeks due to the pandemic until he was admitted with an ileus on April 7, 2020. He had no obvious signs or symptoms of COVID-19 infection, and a preoperative work-up thorax CT scan was normal. Although pelvic magnetic resonance imaging revealed a rectal

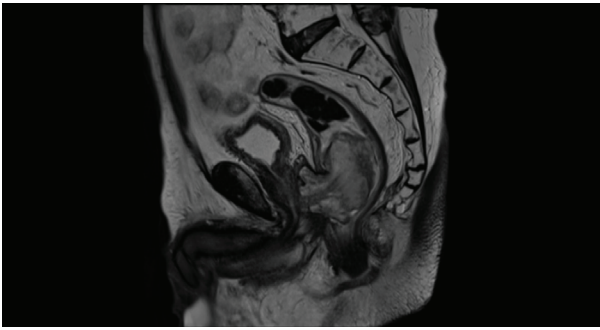


**Figure 2:** Surgeon worn droplet / airborne personal protective equipment



**Figure 3:** Stoma and wound appearance after ileostomy revision





**Figure 4:** Pelvic magnetic resonance image of rectal mass

tumor with prostate invasion (T4bN+), the initial biopsy result was high-grade dysplasia of tubulovillous adenoma, which demonstrated an inadequate biopsy (Figure 4). A laparoscopic sigmoid colostomy with a trans-anal local biopsy was performed. Postoperative follow-up was uneventful and the patient was discharged the day after surgery. The biopsy result was confirmed as rectal cancer and neoadjuvant chemoradiotherapy was recommended. No COVID-19 infection occurred during the period of hospitalization.

The surgery of a 47-year-old woman diagnosed with middle rectal cancer (cT3N+) had been postponed due to the pandemic for one month after long-term neoadjuvant chemoradiotherapy had been completed in January. The developed stricture at the tumor site necessitated surgery. Laparoscopic low anterior resection with diverting ileostomy was performed and after an uneventful postoperative period, she was discharged on the 7<sup>th</sup> postoperative day.

The third uneventful case was a 24-year-old man diagnosed with familial adenomatous polyposis and distal rectum cancer (cT4N+). The patient completed long-term neoadjuvant chemoradiotherapy in January and surgery was delayed. A laparoscopic proctocolectomy was performed after the Deans' Office decision to restart surgeries. He was discharged on the 5<sup>th</sup> day post surgery without complications.

The last case was a 73-year-old woman diagnosed with distal rectum cancer (cT3N-) involving the anal sphincter. She had a history of pelvic irradiation due to cervix carcinoma in 1993. Laparoscopic Miles surgery was performed. She had an uneventful postoperative period and was discharged on the 9<sup>th</sup> day after surgery.

## DISCUSSION

The emergence of SARS-CoV-2 in Wuhan, China, and the rapid spread of the COVID-19 disease in just a few weeks led to strain and deterioration in health systems all over the world. The WHO declared the disease a pandemic

and a public health problem of international concern (1). Governments had to implement extraordinary measures to control the outbreak. Hospitals had to suspend outpatient clinic activity and postpone all elective surgeries to reallocate healthcare providers, particularly anesthesiologists and nurses. Surgical services were gradually permitted and reserved for pandemic patients, and surgical ward staff members were employed in pandemic wards. Colorectal surgeons were unable to perform as many diagnostic and surgical procedures as normal due to staff and beds being reserved for potential COVID-19 patients. The outbreak created emergency conditions, but colorectal diseases have their priorities regardless of the patient's COVID-19 status. The recommendation of postponing treatment for early-stage rectal cancer seems appropriate, but there is a debate in cases of advanced-stage colorectal cancer. The high recurrence rate after the prolongation of chemotherapy and increased cost of delayed surgery has previously been reported (8, 9). Prolongation of chemotherapy may also impair the patient's immune system, increasing the risk for COVID-19 infection.

Adequate and appropriate healthcare should be provided with the necessary adaptation. Given the risk of spreading the disease, several surgical and anesthesiology societies announced recommendations for operating room staff (3-6, 10-14). A known infected patient is the main source; however, asymptomatic cases have also been described (15, 16). While some viruses have been isolated in evaporating body fluids, the current knowledge of SARS-CoV-2 is still incomplete. There is, as yet, no evidence of vertical transmission (17-22). Negative-pressure operating rooms and PPE are recommended. There is debate about whether laparoscopy should be avoided or can be performed with adequate precautions (23, 24). Yu et al. recommended the possibility of laparoscopy for colorectal disease patients during outbreak conditions (25). We experienced no case of an operating room staff member testing positive for COVID-19 after these surgeries.

Preoperative risk stratification and other appropriate measurements to minimize the possibility of the spread of infection must be taken. In our clinic, patients, as well as any accompanying person, were obliged to wear a surgical face mask, since they could be asymptomatic on admission. Patients were also recommended to isolate for a week before surgery (26). Healthcare providers took appropriate precautions and used PPE. Li et al. reported high negative real-time PCR test results in clinically positive patients (27). This is why they combined an additional chest CT scan as a more sensitive measure to evaluate the presence of COVID-19 (28). Patients were considered eligible for surgery after two negative PCR results and no positive sign on a chest CT scan. Despite having followed

all available barrier precautions for adaption, three of our seven patients became COVID-19 positive before, during the surgery, or in the postoperative period. In the case of infection before surgery, the circumstances are easier to predict. Once seroconversion of COVID-19 is detected, conventional methods and procedures are used. In the case of perioperative or postoperative infection, we introduced immediate eradication treatment even if the patient was clinically asymptomatic, according to the guidelines of the pandemic team of the Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine. Patients were transferred to the pandemic ward for follow-up. The question that needs to be answered is how they got the virus. Only our first case was followed up for a long period, with delayed surgery due to subileus because the stoma function tended to change. It was discovered during the follow-up period that the neighboring trauma patient in the ward was COVID-19 positive, and could therefore be the origin of infection for this patient. The preoperatively infected patient (case 3) was an asymptomatic carrier. Fecal virus tests may be integrated in the preoperative workup for asymptomatic carriers that may have negative nasopharyngeal PCR while being fecal test positive (29, 30).

Surgery patients require specialized postoperative care; however, adequate respiratory physiotherapy, early mobilization, and nursing after surgery became problematic as a result of the pandemic. Mobilization was restricted according to isolation guidelines, and bowel movement was delayed to a median of the third day, with the obvious late passage of gas or feces on the fifth day in the case series. The available nurses often had little experience with incentive spirometry and other exercises used in conditions of restricted pulmonary function. Despite precautions, 2 (28.6%) of our patients developed atelectasis with pleural effusion but fortunately did not require intervention. Superinfection of COVID-19 over postoperative atelectasis has been reported to lead to deterioration in the patient's condition and possibly cause death (31). We also experienced problems regarding stoma nursing because of the pandemic-related scheduling of the stoma therapy team. This naturally exacerbated the problem for patients in need of stoma nursing. Stoma therapy and care had to be conducted by surgeons instead of stoma therapy nurses. Also, patient isolation after a COVID-19 diagnosis disrupted continuity of proper stoma care. At present, it seems that the management of patients who already require more complex wound and stoma care will be more difficult during this pandemic.

## CONCLUSIONS

Our short-term experiences revealed that despite observing all barrier precautions and isolation procedures, hospitals will be vulnerable to COVID-19 until the disease can be eradicated. Patient surgery and discharge may be

delayed. Some patients may become COVID-19 positive while in the hospital after surgery. Asymptomatic patients who are infected with COVID-19 in the perioperative period may only be detected after surgery as the disease signs coincide with the window period. Given the current conditions and expected second or third waves of the pandemic, we believe that colorectal surgery services will need to implement significant new planning and arrangements for the preoperative preparation, postoperative surgical care, and delivery of complicated wound and stoma care.

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

**Ethics Committee Approval:** This study was approved by the Ethical Committee of the Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine (Date:22.01.2021, No: 03).

**Author Contributions:** Conception/Design of Study- İ.Ö., A.F.K.G., M.K., M.T.B., M.K.; Data Acquisition- İ.Ö., İ.K., L.D.E., A.M.; Data Analysis/Interpretation- İ.Ö., M.K., M.T.B.; Drafting Manuscript- İ.Ö., İ.K., L.D.E., A.F.K.G., M.T.B., M.K.; Critical Revision of Manuscript- İ.Ö., İ.K., L.D.E., A.F.K.G., A.M., M.K., M.T.B., M.K.; Final Approval and Accountability- İ.Ö., İ.K., L.D.E., A.F.K.G., A.M., M.K., M.T.B., M.K.

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

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

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Etik Komite Onayı:** Bu çalışma için etik komite onayı İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Tarih:22.01.2021, No: 03).

**Yazar Katkıları:** Çalışma Konsepti/Tasarım- İ.Ö., A.F.K.G., M.K., M.T.B., M.K.; Veri Toplama- İ.Ö., İ.K., L.D.E., A.M.; Veri Analizi/Yorumlama- İ.Ö., M.K., M.T.B.; Yazı Taslağı- İ.Ö., İ.K., L.D.E., A.F.K.G., M.T.B., M.K.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- İ.Ö., İ.K., L.D.E., A.F.K.G., A.M., M.K., M.T.B., M.K.; Son Onay ve Sorumluluk- İ.Ö., İ.K., L.D.E., A.F.K.G., A.M., M.K., M.T.B., M.K.

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

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

## REFERENCES

1. Lai CC, Shih TP, Ko WC, Tang HJ, Hsueh PR. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges. *Int J Antimicrob Agents* 2020;55(3):105924. [CrossRef]
2. Ghebreyesus T. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19-11-march-2020> (Last accessed March 29, 2020)

3. Pryor A. SAGES and EAES Recommendations Regarding Surgical Response to COVID-19 Crisis. Available from URL: <https://www.sages.org/recommendations-surgical-response-covid-19/> (Last accessed 21 January 2021)
4. Maintaining Trauma Center Access and Care during the COVID-19 Pandemic: Guidance Document for Trauma Medical Directors. Available from URL: <https://www.facs.org/quality-programs/trauma/maintaining-access> (Last accessed 21 January 2021)
5. U.S Department of Defense (DoD). COVID-19 Practice Management Guide V10. Available from URL: <https://health.mil/Reference-Center/Technical-Documents/2020/03/24/DoD-COVID-19-Practice-Management-Guide> (Last accessed 21 January 2020)
6. American College of Surgeons (ACS). COVID-19 Guidelines for Triage of Emergency General Surgery Patients. (Updated December 8, 2020) Available from URL: <https://www.facs.org/covid-19/clinical-guidance/elective-case/emergency-surgery>. Last accessed 21 January 2021
7. Republic of Turkey, Ministry of Health, Public Health General Directorate, COVID-19 Guide. Available from URL: [https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/covid19/Ingilizce/Rehber/COVID-19\\_Rehberi\\_\\_Genel\\_bilgiler\\_epidemiyoji\\_ve\\_tani\\_8.06.2020\\_eng.pdf](https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/covid19/Ingilizce/Rehber/COVID-19_Rehberi__Genel_bilgiler_epidemiyoji_ve_tani_8.06.2020_eng.pdf) (Last accessed 8 May 2020)
8. Kucejko RJ, Holleran TJ, Stein DE, Poggio JL. How Soon Should Patients With Colon Cancer Undergo Definitive Resection? *Dis Colon Rectum* 2020;63(2):172-182. [CrossRef]
9. Delisle M, Helewa RM, Ward MAR, Hochman DJ, Park J, McKay A. The Association Between Wait Times for Colorectal Cancer Treatment and Health Care Costs: A Population-Based Analysis. *Dis Colon Rectum* 2020;63(2):160-171. [CrossRef]
10. Griffin SM, Alderson D, Taylor J, Mealy K. Updated Intercollegiate General Surgery Guidance on COVID-19. Available from: URL: <https://www.acpgbi.org.uk/content/uploads/2020/03/Updated-Intercollegiate-General-Surgery-Guidance-on-COVID-19-final-with-logos13.pdf> (Last accessed 21 January 2021)
11. Karaca AS, Ozmen MM, Uçar AD, Yasti AÇ, Demir S. General Surgery Operating Room Practice in Patients with COVID-19. *Turk J Surg* 2020;36(1):i-v. [CrossRef]
12. Kamer E, Çolak T. What to Do When A Patient Infected With COVID-19 Needs An Operation: A Pre-surgery, Peri-surgery and Postsurgery Guide. *Turk J Colorectal Dis* 2020;30:1-8. [CrossRef]
13. Coccolini F, Perrone G, Chiarugi M, Di Marzo F, Ansaloni L, Scandroglio I, et al. Surgery in COVID-19 patients: operational directives. *World J Emerg Surg* 2020;15(1):25. [CrossRef]
14. Wax RS, Christian MD. Practical recommendations for critical care and anesthesiology teams caring for novel coronavirus (2019-nCoV) patients. *Can J Anaesth* 2020;67(5):568-76. [CrossRef]
15. Bai Y, Yao L, Wei T, Tian F, Jin DY, Chen L, et al. Presumed Asymptomatic Carrier Transmission of COVID-19. *JAMA* 2020;323(14):1406-7. [CrossRef]
16. Wei WE, Li Z, Chiew CJ, Yong SE, Toh MP, Lee VJ. Presymptomatic Transmission of SARS-CoV-2 - Singapore, January 23-March 16, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2020;69(14):411-5. [CrossRef]
17. Chen H, Guo J, Wang C, Luo F, Yu X, Zhang W, et al. Clinical characteristics and intrauterine vertical transmission potential of COVID-19 infection in nine pregnant women: a retrospective review of medical records. *Lancet* 2020;395(10226):809-15. Erratum in: *Lancet* 2020;395(10229):1038. Erratum in: *Lancet* 2020;395(10229):1038. [CrossRef]
18. Kwak HD, Kim SH, Seo YS, Song KJ. Detecting hepatitis B virus in surgical smoke emitted during laparoscopic surgery. *Occup Environ Med* 2016;73(12):857-63. [CrossRef]
19. Gloster HM Jr, Roenigk RK. Risk of acquiring human papillomavirus from the plume produced by the carbon dioxide laser in the treatment of warts. *J Am Acad Dermatol* 1995;32(3):436-41. [CrossRef]
20. Hensman C, Baty D, Willis RG, Cuschieri A. Chemical composition of smoke produced by high-frequency electrosurgery in a closed gaseous environment. An in vitro study. *Surg Endosc* 1998;12(8):1017-9. [CrossRef]
21. Johnson GK, Robinson WS. Human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) in the vapors of surgical power instruments. *J Med Virol* 1991;33(1):47-50. [CrossRef]
22. Mowbray NG, Ansell J, Horwood J, Cornish J, Rizkallah P, Parker A, et al. Safe management of surgical smoke in the age of COVID-19. *Br J Surg* 2020;107(11):1406-13. [CrossRef]
23. Wexner SD, Cortés-Guiral D, Gilshtein H, Kent I, Raymond MA. COVID-19: impact on colorectal surgery. *Colorectal Dis* 2020;22(6):635-40. [CrossRef]
24. Angelos G, Dockett AG, Gachabayov M, Latifi R, Bergamaschi R. Emergency Colorectal Surgery in a COVID-19 Pandemic Epicenter. *Surg Technol Int* 2020;36:18-21.
25. Yu GY, Lou Z, Zhang W. (Several suggestion of operation for colorectal cancer under the outbreak of Corona Virus Disease 19 in China). *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi* 2020;23(3):9-11.
26. Day M. Covid-19: identifying and isolating asymptomatic people helped eliminate virus in Italian village. *BMJ* 2020;368:m1165. [CrossRef]
27. Li Y, Yao L, Li J, Chen L, Song Y, Cai Z, et al. Stability issues of RT-PCR testing of SARS-CoV-2 for hospitalized patients clinically diagnosed with COVID-19. *J Med Virol* 2020;92(7):903-8. [CrossRef]
28. Bernheim A, Mei X, Huang M, Yang Y, Fayad ZA, Zhang N, et al. Chest CT Findings in Coronavirus Disease-19 (COVID-19): Relationship to Duration of Infection. *Radiology* 2020;295(3):200463. [CrossRef]
29. Li J, Feng J, Liu TH, Xu FC, Song GQ. An infant with a mild SARS-CoV-2 infection detected only by anal swabs: a case report. *Braz J Infect Dis* 2020;24(3):247-9. [CrossRef]
30. Chen L, Lou J, Bai Y, Wang M. COVID-19 Disease With Positive Fecal and Negative Pharyngeal and Sputum Viral Tests. *Am J Gastroenterol* 2020;115(5):790. [CrossRef]
31. Li YK, Peng S, Li LQ, Wang Q, Ping W, Zhang N, et al. Clinical and Transmission Characteristics of Covid-19 - A Retrospective Study of 25 Cases from a Single Thoracic Surgery Department. *Curr Med Sci* 2020;40(2):295-300. [CrossRef]

# THE ROLE OF TRACHEOTOMY IN WEANING FROM MECHANICAL VENTILATION IN PATIENTS WITH COVID-19

## COVID-19 HASTALARINDA MEKANİK VENTİLYASYONDAN AYRILMADA TRAKEOTOMİNİN ROLÜ

Levent AYDEMİR<sup>1</sup> , Hakan KARA<sup>1</sup> , Cömert ŞEN<sup>1</sup> , Kadir Serkan ORHAN<sup>1</sup> , Meryem Nesil KELEŞ TÜREL<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Istanbul, Turkey

**ORCID IDs of the authors:** L.A. 0000-0002-5836-4304; H.K. 0000-0003-3079-6866; C.Ş. 0000-0002-5101-8599; K.S.O. 0000-0002-5125-2035; M.N.K.T. 0000-0003-1829-8186

**Cite this article as:** Aydemir L, Kara H, Sen C, Orhan KS, Keles Turel MN. The role of tracheotomy in weaning from mechanical ventilation in patients with COVID-19. J Ist Faculty Med 2021;84(3):307-10. doi: 10.26650/IUITFD.2021.808960

### ABSTRACT

**Objective:** Significant numbers of COVID-19 patients require invasive mechanical ventilation support during their treatment. Prolonged mechanical ventilation causes a tracheotomy need in some of those patients.

The study aimed to assess the possible benefits of tracheotomy in patients with COVID-19 and its effect on clinical outcomes.

**Material and Method:** Six patients with COVID-19 who underwent an open tracheotomy in our institution were retrospectively reviewed. Its effect on the prognosis, the effectiveness of the safety precautions, and personnel protective equipment (PPE) utilization during the tracheotomy procedures was evaluated.

**Results:** Mean intubation period before a tracheotomy was 21 days (range, 14-28). All patients were male with a mean age of 62. Five of them died postoperatively. One patient was discharged and decannulated. None of the airway team members were infected after the procedures.

**Conclusion:** Tracheotomy in COVID-19 patients is a safe procedure when appropriate PPE measures are taken. Our data do not support the contribution of tracheotomy to accelerating ventilator weaning in patients with COVID-19.

**Keywords:** COVID-19, Tracheotomy, Mechanical ventilation

### ÖZET

**Amaç:** COVID-19 hastalarının önemli bir kısmına, tedavileri sırasında invazif mekanik ventilasyon desteği gerekir. Uzun süreli mekanik ventilasyon, bu hastaların bazılarında trakeotomi ihtiyacını ortaya çıkarır.

Çalışmada, COVID-19 hastalarında trakeotominin olası faydalarını ve klinik sonuçlar üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi amaçlandı.

**Gereç ve Yöntem:** Kurumumuzda açık trakeotomi yapılan altı adet COVID-19 hastası retrospektif olarak incelendi. Trakeotomi işlemleri sırasında güvenlik önlemlerinin etkinliği, kişisel koruyucu ekipman (KKE) kullanımı ve işlemin prognoza etkisi değerlendirildi.

**Bulgular:** Trakeotomi öncesi ortalama entübasyon süresi 21 gündü (aralık, 14-28). Tüm hastalar erkekti ve ortalama yaş 62 idi. Hastaların beşi ameliyat sonrası dönemde öldü. Bir hasta taburcu edildi ve dekanüle edildi. İşlemlerden sonra havayolu ekibinin hiçbir üyesi enfekte olmadı.

**Sonuç:** COVID-19 hastalarında trakeotomi, uygun KKE önlemleri alındığında güvenli bir işlemdir. Verilerimiz, COVID-19'lu hastalarda trakeotominin hastaları mekanik ventilatörden ayırmayı kolaylaştırdığını desteklemedi.

**Anahtar Kelimeler:** COVID-19, Trakeotomi, Mekanik ventilasyon

**Corresponding author/İletişim kurulacak yazar:** dr.hakankara@hotmail.com

**Submitted/Başvuru:** 11.10.2020 • **Accepted/Kabul:** 29.03.2021 • **Published Online/Online Yayın:** 07.07.2021



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

## INTRODUCTION

Coronavirus disease 2019 (COVID-19), caused by SARS-CoV-2, has rapidly spread worldwide and caused critical effects on the healthcare system. It has been reported that 6-25% of the affected patients need to be treated in intensive care units (ICU) (1-3). Among them, most of the patients are followed by invasive mechanical ventilation. Besides, 10% of those patients required prolonged (more than 14 days) ventilation support (3). Performing tracheotomy to these patients brings out the concern of infection transmission risk to healthcare providers. Although human-to-human transmission of the SARS-CoV-2 primarily occurs through respiratory droplets and close contacts, airborne transmission can be seen during some clinical procedures that are likely to create aerosols (4). Among these, open tracheostomy is one of the most concerning procedures for an otolaryngologist. Therefore, some brief reports and guidance making suggestions about the surgical procedure and personal protective equipment (PPE) utilization were published during the early period of the outbreak (5-9). More knowledge has started to accumulate after recent case series were published regarding tracheotomy in COVID-19 patients (2, 3, 10, 11).

Herein, we report our experience of tracheotomy during the COVID-19 pandemic.

## MATERIAL AND METHOD

Our institute was declared as an 'Pandemic Hospital' by the Ministry of Health, a week after the first case was seen in Turkey. Therefore, our department reorganized its working system accordingly and created an airway team consisting of three experienced surgeons for the possible need for tracheotomy in COVID-19 patients. The indications for tracheotomy in COVID-19 patients were determined with joint decisions made by anesthesiologists and our airway team together. These indications are

(a) prolonged mechanical ventilation (more than 14 days), (b) facilitating weaning from mechanical ventilation, (c) pulmonary toilet for those with secondary bacterial pneumonia, (d) reducing death space in those with hypoxia despite endotracheal intubation and (e) patients with life expectancy. All tracheotomies were performed by two surgeons among our airway team according to the tracheotomy guidelines for COVID-19 (7-9).

## RESULTS

Six patients with confirmed COVID-19 have undergone a bed-side open tracheotomy in our institution until now. All patients were male, and the mean age of the patients was 62.2 (range:43-78). The mean number of days followed up as intubated before tracheotomy was 21 (range 14-28). Half of the patients required changing of the tracheotomy cannula postoperatively (one for air leakage five days after the procedure, one for decannulation 12 days after the procedure, and one for obstruction by dried secretions 20 days after the procedure). As of June 12, five patients have died, one patient was discharged home and decannulated. The average life span after tracheotomy of patients who died was 28.2 days (range: 7-43). The only patient, who was healed and discharged, stayed in hospital 33 days after the tracheotomy. He was decannulated two weeks after treatment completion. He was weaned from mechanical ventilation two days after the procedure. None of the remaining five patients could be weaned from ventilation support during their ICU stay. Patients' information and outcomes are given in Table 1.

No complication during the procedures or early postoperative period was observed. None of the team members developed any sign of the infection after the procedures.

## DISCUSSION

There are few publications reporting about performing tracheotomies during the severe acute respiratory syn-

**Table 1:** Patients' information and outcomes

Case no	Gender	Age	Comorbidities	Intubation period (before tracheotomy) (days)	Post-tracheotomy period (days)	Outcome
1	M	67	Diabetes	14	43	Died
2	M	60	RHD, history of stroke without any sequelae	24	33	Discharge
3	M	62	Diabetes, atrial fibrillation, hypertension	21	36	Died
4	M	78	Diabetes, hypertension	24	41	Died
5	M	43	-	28	7	Died
6	M	63	Diabetes, COPD, lung cancer	15	14	Died

M: Male, RHD: Rheumatic heart disease COPD: Chronic obstructive pulmonary disease

drome (SARS) outbreak in 2003, and Tay et al. reviewed them to generate a baseline knowledge for approaching COVID-19 patients who need a tracheotomy (6). They suggested that tracheotomy is a safe procedure when appropriate measures, including PPE, are taken. Cui et al. performed tracheotomy on six patients with COVID-19 (10). Three of them for prolonged intubation, one for preventing aspiration pneumonia (in a patient with cerebral infarction), one for tracheal bleeding, and one for repeated attempts of extubation and re-intubation. The majority of their patients did not benefit from tracheotomy (two of them died, two patients were still in a coma). Recently, a paper reported that no healthcare workers were infected after tracheotomies in 32 patients with COVID-19. The average age of their cases was 62, which is the same as ours. The pre-tracheotomy mean intubated period was 15 days. Twenty-two of their cases were open tracheotomy, while ten were percutaneous. Open tracheotomies were performed in a negative pressure operating theatre (11). Unfortunately, our hospital does not have any negative pressure operating rooms or ICU rooms. Therefore, we preferred bed-side tracheotomy to minimize the risk of transmission during patient transportation. Fifteen percent of their patients died, and 25% were healed and discharged (11). Broderick et al. performed tracheotomy in 10 patients with COVID-19 (3). All patients were male, the same as our cases. The mean age was 57.3. They defined four criteria for tracheotomy indication in COVID-19 patients, including (a) intubation for close to 14 days or more, (b)  $\text{FiO}_2 < 40\%$ , positive end-expiratory pressure (PEEP) below 15, (c) apyrexial, cardiovascularly stable, reducing inflammatory markers, and (d) tracheostomy requirement for weaning. The outcomes of their cohort were quite successful. Six out of 10 patients were discharged from ICU, and all of them were decannulated. The average decannulation time was 16 days (3).

In our case series, only one patient was permanently weaned from mechanical ventilation until today. Unfortunately, the remaining five patients died. Five out six patients continued to stay in the ICU more than two weeks after the tracheotomy procedure in contrast to the idea that was suggested earlier that critically ill patients are likely to be recovered or died within a short period (5). Even our healed patient stayed 33 more days in the hospital post-operatively. Mattioli and colleagues also suggested that COVID-19 related acute respiratory distress syndrome often requires prolonged intubation (2). Considering the long stay in the ICU of the patients, tracheotomy may be helpful to prevent the complications of prolonged endotracheal intubation. However, we observed no benefit of tracheotomy to survival of patients and weaning from the ventilator in our cases. Therefore, we suggest case-by-case decision making, considering each patients' individual clinical status and life expectancy. Tracheotomy can be delayed as long as possible to wait for viral load reducing,

hence transmission risk can be decreased.

A critical problem we encountered in our first case was that an excessive purulent discharge came out from the trachea just after the tracheal incision. We had to use suction at this point. Even though the suction was open for a short period, it might have generated significant amounts of aerosols that may have carried viral particles. We suggest performing endotracheal aspiration by a closed tracheal suction system with a viral filter before the procedure to minimize suction needs during the procedure. It is mentioned that the need for a pulmonary toilet is less in COVID-19 than bacterial pneumonia (5). However, considering the high incidence of ventilator-associated pneumonia (VAP) (1.4%) (12) within patients in the ICU, secondary bacterial pneumonia can bring out the indication of a pulmonary toilet. All patients in our case series had developed secondary bacterial infections during the pre-tracheotomy period. Therefore, we considered a pulmonary toilet as a possible indication in our institution.

Another concern that comes up with tracheotomy is postoperative care of a tracheostomy cannula. Half of our patients required cannula changing due to a variety of causes. All cannula changing procedures were performed successfully using appropriate PPE.

There has been no defined timing for tracheotomy in COVID-19 patients yet. However, in current literature, there is a tendency to wait two or three weeks before a tracheotomy. It is not recommended to perform tracheotomy within the first ten days in terms of the fact that a surgical procedure may deteriorate patients' clinical status. Additionally, high viral load during the early period of the disease may cause a higher transmission rate.

## CONCLUSION

PPE and safety precautions are of the utmost importance when performing tracheotomy in patients with COVID-19. While early results revealed that some patients might benefit from a tracheotomy in terms of facilitating weaning from mechanical ventilation, our case series did not support this data. When the high mortality rate in our case series is considered, we concluded that prolonged intubation might not be accepted as a primary indication for tracheotomy on COVID-19 patients. As the experience of tracheotomy in COVID-19 continues to be shared, the appropriate timing and the benefits of the procedure may be understood more clearly.

---

**Ethics Committee Approval:** This study was approved by the Ethical Committee of the Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine (Date: 29.05.2020, No: 86530).

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

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

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

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

**Etik Komite Onayı:** Bu çalışma için etik komite onayı İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Tarih: 29.05.2020, No: 86530).

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

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

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




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

## REFERENCES

1. Michetti CP, Burlew CC, Bulger EM, Davis KA, Spain DA. Performing tracheostomy during the Covid-19 pandemic: guidance and recommendations from the Critical Care and Acute Care Surgery Committees of the American Association for the Surgery of Trauma. *Trauma Surg Acute Care Open* 2020;5:e000482. [CrossRef]
2. Mattioli F, Fermi M, Ghirelli M, Molteni G, Sgarbi N, Bertellini E, et al. Tracheostomy in the COVID-19 pandemic. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2020;277:2133-35. [CrossRef]
3. Broderick D, Kyzas P, Baldwin AJ, Graham RM, Duncan T, Chaintoutis C, et al. Surgical tracheostomies in COVID-19 patients: A multidisciplinary approach and lessons learned. *Oral Oncol* 2020;106:104767. [CrossRef]
4. World Health Organization. Modes of transmission of virus causing COVID-19: implications for IPC precaution recommendations. <https://www.who.int/publications-detail/modes-of-transmission-of-virus-causing-covid-19-implications-for-ipc-precaution-recommendations>. Accessed 23 May 2020
5. Vukkadala N, Qian ZJ, Holsinger FC, Patel ZM, Rosenthal E. COVID-19 and the otolaryngologist - preliminary evidence-based review. *Laryngoscope* 2020;130(11):2537-43. [CrossRef]
6. Tay JK, Khoo ML, Loh WS. Surgical Considerations for Tracheostomy During the COVID-19 Pandemic: Lessons Learned From the Severe Acute Respiratory Syndrome Outbreak. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 2020;146(6):517-8. [CrossRef]
7. Harrison L, Ramsden J, Winter S, Rocke J HE. Tracheostomy guidance during the COVID-19 Pandemic. *ENT UK*. <https://www.entuk.org/tracheostomy-guidance-during-covid-19-pandemic>. Published 2020. Accessed 22 March 2020.
8. Canadian Society of Otolaryngology-Head and Neck Surgery. Recommendations from the CSO-HNS Taskforce on Performance of Tracheotomy During the COVID-19 Pandemic. <https://www.entcanada.org/wp-content/upload>. Accessed 2 April 2020.
9. Orhan KS, Keles MN, Aydemir L, Sen C. COVID Hastalarında Trakeotomi-Öneriler ve Uygulama Videosu. <https://www.kbb.org.tr/haber/covid-hastalarinda-trakeotomi-oneriler-veyugu-9317>. Accessed 20 May 2020.
10. Cui C, Yao Q, Zhang D, Zhao Y, Zhang K, Nisenbaum E, et al. Approaching Otolaryngology Patients During the COVID-19 Pandemic. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2020;163(1):121-13. [CrossRef]
11. Turri-Zanoni M, Battaglia P, Czaczkes C, Pelosi P, Castelnovo P, Cabrini L. Elective Tracheostomy During Mechanical Ventilation in Patients Affected by COVID-19: Preliminary Case Series From Lombardy, Italy. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2020;163(1):135-7. [CrossRef]
12. Rosenthal VD, Maki DG, Jamulitrat S, Medeiros EA, Todi SK, Gomez DY, et al. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary for 2003-2008. *Am J Infect Control* 2010;38(2):95-104. [CrossRef]

# COULD THE R-RATIO BE AN INDICATOR OF ACUTE LIVER INJURY FOR THE TREATMENT OF COVID-19?

## R-ORANI, COVID-19 TEDAVİSİNDE AKUT KARACİĞER HASARININ BİR GÖSTERGESİ OLABİLİR Mİ?

Yıldırım KAYACAN<sup>1</sup> , Hayrullah YAZAR<sup>2</sup> , Mehmet ÖZDİN<sup>3</sup> 

<sup>1</sup>Ondokuz Mayıs University, Yasar Dogu Faculty of Sports Sciences, Samsun, Turkey

<sup>2</sup>Sakarya University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biochemistry, Sakarya, Turkey

<sup>3</sup>Sakarya Training and Research Hospital, Sakarya, Turkey

**ORCID IDs of the authors:** H.Y. 0000-0001-9447-6322; Y.K. 0000-0003-2784-2980; M.Ö. 0000-0003-3077-7171

**Cite this article as:** Kayacan Y, Yazar H, Ozdin M. Could the R-ratio be an indicator of acute liver injury for the treatment of COVID-19. J Ist Faculty Med 2021;84(3):311-7. doi: 10.26650/IUITFD.2021.824074

### ABSTRACT

**Objective:** The aim of the study was to determine whether the R-ratio could be an indicator in COVID-19 patients.

**Material and Method:** Alkaline phosphatase (ALP) and alanine aminotransferase (ALT) were measured in the first blood serum of all patients (n=314), and R-values were determined and grouped. Then, the correlations between the detected parameters were examined and the differences were analyzed by gender. Patients were compared according to the ALT and ALP upper values of the reference interval. Alpha value was accepted as <0.05.

**Results:** In all patients, ALT and ALP were detected well above normal reference ranges (p=0.000). The R-value ratio was significantly associated with ALT and ALP (p<0.001). R-groups were statistically significant and inversely proportional to age (p=0.049). It was detected that the R-ratio of  $\geq 5$  was higher in women than in men.

**Conclusion:** According to our findings, ALT and ALP measurements in patients diagnosed with COVID-19 were much higher than normal. Another interesting result of our research was that the R-ratio was found to be  $\leq 2$  in the majority of our patients. The  $R \leq 2$  finding, which is accepted as an indicator of acute liver injury, suggested that tracking of this value for COVID-19 could be an important indicator.

**Keywords:** SARS-CoV-2, COVID-19, R-Ratio, ALT, ALP

### ÖZET

**Amaç:** Çalışmanın amacı, COVID-19 hastalarında R oranının bir gösterge olup olamayacağını belirlemektir.

**Gereç ve Yöntem:** Tüm hastaların (n=314) ilk kan serumunda alkalen fosfataz (ALP) ve alanin aminotransferaz (ALT) ölçülerek R değerleri belirlendi ve gruplandı. Daha sonra tespit edilen parametreler arasındaki korelasyonlar incelenerek ve farklılıklar cinsiyete göre analiz edildi. Ayrıca hastalar referans aralığın ALT ve ALP üst değerlerine göre karşılaştırıldı. Alfa değeri <0,05 olarak kabul edildi.

**Bulgular:** Tüm hastalarda, ALT ve ALP normal referans aralıklarının oldukça üzerinde tespit edildi (p=0,000). R-değeri oranı, ALT ve ALP ile önemli ölçüde ilişkiliydi (p<0,001). R grupları istatistiksel olarak anlamlı ve yaşla ters orantılıydı (p=0,049). Kadınlarda  $\geq 5$  R oranının erkeklere göre daha yüksek olduğu tespit edildi.

**Sonuç:** Bulgularımıza göre COVID-19 tanısı alan hastalarda ölçülen ALT ve ALP normalden çok daha yüksekti. Araştırmamızın bir başka ilginç sonucu da hastalarımızın çoğunda R-oranının  $\leq 2$  olarak bulunmasıydı. Akut karaciğer hasarının bir göstergesi olarak kabul edilen  $R \leq 2$  bulgusu, COVID-19 için bu değer izlenmesinin önemli bir gösterge olabileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** SARS-CoV-2, COVID-19, R-Oranı, ALT, ALP

**Corresponding author/İletişim kurulacak yazar:** kayacan@gmail.com

**Submitted/Başvuru:** 10.11.2020 • **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 19.01.2021 •

**Last Revision Received/Son Revizyon:** 20.01.2021 • **Accepted/Kabul:** 17.02.2021 • **Published Online/Online Yayın:** 02.07.2021



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



## INTRODUCTION

Various treatment trials are rapidly progressing in COVID-19 patients. Furthermore, searches for biomarkers continue. Alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase (ALP) remain at the forefront for the examination of liver functions among the test parameters that are followed both for revealing the effects of the disease and the drugs used.

As far as is known, ALT is an aminotransferase consisting of an enzyme group that catalyzes the conversion of  $\alpha$ -keto acids into amino acids by transferring amino groups (1). ALT is located in the cytosol of hepatocytes, and high serum levels indicate a disruption in the integrity of the hepatocyte plasma membrane. ALT has a higher diagnostic sensitivity in terms of liver-biliary disease compared to AST (2). This sensitivity made ALT stand out as a test to be examined in the COVID-19 pandemic because ALT's specific activity in the liver is about 10 times higher than in heart and skeletal muscle, and high serum ALT activity is mainly accepted as an indicator of parenchymal liver disease (3).

Although the exact metabolic function of ALP, which is another test parameter discussed in our study, has not been fully explained yet, this parameter has been associated with intestinal lipid absorption and bone calcification (4). It may also be high in secondary bone diseases such as skeletal metastases and in diseases such as multiple myeloma, acromegaly, kidney failure, hyperthyroidism, ectopic ossification, sarcoidosis, bone tuberculosis, and fracture healing (5). The Biliary epithelium is the main source of alkaline phosphatase (ALP), which increases in liver damage. The causes of intra-extrahepatic cholestasis, resulting in biliary epithelial damage, produce an increase in serum ALP levels (3). There have been many studies on ALP, which are also discussed in the COVID-19 pandemic (6-8). The examination of ALP in many diseases can be associated with the fact that it is found especially in cell membranes or inside the cell, and is seen in almost all body tissues. This is probably the reason why it is the second preferred test parameter next to ALT for calculating the R-value.

The "R-value" is very useful and beneficial for distinguishing acute liver damage. This value was formed by the Council for International Organizations of Medical Sciences of the World Health Organization (WHO) for the differentiation of drug-induced types of acute liver injury (9). The R-value is found by proportioning the ratio of the ALT and ALP values, which are measured in the patient, to the upper limit of normal (ULN). If the R-value is  $\geq 5$ , it can be said that hepatocellular damage occurs. If the R-value is  $\leq 2$ , sepsis, choledocholithiasis and heart failure occur, and if the R-value is between 2-5, it can be interpreted as mixed type damage (10, 11). In our study, we investigated whether COVID-19, which is caused by the newly emerged SARS-CoV-2 virus, leads to acute liver

damage by using the R-ratio. This ratio is a value used by the Council for International Organizations of Medical Sciences of the World Health Organization to differentiate the drug-induced types of acute liver injury. We hope that our research will shed light on some unknown points for the clinical course of COVID-19, especially about the liver, since our research is not yet found in the literature.

## MATERIAL AND METHOD

The study was conducted on patients diagnosed with COVID-19 ( $n=314$ ) between 15 March 2020 and 9 April 2020, by Ondokuz Mayıs University, Faculty of Medicine. The patients examined in the study consisted, of people, who had not previously used any medication nor had been treated for any kind of liver disease ALT and ALP values taken from the first blood serum of the patients were obtained by scanning through the Hospital Information Management System (HIMS). Then, the R-values of the patients during the first admission were calculated according to the formula " $R = (\text{ALT} \div \text{upper limit of normal for ALT}) / (\text{ALP} \div \text{upper limit of normal for ALP})$ " defined by the WHO. The calculated values were grouped according to the reference intervals specified in the literature ( $R\text{-value} \geq 5, R \leq 2, R=2-5$ ) (10, 11).

Age and gender were also considered in patients diagnosed with COVID-19 via real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) and computed tomography (CT) lung screening. All patient blood samples were taken from the venous blood by phlebotomists. Cooled centrifugation was performed at 5000 rpm for 10 minutes to obtain serum. Ethical approval of the study was given by the Sakarya Medical School Ethics Committee (Date: 13.04.2020, No: 147).

### Performance characteristics of biochemical tests

The ALT and ALP test parameters were analyzed in blood serum on a Beckman Coulter brand AU 5800 (serial no: 2016022598, Koutou-ku, Tokyo, Made in Japan) fully automatic autoanalyzer, using the photometric method.

### ALT methodology

This ALT procedure is based on principles outlined by Wroblewski and LaDue (12) and utilizes a modification of the methodology recommended by the International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) (13). ALT transfers the amino group from alanine to  $\alpha$ -oxoglutarate to form pyruvate and glutamate. The pyruvate enters a lactate dehydrogenase (LD) catalyzed reaction with NADH to produce lactate and NAD<sup>+</sup>. The decrease in absorbance due to the consumption of NADH is measured at 340 nm and is proportional to the ALT activity in the sample.

### ALP methodology

This ALP procedure is based on the method developed by Bowers and McComb and has been formulated as recommended by the AACC and IFCC (14, 15). Alkaline phos-

phatase activity is determined by measuring the rate of conversion of p-nitrophenyl phosphate (pNPP) in the presence of 2-amino-2-methyl-1-propanol (AMP) at pH 10.4. The rate of change in absorbance due to the formation of PNP is measured bi-chromatically at 410/480 nm and is directly proportional to the ALP activity in the sample.

**ALT (normal value: 0-35 U/L)**

**Linearity:** The test is linear in the range of 3-500 U/L enzyme activity.

**Sensitivity:** The lowest detectable level represents the lowest measurable ALT level unlike zero and is estimated at 1 U/L.

**Precision:** The total CV value was determined to be 0.80.

**ALP (normal value: 30-120 U/L)**

**Linearity:** the test is linear in the range of 5-1500 U/L enzyme activity.

**Sensitivity:** The lowest detectable level was estimated at 1 U/L.

**Accuracy:** The total % CV value was determined as 2.15.

**Statistics**

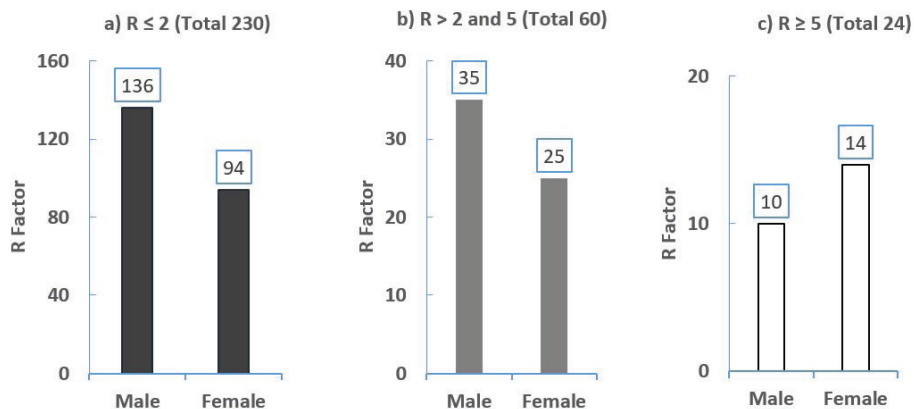
Statistical analysis was performed using SPSS v.21(IBM, Armonk, NY, USA). The patient findings did not show normal distribution (Shapiro-Wilk,  $p=0.000$ ) which is why Spearman's rho was used for correlation analyses while Mann-Whitney U was used to identify the differences between genders. The difference between the upper limit of normal for ALT/ALP and the findings of patients were analyzed with the Wilcoxon test. A significance level of  $p<0.05$  was accepted.

**RESULTS**

The ratio of male patients admitted to the hospital and diagnosed with COVID-19 was higher than female patients (male: 58.280%, female: 41.3%) (Table 1). No statistical difference was found between the parameters measured by gender (Table 2). R-factor  $\geq 5$  was found to be higher in women than in men. However, it was observed that patients concentrated in the  $R \leq 2$  group (Figure 1). R-values were significantly associated with ALT and ALP. A correlation was detected between ALP and ALT. Also, correlations were observed in both raw R-values and grouped R-Factor values with ALT and ALP (Table 3). It was determined that 256 patients in ALT values were examined without gender reference and 236 patients in ALP values

**Table 1:** Descriptive statistical findings of parameters measured in patients

	Gender	n	Mean	Std. D	SEM
Age	Male	183	51.37	24.84	1.84
	Female	131	47.03	26.60	2.32
ALT	Male	183	110.23	261.71	19.35
	Female	131	153.33	261.12	22.81
ALP	Male	183	259.32	307.37	22.72
	Female	131	228.31	184.79	16.15
R-formula	Male	183	2.05	5.92	0.44
	Female	131	2.77	5.00	0.44
R-group	Male	183	1.30	0.57	0.04
	Female	131	1.40	0.68	0.06



**Figure 1:** The figure shows the R-ratio groups and numbers determined according to the gender of the patients. R-factor  $\geq 5$  was found to be higher in women than in men. However, patients were mostly in  $R \leq 2$  group.

**a)** R-Factor  $\leq 2$  suggests a cholestatic pattern of liver injury and sepsis (male: 74.3%; female: 71.7%); **b)** R-Factor between 2 and 5 suggests a mixed pattern of liver injury (male: 19.12%; female: 19.08%); **c)** R-Factor  $\geq 5$  suggests hepatocellular pattern of liver injury (male: 5.46%; female: 10.68%)

**Table 2:** Comparison of genders in measured parameters

Test	Age (years)	ALP	ALT	R-formula	R-group
Mann-Whitney U	10727	11826	10924.5	10612	11245.5
Z	-1.588	-0.202	-1.339	-1.733	-1.206
P	0.112	0.84	0.181	0.083	0.228

**Table 3:** Total correlation findings detected in ALP, ALP and R-factor (n=314)

Parameters	Age (years)	ALT	ALP	R-formula
	-0.087			
ALT	0.122			
	314			
	-0.002	.206*		
ALP	0.969	0.000		
	314	314		
	-0.085	.687*	-.481*	
R-formula	0.132	0.000	0.000	
	314	314	314	
	-0.11	.677*	-.193*	.774*
R-group	0.049	0.000	0.001	0.000
	314	314	314	314

\*Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

**Table 4:** Comparison with the maximum reference value of ALP and ALT Wilcoxon

Parameters	Ranks	n	Mean rank	Sum of ranks	p
ALT < ALT Max Ref. (35 U/L)	Negative ranks	51	39.07	1992.50	0.000
	Positive ranks	256	177.41	45593.50	
	Ties	7			
	Total	314			
ALP < ALP Max Ref. (120 U/L)	Negative ranks	78	61.30	4781.50	0.000
	Positive ranks	236	189.29	44673.50	
	Ties	0			
	Total	314			

were above the accepted maximum normal reference value and both parameters were statistically significant ( $p=0.000$ ) compared to the upper limit of the accepted reference range (ALT=35 U/L, ALP=120U/L) (Table 4).

## DISCUSSION

No significant difference was detected in AST, ALT and R-values by gender in our study. However, the ratio of male patients was higher than female patients. When the literature on the subject is examined, it is seen that men are generally infected more with the virus (16). Moreover a high mortality rate has been commonly reported in

males (17). The fact that the male population has more socio-economic mobility than the female population and that they are present more frequently in public areas as well as having high rates of smoking brings along the disease risk. Given their immunocompromised status, more intense surveillance or individually adapted therapeutic approaches are required for severe patients with COVID-19 without gender discrimination.

The present study shows that the new type of coronavirus has an important effect on liver damage. The study also determined that the patients were predominantly in the first group ( $R \leq 2$ ) for the grouping made according to the

R-ratio. The finding determined here is also supported by the literature. In a study which was conducted on a cohort of 228 patients, SARS-CoV-2 infection produced acute liver injury in 43% of chronic liver damage (CLD) patients without cirrhosis. Additionally, 20% of compensated cirrhosis patients developed either acute-on-chronic liver failure (ACLF) or acute decompensation. Liver-related complications were seen in nearly half of the decompensated cirrhotics, which were of greater severity and with higher mortality (18).

Other studies have also reported clinical features and laboratory test results associated with liver dysfunction in patients with COVID-19 infection (19, 20). Pre-existing liver conditions were not listed in most of these studies and the interaction of pre-existing liver disease with COVID-19 was not investigated, which are major limitations in evaluating the underlying causes of liver injury in the course of this severe disease. However, elevated levels of alanine aminotransferase and reduced platelet counts as well as reduced levels of albumin showed an association with higher fatality in COVID-19 patients (21). It is still unknown whether these laboratory analyses are an indicator of pre-existing hepatic diseases in severe patients, or whether they rather mirror liver failure caused by the SARS-CoV-2 itself (22). It is stated in the literature that patients in this group may have sepsis, choledocholithiasis and heart failure (9-12). Since the virus is new, we see that there is little research on the subject. However the literature supports the fact that there are liver problems in COVID-19 patients (7). However, Barrasa et al. found that 48 patients with COVID-19, who completed a 7-day ICU stay, had heart and blood pressure problems in their mortality assessment (23). These findings support the findings determined in the R-ratios in the presented study.

Cai Q et al. investigated the characteristics of liver tests in COVID-19 (24). They reviewed 417 COVID-19 patients with a definitive diagnosis by retrospectively screening clinical records and laboratory results. According to their findings, 318 (76.3%) of 417 patients had abnormal liver test results. They also found that the presence of abnormal liver tests became more pronounced during hospitalization, and liver enzyme levels increased more than three times after hospitalization. They interpreted their findings as follows: Patients with abnormal liver tests have a higher risk of COVID-19 progressing into a serious disease, so liver damage should be monitored and assessed frequently. Considering that there is a serious elevation in liver enzymes in the findings obtained in our study, it can be said that both studies overlap in this respect.

Another issue that we would like to discuss in our study is the suitability of using the R-ratio monitoring in COVID-19, with treatment still being in the trial phase. Undoubtedly, the fact that the R-ratio was established by

the WHO for the distinction of drug-induced acute liver damage enabled it to be used as a criterion for many studies on active ingredients (9, 25). According to the findings, the R-ratio defines the liver injury pattern with cholestatic or mixed causes as hepatocellular damage. It is also a value calculated at the onset of liver injury.

According to the results of our study, it is considered appropriate to use the R-ratio for this disease since its treatment protocols are not clear yet, given the effect of COVID-19 disease on the R-ratio. In our opinion, the R-ratio remains reliable for many new pharmaceutical agents. Our recommendation for using the R-ratio for liver damage detection by drug treatments for COVID-19 patients is not just based on our results. Although our study is still the first in the literature, it is also stated elsewhere that the R-criteria are the gold standard in clinical studies that also include the liver. For example, Watkins reported in his "idiosyncratic drug-induced liver injury" study that while the R-ratio provides the best balance of sensitivity and specificity, new composite algorithms provide additional specificity in predicting final development (26). Whritenour J et al. recommended a lymphocyte transformation test (LTT) for drug-induced liver injury. According to them, this test can be used as a diagnostic method to determine whether a subject with a hypersensitivity reaction has become sensitive to a particular drug (27). In our opinion, although using the R-ratio is regarded as appropriate for drugs used in COVID-19 treatment, it is also possible to evaluate this along with the LTT test. Considering the relationship between the cellular response to the SARS-CoV-2 virus and the immune system, perhaps the R-ratio and LTT test should be used together to distinguish this condition from liver damage.

#### Limitation of the study

The relationship between COVID-19 and liver damage was analyzed in a gender reference in this study. Since these patients were not followed up, it is not known if they had previous liver disease. This situation constitutes an important limitation of the study because some studies demonstrated that COVID-19 patients with pre-existing liver disease are at higher risk for hospitalizations and mortality (28-30). Therefore, the impact of pre-existing liver disease on treatment and clinical outcomes of COVID-19 should be determined. Large-scale clinical studies are needed to identify the causes of liver injury in patients with COVID-19 infection.

#### CONCLUSION

The R-ratio was examined for the first time in COVID-19 patients in this study. According to the current data, the ALT and ALP values measured in the first blood serum of the patients who were diagnosed with COVID-19 were much higher than normal. This situation showed us the possibility of the SARS-CoV-2 virus causing acute liver

damage. Indeed, the fact that the R-ratio was found as  $<2$  in most of our patients supported this view. Thus, it was thought that monitoring the R-value for COVID-19 could be a guiding parameter for clinicians, particularly in terms of acute liver injury. However, the inability to obtain parameters such as morbidity, mortality, length of hospital stay, intubation, or dialysis data shows the limitation of the study. Therefore, more research is needed to examine the relationship between the R-ratio and COVID-19.

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

**Ethics Committee Approval:** This study was approved by the Ethical Committee of the Sakarya University, Faculty of Medicine (Date:13.04.2020, No: 147).

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

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

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

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Etik Komite Onayı:** Bu çalışma için etik komite onayı Sakarya Üniversitesi, Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Tarih:13.04.2020, Sayı: 147).

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

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

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

## REFERENCES

1. Wang Y, Chen J, Chen Y, Wu XT. Improvement of nonalcoholic fatty liver disease in ALT at  $\geq 12$  months after Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy, no effect in ALT and AST at  $< 12$  months after SG and in AST at  $> 12$  and  $\leq 24$  months after RYGB. *Surg Obes Relat Dis* 2020;16(3):447-50. [CrossRef]
2. Moss DW, Henderson RA. Clinical Enzymology In: Burtis CA, Ashwood ER, eds Tietz textbook of clinical chemistry Philadelphia: WB Saunders Company, 1999; 676-84.
3. Friedman L. S, Chopra S, Travis A. C. Approach to the patient with abnormal liver biochemical and function tests. Up to Date, 2014.
4. Yao WH, Wei XL, Guo H, Cheng D, Li H, Sun LM, et al. Tributyltin reduces bone mineral density by reprogramming bone marrow mesenchymal stem cells in rat. *Environ Toxicol Phar* 2020;73:103271. [CrossRef]
5. Thomas L. Alkaline phosphatase (ALP) In: Thomas L, ed Clinical laboratory diagnostics Use and assessment of clinical laboratory results Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft, 1998:36-46.
6. Qian ZP, Mei X, Zhang YY, Zou Y, Zhang ZG, Zhu H, et al. Analysis of baseline liver biochemical parameters in 324 cases with novel coronavirus pneumonia in Shanghai area. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2020;28(3):229-33.
7. Zhang C, Shi L, Wang FS. Liver injury in COVID-19: management and challenges. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2020;5(5):428-30. [CrossRef]
8. Han Y, Zhang H, Mu S, Wei W, Jin C, Tong C, et al. Lactate dehydrogenase, an independent risk factor of severe COVID-19 patients: a retrospective and observational study. *Aging (Albany NY)* 2020;12(12):11245-58. [CrossRef]
9. Zimmerman HJ, Ishak KG. General aspects of drug-induced liver disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1995;24(4):739-57. [CrossRef]
10. Norris W, Paredes AH, Lewis JH. Drug-induced liver injury in 2007. *Curr Opin Gastroenterol* 2008;24(3):287-97. [CrossRef]
11. Andrade RJ, Lucena MI, Kaplowitz N, Garcia-Munoz B, Borraz Y, Pachkoria K, et al. Outcome of acute idiosyncratic drug-induced liver injury: Long-term follow-up in a hepatotoxicity registry. *Hepatology* 2006;44(6):1581-88. [CrossRef]
12. Wroblewski F, Ladue JS. Serum glutamic pyruvic transaminase in cardiac with hepatic disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956;91(4):569-71. [CrossRef]
13. Bergmeyer HU, Horder M. International federation of clinical chemistry. Scientific committee. Expert panel on enzymes. IFCC document stage 2, draft 1; 1979-11-19 with a view to an IFCC recommendation. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 3. IFCC method for alanine aminotransferase. *J Clin Chem Clin Biochem* 1980;18(8):521-34.
14. Bowers GN, Jr., McComb RB. Measurement of total alkaline phosphatase activity in human serum. *Clin Chem* 1975;21(13):1988-95. [CrossRef]
15. Tietz NW. Textbook of Clinical Chemistry, W.B. Saunders, (ed). 1986.
16. Du RH, Liang LR, Yang CQ, Wang W, Cao TZ, Li M, et al. Predictors of Mortality for Patients with COVID-19 Pneumonia Caused by SARS-CoV-2: A Prospective Cohort Study. *Eur Respir J* 2020;55(5):2000524. [CrossRef]
17. Liu Y, Du X, Chen J, Jin Y, Peng L, Wang HHX, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as an independent risk factor for mortality in hospitalized patients with COVID-19. *J Infect* 2020;81(1):30208-5. [CrossRef]
18. Sarin SK, Choudhury A, Lau GK, Zheng MH, Ji D, Abd-El Salam S, et al. Pre-existing liver disease is associated with poor outcome in patients with SARS CoV2 infection; The APCOLIS Study (APASL COVID-19 Liver Injury Spectrum Study). *Hepatol Int* 2020;14(5):690-700. [CrossRef]
19. Cai Q, Huang D, Yu H, Zhu Z, Xia Z, Su Y, et al. COVID-19: Abnormal liver function tests. *J Hepatol* 2020;73(3):566-74. [CrossRef]
20. Zhao X-Y, Xu X-X, Yin H-S, Hu Q-M, Xiong T, Tang Y-Y, et al. Clinical characteristics of patients with 2019 coronavirus disease in a non-Wuhan area of Hubei Province, China: a retrospective study. *BMC Infect Dis* 2020;20:311. [CrossRef]

21. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet* 2020;395:1054-62. [\[CrossRef\]](#)
22. Boettler T, Newsome PN, Mondelli MU, Maticic M, Cordero E, Cornberg M, et al. Care of patients with liver disease during the COVID-19 pandemic: EASL-ESCMID position paper. *JHEP Rep* 2020;2(3):100113. [\[CrossRef\]](#)
23. Barrasa H, Rello J, Tejada S, Martín A, Balziskueta G, Vinuesa C, et al. COVID19 Study Investigators SARS-Cov-2 in Spanish Intensive Care: Early Experience with 15-day Survival in Vitoria. *Anaesth Crit Care Pain Med* 2020;39(5):553-61. [\[CrossRef\]](#)
24. Cai Q, Huang D, Yu H, Zhu Z, Xia Z, Su Y, et al. Characteristics of Liver Tests in COVID-19 Patients. *J Hepatol* 2020;73(3):566-74. [\[CrossRef\]](#)
25. Navarro VJ, Senior JR. Drug-related hepatotoxicity. *N Engl J Med* 2006;354(7):731-39. [\[CrossRef\]](#)
26. Watkins PB. Idiosyncratic drug-induced liver injury in patients: Detection, severity assessment and, regulatory implications. *Adv Pharmacol* 2019;85:165-93. [\[CrossRef\]](#)
27. Whritenour J, Ko M, Zong Q, Wang J, Tartaro K, Schneider P, et al. Development of a modified lymphocyte transformation test for diagnosing drug-induced liver injury associated with an adaptive immune response. *J Immunotoxicol* 2017;14(1):31-8 [\[CrossRef\]](#)
28. Singh S, Khan A. Clinical characteristics and outcomes of coronavirus disease 2019 among patients with preexisting liver disease in the United States: a multicenter research network study. *Gastroenterology* 2020;159(2):768-71. [\[CrossRef\]](#)
29. Gao YD, Ding M, Dong X, Zhang JJ, Kursat Azkur A, Azkur D, et al. Risk factors for severe and critically ill COVID-19 patients: A review. *Allergy* 2021;76(2):428-55. [\[CrossRef\]](#)
30. Ali N. Relationship Between COVID-19 Infection and Liver Injury: A Review of Recent Data. *Front Med-Lausanne* 2020, 7. [\[CrossRef\]](#)

# THE RELATIONSHIP BETWEEN sTREM-1 AND ACTIVATION OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASES

## İNFLAMATUAR BARSAK HASTALIKLARI AKTİVASYONU İLE sTREM-1 ARASINDAKİ İLİŞKİ

Yasin KUTLU<sup>1</sup> , İlkin Deniz TOPRAK<sup>2</sup> , Yasemin GÖKDEN<sup>1</sup> , Hasan ERUZUN<sup>3</sup> , Yücel ARMAN<sup>1</sup> , Şengül AYDIN YOLDEMİR<sup>1</sup> , Zeki TOPRAK<sup>4</sup> , Tufan TÜKEK<sup>5</sup> 

<sup>1</sup>Sağlık Bilimleri University, Okmeydanı Training and Research Hospital, Department of Internal Medicine, Istanbul, Turkey

<sup>2</sup>Sağlık Bilimleri University, GOP Training and Research Hospital, Department of Internal Medicine, Istanbul, Turkey

<sup>3</sup>Ondokuz Mayıs University, School of Medicine, Department of Gastroenterology, Samsun, Turkey

<sup>4</sup>Sağlık Bilimleri University, Bakırköy Dr. Sadi Konuk Training and Research Hospital, Department of Nephrology, İstanbul, Turkey

<sup>5</sup>Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Department of Internal Medicine, Istanbul, Turkey

**ORCID IDs of the authors:** Y.K.0000-0003-2184-634X; İ.D.T. 0000-0002-9320-1252; Y.G. 0000-0001-6767-3072; H.E. 0000-0003-0355-1820; Y.A. 0000-0002-9584-6644; Ş.A.Y. 0000-0003-4236-1181; Z.T. 0000-0002-7411-3628; T.T. 0000-0002-4237-1163

**Cite this article as:** Kutlu Y, Toprak ID, Gokden Y, Eruzun H, Arman Y, Aydin Yoldemir S, et al. The relationship between sTREM-1 and activation of inflammatory bowel diseases. J Ist Faculty Med 2021;84(3):318-23. doi: 10.26650/IUITFD.2020.0090

### ABSTRACT

**Objective:** In inflammatory bowel disease (IBD), there is no reliable biomarker, yet. We aimed to determine whether Serum Soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 (sTREM-1) could be useful as a marker for the diagnosis and/or the determination of disease activity in patients with IBD.

**Material and Method:** A total of 47 patients with ulcerative colitis (UC) and 25 patients with Crohn's disease (CD) were prospectively enrolled. Clinical disease activity was analyzed using the Crohn's Disease Activity Index (CDAI) for CD and the True-love-Witts index for UC.

**Results:** sTREM-1 levels were significantly lower in patients with IBD compared to healthy controls ( $p=0.001$ ). In comparison of the levels of sTREM-1 between the different groups (CD, UC, and healthy controls) the difference was statistically significant. No considerable differences in sTREM-1 levels were determined in patients with active versus quiescent disease. The sTREM-1 levels negatively correlated with C-reactive protein, blood neutrophil-lymphocyte ratio, and positively with haemoglobin levels.

**Conclusion:** sTREM-1 levels are decreased in IBD patients compared with the healthy individuals. It may, therefore, be useful for the diagnosis of IBD. However, it does not seem to be a precise marker of disease activity in IBD and cannot be suggested for assessing disease activity in these patients.

**Keywords:** sTREM-1, inflammatory bowel diseases, Crohn's disease, ulcerative colitis

### ÖZET

**Amaç:** İnflamatuar barsak hastalıkları (İBS) tanısında henüz uygun bir biyobelirteç bulunmamıştır. Çalışmamızda STREM-1 molekülünün bir belirteç olarak, İBS tanısında ve hastalık aktivitesini belirlemede uygunluğunu belirlemeyi amaçladık.

**Gereç ve Yöntem:** Toplam 47 ülseratif kolit ve 25 Crohn hastalığı tanılı vaka çalışmaya dahil edildi. Crohn hastalığı için aktiviteyi belirlemede Crohn Hastalığı Aktivite İndeksi (CDAI), ülseratif kolit için ise Truelove-Witts indeksi kullanıldı.

**Bulgular:** Sağlıklı grupla kıyaslandığında, sTREM-1 molekülü, İBS hastalarında anlamlı derecede düşük saptandı. Ülseratif kolit, Crohn hastalığı ve sağlıklı grup arasında sTREM-1 molekülü kıyaslandığında ise fark istatistiksel olarak anlamlıydı. Aktif ve remisyonda olan hastalarda sTREM-1 düzeylerinde önemli bir fark bulunmamıştır. sTREM-1 seviyeleri C-reaktif protein, nötrofil-lenfosit oranı ve hemoglobin düzeyleri ile negatif korelasyon gösterdi.

**Sonuç:** sTREM-1 seviyeleri İBS'de sağlıklı bireylere göre daha düşüktür. İBS tanısı için yararlı olabilir. Ancak, İBS'de hastalık aktivitesinin belirlemede doğru bir belirteç gibi görünmemektedir ve bu hastalarda hastalığın aktivitesini değerlendirmek için önerilemez.

**Anahtar Kelimeler:** sTREM-1, inflamatuvar barsak hastalıkları, Crohn hastalığı, ülseratif kolit

**Corresponding author/İletişim kurulacak yazar:** hasanerezun@gmail.com

**Submitted/Başvuru:** 15.07.2020 • **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 03.09.2020 •

**Last Revision Received/Son Revizyon:** 25.09.2020 • **Accepted/Kabul:** 01.11.2020 • **Published Online/Online Yayın:** 05.07.2021



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

## INTRODUCTION

In general, inflammatory bowel disease (IBD) refers to two major diseases: Ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD). Though UC and CD have different pathologic and clinical characteristics, the exact pathogenetic mechanisms of IBDs are still not understood in detail.

The triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) is a cell surface receptor expressed on monocytes/macrophages and neutrophils during acute inflammation. It is a member of the immunoglobulin superfamily (1). During inflammation, sTREM-1 is released from the membrane-bounded TREM-1. Studies have shown that bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and fungi such as *Aspergillus fumigatus* may up-regulate TREM-1 expression in the cell culture, peritoneal lavage fluid, and tissue samples obtained from infected patients (2, 3).

However, increased levels of sTREM-1 have also been reported in non-infectious inflammatory diseases such as systemic lupus erythematosus (4), acute pancreatitis (5), and chronic kidney disease (6). Thus, sTREM-1 is not only defined as a diagnostic marker for bacterial or fungal infections but also potentially a new marker for diagnosing and evaluating the severity of the disease in other inflammatory diseases.

Thus, the aims of the present study were: 1) to analyse and compare sTREM-1 levels in UC and CD patients and healthy individuals and 2) to search for an answer to the question of whether sTREM-1 could be used as a possible biomarker in IBD for the diagnosis and evaluation of disease activity.

## MATERIAL AND METHODS

### Patients and clinical data collection

In the gastroenterology and internal medicine departments of the University of Health Sciences Okmeydanı Training and Research Hospital, 72 outpatient or hospitalized adult patients with an estimated GFR greater than 90 (mL/min)/(1.73 m<sup>2</sup>) and with endoscopically and histopathologically confirmed IBD (47 UC, 25 CD) were included. This study was approved by the Ethics Committee of Health Sciences University, Okmeydanı Training and Research Hospital (Date: 28.02.2017, No: 602). Sixteen healthy controls matched for age and sex with these patients were included in the study. Their disease activities were recorded [CD: clinically Crohn's Disease Activity Index (CDAI), UC: clinically Truelove-Witts index] at the time of blood collection (7, 8). Age, gender, type and duration of the disease, area of involvement of the disease in the bowel, medical treatments, and surgical operation history were recorded at the time of blood collection. C-reactive protein (CRP), erythrocyte sedimentation rate (ESR), and complete blood count results were recorded.

Clinical remission in UC was defined as 1 or 2 stools per day without blood, absence of fever and tachycardia, normal hemoglobin levels, and weight gain. Active patients were categorized as mild, moderate, or severe according to the Truelove-Witts index.

For CD, active and/or inactive time points were based on the disease activity scores (active: CDAI>150 points; moderate activity: CDAI:221-450; severe activity: CDAI>450 points; inactive: CDAI≤150 points).

### Measurement of sTREM-1

The serum sTREM-1 levels were analysed in all participants. Blood samples were collected from all of the participants and left to stand for 30 min at room temperature, centrifuged for 10 min at 4000 rpm, and the obtained serum was preserved at -80°C. All stored blood samples were thawed only once on the analysis day. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits were used with a standardized protocol.

### Data analysis and statistics

The Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 24 was used to analyse the data. It has been determined by the Kolmogorov-Smirnov test that the data differ significantly from the normal distribution. Therefore, non-parametric methods have been used in the analysis of data. Descriptive statistics (frequency, mean, standard deviation, and minimum, maximum, median) of the variables were calculated. Significant differences were calculated using the Mann-Whitney U test and Kruskal Wallis test for continuous variables. To determine the relationship between two continuous variables, Spearman's rank correlation was used. P values of less than 0.05 were considered statistically significant.

## RESULTS

### Patients' characteristics

Seventy-two IBD patients (25 CD, 47 UC) and 16 healthy controls were included in the study. The detailed demographic and clinical characteristics of the study participants are presented in Table 1.

**Table 1:** Characteristics of IBD patients and healthy controls

	UC	CD	Control
<b>Number of individuals (n)</b>	47	25	16
<b>Males</b>	25	12	8
<b>Age (years) (range)</b>	49.8 (18-69)	35.8 (25-55)	42.2 (24-62)
<b>Active/remission (n)</b>	28/19	19/6	
<b>Smokers</b>	20	15	9



### The sTREM-1 levels in IBD patients and healthy controls

The patients with CD and UC were evaluated as a single disease group (IBD) and compared with healthy controls (Table 2, Figure 1). As shown in Figure 1 and Table 2, sTREM-1 levels were significantly lower in patients with IBD (mean:221±228 pg/ml) compared to healthy controls (mean:502±404 pg/ml) ( $p=0.001$ ). There was also a statistically significant difference between patient and control groups regarding serum CRP ( $p<0.0001$ ) and ESR ( $p<0.0001$ ) levels, blood neutrophil-lymphocyte ratio (NLR) ( $p=0.003$ ), platelet counts ( $p=0.004$ ), and haemoglobin ( $p<0.0001$ ) levels.

In comparison of the sTREM-1 levels between the different disease groups and controls (CD:mean=169±105, UC: mean=249±269 and healthy controls: mean=502±404 pg/ml) the difference was also statistically significant ( $p=0.004$ ) (Table 3, Figure 2).

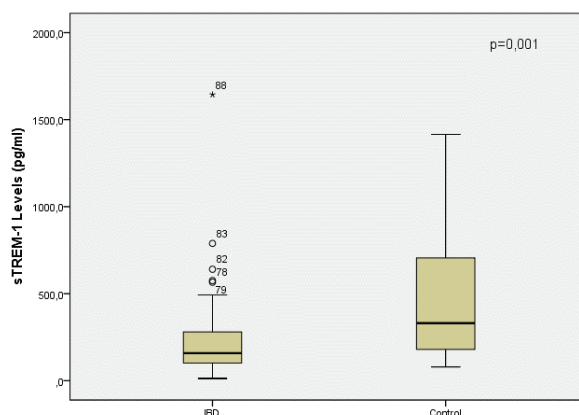
When using the Spearman's rank correlation to study the correlation of sTREM-1 levels with several variables (Table 4), it was found that s-TREM-1 levels negatively correlated with CRP ( $r=-0.387$ ,  $p<0.0001$ ) and ESR ( $r=-0.235$ ,  $p=0.028$ ) levels, NLR ( $r=-0.377$ ,  $p<0.0001$ ), platelet count ( $r=-0.258$ ,  $p=0.015$ ) and positively with the haemoglobin levels ( $r=0.300$ ,  $p=0.004$ ). There was no correlation between sTREM-1 and CDAI ( $p=0.57$ ).

### DISCUSSION

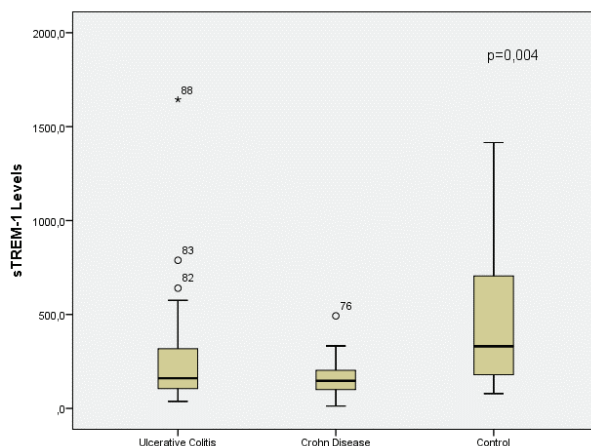
Fluctuating disease course is the characteristic feature of both CD and UC with active disease and remission episodes. Objective evaluation of disease activity is essential for tailoring the best treatment approach and evaluating treatment response. A trustworthy biomarker for IBD would be an extremely helpful guide for physicians.

In IBD patients, extensive efforts have been undertaken to evaluate non-invasive biomarkers and disease activity indices (2, 9, 10). Among laboratory parameters, CRP and ESR are routinely analysed, but they exhibit low specificity for IBD (2, 7). A precise laboratory biomarker that truthfully reflects the disease activity of IBD has not been defined yet. Inflammatory markers can be used as a rational

marker for the IBD group where the main pathogenetic mechanism is intestinal inflammation. Therefore, the current study aimed to analyse the serum sTREM-1 levels in IBD patients in diagnosis and evaluation of disease activity. Park JJ et al. reported that the mean sTREM-1 level in healthy controls ( $0.6\pm1.4$  pg/ml) was significantly lower than that of the patients with either UC ( $60.4\pm41.8$  pg/



**Figure 1:** The distribution of sTREM-1 levels in IBD and control groups



**Figure 2:** The distribution of sTREM-1 levels in ulcerative colitis, Crohn disease and control groups

**Table 2:** The distribution of sTREM-1, CRP, ESR, NLR, platelet and haemoglobin levels in active and quiescent IBD

Group	STREM-1 (pg/mL)	CRP (mg/L)	ESR (mm/s)	NLR	Platelet ( $10^3/uL$ )	Haemoglobin (g/dL)
Remission (n=25)	251±175 (12-640)	4.8±3.7 (0.3-7.7)	18±12 (2-54)	2.3±1.2 (1-7)	280±44 (201-351)	13.5±1.2 (11.7-17)
Active (n=47)	206±252 (31-1644)	42±58 (2.1-320)	40±23 (2-92)	3.3±1.6 (1.2-7.5)	390±162 (163-835)	11.1±2.3 (5.8-15.5)
<b>p value</b>	<b>0.098</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.003</b>	<b>0.002</b>	<b>&lt;0.0001</b>

CRP: C-reactive protein, ESR: Erythrocyte sedimentation rate, NLR: Neutrophil lymphocyte ratio

**Table 3:** The distribution of sTREM-1, CRP, ESR, NLR, platelet and haemoglobin levels in the CD, UC and healthy controls

Group	STREM-1 (pg/mL)	CRP (mg/L)	ESR (mm/s)	NLR	Platelet (10 <sup>3</sup> /uL)	Haemoglobin (g/dL)
Control (n=16)	502±404 (79-1415)	2.7±1.8 (0.3-7.7)	12±7.7 (1-28)	2.04±1.3 (0.9-7)	258±62 (198-342)	14.0±0.9 (12.9-14.9)
IBD (n=72)	221±228 (12-1644)	29±50 (1.3-320)	32 ± 22 (2-92)	2.9±1.6 (1-7.5)	352±143 (163-835)	11.9±2.2 (5.8-17.1)
UC (n=47)	249±269 (37-1644)	18.9±29.7 (1.3-138)	27±20 (2-92)	2.6±1.2 (1-6.5)	352±152 (202-835)	12.1±2.4 (5.8-17.1)
CD (n=25)	169±105 (12.5-492)	48.2±71.2 (2.1-320)	42±25 (6-84)	3.5±2.0 (1.24-7.5)	351±129 (163-617)	11.6±2.0 (8.0-14.5)
p value	0.004	<0.0001	<0.0001	0.003	0.016	0.001

CRP: C-reactive protein, ESR: Erythrocyte sedimentation rate, NLR: Neutrophil lymphocyte ratio

**Table 4:** The correlation of sTREM-1 levels with CRP, ESR, NLR, platelet and haemoglobin

STREM-1 (pg/mL)	CRP (mg/L)	ESR (mm/s)	NLR	Platelet (10 <sup>3</sup> /uL)	Haemoglobin (g/dL)
Correlation coefficient	-0.387	-0.235	-0.377	-0.258	0.300
p value	<0.0001	0.028	<0.0001	0.015	0.004

ml) or CD (66.5±42.4 pg/ml) of the (11). Similarly, Tzivras M et al. reported that sTREM-1 values in healthy individuals (53.31±32.93) were significantly lower than that of the CD (735.10±197.17) and UC (435.82±279.71) group. Interestingly, in the same study, it was also reported that the sTREM-1 concentrations were significantly lower in patients with moderately active CD (CDAI 150-400) (16.03±4.19), remission of CD (4.91±3.21), remission of UC (7.09±4.9), and with mildly active UC (18.91±15) than the healthy control group (10). Also in a study by Billioud V et al. the sTREM-1 level was higher in the CD group than that of the healthy controls (12). Some other recent studies indicate that sTREM-1 levels were nearly undetectable in healthy controls (13, 14).

In our study, we conversely detected significantly lower levels of sTREM-1 in the plasma of IBD patients than in the matched healthy controls. However, we should state that our study's sample size was higher than that of the three other previous studies. Similarly, Bouchon A et al. have shown that TREM-1 was not up-regulated in patients with non-infectious inflammatory diseases caused by immune complexes such as psoriasis, ulcerative colitis, or vasculitis. However, the expression of TREM-1 was up-regulated on neutrophils and monocytes both in cell culture and tissue samples obtained from the patients in the presence of bacterial infections (15). The cause of this discrepancy among the studies is unclear, but it may be because of the different sTREM-1 quantification techniques used in different studies or cross-reactivity with other immunoglobulins. Also, the expression of TREM 1

may vary between races. Moreover, high numbers of bacteria within intestinal mucus have been associated with IBD (16). The fact that the group of patients with severe activation is less in our study (29/72) may have resulted in lower intestinal bacterial overload. So, unlike other studies, we may find the sTREM-1 levels lower in the patients.

Furthermore, we found CRP, ESH, NLR, haemoglobin, and platelet counts statistically significantly different between the groups. The levels of sTREM-1 in UC and CD patients separately were also significantly lower than the healthy individuals.

From this point of view, the data presented here demonstrate that sTREM-1, which acts as a negative acute phase reactant, may be useful for the diagnosis of IBD.

The innate immune system is composed of myeloid-derived cells (neutrophils, monocytes, dendritic cells, and macrophages), natural killer cells, and innate lymphoid cells. These cells, express pattern recognition receptors, which bind stereotypic microbial products. In combination, these cells provide the initial response to either pathogenic or commensal micro-organisms. sTREM-1 may have a role in regulating the responsiveness to the intestinal flora. However, there is currently insufficient data to assess this role. Further studies are needed. But, based upon the results of recent studies and the current study, conditions such as sepsis may increase the STREM-1 levels to manage the bacterial response, but it may not increase in IBD because of the possible defective

function of the sTREM-1 molecule. Another point of view is that sTREM-1 could be suppressed in IBD because of the activation of other proinflammatory pathways.

Moreover, Billoud V et al. reported that sTREM-1 was neither correlated with CDAI nor with CRP. Also, there was no significant difference in sTREM-1 levels between the active and remission groups. So, Billoud et al. concluded that plasma sTREM-1 does not seem to be a precise marker of disease activity in CD and cannot be suggested for analysing disease activity in these patients (12). In our study, when sTREM-1 levels in active and remission groups were compared, the mean of the sTREM-1 levels in the active group was lower, but unfortunately this trend did not reach statistical significance. There was a significant difference between the other inflammatory markers (CRP, ESR, NLR, Haemoglobin, and Platelet counts). This finding suggests that while sTREM-1 may be useful as a negative acute phase reactant in IBD diagnosis, we concluded that sTREM-1 does not seem to be a precise marker of disease activity in IBD and cannot be suggested for analysing disease activity in these patients. Serum sTREM-1 levels were negatively correlated with CRP, ESR, NLR, platelet levels, and positively correlated with haemoglobin levels.

Another possible explanation about the lower sTREM-1 levels in the patients involves the pathophysiological mechanisms. In the pathophysiology of IBD, massive neutrophil infiltration is involved and the degree of neutrophil migration into intestinal crypts correlates with the mucosal injury and the patients' symptoms. Moreover, migrated neutrophils have been concerned in the impairment of epithelial barrier function, tissue destruction, and the maintenance of inflammation by the release of inflammatory mediators (17). Soluble TREM-1 could have been measured lower because of the neutrophil adhesion and also migration to the tissue, even if TREM-1 levels were higher in IBD patients.

Another issue we need to mention is that in UC, the oxidative injury theory is one of the pathogenic mechanisms. TREM-1 is expressed on neutrophils and its engagement stimulates rapid degranulation of neutrophils and oxidative burst; thus sTREM-1 could more exactly show the disease activity in UC than CD(11). Hence, in our study higher sTREM-1 levels were found in UC (mean=249, range=37-1644) compared with CD (mean:169, range=12.5-492). However, the difference was not statistically significant ( $p=0.504$ ). If the sample size was larger, this difference could be significant.

### Limitations of the study

Our study has some limitations. Firstly, our study is limited by its small sample size. Most probably, because of this small sample size, we were unable to display any associations between serum sTREM-1 levels and activity scores.

A larger cohort study is warranted to confirm our data. Secondly, this study was not aimed at elucidating the pathophysiological pathways of sTREM-1 regulation in IBD but was rather designed to evaluate its possible clinical significance in IBD. Third, by choosing a cross-sectional design we cannot rule out excess circulating sTREM-1 as a consequence rather than the driving factor. Fourth, our results were obtained in samples from Turkish people and should be investigated in other ethnic groups. Finally, we did not examine whether the sTREM-1 level could be a predictor of future relapse or not.

### CONCLUSION

In conclusion, our results indicate that the sTREM-1 levels are down-regulated in the serum of IBD patients compared with healthy controls. The sTREM-1 drew attention as a negative acute phase reactant, in the current study. The presence of a negative correlation with CRP suggests that this molecule can be used as a negative acute phase reactant, especially in non-bacterial inflammatory diseases. However, it does not appear to be an accurate marker of disease activity in IBD and cannot be recommended for assessing disease activity in these patients. Further larger-scale studies of sTREM-1 in diverse clinical spectrums of IBD patients are warranted.

---

**Ethics Committee Approval:** This study was approved by the Ethics Committee of Health Sciences University, Okmeydanı Training and Research Hospital (Date: 28.02.2017, No: 602).

**Informed Consent:** Written consent was obtained from the participants.

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

**Author Contributions:** Conception/Design of Study- Y.K., Y.G.; Data Acquisition- Y.K., Z.T.; Data Analysis/Interpretation- İ.D.T., H.E., Y.A., T.T.; Drafting Manuscript- Y.K., İ.D.T., Y.G.; Critical Revision of Manuscript- H.U., Y.A., Z.T., T.T.; Final Approval and Accountability- Y.K., İ.D.T., Y.G., H.E., Y.A., Ş.A.Y., Z.T., T.F.

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

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

---

**Etik Komite Onayı:** Bu çalışma için etik komite Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Tarihi: 28.02.2017, No: 602).

**Bilgilendirilmiş Onam:** Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Çalışma Konsepti/Tasarım- Y.K., Y.G.; Veri Toplama- Y.K., Z.T.; Veri Analizi/Yorumlama- İ.D.T., H.E., Y.A., T.T.; Yazı Taslağı- Y.K., İ.D.T., Y.G.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- H.U., Y.A.,

Z.T., T.T.; Son Onay ve Sorumluluk- Y.K., İ.D.T., Y.G., H.E., Y.A., Ş.A.Y., Z.T., T.F.

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

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

## REFERENCES

1. Bouchon A, Dietrich J, Colonna M. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *J Immunol* 2000;164(10):4991-5. [\[CrossRef\]](#)
2. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys? *Gut* 2006;55(3):426-31. [\[CrossRef\]](#)
3. Scaldaferrri F, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: progress and current concepts of etiopathogenesis. *J Dig Dis* 2007;8(4):171-8. [\[CrossRef\]](#)
4. Bassyouni IH, Fawzi S, Gheita TA, Bassyouni RH, Nasr AS, El Bakry SA, et al. Clinical Association of a Soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 (sTREM-1) in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Immunol Invest* 2017;46(1):38-47. [\[CrossRef\]](#)
5. Liu M, Wu W, Zhao Q, Feng Q, Wang W. High expression levels of Trigger Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 on neutrophils associated with increased severity of acute pancreatitis in mice. *Biol Pharm Bull* 2015;38(10):1450-7. [\[CrossRef\]](#)
6. Essa ES, Elzorkany KM. sTREM-1 in patients with chronic kidney disease on hemodialysis. *APMIS* 2015;123(11):969-74. [\[CrossRef\]](#)
7. Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F Jr. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 1976;70(3):439-44. [\[CrossRef\]](#)
8. Truelove SC, Witts LJ. Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial. *Br Med J* 1955;2(4947):1041-8. [\[CrossRef\]](#)
9. Desai D, Faubion WA, Sandborn WJ. Review article: biological activity markers in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;25(3):247-55. [\[CrossRef\]](#)
10. Tzivras M, Koussoulas V, Giamarellos-Bourboulis EJ, Tzivras D, Tsaganos T, Koutoukas P, et al. Role of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2006;12(21):3416-9. [\[CrossRef\]](#)
11. Park JJ, Cheon JH, Kim BY, Kim DH, Kim ES, Kim TI, et al. Correlation of serum-soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 with clinical disease activity in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2009;54(7):1525-31. [\[CrossRef\]](#)
12. Billioud V, Gibot S, Massin F, Oussalah A, Chevaux JB, Williet N, et al. Plasma soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in Crohn's disease. *Dig Liver Dis* 2012;44(6):466-70. [\[CrossRef\]](#)
13. Radsak MP, Taube C, Haselmayer P, Tenzer S, Salih HR, Wiewrodt R, et al. Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 1 is released in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Dev Immunol* 2007;2007:52040. [\[CrossRef\]](#)
14. Yasuda T, Takeyama Y, Ueda T, Shinzeki M, Sawa H, Takahiro N, et al. Increased levels of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in patients with acute pancreatitis. *Crit Care Med* 2008;36(7):2048-53. [\[CrossRef\]](#)
15. Bouchon A, Facchetti F, Weigand MA, Colonna M. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature* 2001;410(6832):1103-7. [\[CrossRef\]](#)
16. Schultsz C, Van Den Berg FM, Ten Kate FW, Tytgat GN, Dankert J. The intestinal mucus layer from patients with inflammatory bowel disease harbors high numbers of bacteria compared with controls. *Gastroenterology* 1999;117(5):1089-97. [\[CrossRef\]](#)
17. Brazil JC, Louis NA, Parkos CA. The role of polymorphonuclear leukocyte trafficking in the perpetuation of inflammation during inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2013;19(7):1556-65. [\[CrossRef\]](#)

# AN EVALUATION OF PATIENTS DIAGNOSED WITH OPTIC NEURITIS IN CHILDHOOD

## ÇOCUKLUK ÇAĞINDAKİ OPTİK NÖRİT TANILI HASTALARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Mahmut ASLAN<sup>1</sup> , Serkan KIRIK<sup>1</sup> , Serdal GÜNGÖR<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Inonu University, Faculty of Medicine, Department of Pediatrics, Division of Pediatric Neurology, Malatya, Turkey

**ORCID IDs of the authors:** M.A. 0000-0002-5355-8994; S.K. 0000-0002-8658-2448; S.G. 0000-0003-3875-6770

**Cite this article as:** Aslan M, Kirik S, Gungor S. An evaluation of patients diagnosed with optic neuritis in childhood. J Ist Faculty Med 2021;84(3):324-30. doi: 10.26650/IUITFD.2021.814576

### ABSTRACT

**Objective:** Optic neuritis (ON) is an autoimmune disease that starts with acute and subacute vision loss and is characterized by the demyelination of the optic nerve. It may appear as an isolated, idiopathic condition, or it may be a precursor of diseases such as Multiple Sclerosis (MS) or Neuromyelitis Optica (NMO). In the study, we aimed to evaluate ON patients and the long-term prognosis in pediatric patients.

**Material and Method:** In this study, 13 patients who applied to the pediatric neurology clinic between years 2010-2017 and were diagnosed with acute ON were assessed retrospectively.

**Results:** Thirteen patients diagnosed with ON were included in our study, six of whom were diagnosed with isolated ON (6/13, 46.15%). Nine of them were female. The average age of our patients was 12.8±3.07 years. Seven patients (53.85%) had unilateral involvement. A complete recovery was provided in 12 patients. There were recurrences in the follow-up of two patients, diagnosed with MS.

**Conclusion:** ON should absolutely be considered in every child with blurred vision and vision loss. Early stage steroid treatment is the most efficient therapy.

**Keywords:** Demyelinating disease, optic neuritis, pediatric

### ÖZET

**Amaç:** Optik nörit (ON), akut ve subakut görme kaybı ile başlayan, optik sinirin demiyelinizasyonu ile karakterize bir otoimmün hastalıktır. İzole, idiyopatik bir durum olarak ortaya çıkabildiği gibi Multipl Skleroz (MS) veya Nöromiyelitis Optika (NMO) gibi hastalıkların öncüsü de olabilir. Çalışmamızda çocuk hastalarda optik nörit tanılı vakaların demografik özelliklerini ve uzun dönem prognozu değerlendirmeyi amaçladık.

**Gereç ve Yöntem:** Bu çalışmada, 2010-2017 yılları arasında çocuk nöroloji kliniğine başvuran ve akut ON tanısı alan hastalar retrospektif olarak değerlendirildi.

**Bulgular:** ON tanısı alan 13 hasta çalışmaya dahil edildi. Bunların 6'sına (%46,15) izole ON tanısı kondu. Hastaların dokuzu kadın ve ortalama yaş 12,8±3,07 yıldı. Yedi hastada (%53,85) tek taraflı tutulum vardı. On iki hastada tam bir iyileşme sağlanırken, MS tanısı alan iki hastanın takibinde nöks gelişti.

**Sonuç:** Görme bulanıklığı ve görme kaybı olan her çocukta ON mutlaka düşünülmelidir. Erken dönem steroid tedavisi en etkili tedavidir.

**Anahtar Kelimeler:** Demiyelinizan hastalık, optik nörit, pediatrik

### INTRODUCTION

Optic neuritis (ON) is an autoimmune disease that is characterized by the demyelination of the optic nerve. It constitutes 25% of acute demyelinating syndromes in children. It may either appear as an isolated, idiopathic condition, or it may be a precursor of diseases such as

multiple sclerosis (MS) or neuromyelitis optica (NMO). MS has been reported in 38% of patients who have applied with isolated ON (1, 2). This ratio can go up to 80% in patients with white matter hyperintensities in cranial Magnetic Resonance Imaging (MRI) (3). The prevalence of ON was determined as 0.2 in 100,000 in a study performed in Canada (4).

**Corresponding author/İletişim kurulacak yazar:** srknkrk@hotmail.com

**Submitted/Başvuru:** 22.10.2020 • **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 02.01.2021 •

**Last Revision Received/Son Revizyon:** 17.03.2021 • **Accepted/Kabul:** 18.03.2021 • **Published Online/Online Yayın:** 12.07.2021



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

ON is characterized by acute and subacute vision loss (4). The cardinal features of ON include decreased visual acuity, abnormal color vision, and visual field deficits. Visual loss usually occurs over hours to days (4, 5). In children, visual acuity at baseline is typically worse than adults, and the possibility of bilateral vision loss is higher. Papillitis is observed more frequently in pediatric patients with optic neuritis, after excluding other possible etiologies resulting in optic disc edema. Optic disc and nerve involvement may be confirmed by visual evoked potential (VEP) (1, 4, 5). For the differential diagnosis of other diseases that may lead to optic disc edema, neuroimaging, lumbar puncture, and cerebrospinal fluid (CSF) examinations are required (5). In neuroimaging studies, typical MRI findings in dedicated orbital and brain MRI studies consist of the thickening of the optic nerves on T1-weighted imaging, a bright T2 signal along the optic nerve, and post-gadolinium enhancement, all of which are important for a diagnosis (5-7).

Although steroids are the most effective medication in the treatment of acute ON, the forms of use are always controversial. In a multi-center study performed by ON study protocol, the use of steroids through oral, retrobulbar, and intravenous routes were compared. Although intravenous administration of steroids shows a faster effect in previous studies, no differences were determined at the end of one year with regard to vision (2, 6, 7).

In our study, patients diagnosed with acute ON were assessed retrospectively. Demographic characteristics, diagnoses, clinical findings, treatment response, and the clinical monitoring of patients were examined. We aimed to evaluate the clinical features and long term prognosis of ON in pediatric patients.

## MATERIAL AND METHODS

The patients who applied to the pediatric neurology clinic between 2010 and 2017 and were diagnosed with ON were included to our study. ON was diagnosed when patients presented acute or subacute vision loss, decreased visual acuity, papilledema, abnormal color vision, and visual field deficits. Cranial and orbital MRI studies were done in all of the patients. Typical findings indicating ON, which were the thickening of the optic nerves on T1-weighted imaging, bright T2 signal along the optic nerve, and post-gadolinium enhancement, were also noted. This retrospective study was carried out in a tertiary center by evaluating electronic patient files. A lumbar puncture was performed to all the patients. The CSF IgG index was calculated with the CSF IgG index= (CSF IgGxserum albumin)/(CSF albuminxserum IgG) formula. The oligoclonal band (OCB) results were also attained. The demographic characteristics, clinical findings, treatment response, and prognosis of these patients were examined. The patients were followed for 1-4 years. In addition

to an MRI, visual and neurological examinations and VEP tests were performed in all patients. VEP tests were considered abnormal when prolonged P100 latencies were present (>114 ms). Patients whose medical records could not be accessed or who were found to have a secondary cause of acute vision loss (orbital mass, intracranial mass-occupying lesion, etc.) were excluded. Besides the patient who was diagnosed with neurobrucellosis, steroid treatment was given immediately to all of the other patients at the acute phase when the diagnosis of optic neuritis was confirmed. The complete recovery of vision loss was assessed as a complete response.

The isolated recurrent ON was diagnosed in patients having multiple episodes of ON ( $\geq 2$  episodes) and normal cranial MRI with or without OCBs in CSF (7). For the diagnosis of MS (adults and pediatric patients) the 2017 revised McDonald criteria were used; however, these criteria are sometimes not fulfilled in pediatric patients. If the MRI is normal, the OCB is more important in such cases. A NMO disease was diagnosed when the aquaporin-4 antibody was positive and at least one of the core clinical characteristics was present: 1. Optic neuritis, 2. Acute myelitis, 3. Area postrema syndrome-nausea/vomiting/hiccups, 4. Other brainstem syndrome, 5. Symptomatic narcolepsy or acute diencephalic syndrome with MRI lesion(s), 6. Symptomatic cerebral syndrome with MRI lesion(s). Specific MRI criteria are not required to confirm a diagnosis of NMO (7).

## RESULTS

Thirteen patients diagnosed with ON were included in our study. Among these patients, 5 (38.4%) had an isolated non-recurrent ON episode, 5 (38.4%) were diagnosed with MS, and two patients (15.38%) were diagnosed with NMO after the initial work-up. The remaining patient (7.7%) with neurobrucellosis (Table 1).

The age of our patients ranged between 10-17 years, and the mean age was  $15.25 \pm 2.12$  years (Table 1). Nine pa-

**Table 1:** Patients' demographic findings and diagnosis

Patient	n (%)
<b>Age (median)</b>	12.8 $\pm$ 3.07 years
<b>Gender</b>	
Female	9 (69.2)
Male	4 (30.8)
<b>Unilateral</b>	7 (53.85)
<b>Bilateral</b>	6 (46.15)
<b>Diagnosis</b>	
Isolated optic neuritis	5 (38.4)
Multiple sclerosis	5 (38.4)
Neuromyelitis optica	2 (15.38)
Neurobrucellosis	1 (7.7)

**Table 2:** Patients' demographic, laboratory and radiological findings, neurological examination, treatments and follow-up

Patient number	Age of diagnosis	Gender	Follow-up (month)	Diagnosis	Radiology	VEP	Positive laboratory	Treatment	Response to treatment	Neurological examination	Symptoms at initial presentation	Clinical course
1	9	F	56	Isolated ON	Contrast enhancement at right optic nerve	Prolonged P100 latency during right eye stimulation	-	Steroid	Responded	Right visual loss (20/100)	Pain and visual loss in right eye	No attack
2	14	F	26	Isolated ON	Elevated liquid around the right optic nerve	Indiscernible cortical waves during right eye stimulation	-	Steroid	Responded	Right total visual loss (20/40) Right papillary stasis	Blurring and pain in right eye	No attack
3	13,5	F	20	NMO	Contrast enhancement at right optic nerve and 5-7 cervical spinal cord segment	Prolonged P100 latency during right eye stimulation	Anti-MOG (+) Oligoclonal band (+) Increased IgG index	Steroid, azathioprine	Responded	Right visual loss (20/40)	Blurring and visual loss in right eye, numbness in right leg, pain in legs	3 relaps (ON), after azatiopirin no relaps
4	8,5	F	9	Isolated ON	Contrast enhancement at right optic nerve	Prolonged P100 latency during right eye stimulation	-	Steroid	Responded	Right total visual loss (20/200)	Visual loss and pain in right eye	No attack
5	13,5	F	22	MS	Multifocal white matter lesions with contrast enhancement and contrast enhancement at bilateral optic nerve	-	Oligoclonal band (+) Increased IgG index	Steroid	Responded	Bilateral papillary stasis	Headache and blurring	3 attacks Treated with Rebif
6	13	F	17	MS	Multifocal white matter lesions with contrast enhancement and contrast enhancement at bilateral optic nerve	-	Oligoclonal band (+) Increased IgG index	Steroid	Responded	Ataxia	Blurring, numbness in hands, visual loss	3 attacks Treated with Rebif
7	17	M	12	MS	Multifocal white matter lesion with contrast enhancement near pons and lateral ventricle and contrast enhancement at right optic nerve	Indiscernible cortical waves during right eye stimulation	Oligoclonal band (+) Increased IgG index	Steroid	Responded	Right total visual loss (20/100)	Visual loss and pain	No attack
8	13	M	10	Isolated ON	Contrast enhancement at right ON, enlargement at left optic nerve	Indiscernible cortical waves during right eye stimulation Prolonged P100 latency during left eye stimulation	No	Steroid	Responded	Right visual loss (20/80)	Bilateral blurring and pain	No attack
9	12,5	F	56	NMO	Multifocal white matter lesions with contrast enhancement and contrast enhancement at bilateral optic nerve	Prolonged P100 latency during both right and left eye stimulation	Antiqaaporin 4 (+) Oligoclonal band (+) Increased IgG index	Steroid	Not responded	Motor weakness at upper and lower extremities (MRC score 4/5) Left low extremity weakness Visual loss (20/40)	Unsteady gait, abnormal cerebellar tests, visual loss and pain	Nearly total visual lost Treated with Imuran

Table 2: Continued

Patient number	Age of diagnosis	Gender	Follow-up (month)	Diagnosis	Radiology	VEP	Positive laboratory	Treatment	Response to treatment	Neurological examination	Symptoms at initial presentation	Clinical course
10	9	M	18	MS	Multifocal white matter lesions with contrast enhancement and contrast enhancement at bilateral ON	-	Oligoklonal band (+) Increased IgG index	Steroid	Responded	Ataxia	Blurring, numbness in hands, unsteady gait, abnormal cerebellar tests	No attack
11	9,5	M	16	Neurobrucellosis	Contrast enhancement at left optic nerve	Prolonged P100 latency during left eye stimulation	Positive Brucella culture in blood Wright test (+)	Antibiotics and asetolozamide	Responded	Blurring and papillary stasis Visual field lesion	Blurring	No attack
12	17	F	3	Isolated ON	Contrast enhancement at left optic nerve	Prolonged P100 latency during left eye stimulation	Anti-MOG (+)	Steroid	Responded	Visual loss at left eye and painful eye movements	Left visual loss	No attack
13	17	F	3	MS	Contrast enhancement at left optic nerve	Prolonged P100 latency during left eye stimulation	Oligoklonal band (+) Increased IgG index	Steroid	Responded	Visual impairment in left eye (20/200)	Blurring left eye and painful eye movements	After 2 months, new symptoms occurred leading to the diagnosis of MS

ON: Optic neuritis, MS: Multiple Sclerosis, NMO: Neuromyelitis Optica, anti-MOG: anti-myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody

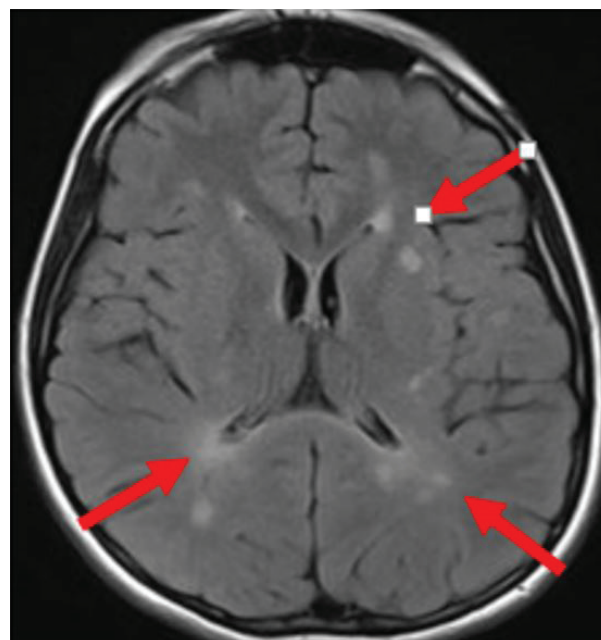


Figure 1: Periventricular and subcortical white matter hyperintensities in T2W images are shown by red arrows (patient 5 in Table 2)

tients (69.20%) were female, and 4 patients (30.80%) were male. The F/M ratio was 2.25. Their ages of diagnosis ranged between 8.5-17 years, with a mean of 12.8+/-3.07 years.

All patients had visual problems such as blurred vision and visual loss as an initial presentation. Five patients diagnosed with isolated ON, one with neurobrucellosis and two with NMO had unilateral involvement of the optic nerve. Other patients applied with bilateral vision problems. Patients diagnosed with isolated ON had no additional complaints. Eight patients (61.54%) had painful eye movements. Eight patients (61.5%) had unilateral involvement, and six patients (38.4%) had bilateral involvement (Table 2).

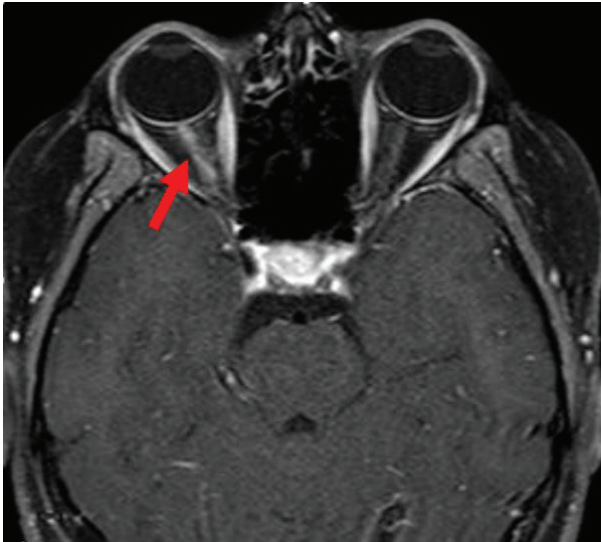
In the neurological examination of our patients; various levels of vision loss or blurred vision were always present. In the patients whose final diagnoses were MS and NMO, the symptoms and signs in addition to the loss of vision at the initial visit were numbing of the hands, ataxic gait, dysmetria/dysdiadochokinesia, foot drop, and muscle weakness in the lower extremities. Papillary stasis was present in the examination of fundus oculi in three patients who were diagnosed with MS, isolated ON, and neurobrucellosis. Furthermore, the neurobrucellosis patient had a visual field defect (Table 2).

In all patients diagnosed with MS, there were diffuse plaques with contrast enhancement in the white matter (Figure 1). The cranial MRI of the other patients revealed hypertrophy in the involved optic nerves and contrast enhancement as well (Figure 2). Ten (76.92%) of the 13 pa-



tients had abnormal VEP tests, the prolonged latencies of P100 wave, or indiscernible cortical waves during the stimulation of the affected eye.

In the CSF examination, glucose levels were normal in all patients, and an elevated cell count was obtained in only



**Figure 2:** The contrast enhancement due to neuritis in right optic nerve is shown by red arrow (patient 8 in Table 2)

one patient, the one who was diagnosed with neurobrucellosis. In this patient, a lumbar puncture showed pleocytosis of the cerebrospinal fluid, predominantly lymphocytes. This patient also had a Brucella serum agglutination titer of 1/320. An elevated protein level was found in eight patients. The OCB checked in CSF was positive, and the IgG index was increased in all of our patients diagnosed with MS and the patients diagnosed with NMO. Our patient diagnosed with NMO also had aquaporin 4 positivity. There was brucella proliferation in both the blood and CSF culture in our patient diagnosed with neurobrucellosis. There was bilateral optic nerve involvement in three (75%) of the five patients diagnosed with MS (Table 2). In isolated ON cases, the initial OCB and IgG index were negative, and no recurrence was found to be an important finding.

All patients were hospitalized, and except for the one with neurobrucellosis, pulse steroids (30 mg/kg/day) were administered for five days. In the follow-up, steroids were administered via oral route at 2 mg/kg/day dose, and they were stopped after decreasing the dose for 4-6 weeks. One of our NMO patients did not respond to treatment. The patient who was diagnosed with NMO developed permanent visual loss because he applied with a decrease in visual acuity later. However, no attack was observed under the treatment with azathioprine. A complete treatment response was obtained in all of our patients diagnosed with isolated ON and MS. A doxy-

cycline, rifampicin, and acetazolamide treatment was applied to our neurobrucellosis patient for 6 months. Interferon 1a [Rebif® (Merck comp.)] was administered to two MS patients who developed attacks in the follow-up (Table 2).

Patients were followed up for  $2.65 \pm 2$  years. Two of the patients diagnosed with MS had no attacks in their follow-up to 2.5 years. Two other patients with MS had two (blurring vision) and three attacks (headache and blurring vision), respectively. Interferon 1a [Rebif® (Merck comp.)] was administered to the patients who experienced attacks. An attack presenting with blurring vision was experienced in the 1-year follow-up of the patient with NMO, and it was concluded with a cure. In the other patient with NMO, total visual loss was present in the affected eyes. The patient with neurobrucellosis had no problems during the follow-up. The patient who with NMO had nearly complete loss of vision and a gait disorder during the 4.5-year follow-up (Table 2). The 13<sup>th</sup> patient (Table 2) presented with a second attack months after the first attack of ON. OCB positivity was seen at the first and second attack. The second episode was accompanied by plaques in T2 and T1W images and contrast enhancement was also noticed.

## DISCUSSION

The average age was  $12.8 \pm 3.07$  years, and F/M ratio was 2.25 in our study. Wileyto et al. had found the average age as 12.2 year, and F/M ratio as 1.6 in their study (8). ON was 53.85% unilateral and 46.15% bilateral in our study. Wileyto et al. had determined similar rates of 58% unilateral and 42% bilateral (8). In our study, one patient of nine had received VEP, and all had various rates of abnormalities. In the study of Wileyto et al. there was 88% distortion in VEP (8). NMO is a demyelinating disease with high mortality and morbidity that starts with ON. Lately, the positivity of antibodies developed against the aquaporin 4 molecule have gained a supporting feature for the diagnosis of NMO (9, 10). In our series, two patients who received NMO diagnosis also applied to the ON clinic. Frequent attacks were experienced in the follow-up of the patients and caused morbidity.

The incidence of MS was reported to be increased in patients with bilateral ON and OCB positive ones, and accordingly, abnormal MRI possibility is higher in patients with bilateral involvement (11). Also in our study, 3 (60%) of the 5 patients diagnosed with MS had bilateral involvement, and all of them were OCB positive. MS was reported in 38% of the patients who applied with isolated ON (5). This rate was found as 36.36% in our study, and it was in compliance with the literature.

OCB are clonally restricted immunoglobulins which are produced by cerebrospinal fluid and parenchymal B lymphocytes. OCB are detected by isoelectric focus (12, 13).

This is an important feature of ongoing inflammatory process in the central nervous system (CNS) and have been reported in a number of neuroinflammatory conditions (paraneoplastic syndromes, NMO spectrum disorders etc.) and infections (herpesvirus encephalitis etc.) (14). The potential role of OCB in maintaining immune responses and creating a neurodegenerative environment in MS has been increasingly noted (15). Some of the novel studies show the presence of OCB at the onset of MS; a higher level of gray matter pathology, increased severe disability, and cognitive impairment were compared to OCB-negative MS over a ten-year study period (16). In primary progressive MS, a lower incidence of OCB positivity has been reported than in relapsing-remitting MS. However, primary progressive MS has higher CSF immunoglobulin levels (17). Patients whose tests were positive for anti-myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody (anti-MOG-Ab) had good responses to steroids in our study. In addition, OCB positivity is a weak prognostic indicator in this study.

In the treatment of acute ON, pulse steroids are recommended for 3-5 days in 20-30 mg/kg/day doses, and oral steroids for 4-6 weeks as maintenance. Most of the ON patients responded to this treatment. In our study, a complete response was not obtained in 9 patients, demyelination in 10 patients, and only the patient diagnosed with NMO developed morbidity. It is known that steroid treatment is generally positive in patients who have developed MS; however, it does not change the recurrence (5). In our series, a complete response was obtained in all of the four MS patients, and two patients developed recurrence in the follow-up.

The fact that our study is a retrospective study and contains a low number of patients may be assumed as negative aspects of our study. The absence of losses in patient data and the average follow-up time of 2.65 years may be assumed as positive aspects of our study.

## CONCLUSION

ON should absolutely be considered in every child with blurred vision and vision loss. It may either be ON, or it could be the precursor of a serious demyelinating disease. For this reason, patients should receive a meticulous neurological and visual examination. VEP, cranial imaging, and lumbar puncture (if required) should be performed. Anti-MOG and OCB positivity are important in terms of prognosis.

**Ethics Committee Approval:** This study was approved by the Ethical Committee of the İnönü University Faculty of Medicine (Date: 2018, No: 10).

**Informed Consent:** Written consent was obtained from the participants.

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

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

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

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

**Etik Komite Onayı:** Bu çalışma için etik komite onayı İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Tarih: 2018, No: 10-18).

**Bilgilendirilmiş Onam:** Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Çalışma Konsepti/Tasarım- M.A.; Veri Toplama- M.A., S.K.; Yazı Taslağı- M.A., S.K.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- S.G.; Son Onay ve Sorumluluk- M.A., S.K., S.G.

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

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

## REFERENCES

1. Optic Neuritis Study Group. The 5-year risk of MS after optic neuritis. Experience of the optic neuritis treatment trial. *Neurology* 1997;49(5):1404-13. [CrossRef]
2. El-Dairi MA, Ghasia F, Bhatti MT: Pediatric optic neuritis. *Int Ophthalmol Clin* 2012;52(3):29-49. [CrossRef]
3. O'Riordan JI, Thompson AJ, Kingsley DP, et al. The prognostic value of brain MRI in clinically isolated syndromes of the CNS. A 10-year followup. *Brain* 1998;121(Pt 3):495-503. [CrossRef]
4. Banwell B, Kennedy J, Sadovnick D, et al. Incidence of acquired demyelination of the CNS in Canadian children. *Neurology* 2009;72(3):232-9. [CrossRef]
5. Melinda Y. Chang, MD, and Stacy L. Pineles, MD. Pediatric Optic Neuritis. *Pediatric Neurology* 2017;24(2):122-8. [CrossRef]
6. Cleary PA, Beck RW, Anderson MM, Jr, Kenny DJ, Backlund JY, Gilbert PR. Design, methods and conduct of the ONTT. *Control Clin Trials* 1993;14(2):123-42. [CrossRef]
7. Borchert M, Liu GT, Pineles S, Waldman AT. Pediatric Optic Neuritis: What Is New. *J Neuroophthalmol* 2017;37(Suppl 1):S14-S22. [CrossRef]
8. Wilejto M, Shroff M, Buncic JR, Kennedy J, Goia C, et al. The clinical features, MRI findings, and outcome of optic neuritis in children. *Neurology* 2006;67(2):258-62. [CrossRef]
9. Wingerchuk DM, Weinshenker BG. Neuromyelitis optica: clinical predictors of a relapsing course and survival. *Neurology* 2003;60(5):848-53. [CrossRef]
10. Lennon VA, Kryzer TJ, Pittock SJ, Verkman AS, Hinson SR. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J Exp Med* 2005;202(4):473-7. [CrossRef]
11. Morales DS, Siatkowski RM, Howard CW, Warman R. Optic neuritis in children. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 2000;37(5):254-9.

12. Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, et al. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Arch Neurol* 2005;62(6):865-70. [\[CrossRef\]](#)
13. Obermeier B, Lovato L, Mentele R, Brück W, Forne I, Imhof A, et al. Related B cell clones that populate the CSF and CNS of patients with multiple sclerosis produce CSF immunoglobulin. *J Neuroimmunol* 2011;233(1-2):245-8. [\[CrossRef\]](#)
14. Juryńczyk M, Craner M, Palace J. Overlapping CNS inflammatory diseases: differentiating features of NMO and MS. *J Neurol Neurosurg. Psychiatry* 2015;86(1):20-5. [\[CrossRef\]](#)
15. Pryce G, Baker D. Oligoclonal bands in multiple sclerosis; Functional significance and therapeutic implications. Does the specificity matter? *Mult Scler Relat Disord* 2018;25(20):131-7. [\[CrossRef\]](#)
16. Farina G, Magliozzi R, Pitteri M, Reynolds R, Rossi S, Gajofatto A, et al. Increased cortical lesion load and intrathecal inflammation is associated with oligoclonal bands in multiple sclerosis patients: a combined CSF and MRI study. *J Neuroinflamm* 2017;14(1):40. [\[CrossRef\]](#)
17. Lourenco P, Shirani A, Saeedi J, Oger J, Schreiber WE, Tremlett H. Oligoclonal bands and cerebrospinal fluid markers in multiple sclerosis: associations with disease course and progression. *Mult Scler* 2013;19(5):577-84. [\[CrossRef\]](#)

# GADOLINIUM RETENTION IN HUMANS: SURVEY OF RADIOLOGISTS AND IMPACT ON DAILY PRACTICE\*

## İNSANDA GADOLİNYUM BİRİKİMİ: RADYOLOJİ UZMANLARI VE KLİNİK UYGULAMALAR ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Mehmet Emin ADİN<sup>1</sup> , David Mark YOUSEM<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Yale School of Medicine, Connecticut, USA, emin.adin@gmail.com

<sup>2</sup>Johns Hopkins University School of Medicine, Maryland, USA

**ORCID IDs of the authors:** M.E.A. 0000-0002-0070-9998; D.M.Y. 0000-0002-1222-6643

**Cite this article as:** Adin ME, Yousem DM. Gadolinium retention in humans: survey of radiologists and impact on daily practice. J Ist Faculty Med 2021;84(3):331-41. doi:10.26650/IUITFD.2021.874672

### ABSTRACT

**Objective:** We sought to assess the 1) awareness and impact of emerging gadolinium retention data on preferences of radiologists in their practice, and 2) factors that influence the attitudes about gadolinium use and risk. This study also documents various specifics of radiology practice in Turkey.

**Methods:** A twenty-one question survey was directed to radiologists who were at least one year from completion of residency and/or fellowship training. A survey link was emailed to the members of the Turkish Society of Radiology and was active for four weeks. The results were statistically analyzed.

**Results:** Three hundred and thirty-five radiologists completed the survey. At the time of this survey, 89% of respondents were aware of gadolinium retention in the brain. Forty-five percent of respondents said they decreased the amount of gadolinium administered and/or frequency of gadolinium-enhanced scans since the emergence of the gadolinium retention data. Eighty-eight percent of radiologists, who were aware of the molecular classification of different gadolinium agents, used a macrocyclic agent. Thirty-nine percent (n=130) had switched to a macrocyclic agent from a linear agent within the previous three years. Radiologists' attitudes toward gadolinium retention were significantly associated with their background factors such as experience in radiology, subspecialty training, and daily work definition, amongst others. Observance of hyperintense dentate nuclei due to gadolinium retention was uncommon in daily practice.

**Conclusions:** Gadolinium retention publications have affected the practice of contrast enhanced Magnetic resonance imaging (MRI) scans, mostly in the form of switching to a macrocyclic gadolinium agent and decreasing utilization of gadolinium in general for some indications. These changes varied among radiologists by background factors.

**Keywords:** Gadolinium, magnetic resonance imaging, surveys and questionnaires, radiologists, cerebellar nuclei

### ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmada, 1) Son yıllarda ortaya konulan, insan beyininde gadolinium birikimi verileri hakkında radyologların farkındalığı, klinik uygulamaları ve tercihleri üzerindeki etkisi ve 2) Gadolinium kullanımı ve riski hakkındaki yaklaşımları etkileyen faktörlerin değerlendirilmesi amaçlandı. Ayrıca bu çalışmada, Türkiye'deki radyoloji pratiği hakkında önemli bilgiler sunuldu.

**Yöntem:** İhtisas veya yan dal eğitiminin tamamlanmasından en az bir yıl geçmiş olan radyologlara yönelik 21 soruluk anket hazırlandı. Türk Radyoloji Derneği üyelerine e-posta ile gönderilen anket linki dört hafta boyunca aktifti.

**Bulgular:** Üç yüz otuz beş kişi anketi tamamladı. Katılımcıların %89'u beyinde gadolinium birikimi hakkındaki gelişmelerden haberdardı. Katılımcıların %45'i gadolinium birikimi verilerinin ortaya çıkmasından bu yana uyguladıkları gadolinium miktarını ve/veya gadolinium gerektiren görüntülemelerin sıklığını azalttığını söyledi. Gadolinium ajanlarının moleküler sınıflandırmasının farkında olan radyologların %88'i makrosiklik bir ajan kullandığını belirtti. Yüzde 39'u (n=130) önceki üç yıl içinde (2015-2018) lineer bir ajandan makrosiklik bir ajana geçtiğini bildirdi. Radyologların gadolinium birikimine yönelik yaklaşımı, radyoloji deneyimi, üst ihtisas eğitimi, kurumu ve bir radyoloji konferansına katılım sıklığı gibi kişiye özel faktörlerle önemli ölçüde ilişkiliydi. Katılımcıların günlük klinik pratikte gadolinium birikimine bağlı gelişen hiperintens dentat nükleus gözlemlene sıklığı düşüktü.

**Sonuç:** Gadolinium birikimi çalışmaları, radyologların MR görüntüleme pratiğini ve yaklaşımını, çoğunlukla makrosiklik gadolinium ajanlarına geçiş ve gadolinium kullanımını azaltmak suretiyle etkilemiştir. Bu değişiklikler, radyologların bireysel koşullarına göre değişiklik göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Gadolinium, manyetik rezonans görüntüleme, anketler, radyoloji uzmanları, serebellar çekirdekler

\* This study was presented at ECR 2020.

**Corresponding author/İletişim kurulacak yazar:** emin.adin@gmail.com

**Submitted/Başvuru:** 04.02.2021 • **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 02.03.2021 •

**Last Revision Received/Son Revizyon:** 06.03.2021 • **Accepted/Kabul:** 08.03.2021 • **Published Online/Online Yayın:** 27.05.2021



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

## INTRODUCTION

Since the original reports of intracranial gadolinium retention/deposition in 2014, a number of studies have been published that attribute Hyperintense Dentate Nuclei (HDN) on T1-weighted MR images to repeated administrations of intravenous gadolinium (1-8). The clinical ramifications of gadolinium deposition have been debated and not yet substantiated, but the possible unwanted outcomes have worried practitioners, patients, drug companies and government organizations (9-11). On the other hand, while alternative contrast agents are being investigated, gadolinium is still integral to many Magnetic resonance imaging (MRI) protocols (12, 13). Involvement of radiologists in study ordering, appropriateness of scan indication, optimum protocoling and patient engagement are among the new areas of emphasis on utilization (14-16). Despite the numerous publications and significant research activity around the potential impact of gadolinium retention in the human body, little is known about the impact of these initiatives on daily radiology practice. Practice diversity exists across the globe. This study was based in Turkey, a country where the majority of radiologists individually prescribe gadolinium for their patients prior to MRI scans. Thus, their personal preferences may have a direct impact on the landscape of gadolinium utilization. This is important, as the study was conducted in a period when there was no limitation on the utilization of linear gadolinium molecules in the market yet. In this regard, the aim of this study was two fold: 1) to assess the awareness and impact of emerging gadolinium retention data on the preferences of radiologists in their practice, and 2) analyze the factors that influence the attitudes about gadolinium use and risk.

## METHODS

A survey was created using [www.surveymonkey.com](http://www.surveymonkey.com) (San Mateo, CA) (see Appendix 1). The survey was anonymous with no personal information like name, sex, race, age or the name of the institution being asked, thus, as per ethical committee regulations, the study did not require IRB processing. All respondents read a written informed consent and agreed to participate prior to proceeding with the survey questions. Each question included a 'no response' choice to allow participants not to share their opinions. The survey was addressed to radiologists who were at least one year from completion of residency and/or fellowship training. A closed survey link was emailed to the members of the Turkish Society of Radiology and a reminder email was sent two weeks later. The survey was active during four weeks (October-November 2018). The survey was set to allow only one individual response per device, to prevent repetitive responses. A total of 21 multiple-choice questions were asked. Participants were able to skip any question.

Statistical analyses were performed using SPSS version 21.0 for Windows (SPSS, Chicago, Ill). Descriptive statistics are presented. Decimals of percentages were rounded, as the actual numbers of samples (n) were provided. Respondents were grouped according to types of institution, scope of daily radiology practice, experience in radiology, and frequency of their attendance at radiology conferences/meetings. Normality of the variables' dispersion was tested with the Kolmogorov-Smirnov test. Nonparametric Kruskal-Wallis H Test was used to test the difference between the groups, because all tested variables showed a non-Gaussian dispersion ( $p < 0.0001$  on Kolmogorov-Smirnov test for all variables). Groups were statistically analyzed and significant data for each subgroup are presented in a table (Table 1).

## RESULTS

Three hundred and thirty-five members of Turkish Society of Radiology with at least one year of experience after radiology training completed the survey.

### Background of respondents

Thirty-one percent ( $n=103/335$ ) of respondents were affiliated with government-run community hospitals, 48% ( $n=160$ ) with academic institutions, and 21% were affiliated with a private practice ( $n=64$  private hospital;  $n=7$  imaging centers). Seventy-two percent ( $n=242/335$ ) of respondents defined their daily radiology practice as a general diagnostic radiology, 22% ( $n=72$ ) as a diagnostic subspecialty, and 6% ( $n=21$ ) as an interventional subspecialty. There was significant difference between participants' daily work definition based on their institution. Most of the community hospitals and private practice radiologists (94% and 83%, respectively) were performing general radiology as opposed to academic center radiologists (53%, ( $p < 0.0001$ )). 50% ( $n=167$ ) of respondents were 1 to 5 years from their previous training period (either fellowship or residency), 19% ( $n=63$ ) were 5 to 10 years, 10% ( $n=33$ ) were 10 to 15 years, and 20% ( $n=67$ ) were more than 15 years after their training period. Thirty-six percent ( $n=122$ ) of respondents attended a radiology conference less frequently than once a year, 30% ( $n=101$ ) attended once a year, and 30% ( $n=100$ ) attended more frequently than once a year with 2% ( $n=5$ ) attending conferences at least once a month. Forty-two percent of general radiology practitioners were attending a scientific conference less frequently than a year, as opposed to subspecialists and interventional radiologists (25% and 10%, respectively ( $p=0.02$ )).

### Awareness of radiologists and adoption in clinical practice

Twenty-two percent ( $n=84$ ) did not know the class (macrocytic or linear) of gadolinium agent they used. Twenty-six percent ( $n=86$ ) were using a macrocytic gadolinium

**Table 1.** Grouped survey results with respect to background factors of respondents

	Daily work definition				Decision of gadolinium administration				Who prescribe gadolinium				
	General diagnostic radiology	Interventional radiology	Subspecialty	p value	Radiologist to scan	Clinician	Radiologist and clinician's collaboration	p value	Radiologist	Clinician	p value		
Community hospital	94% (n=97)	2% (n=2)	4% (n=4)	<.0001	11% (n=11)	74% (n=72)	14% (n=14)	.021	83% (n=84)	17% (n=17)	<.0001		
Academic centers	53% (n=85)	11% (n=17)	37% (n=58)		26% (n=41)	55% (n=88)	12% (n=20)		92% (n=147)	7% (n=11)			
Private practice	83% (n=59)	3% (n=2)	14% (n=10)		9% (n=6)	21% (n=15)	35% (n=25)		62% (n=44)	35% (n=25)			
Renal function tests prior to a gadolinium enhanced scan													
	Not testing	eGFR	Serum creatinine level	Both creatinine and eGFR	Don't know	Recording prior Gadolinium administrations		p value	Agent specific consent form prior to scan		p value		
						Yes	No		Yes	No			
Community hospital	38% (n=39)	6% (n=6)	32% (n=33)	12% (n=12)	13% (n=13)	31% (n=32)	69% (n=71)	.003	59% (61)	41% (n=42)	P<0.01		
Academic centers	29% (n=47)	6% (n=10)	24% (n=39)	29% (n=46)	11% (n=18)	38% (n=61)	62% (n=99)		55% (88)	45% (n=72)			
Private practice	42% (n=30)	10% (n=7)	32% (n=23)	14% (n=10)	1% (n=1)	61% (n=43)	39% (n=28)		75% (53)	23% (n=16)			
Frequency of HDN observation													
	Never	Weekly	Monthly	Yearly	p value	Time passed since the previous residency or fellowship				p value	Radiologists involved in bulk purchase		p value
						1-5 years	5-10 years	10-15 years	>15 years		No	Yes	
Community hospital	72% (n=74)	2% (n=2)	12% (n=12)	11% (n=11)	.001	63% (n=65)	21% (n=22)	7% (n=7)	8% (n=8)	<.0001	54% (n=56)	25% (n=26)	20% (n=21)
Academic centers	65% (n=104)	4% (n=7)	13% (n=21)	16% (n=26)		51% (n=81)	16% (n=26)	11% (n=18)	19% (n=31)		22% (n=36)	44% (n=70)	34% (n=54)
Private practice	47% (n=33)	3% (n=2)	21% (n=15)	28% (n=20)		28% (n=20)	21% (n=15)	11% (n=8)	39% (n=28)		41% (n=29)	45% (n=32)	14% (n=10)
Awareness of Gadolinium retention in human body													
	Unaware	since 2015	since 2016	since 2017	since 2018	p value	Recently switching to a different class of gadolinium agent			p value			
							Don't know the class	Continues linear	Continues macrocyclic		To linear	To macrocyclic	
Community hospital	14% (n=14)	29% (n=30)	28% (n=29)	27% (n=28)	2% (n=2)	.007	24% (n=25)	7% (n=7)	24% (n=25)	39% (n=40)	4% (n=4)	.001	
Academic centers	4% (n=6)	34% (n=55)	36% (n=58)	18% (n=28)	8% (n=13)		19% (n=31)	6% (n=9)	25% (n=40)	45% (n=72)	4% (n=6)		
Private practice	25% (n=18)	30% (n=21)	24% (n=17)	18% (n=13)	1% (n=1)		39% (n=28)	4% (n=3)	30% (n=21)	24% (n=17)	N/A		

**Table 1.** Grouped survey results with respect to background factors of respondents (Continued)

	Decision of gadolinium administration				Radiologists involved in bulk purchase				Time passed since the previous residency or fellowship				
	Radiologist prior to scan	Radiologist during the scan	Clinician	Radiologist and clinician's collaboration	Yes	No	Don't know	p value	1-5 years	5-10 Years	10-15 Years	>15 years	p value
General diagnostic radiology	12% (n=28)	10% (n=24)	61% (n=147)	17% (n=42)	43% (n=104)	31% (n=76)	26% (n=62)	.014	55% (n=132)	19% (n=47)	8% (n=19)	16% (n=39)	.001
Interventional radiology	29% (n=6)	10% (n=2)	43% (n=9)	19% (n=4)	33% (n=7)	48% (n=10)	19% (n=4)		52% (n=11)	19% (n=4)	5% (n=1)	24% (n=5)	
Subspecialty	33% (n=24)	18% (n=13)	31% (n=22)	18% (n=13)	15% (n=11)	58% (n=42)	26% (n=19)		33% (n=24)	17% (n=12)	18% (n=13)	32% (n=23)	
Awareness of gadolinium retention in human body													
Frequency of attendance to radiology meeting/conferences													
Unaware	Since 2015	since 2016	Since 2017	Since 2018	p value	more than once a month	once a year	more than once a year	less than once a year	p value			
General diagnostic radiology	12% (n=30)	29% (n=70)	30% (n=73)	22% (n=54)	.035	1% (n=3)	29% (n=71)	24% (n=59)	42% (n=102)	.02			
Interventional radiology	N/A	24% (n=5)	48% (n=10)	29% (n=6)	N/A	N/A	43% (n=9)	48% (n=10)	10% (n=2)				
Subspecialty	11% (n=8)	44% (n=32)	29% (n=21)	13% (n=9)	3% (n=2)	3% (n=2)	29% (n=21)	43% (n=31)	25% (n=18)				
Timing of Gad agent switch													
Type of institution													
Within previous three months	A year ago	1-3 years ago	p value	Com-munity hospital	Academic center	Private practice	p value						
General diagnostic radiology	12% (n=29)	33% (n=79)	.003	40% (n=97)	35% (n=85)	24% (n=59)	.015						
Interventional radiology	5% (n=1)	38% (n=8)		10% (n=2)	81% (n=17)	10% (n=2)							
Subspecialty	8% (n=6)	28% (n=20)	32% (n=23)										

**Table 1.** Grouped survey results with respect to background factors of respondents (Continued)

	Type of institution			Daily work definiton			Decision of gadolinium administration						
	Communi-ty hospital	Academic center	Private practice	p value	General diagnostic radiology	Interven-tional radiology	Subspe-ciality	p value	Radiolo-gist prior to scan	Clinician	Radiolo-gist and clinician's collabora-tion	p value	
1-5 years from resi-dency	39% (n=65)	49% (n=81)	12% (n=20)	<.0001	79% (n=132)	7% (n=11)	14% (n=24)	.001	15% (n=25)	63% (n=105)	15% (n=25)	.033	
5-10 years from resi-dency	35% (n=22)	41% (n=26)	24% (n=15)		75% (n=47)	6% (n=4)	19% (n=12)		13% (n=8)	57% (n=36)	17% (n=11)		
10- 15 years from residency	21% (n=7)	56% (n=18)	24% (n=8)		58% (n=19)	3% (n=1)	39% (n=13)		18% (n=6)	42% (n=14)	30% (n=10)		
>15 years from resi-dency	12% (n=8)	46% (n=31)	42% (n=28)		58% (n=39)	8% (n=5)	34% (n=23)		27% (n=18)	28% (n=19)	19% (n=13)		
Recording prior gadolinium adminis-trations													
Details of gadolinium agent on MRI report													
	Yes	No	p value	Yes	No	p value	Never	Weekly	Monthly	Yearly	p value		
1-5 years from resi-dency	34% (n=56)	67% (n=111)	.006	25% (n=41)	75% (n=126)	.001	68% (n=114)	2% (n=3)	13% (n=21)	16% (n=27)	.022		
5-10 years from resi-dency	37% (n=23)	64% (n=40)		29% (n=18)	71% (n=45)		70% (n=44)	3% (n=2)	11% (n=7)	13% (n=8)			
10- 15 years from residency	58% (n=19)	42% (n=14)		30% (n=10)	64% (n=21)		46% (n=15)	N/A	24% (n=8)	27% (n=9)			
>15 years from resi-dency	54% (n=36)	46% (n=31)		51% (n=34)	48% (n=32)		52% (n=35)	9% (n=6)	16% (n=11)	19% (n=13)			
Recently switching to a different class of gadolinium agent													
Who prescribe gadolinium													
	General diagnostic radiology	Subspe-ciality	Interven-tional radiology	p value	Radiolo-gist	Clinician	p value	Don't know the class	Continues linear	Continues macro-cyclic	To macro-cyclic	To linear	p value
more than once a month	60% (n=3)	N/A	40% (n=2)	.001	80% (n=4)	20% (n=1)	<.0001	N/A	N/A	N/A	40% (n=2)	60% (n=3)	<.0001
one confer-ence a year	70% (n=71)	9% (n=9)	21% (n=21)		88% (n=89)	9% (n=9)		17% (n=17)	7% (n=7)	30% (n=30)	42% (n=42)	4% (n=4)	
more than once a year	59% (n=59)	10% (n=10)	31% (n=31)		92% (n=92)	7% (n=7)		14% (n=14)	6% (n=6)	24% (n=24)	53% (n=53)	3% (n=3)	
less than once a year	84% (n=102)	2% (n=2)	18% (n=15)		71% (n=87)	27% (n=33)		41% (n=50)	5% (n=6)	22% (n=27)	26% (n=32)	3% (n=3)	



**Table 1.** Grouped survey results with respect to background factors of respondents (Continued)

Awareness of gadolinium retention in human body						
	Unaware	since 2015	since 2016	since 2017	since 2018	p value
At least once a month	N/A	80% (n=4)	20% (n=1)	N/A	N/A	<0.01
More than one conference per year	2% (n=2)	34% (n=34)	42% (n=42)	21% (n=21)	1% (n=1)	
One conference per year	7% (n=7)	44% (n=44)	27% (n=27)	17% (n=17)	6% (n=6)	
less than one conference per year	22% (n=27)	19% (n=23)	28% (n=34)	24% (n=29)	7% (n=9)	

agent and had not change it in the previous three years, 39% (n=130) were using a linear gadolinium agent and switched it to a macrocyclic agent in the previous three years, 6% (n=19) were still using linear gadolinium agents, 3% (n=10) were using a macrocyclic gadolinium agent and switched to a linear agent in the previous three years. In terms of the timing of change within the previous three-year period; 11% (n=36) switched to a gadolinium agent within the previous three months, 32% (n=107) in the previous year, 17% (n=56) within the previous three years. Thirty-six percent (n=107) switched because of gadolinium retention, 26% (n=77) because of NSF risk, and 11% (n=33) switched because of the agent's cost. In terms of gadolinium deposition, 11% (n=38) were unaware of emerging gadolinium retention data. This ratio was highest among those who attended a radiology conference less frequently than once a year (see Table 1 for details). Thirty-two percent (n=107) came to know of gadolinium deposition risk in 2015, 31% (n=104) in 2016, 21% (n=69) in 2017, and 5% (n=16) in 2018. Thirty-six percent (n=121) had not read the statements of the following organizations about gadolinium retention. Thirty-nine percent (n=132) read the American College of Radiology (ACR) and American Society of Neuroradiology (ASNR) statements, 7% (n=24) read the US Food and Drug Administration (FDA) statement, 15% (n=50) read the European Medicines Agency's (EMA) pharmaceutical risk assessment committee statement on the matter. In terms of the impact of knowledge of gadolinium retention on practitioners' clinical practice, 45% (n=152) said they decreased the amount and/or frequency of gadolinium-enhanced scans since the time that they found out about gadolinium deposition risk, while 46% (n=156) did not. Respondents were asked to rate the frequency of cases in which they faced diagnostic difficulty because of a reluctance to administer gadolinium. Twenty-two percent (n=73) answered 'never', 59% (n=195) answered 'seldom' and 19% (n=63) answered 'frequently'. On the frequency of encountering HDN on pre-contrast MRI studies, 64% of radiologists (n=211) said 'never', 18% (n=58) said 'once a year', 15% (n=48) said 'once a month', 3% (n=11) said 'once a week'. While 58% (n=54) respondents did report the existence of an HDN on their final MRI reports, 42% (n=39) did not. The highest HDN observation rates were seen in academic centers (Table 1). Forty-four percent (n=105) of respondents would include the generic name and amount of gadolinium agent used for a scan in their final MRI report, 56% (n=131) would not. One percent (n=3) of respondents faced a medico-legal problem or a complaint by patients and/or their relatives because of gadolinium administration, 99% (n=330) did not. All three of those who had a medico-legal problem were between 1-5 years from residency.

The rate at which radiologists detected HDN was highest among academic centers, followed by private practices and community hospitals, respectively (p:0.001), see

Table 1 for details). Awareness of gadolinium retention was highest among academic centers and was followed by community hospitals and private practice (94%, 86% and 75% respectively ( $p=0.07$ ) see Table 1 for details). Thirty-nine percent of private practice members were unaware of the class of gadolinium agent they were using as opposed to 24% in community hospitals and 19% in academic centers ( $p=0.001$ ). Forty-five percent of academic centers switched from linear to macrocyclic agents and this was followed by community hospitals (39%) and private practices (24%,  $p=0.01$ ). Unawareness rates of gadolinium deposition was inversely correlated with how frequently the physicians attended a radiology conference (22%, 7%, 2% and 0% in groups with; less frequent than once a year, once a year, more frequent than once a year and once a month, respectively ( $p<0.01$ )).

### Routine MRI workflow and protocoling

According to 53% ( $n=173$ ) of respondents, the referring physician would decide whether to include post-gadolinium sequences for a given MRI scan. This practice was significantly common in community hospitals (Table 1). The remaining respondents said a radiologist would be involved in the decision-making process in the following roles: Prior to a particular scan, radiologist would decide whether gadolinium administration is needed (17%,  $n=58$ ); at the time of a scan, after evaluating initial sequences (12%,  $n=29$ ); and prior to a scan after a discussion with referring physician based on clinical indication (18%,  $n=59$ ). The rate of a radiologist's role in the decision-making process of gadolinium injection was the highest among subspecialty-focused radiology practitioners and experienced radiologists (Table 1). Interestingly, private practice radiologists had higher rates of involvement in gadolinium protocoling compared to academic centers and community hospitals (74% versus 55% and 21%, respectively ( $p=0.021$ )). For outpatient MRI scans, a radiologist would prescribe gadolinium in 84% ( $n=280$ ), while the rest were prescribed by a referring physician (16%,  $n=55$ ). Thirty-eight percent ( $n=128$ ) of respondents were consulted in the hospital's gadolinium purchase process for inpatient services, while 36% ( $n=122$ ) were not. Twenty-five percent ( $n=85$ ) said they were unaware of the hospital's purchase process. Twenty-eight percent ( $n=95$ ) of respondents were routinely testing serum creatinine levels before an MRI scan, 7% ( $n=23$ ) tested eGFR levels and 20% ( $n=68$ ) tested both creatinine and eGFR levels on a routine basis. Thirty-five percent ( $n=117$ ) tested neither parameter and 10% ( $n=32$ ) were unaware of renal function testing status prior to an MRI scan in their institution. Kidney function testing was highest in academic centers, followed by community hospitals and private practices ( $p=0.03$ , see Table 1 for details). Sixty percent ( $n=202$ ) of participants offered agent specific (e.g. linear vs macrocyclic gadolinium) consent forms to patients prior to MRI scans, while 39% ( $n=131$ ) did not. Forty-one percent

( $n=136$ ) of participants recorded a cumulative dose of gadolinium administration from prior studies before undergoing an MRI scan, while 59% ( $n=199$ ) did not. The rate of recording cumulative gadolinium administration from prior studies, including outside studies, was highest by radiologists in private practice (61% compared to 38% and 31% in academic centers and community hospitals, respectively ( $p<0.0001$ )). Agent specific consent acquisition was most common among private practice practitioners followed by community hospitals and academic centers (75%, 59% and 55%, respectively ( $p<0.001$ )).

### DISCUSSION

Awareness of gadolinium retention has had a significant impact on practitioners' approaches to contrast enhanced MRI scans, as nearly a half of our study participants decreased the amount of gadolinium administration per scan, and/or decreased the frequency of gadolinium-enhanced scans since they became aware of the gadolinium retention risk. This stance did not show any significant association with respondents' background factors like institution, experience and practice type. Currently, the vast majority of participants in our present study use a macrocyclic agent, with more than half of them having switched to it within the previous three years (2015-2018), mostly during 2018. The rate of switching to a macrocyclic agent was highest among academic centers. This may be because they were the most concerned about gadolinium deposition, they were the heaviest users of linear agents prior to recognizing the gadolinium deposition controversy, or because of economic factors not explored by this study. Certainly the manufacturers of gadolinium agents have been marketing on the basis of reduced gadolinium deposition since the reports of HDN have arisen. In terms of reasoning, among those who switched to a different class of gadolinium, most stated they had done so because of recent gadolinium retention data, and this was followed by NSF risk and the agent's cost. Moreover, despite several published studies in high impact journals (1-30), a tenth of radiologists are still unaware of gadolinium retention issues. This ratio was highest among those who attended a radiology conference less frequently than once a year. Frequency of attendance at a scientific conference was most common amongst interventional radiology practitioners. The awareness rate of gadolinium deposition was correlated with how frequently the radiologist attended a radiology conference. This signifies that despite the ubiquity of online and offline learning tools, conventional conferences are still an important source of practitioners' update on HDN. On the other hand, observance of retained intracranial gadolinium is uncommon, as more than a half of our respondents had never noticed HDN in their daily practice, which maybe resultant of the scarcity of MRI utilization in their practice. The highest HDN observa-

tion rates were seen in academic centers. In terms of MRI protocoling, in practice of more than a half of our survey respondents, ordering physicians make the decision whether to administer gadolinium at the time of the study request. This practice was very common in community hospitals. The rate of a radiologist's role in the decision-making process of gadolinium injection was the highest in private practices and among subspecialty-focused radiology practitioners and experienced radiologists. Despite the professional responsibility of radiologists in study protocoling, the present study shows that in the majority of cases, particularly in government-run and community hospitals, referring physicians are the primary decision-makers of the gadolinium necessity for a given scan (53%). However, radiologists still determine the particular gadolinium agent to be used in the vast majority of practices (84%), regardless of the type of institution.

Gadolinium, a rare earth metal, has been documented to remain in the human brain for as long as eleven years and possibly longer (4). It is also retained in the skin, bones and liver, along with other organs and has different chemical forms and uncertain *in vivo* behavior (17-22). After such gadolinium retention reports emerged, safety concerns were raised and linear agents, which deposit more frequently in tissue, were eventually suspended from the contrast agent market in many countries (9). Public attention to gadolinium retention reports increased the number of people with symptoms attributed to their gadolinium injection history, which also sparked medico-legal issues (10, 11). In the present study, a medicolegal case associated with a patient's gadolinium administration history was an extremely rare occasion. Although practitioners remain wary, adverse clinical outcomes of intracranial gadolinium retention have not been proved to date. In their survey study of gadolinium related symptoms, Semelka et al. reported a variety of symptoms including, but not limited to, headache and bone pain (10). However, their study suffered from selection bias, as symptoms were self-reported by patients who underwent repeated doses of gadolinium administration and attributed their symptoms to this history. Along with new clinical regulations in gadolinium applications, possible ways to decrease cumulative gadolinium exposure in chronic patients like multiple sclerosis are being investigated (23, 24). Gong et al. succeeded in decreasing the amount of gadolinium needed for a brain MRI by up to 10% of the regular dose by using a series of image enhancing algorithms (25).

The present study also has critical findings in terms of radiology practice in Turkey. Participants in our study were affiliated with academic facilities, community hospitals and private practices, in decreasing order. Young radiologists were more commonly affiliated with community hospitals, possibly resulting from an ongoing Turkish gov-

ernment policy of obligatory duty in underserved areas after completion of a residency program. The majority of survey respondents defined their daily basis practice as general diagnostic radiology (low percentages of subspecialty focused practice). This is in line with the radiology training landscape reported by the European Society of Radiology (ESR), which showed fellowship training was not well established in European countries when compared with North America (26). Gadolinium retention data affected the majority of radiologists in this survey. Nonetheless, in the English literature, very few studies are available on impact of emerging gadolinium retention data on daily radiology practice and gadolinium enhanced MRI exercises (27-29). Despite diversity in adopted methods and their small sample sizes, available studies' overall results are in line with our present study. In their online open survey study conducted on Radiopedia.com, Fitzgerald et al. reported that 24 of 87 (28%) respondents made a change in their practice by either switching to a macrocyclic agent or decreasing the number of contrast enhanced MRI scans (29). This percentage is lower than our findings; however, their study was conducted at an earlier stage of gadolinium retention awareness. In an international survey study conducted on 58 neurosurgeons and neuroendocrinologists by Nachtigal et al., 28% of respondents were unaware of gadolinium retention risk (28). In their study 11% of respondents were unaware of the class of gadolinium agent they prescribed, a mildly lower rate than our findings (28). There is also a scarcity of studies focusing on contrast enhanced MRI exercises like gadolinium protocoling, consent forms, and renal function testing. In a study conducted on 162 pediatric radiologists (mostly academic centers from the USA), 25% of respondents would not contact the clinician and thus, the ordering physician would decide the MRI protocol as far as gadolinium administration (27). In our study this rate was significantly higher (53%). Together, our studies show that referring clinicians are deciding whether to administer contrast on MRI studies to a large extent. This may have caused unwarranted gadolinium injections (28).

More than a half of respondents in our study performed routine renal function testing prior to an enhanced MRI scan, mostly by testing serum creatinine levels. There was significant association between renal function testing and the type of institution. Academic centers had the highest renal function testing rates. In their aforementioned study, Blumfield et al. reported that 59% of their respondents required renal function testing only in selected cases (27). Two thirds of our respondents had distinct consent forms for each gadolinium class; same as the frequency of recording prior individual gadolinium administrations before undergoing an MRI scan. Prior exposure data recording was significantly higher among private practices and experienced radiologists. Recording prior administrations of gadolinium is important, as

gadolinium retention has been shown to be dose-dependent (30).

In terms of reporting practices, more than a half of our respondents did not include the generic name and amount of gadolinium agent used for the scan in their final MRI report. Experienced radiologists had significantly higher reporting rates. More than half of those who encounter HDN would report this finding in their MRI report. Fitzgerald et al. reported that 38% of participants in their study had never seen HDN and 58% of their respondents would report HDN in the final MRI report, in line with our present findings.

The present study was conducted on a large cohort of radiologists from Turkey, thus the findings may not necessarily reflect the worldwide situation. However, findings of the current study were comparable to that of globally conducted studies (26, 28, 29). Because the name of institutions was not queried, the specific number of institutions participating in this study could not be quantified. Heterogeneity within the practice of a certain institution was not queried, as the study aimed to investigate the radiologists' personal stance rather than institutional practices.

## CONCLUSION

Gadolinium retention publications have affected radiologists' preferences in the practice of contrast enhanced MRI scans, mostly in the form of switching to a macrocyclic gadolinium agent and decreasing utilization of gadolinium. These changes varied among radiologists by background factors such as experience in radiology, practice setting, and subspecialty training. Some of our findings about the practice of radiology in Turkey are potentially actionable. There may be a need for greater involvement of radiologists in study protocoling and gadolinium decision-making.

**Acknowledgements:** Authors thank survey responders for their time. We also thank Turkish Society of Radiology for sending invitation e-mails to their members.

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

**Author Contributions:** Conception/design of study- M.E.A.; Drafting manuscript- M.E.A., D.M.Y.; Critical revision of manuscript- M.E.A.; Final approval and accountability- M.E.A., D.M.Y.

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

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

**Teşekkür:** Yazarlar, zaman ayırıp ankete cevap verenlere ve Türkiye Radyoloji Derneği'ne ve üyelerine davet e-postası gönderdikleri için de ayrıca teşekkür ederler.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Çalışma konsepti/tasarım-M.E.A.; Yazı taslağı-M.E.A., D.M.Y.; İçeriğin eleştirel incelemesi- M.E.A.; Son onay ve sorumluluk- M.E.A., D.M.Y.

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

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

## REFERENCES

1. Kanda T, Ishii K, Kawaguchi H, Kitajima K, Takenaka D. High signal intensity in the dentate nucleus and globus pallidus on unenhanced T1-weighted MR images: relationship with increasing cumulative dose of a gadolinium-based contrast material. *Radiology* 2014;270:834-41. [CrossRef]
2. Adin ME, Yousem DM, Kleinberg L, et al. Hyperintense dentate nuclei on T1 weighted MRI. Presented at the XX<sup>th</sup> Symposium Neuroradiologicum, Istanbul, Turkey, 2014. O152
3. Kanda T, Osawa M, Oba H, Toyoda K, Kotoku JI, Haruyama T, et al. High signal intensity in dentate nucleus on unenhanced T1-weighted MR images: association with linear versus macrocyclic gadolinium chelate administration. *Radiology* 2015;275(3):803-9. [CrossRef]
4. Adin ME, Kleinberg L, Vaidya D, Zan E, Mirbagheri S, Yousem DM. Hyperintense dentate nuclei on T1-weighted MRI: relation to repeat gadolinium administration. *AJNR Am J Neuroradiol* 2015 Sep 10. [CrossRef]
5. Ramalho J, Semelka RC, Ramalho M, Nunes RH, AlObaidy M, Castillo M. Gadolinium-based contrast agent accumulation and toxicity: an update. *AJNR Am J Neuroradiol* 2016;37(7):1192-8. [CrossRef]
6. Kanda T, Fukusato T, Matsuda M, Toyoda K, Oba H, Kotoku JI, et al. Gadolinium-based contrast agent accumulates in the brain even in subjects without severe renal dysfunction: evaluation of autopsy brain specimens with inductively coupled plasma mass spectroscopy. *Radiology* 2015;276(1):228-32. [CrossRef]
7. Tamrazi B, Nguyen B, Liu CS, Azen CG, Nelson MB, Dhall G, et al. Changes in signal intensity of the dentate nucleus and globus pallidus in pediatric patients: impact of brain irradiation and presence of primary brain tumors independent of linear gadolinium-based contrast agent administration. *Radiology* 2017;287(2):452-60. [CrossRef]
8. Adin ME, Yousem DM. Hyperintense dentate nuclei at precontrast T1-weighted MRI: Gadolinium deposition or brain irradiation?. *Radiology* 2018;288(2):632-3. [CrossRef]
9. Runge VM. Dechelation (Transmetalation): Consequences and Safety Concerns With the Linear Gadolinium-Based Contrast Agents, In View of Recent Health Care Rulings by the EMA (Europe), FDA (United States), and PMDA (Japan). *Investigative Radiology* 2018;53(10):571-8. [CrossRef]
10. Semelka RC, Ramalho J, Vakharia A, AlObaidy M, Burke LM, Jay M, et al. Gadolinium deposition disease: Initial description of a disease that has been around for a while. *Magn Reson Imaging* 2016;34(10):1383-90. [CrossRef]
11. <https://gadoliniumtoxicity.com>.
12. Gale EM, Atanasova IP, Blasi F, Ay I, Caravan P. A manganese alternative to gadolinium for MRI contrast. *J Am Chem Soc* 2015;137(49):15548-57. [CrossRef]

13. Park, Eun-Ah, Whal Lee, Young Ho So, Yun-Sang Lee, Bong-sik Jeon, et al. Extremely small pseudoparamagnetic iron oxide nanoparticle as a novel blood pool T1 magnetic resonance contrast agent for 3 T whole-heart coronary angiography in canines: comparison with gadoterate meglumine. *Invest Radiol* 2017;52(2):128-33. [\[CrossRef\]](#)
14. Vijayarathi A, Kharkar R, Salamon N. Strategies for patient-centered communication in the digital age. *Curr Probl Diagn Radiol*. Epub 2018 Jun 1. [\[CrossRef\]](#)
15. Gefen R, Bruno MA, Abujudeh HH. Online portals: gateway to patient-centered radiology. *AJR Am J Roentgenol* 2017;209(5):987-91. [\[CrossRef\]](#)
16. Oren O, Kebebew E, Ioannidis JP. Curbing unnecessary and wasted diagnostic imaging. *JAMA* 2019;321(3):245-246. [\[CrossRef\]](#)
17. Guo BJ, Yang ZL, Zhang LJ. Gadolinium deposition in brain: current scientific evidence and future perspectives. *Front Mol Neurosci* 2018;11:335. [\[CrossRef\]](#)
18. Zhao J, Zhou ZQ, Jin JC, Yuan L, He H, Jiang FL, et al. Mitochondrial dysfunction induced by different concentrations of gadolinium ion. *Chemosphere* 2014;100:194-9. [\[CrossRef\]](#)
19. Abraham JL, Thakral C. Tissue distribution and kinetics of gadolinium and nephrogenic systemic fibrosis. *Eur J Radiol* 2008;66(2):200-07. [\[CrossRef\]](#)
20. Ray DE, Cavanagh JB, Nolan CC, et al. Neurotoxic effects of gadopentetate dimeglumine: behavioral disturbance and morphology after intracerebroventricular injection in rats. *AJNR Am J Neuroradiol* 1996;17(2):365-73.
21. Behzadi AH, Farooq Z, Zhao Y, Shih G, Prince MR. Dentate Nucleus Signal Intensity Decrease on T1-weighted MR Images after Switching from Gadopentetate Dimeglumine to Gadobutrol. *Radiology* 2018;287(3):816-23. [\[CrossRef\]](#)
22. Adin ME, Yousem DM. Disappearance of T1-weighted MRI hyperintensity in dentate nuclei of individuals with a history of repeat gadolinium administration. *Radiology* 2018;288(3):911. [\[CrossRef\]](#)
23. Karimian-Jazi K, Wildemann B, Diem R, Schwarz D, Hielscher T, Wick W, et al. Gd contrast administration is dispensable in patients with MS without new T2 lesions on follow-up MRI. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2018;5(5):e480. [\[CrossRef\]](#)
24. Eichinger P, Schon S, Pongratz V, Wiestler H, Zhang H, Bussas M, et al. Accuracy of unenhanced MRI in the detection of new brain lesions in multiple sclerosis. *Radiology* 2019;291(2):429-35. [\[CrossRef\]](#)
25. Gong E, Pauly JM, Wintermark M, Zaharchuk G. Deep learning enables reduced gadolinium dose for contrast-enhanced brain MRI. *J Magn Reson Imaging* 2018;48(2):330-40. [\[CrossRef\]](#)
26. European Society of Radiology. Radiological Training Programmes in Europe: EAR Education Survey - Analysis of Results. 2004 EAR Education Committee. [accessed 2016 May 8]. Available from: URL: [https://www.myesr.org/html/img/pool/ESR\\_brochure\\_05.pdf](https://www.myesr.org/html/img/pool/ESR_brochure_05.pdf)
27. Blumfield E, Moore MM, Drake MK, Goodman TR, Lewis KN, et al. Survey of gadolinium-based contrast agent utilization among the members of the Society for Pediatric Radiology: a Quality and Safety Committee report. *Pediatr Radiol* 2017;47(6):665-73. [\[CrossRef\]](#)
28. Nachtigall LB, Karavitaki N, Kiseljak-Vassiliades K, Ghalib L, Fukuoka H, Meyer LT, et al. Physicians' awareness of gadolinium retention and MRI timing practices in the longitudinal management of pituitary tumors: a "Pituitary Society" survey. *Pituitary* 2019;22(1):37-45. [\[CrossRef\]](#)
29. Fitzgerald RT, Agarwal V, Hoang JK, Gaillard F, Dixon A, Kanal E. The impact of gadolinium deposition on radiology practice: an international survey of radiologists. *Curr Probl Diagn Radiol* 2019;48(3):220-3. [\[CrossRef\]](#)
30. McDonald RJ, McDonald JS, Kallmes DF, Jentoft ME, Murray DL, Thielen KR, et al. Intracranial gadolinium deposition after contrast-enhanced MR imaging. *Radiology* 2015;275(3):772-82. [\[CrossRef\]](#)

## Appendix 1: Survey questions.

This survey is designed solely for scientific research purposes and there is no financial relation with any company, institution or organization. The survey does not require any personal information. Please do not participate in the survey if one full year has not passed since your residency and/or fellowship training. To be part of this study, your current radiology practice should include MRI studies, please do not participate otherwise.

1-What kind of institution do you work for?

2-Which of the following best describes your daily radiology practice?

3-Who decides whether an MRI examination in your institution will be performed with or without IV contrast agent application?

4-If gadolinium is prescribed to patients before scan as part of your practice, who prescribes MR contrast agent in your hospital?

5- If contrast agents are provided by hospital itself, does hospital management consult radiologists before making bulk purchases of MRI contrast agent?

6-Do you routinely check kidney function before your patients are given gadolinium?

7-Do you question your patients' exposure and amount of gadolinium before the contrast-enhanced MRI is performed?

8- Are you aware of molecular classes (linear or macrocyclic) of gadolinium agents? If so, have you changed the contrast agent you have prescribed in the previous three years?

9-If yes, why?

10- If yes, when did you change it?

11-How often do you attend to scientific conferences/meetings?

12- How many years ago did you complete your residency/fellowship training?

13-Have you heard that gadolinium accumulates in the brain after a certain amount of exposure in some individuals with a history of contrast-enhanced MRI scans? If so, when did you first get to know it? (Please jump to the 15<sup>th</sup> question if your answer to the first part of this question is No).

14-Did you change the amount or frequency of contrast agent application after being aware of gadolinium accumulation in the human brain?

15-Do you include in your MRI report the name and amount of contrast material given to the patient during scan?

16-Do you have a drug-specific consent form for the patients and/or relatives before administration of a contrast agent?

17- Have you ever observed a hyperintense dentate nucleus at your routine clinical MRI readings? If so how often do you observe?

18-Do you report hyperintense dentate nucleus in your MRI report?

19-Are you aware of the following medical institutions' announces about gadolinium accumulation in the brain? (click all that apply).

20-Did you experience any diagnostic difficulties because you hesitated to use contrast media in your clinical practice?

21-Have you received any feedback from your patients about the accumulation of gadolinium in the brain or have you had any medical-legal problems?

## ASSESSMENT OF PAVLIK HARNESS EFFECTIVENESS IN 3-6 MONTHS OLD PATIENTS WITH UNSTABLE HIPS

### İNSTABİL KALÇAYA SAHİP, 3-6 AYLIK HASTALARIN TEDAVİSİNDE PAVLİK BANDAJI ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Tuna PEHLİVANOĞLU<sup>1,2</sup> , Serkan BAYRAM<sup>3</sup> , Mehmet DEMİREL<sup>3</sup> , Mustafa Abdullah ÖZDEMİR<sup>3</sup> ,  
Yavuz SAĞLAM<sup>3</sup> , Turgut AKGÜL<sup>3</sup> , Fuat BİLGİLİ<sup>3</sup> 

<sup>1</sup>Emsey Hospital, Department of Orthopaedics and Traumatology, Istanbul, Turkey

<sup>2</sup>Yeni Yüzyıl University, Faculty of Health Sciences, Istanbul, Turkey

<sup>3</sup>Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Department of Orthopaedics and Traumatology, Istanbul, Turkey

**ORCID IDs of the authors:** T.P. 0000-0001-8886-7538; S.B. 0000-0001-7651-1200; M.D. 0000-0003-1131-7719; M.A.Ö. 0000-0002-8281-3528; Y.S. 0000-0003-4475-8211; T.A. 0000-0002-0704-3797; F.B. 0000-0002-9417-2166

**Cite this article as:** Pehlivanoglu T, Bayram S, Demirel M, Ozdemir MA, Saglam Y, Akgul T, et al. Assessment of the effectiveness of pavlik harness in management of unstable hip patients between the age of three and six months. J Ist Faculty Med 2021;84(3):342-7. doi: 10.26650/IUITFD.2021.879703

#### ABSTRACT

**Objective:** To investigate the effectiveness of the Pavlik harness (PH) in the treatment of patients who were diagnosed with unstable hips aged between three and six months.

**Material and Method:** We retrospectively reviewed patients aged three to six months who were diagnosed with unstable hips and treated with the PH. The patients were treated using PH and were closely followed by a weekly clinical examination. The primary outcome was to assess the success rate of PH treatment in children with unstable hips (Graf Type IID, III, IV). A successful outcome as a result of PH treatment was defined as either obtaining a Type I hip based on Graf's method of hip ultrasonography or a concentric reduction based on hip radiography.

**Results:** Thirty-three patients' 34 hips were included in this study with a diagnosis of DDH based on hip sonography performed according to the Graf's method at the time of initial admission to our department. The mean age of the children in the beginning of the PH treatment was 17 weeks (range, 14–22); the mean follow-up was 48 months (range, 24–84). On admission, the mean alpha angle was 46 (range, 35–58). According to the Graf classification, DDH was determined as Type D in 18 hips (52%), Type IIIa in 5 hips, Type IIIB in 3 (24%) and Type IV in 8 (24%). Of these 34 hips, 28 (82%) were treated successfully using PH, with a mean application time of 11.24 weeks (range, 4–20). The success rate of PH treatment was determined as 82% (28/34 hips).

**Conclusions:** Favorable outcomes can be expected from PH

#### ÖZET

**Amaç:** Üç ila altı aylık stabil olmayan kalça teşhisi konulan hastaların tedavisinde pavlik bandajın (PB) etkinliğinin araştırılması.

**Gereç ve Yöntem:** Üç ila altı aylık stabil olmayan kalça teşhisi konulan ve pavlik bandajı ile tedavi edilen hastalar geriye dönük olarak incelendi. Hastaların stabil olmayan kalçaları PB kullanılarak tedavi edildi ve haftalık olarak klinik muayene ile yakından takip edildi. Birincil sonuç kriteri, stabil olmayan kalçaları olan çocuklarda PB tedavisinin başarı oranını değerlendirmektir (Graf'a göre tip IID, III, IV). Başarı kriterleri, Graf'ın kalça ultrasonografisi yöntemine göre tip I kalça veya kalça radyografisinde konsantrik reduksiyon elde edilmesi olarak tanımlandı.

**Bulgular:** Bölümümüze ilk başvuru sırasında Graf yöntemine göre ultrasonografik muayene ile tanı konan 33 hasta ve 34 kalça çalışmaya dahil edildi. Pavlik bandajı tedavisinin başlangıcında çocukların ortalama yaşı 17 hafta (aralık, 14–22); ortalama takip süresi 48 ay (aralık, 24–84) olarak saptandı. Başvuru anında ortalama alfa açısı 46 (aralık, 35–58) olarak ölçüldü. Graf sınıflandırmasına göre GKD, 18 kalça Tip D (%52), 5 kalçada Tip IIIa, 3 (%24) tip IIIB ve 8 (%24) tip IV olarak saptandı. Bu 34 kalçadan 28'i (%82), ortalama 11,24 hafta (aralık, 4–20) uygulama süresi ile PB kullanılarak başarıyla tedavi edildi. PH tedavisinin başarı oranı %82 (28/34 kalça) olarak belirlendi.

**Sonuç:** İnstabil kalçası olan (Graf Tip IID, III, IV) üç ila altı ay arasında tanı konulan hastalarda PB tedavisinden başarılı sonuçlar elde edilebilir.

**Corresponding author/İletişim kurulacak yazar:** dr.serkanbayram89@gmail.com

**Submitted/Başvuru:** 24.02.2021 • **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 07.04.2021 •

**Last Revision Received/Son Revizyon:** 14.04.2021 • **Accepted/Kabul:** 14.04.2021 • **Published Online/Online Yayın:** 13.07.2021



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

treatment in patients with unstable hips (Graf Type IID, III, IV) who are diagnosed between the age of three and six months.

**Keywords:** Developmental dysplasia of the hip; Pavlik harness; harness treatment; treatment success rate; late-diagnosed hip dysplasia

**Anahtar Kelimeler:** Gelişimsel kalça displazisi; Pavlik bandajı; bandaj tedavisi; tedavi başarı oranı; geç teşhis edilen gelişimsel kalça displazisi

## INTRODUCTION

Today, after more than 50 years, the Pavlik harness (PH) treatment, which works physiologically based on the principle that 'the hip is an organ of movement and must be treated by movement', has been the method of choice to manage children with developmental dysplasia of the hip (DDH) (1, 2). The PH treatment remains the mostly preferred treatment modality, especially in patients younger than six months of age, because PH is the most thoroughly analyzed type of splint and reported to be safe and highly effective method as compared to any other type of splint in large series of patients (3-6). Nonetheless, there is disagreement in the literature about the optimal age to begin PH treatment. Most authors advocate that the harness can endow successful results as long as the treatment is initiated before the age of two to three months (4-8).

Conversely, some authors suggest that there is no correlation between age at the start of treatment and failure of PH treatment (9, 10). According to our review of the literature, there certainly needs to be more research to clarify the question about whether the PH is a safe and effective method of treatment for patients with unstable hips diagnosed after three months of age. However, PH treatment is not effective after six months of age (4, 9).

Therefore, the present study aimed to investigate the effectiveness of the PH in the treatment of a specific group of children who were diagnosed with unstable hips aged between three and six months.

## MATERIAL AND METHOD

### Study design

We retrospectively reviewed 87 patients (127 hips) who were treated with the PH after suffering from DDH with

a subluxated or dislocated hip from 2009 to 2016 in a single center (university hospital). According to the eligibility criteria as shown in Table 1, after 54 children (93 hips) were excluded, the remaining 33 children (34 hips) with an unstable hip (25 females and 8 males) who were diagnosed between the ages of three to six months and treated using PH were included in the present study. This retrospective study was approved by the Institutional Review Board; written and informed consent was obtained from the patients' parents.

After detailed clinical examination, all of these 33 patients underwent hip sonography based on Graf's method at the time of initial admission to our department. The mean age of the children in the beginning of the PH treatment was 17 weeks (range, 14–22); the mean follow-up was 48 months (range, 24–84) (Table 2). On admission, the mean alpha angle was 46 (range, 35–58).

**Table 2:** Demographic characteristics of the study participants

Mean age at the start of PH* treatment (week)	17 (range, 14–22)
Gender	25 females, 8 males
Side, R/L	21/13
Bilateral involvement	1
Unilateral involvement	32
Follow-up duration (month)	48 (range, 24–84)

\*PH: Pavlik harness

### Management protocol and primary outcome parameters

The patients' unstable hips were treated using the PH and closely followed by weekly clinical examination. The PH was applied by a single pediatric orthopedic surgeon

**Table 1:** Eligibility criteria for inclusion and exclusion of the study participants

Inclusion criteria	Exclusion criteria
A diagnosis of typical DDH*	<3 months old at the time of diagnosis
Children with unstable hips (Type IID, III, IV**) who were diagnosed after 3 months of age	<2 years of follow-up
Being willing to participate the study	Lost to follow-up
	Concomitant neuromuscular comorbidities
	Teratological dislocations
	Previous failed orthosis treatment
	Unwilling to participate the study

\*DDH: Developmental dysplasia of the hip, \*\*The diagnosis of DDH was established based on the Graf's method of hip ultrasonography



for all patients, and the parents were advised regarding the proper use of the PH. Concentric reduction of unstable hips was assessed using ultrasonography with a three-week-interval. All patients were also evaluated with a hip radiograph to assess the ossific nucleus of the femoral head and hip morphology. Additionally, patients who developed the ossific nucleus of the femoral head were also evaluated radiologically to assess the reduction after applying the PH.

Establishing success as a result of PH treatment in three to six month old children, who were diagnosed with unstable hips after performing a sonography according to Graf's method (Type IID, III, IV) was the main goal of the present study. Success was defined as achieving either a Type I hip after performing a hip sonography according to Grafs method or detection of a concentric reduction on hip X-ray.

The application of the PH continued until a stable hip was obtained or concentric reduction was determined by plain radiography. If stable reduction was obtained, but residual acetabular dysplasia was noticed on the final radiograph, the bandage was switched to a custom-made abduction splint for two or three months. If no reduction on plain radiography or no Graf-type improvement was observed within three weeks of PH treatment, the treatment was considered to have failed. The treatment was subsequently discontinued, and closed reduction combined with the application of a hip-spica cast was performed. As soon as use of the harness was ceased, a standard anteroposterior radiograph of the hip was taken to evaluate the reduction of the femoral head and acetabular development. The patients were then regularly monitored by radiographic examination at one year of age and then once annually.

Radiographic examination (anteroposterior and frog leg lateral X-rays) was performed after the cessation of the treatment with PH, at the end of the treatment with hip abduction orthosis, and at the final follow-up visit. In order to assess residual acetabular dysplasia, the acetabular index (AI) as described by Hilgenreiner was measured on all AP radiographs (11). The Kalamchi and MacEwen classification were also used to examine avascular necrosis of the femoral head (AVN) (12). In an effort to minimize observer and measurement bias, all radiographic assessments were carried out by a single pediatric orthopedic surgeon.

## RESULTS

According to Graf classification, DDH was determined as Type D in 18 hips (52%), Type IIIa in 5 hips, Type IIIb in 3 (24%) and Type IV in 8 (24%). Of these 34 hips, 28 (82%) had been treated successfully with PH, with a mean application time of 11.24 weeks (range: 4–20). The mean

time from the beginning of treatment to stable reduction was 11 weeks (range: 4–20). Since a stable hip according to hip sonography or a concentric reduction on hip radiography was not obtained as a result of PH treatment in six unstable hips (3 with Type IIIB, 3 with Type IV) of five children; they were treated with closed reduction and a hip-spica cast, which was performed under general anesthesia. When these results were taken into account, the success rate of PH treatment was determined as 82% (28/34 hips) (Table 3).

**Table 3:** Rates of successful treatment

DDH* type **	Success rate
Type D	17/18 (95%)
Type IIIa	3/5 (60%)
Type IIIb	2/3 (66%)
Type IV	6/8 (75%)

\*DDH: Developmental dysplasia of the hip

\*\*DDH was categorized according to Graf classification

During the follow-up period, four unstable hips (four children) were treated successfully with the PH. However, the ultrasonographic examination could not be performed due to the development of the femoral head ossification center. In these hips, PH treatment was ceased when the stable and concentric reduction was determined based on plain radiography and physical examination. In the remaining 24 unstable hips of 24 patients, the mean alpha angle improved from 46° (range, 35°–58°) on admission to 62° (range, 60°–65°) at the end of the PH treatment.

The average AI of children treated successfully with the PH significantly improved from 34.5° (range: 30°–38.5°) after PH treatment to 18.2° (range: 14°–22°) at a mean follow-up of 48 months (range: 24–84 months). According to Tönnis's criteria regarding the DDH in pediatric population, only one child had a mild dysplasia (13). Furthermore, the final radiographic examination revealed that two hips of patients (1 with type IIIB and 1 with Type IV), in whom PH failed and closed reduction and a hip-spica cast was performed, had developed AVN according to the Kalamchi and MacEwen classification (1 hip with Type I, 1 hip with Type IV). Otherwise, the children treated successfully by PH showed no signs of AVN. Additionally, no other complications including femoral nerve palsy or skin breakdown occurred during the follow-up.

## DISCUSSION

Many authors have referred to the PH as the first-choice of treatment in children younger than months of age due to its dynamic role in terms of hip reduction (2, 14-16). Nonetheless, the literature lacks consensus regarding the optimal age to begin PH treatment. Although most

authors have proposed that substantially higher success rates can be expected if the treatment is initiated prior to the age of two to three months (4-8), some studies have suggested that the age at the start of treatment was not an indicator of success for PH treatment (9, 10). Besides, most studies regarding this topic have included a heterogeneous group of patients in terms of hip stability (Graf type), and a limited number of studies in the literature have specifically focused on the success rate of PH in unstable hips (Type D-III-IV as per Graf classification) after three months of infancy (1, 4-9).

Unlike most studies on the topic, we more specifically asked if the PH is a safe and effective nonsurgical treatment for children with unstable hips diagnosed after three months of infancy. Therefore, our study specifically focused on a certain group of patients with severe problems and reflected the results of PH treatment for these unstable hips. The evidence from the present study demonstrated that the PH may be an influential technique in achieving stable reduction with a low rate of complications for children with unstable hips (Graf Type IID, III, IV) who are diagnosed with DDH and treated between three and six months of age.

Lerman et al. assessed predictors of treatment failure for PH in 93 patients (137 hips) with DDH (9). Seventeen patients (26 hips) failed the PH treatment, and the authors found no correlation between initiation of treatment and rates of failure. However, in the failed group, only two patients were aged three months or older. Therefore, their results could not be extrapolated to the whole late-diagnosed DDH. In contrast, in a study which included 31 cases of DDH of Graf Type IIc or more severe cases, Atalar et al. found Graf type, age at start of treatment, and bilaterality as the success indicators of PH treatment (4). In their study, the mean age at the start of treatment was eight weeks, with age ranging from 4 to 20 weeks. In this study, children aged seven weeks and under exhibited a higher rate of success than those aged eight weeks and over. Furthermore, patients with Type IIc, D or III hips presented a higher rate of treatment success than patients with Type IV hips, and patients with bilateral DDH had a lower rate of treatment success than patients with unilateral involvement (4). They emphasized that the beginning of PH treatment before the 7<sup>th</sup> week of infancy was the key aspect for successful outcomes in the management of DDH. Similarly, in another study which analyzed the factors affecting the success rate of this treatment modality in 153 children ( $\leq 6$  months of age) with DDH treated using the PH, Ömeroğlu et al. found the treatment starting age as the only patient-related variable (5). In their study, although more than 90% of patients under three months of age (37 of 40) were treated successfully, the treatment failed in one-third of patients older than five months of age (9 of 24). Additionally, Ömeroğlu et al. stated that both a lower initial alpha an-

gle and a higher Graf hip type decreased the success rate of PH treatment, since unsuccessful results were obtained in more than two-thirds of Graf Type III hips and two of four Graf Type IV hips (5). Therefore, they concluded that the threshold values for increased risk of treatment failure with PH were an age older than four months and an alpha angle less than 46°. Lastly, in a more recent study in this topic, Larson et al. reported a study which included 176 children with 38 patients (21.6%) failing PH treatment (17). In that study, patients were divided based on the age at which the PH was initiated (group 1 $\leq$ 30 days, group 2=30 to 60 days, group 3 $\geq$ 60 days). They concluded that there was no difference in the failure rates by age.

AVN, the most catastrophic complication of DDH treatment, still poses a complicated diagnostic and treatment challenge for orthopedic surgeons. What is more, because of the complex and multifactorial etiology, the development of this devastating complication remains difficult to predict (18). Although the rate of AVN following successful reduction is reported to be low, ranging from 0% to 22%, higher rates of AVN are attributed to fixed dislocation, unsuccessful reduction, bilateral hip involvement as well as presentation beyond three months of age (9, 18-20). In a retrospective study which set out to analyze 100 children with distinct levels of hip instability treated using PH, Kokavec et al. drew the conclusion that Pavlik's method is safe and accurate for all dysplastic and subluxated hips, together with the great majority of dislocated hips (1). However, the authors emphasized that late onset and prolonged duration of the PH treatment were associated with higher rates of treatment failure and AVN. In our study, we observed no evidence of AVN in children with unstable hips treated successfully by PH; however, AVN occurred in two hips (1 hip with Type I, 1 hip with Type IV) in whom closed reduction using a hip spica cast was applied because of failure of PH. Therefore, we believe that the major predictive factor for AVN in the treatment of DDH may be the failure of PH as well as the severity of the pathology. Nonetheless, although the present study displayed satisfactory outcomes of PH treatment, the likelihood of complications including AVN and late acetabular dysplasia may compromise the results at the long term follow-up (10, 21, 22).

Residual acetabular dysplasia has been implicated as one of the most prevalent complications following the treatment of DDH (23). In our series, at the end of a median follow-up duration of four years, no residual acetabular dysplasia was observed based on radiographic measurements except for one child who had a mild acetabular dysplasia. However, Fujika et al. reported a severe dysplasia rate of 19% in a series of 380 patients with a follow-up duration of more than 20 years (21). Similarly, Tucci et al. warned against late acetabular dysplasia in patients with hip instability treated with PH and suggested that all such patients should be monitored until skeletal maturity (22).

Therefore, patients in the present study seem to need further follow-up evaluations in order not to miss probable residual dysplasia.

In a comparative study, Westacott et al. found no significant difference with regard to results or complications between staged and immediate cessation after successful treatment using PH (3). In our study, the treatment was stopped as soon as a stable hip was obtained according to ultrasonographic examination, or concentric reduction was observed on plain radiography. We observed no recurrence or reintervention after immediate cessation in our case series. However, based on the present study, due to the lack of a control group, whether or not immediate cessation was superior to staged cessation could not be determined.

This study has several important limitations. The first limitation was the retrospective nature of the study. Second, the follow-up period in this study was limited to the middle-term outcomes. Third, this study did not include a control group. Lastly, the Barlow and Ortoloni examinations in the initial evaluation of these patients were not included.

## CONCLUSION

With successful outcomes and low morbidity, favorable outcomes can be expected from PH treatment for children with unstable hips (Graf Type IID, III, IV) who are diagnosed between the age of three and six months. Otherwise, there certainly needs to be much more research to clarify the safety and effectiveness of the PH for this particular group of patients.

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

**Author Contributions:** Conception/Design of Study- T.P., S.B., M.A.Ö., M.D.; Data Acquisition- S.B., T.P., Y.S., F.B.; Data Analysis/Interpretation- T.A., T.P., S.B., M.D.; Drafting Manuscript- T.P., S.B., M.D., M.A.Ö.; Critical Revision of Manuscript- Y.S., T.A., F.B.; Final Approval and Accountability- T.P., S.B., M.D., M.A.Ö., Y.S., T.A., F.B.

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

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

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Çalışma Konsepti/Tasarım- T.P., S.B., M.A.Ö., M.D.; Veri Toplama- S.B., T.P., Y.S., F.B.; Veri Analizi/Yorumlama- T.A., T.P., S.B., M.D.; Yazı Taslağı- T.P., S.B., M.D., M.A.Ö.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- Y.S., T.A., F.B.; Son Onay ve Sorumluluk- T.P., S.B., M.D., M.A.Ö., Y.S., T.A., F.B.

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

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

## REFERENCES

1. Kokavec M, Makai F, Olos M, Bialik V. Pavlik's method: a retrospective study. Arch Orthop Trauma Surg 2006;126(2):73-6. [CrossRef]
2. Pollet V, Pruijs H, Sackers R, Castelein R. Results of Pavlik harness treatment in children with dislocated hips between the age of six and twenty-four months. J Pediatr Orthop 2010;30(5):437-42. [CrossRef]
3. Westacott DJ, Mackay ND, Waton A, Webb MS, Henman P, Cooke SJ. Staged weaning versus immediate cessation of Pavlik harness treatment for developmental dysplasia of the hip. J Pediatr Orthop B 2014;23(2):103-6. [CrossRef]
4. Atalar H, Sayli U, Yavuz OY, Uraş I, Dogruel H. Indicators of successful use of the Pavlik harness in infants with developmental dysplasia of the hip. Int Orthop 2007;31(2):145-50. [CrossRef]
5. Omeroglu H, Kose N, Akceylan A. Success of Pavlik Harness Treatment Decreases in Patients > 4 Months and in Ultrasonographically Dislocated Hips in Developmental Dysplasia of the Hip. Clin Orthop Relat Res 2016;474(5):1146-52. [CrossRef]
6. Cashman J, Round J, Taylor G, Clarke N. The natural history of developmental dysplasia of the hip after early supervised treatment in the Pavlik harness. J Bone Joint Surg Br 2002;84(3):418-25. [CrossRef]
7. Harding MG, Harcke HT, Bowen JR, Guille JT, Glutting J. Management of dislocated hips with Pavlik harness treatment and ultrasound monitoring. J Pediatr Orthop 1997;17(2):189-98. [CrossRef]
8. Viere R, Birch J, Herring J, Roach J, Johnston C. Use of the Pavlik harness in congenital dislocation of the hip. An analysis of failures of treatment. J Bone Joint Surg Am 1990;72(2):238-44. [CrossRef]
9. Lerman JA, Emans JB, Millis MB, Share J, Zurakowski D, Kasser JR. Early failure of Pavlik harness treatment for developmental hip dysplasia: clinical and ultrasound predictors. J Pediatr Orthop 2001;21(3):348-53. [CrossRef]
10. Uçar DH, Isklar ZU, Kandemir U, Tümer Y. Treatment of developmental dysplasia of the hip with Pavlik harness: prospective study in Graf type IIc or more severe hips. J Pediatr Orthop B 2004;13(2):70-4. [CrossRef]
11. Thieme WT, Thiersch JB. Translation: Hilgenreiner on congenital hip dislocation. J Pediatr Orthop 1986;6(2):202-14. [CrossRef]
12. Kalamchi A, MacEwen GD. Avascular necrosis following treatment of congenital dislocation of the hip. J Bone Joint Surg Am 1980;62(6):876-88. [CrossRef]
13. Tönnis D. Normal values of the hip joint for the evaluation of X-rays in children and adults. Clin Orthop Relat Res 1976;119:39-47. [CrossRef]
14. Westacott DJ, Mackay ND, Waton A, Webb MS, Henman P, Cooke SJ. Staged weaning versus immediate cessation of Pavlik harness treatment for developmental dysplasia of the hip. J Pediatr Orthop B 2014;23(2):103-6. [CrossRef]
15. Nakamura J, Kamegaya M, Saisu T, Someya M, Koizumi W, Moriya H. Treatment for developmental dysplasia of the hip using the Pavlik harness. J Bone Joint Surg Br 2007;89(2):230-5. [CrossRef]

16. Ramsey P, Lasser S, MacEwen G. Congenital dislocation of the hip. Use of the Pavlik harness in the child during the first six months of life. *J Bone Joint Surg Am* 1976;58(7):1000-4. [\[CrossRef\]](#)
17. Larson JE, Patel AR, Weatherford B, Janicki JA. Timing of Pavlik Harness Initiation: Can We Wait? *J Pediatr Orthop* 2019;39(7):335-8. [\[CrossRef\]](#)
18. Tiruveedhula M, Reading IC, Clarke NM. Failed Pavlik harness treatment for DDH as a risk factor for avascular necrosis. *J Pediatr Orthop* 2015;35(2):140-3. [\[CrossRef\]](#)
19. Kitoh H, Kawasumi M, Ishiguro N. Predictive factors for unsuccessful treatment of developmental dysplasia of the hip by the Pavlik harness. *J Pediatr Orthop* 2009;29(6):552-7. [\[CrossRef\]](#)
20. Suzuki SG, Yamamuro T. Avascular necrosis in patients treated with the Pavlik harness for congenital dislocation of the hip. *J Bone Joint Surg Am* 1990;72(7):1048-55. [\[CrossRef\]](#)
21. Fujioka F, Terayama K, Sugimoto N, Tanikawa H. Long-term results of congenital dislocation of the hip treated with the Pavlik harness. *J Pediatr Orthop* 1995;15(6):747-52. [\[CrossRef\]](#)
22. Tucci JJ, Kumar SJ, Guille JT, Rubbo ER. Late acetabular dysplasia following early successful Pavlik harness treatment of congenital dislocation of the hip. *J Pediatr Orthop* 1991;3(4):502-5. [\[CrossRef\]](#)
23. Carsi B, Al-Hallao S, Wahed K, Page J, Clarke NM. Incomplete periacetabular acetabuloplasty. *Acta Orthop* 2014;85(1):66-70. [\[CrossRef\]](#)

# RETROSPECTIVE ANALYSIS OF ALPHA GLOBIN COPY NUMBER VARIATIONS DETERMINED BY MLPA IN THE TRAKYA REGION

## TRAKYA BÖLGESİNDE MLPA İLE BELİRLENEN ALFA GLOBİN KOPYA SAYISI DEĞİŞİKLİKLERİNİN RETROSPEKTİF ANALİZİ

Selma DEMİR<sup>1</sup> , Hakan GÜRKAN<sup>1</sup> , Damla EKER<sup>1</sup> , Sinem YALÇINTEPE<sup>1</sup> , Emine İkbal ATLI<sup>1</sup> , Engin ATLI<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Trakya University, Faculty of Medicine, Department of Medical Genetics, Edirne, Turkey

**ORCID IDs of the authors:** S.D.0000-0002-0964-5513; H.G.0000-0002-8967-6124; D.E.0000-0001-7563-118X; S.Y.0000-0002-8557-8885; E.İ.A.0000-0001-9003-1449; E.A.0000-0002-3937-5243

**Cite this article as:** Demir S, Gurkan H, Eker D, Yalcintepe S, Atli El, Atli E. Retrospective analysis of alpha globin copy number variations determined by mlpa in the Trakya region. J Ist Faculty Med 2021;84(3):348-53. doi: 10.26650/IUITFD.2021.880592

### ABSTRACT

**Objective:** Alpha thalassemia is a common type of hemoglobinopathy that occurs as a result of deletions or point mutations in the alpha globin gene cluster. The molecular analysis of alpha thalassemia is challenging due to the presence of genes with high sequence similarities in alpha globin gene clusters and pseudogenes. As well as in all genetic diseases, determining the causative mutation types of alpha thalassemia and their frequencies have critical importance for accurate genetic screening and prevention strategies.

**Material and Method:** In our study, alpha globin copy number variations determined by the Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) method were examined retrospectively with suspicion of alpha thalassemia in 35 female and 43 male patients tested in the Genetic Diseases Diagnosis Center of the Medical Genetics Department at Trakya University Faculty of Medicine.

**Results:** The most common deletion among our patients was the  $-\alpha^{3.7}$  (35.3%), followed by the  $-\alpha^{20.5}$  (10.3%) deletion. The  $-\alpha^{SEA}$  deletion was detected in three patients while 4 out of 78 cases were found to have the  $-\alpha^{MED}$  deletion. In three patients, a heterozygous large deletion and in one case HS40 regulatory region deletion were detected. In 14 (18%) of the patients,  $\alpha$  globin triplications were detected. The  $-\alpha^{4.2}$  deletion was detected in only one of our patients.

**Conclusion:** Our study is the first to report the presence of eight different alpha globin copy number changes and 13 different alpha globin genotypes in the Trakya region.

**Keywords:** Alpha thalassemia, globin, copy number variation

### ÖZET

**Amaç:** Alfa talasemi, alfa globin gen kümesindeki delesyonların veya nokta mutasyonlarının bir sonucu olarak ortaya çıkan yaygın bir hemoglobinopati türüdür. Alfa talaseminin moleküler analizi, alfa globin gen kümesinde yüksek dizi benzerliklerine sahip genlerin ve psödogenlerin varlığı nedeniyle zordur. Tüm genetik hastalıklarda olduğu gibi, alfa talasemide de, alta yatan mutasyon türlerinin ve sıklıklarının belirlenmesi, doğru genetik tarama ve önleme stratejileri için kritik öneme sahiptir.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmamızda, alfa talasemi şüphesiyle Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Genetik Hastalıklar Tanı ve Değerlendirme Merkezinde test edilen 35 kadın ve 43 erkek hastada Multipleks Ligasyon-bağımlı Prob Amplifikasyon (MLPA) yöntemiyle belirlenen alfa globin kopya sayısı varyasyonları geriye dönük olarak incelendi.

**Bulgular:** Olgularımız arasında en sık (%35,3) saptanan delesyon  $-\alpha^{3.7}$  ve ardından %10,3 görülme sıklığı ile  $-\alpha^{20.5}$  delesyonu gelmekteydi. Üç olguda tüm problemleri kapsayan büyük delesyon, bir olguda ise HS40 düzenleyici bölgesinde delesyon saptanırken, 78 olgunun 4'ünde  $-\alpha^{MED}$ , üçünde ise  $-\alpha^{SEA}$  delesyonu saptandı. Olguların 14'ünde (%18)  $\alpha$  globin triplikasyonları belirlendi.  $-\alpha^{4.2}$  delesyonu olgularımızdan yalnızca bir tanesinde saptandı.

**Sonuç:** Çalışmamız, Trakya bölgesinde sekiz farklı alfa globin kopya sayısı değişikliği ve 13 farklı alfa globin genotipinin varlığını bildiren ilk çalışmadır.

**Anahtar Kelimeler:** Alfa talasemi, globin, kopya sayısı değişikliği

**Corresponding author/İletişim kurulacak yazar:** selmademir1980@gmail.com

**Submitted/Başvuru:** 16.02.2021 • **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 15.03.2021 •

**Last Revision Received/Son Revizyon:** 05.04.2021 • **Accepted/Kabul:** 06.04.2021 • **Published Online/Online Yayın:** 02.07.2021



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

## INTRODUCTION

Alpha thalassemia, a hematological disorder characterized by the lack or absence of alpha globin chain synthesis, is a common global hemoglobinopathies. The alpha globin ( $\alpha$ -globin) gene cluster located in the subtelomeric region of the 16<sup>th</sup> chromosome is responsible for the synthesis of the alpha globin chains, which are important components of the hemoglobin. This region consists of the *HBZ* (OMIM 142310), *HBA2* (OMIM 141850), *HBA1* (OMIM 141800) and *HBQ1* (OMIM 142240) genes and is under the control of the HS-40 regulatory region. Defects in the alpha globin genes in the same chromosome cause a mild phenotype resulting in either a silent alpha thalassemia or alpha thalassemia-trait phenotype, depending on the number of genes affected. HbH disease, on the other hand, is a severe form of alpha thalassemia due to the homozygous or compound heterozygous mutations of alpha globin genes. The severest form of alpha thalassemia is Hb Bart's hydrops fetalis syndrome, associated with total loss of alpha globin expression (1-3). Point mutations may cause  $\alpha$ -thalassemia, but the most common cause is deletion of the genes located in the alpha globin cluster on one or both chromosomes (4).

Determining alpha globin mutations is of great importance in countries where consanguineous marriages are common, in order to prevent hydrops fetalis, the most severe form of the disease, and for accurate genetic counselling. There have been studies reporting the frequency and the underlying mutation types of alpha thalassemia in different regions of our country (4-13). However, to our knowledge, no study has reported the frequencies of copy number changes of the alpha globin cluster in the Trakya Region of Turkey.

In this study, we aimed to present the results of Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) of patients whose genetic analyzes were performed with suspicion of alpha thalassemia in the Genetic Diseases Diagnosis Center of the Medical Genetics Department in Trakya University's Faculty of Medicine between November 2012 and September 2020.

## MATERIAL AND METHOD

The results of alpha globin copy number variations of 78 patients (35 females, 43 males, mean age  $23.80 \pm 22.4$  years) referred to our center with alpha thalassemia were included in this study. Ethics committee approval of the study was obtained with the approval of Trakya University Faculty of Medicine Scientific Research Ethics Committee (TUTF-BAEK 2020/380.). A written informed consent form was obtained from the patients or from the legal guardians of the younger cases.

Genomic DNA isolation was performed with the Qiagen EasyOne automatic DNA isolation system (Qiagen,

Hilden, Germany) from 2 ml peripheral blood samples taken into an EDTA tube. Quality control and purity of the isolated genomic DNA samples were determined by NanoDrop spectrophotometrically [NanoDrop 2000C; Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, MA, USA]. The MLPA method was applied to determine  $\alpha$ -globin copy number variations in high quality samples with A260/280 values between 1.8-2.0.

The P140 HBA kit (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands), including 45 probes designed to investigate alpha globin cluster copy number variations, was used for MLPA study. Fluorescent fragments obtained after ligation and amplification (performed in accordance with the manufacturer's protocol) were separated on the ABI 3130 XL (Applied BioSystems, USA) capillary electrophoresis system and sizes of the fragments were determined using the GeneMapper (Applied BioSystems, USA) program. The results were analyzed with the Coffalyser software (MRC Holland). R open software was used to calculate the descriptive statistics (14).

## RESULTS

The most common genotype among our cases was the  $-\alpha^{3.7} / \alpha\alpha$  genotype with a frequency of 46.20%. The most common type of globin deletion was also the  $-\alpha^{3.7}$  deletion with 35.3%. The second most common deletion was the  $-\alpha^{20.5}$  deletion detected in 10.3% of the cases. A large deletion covering all probes was detected in three cases, while a heterozygous deletion of the HS40 regulatory region was determined in only one patient. In 14 (18%) of the cases, the  $\alpha$  globin triplications were detected. The  $-\alpha^{4.2}$  deletion was detected in only one of our cases. Figure 1 presents Coffalyser views of the triplication, showing the  $-\alpha^{MED}$  and  $-\alpha^{20.5}$  deletions with the biallelic  $-\alpha^{3.7} / -\alpha^{20.5}$  deletion. The genotypes and hematological parameters of the cases are shown in Table 1, and the distribution of globin variants of the cases among the total number of chromosomes is shown in Table 2.

## DISCUSSION

Molecular analysis of alpha thalassemia is challenging due to the presence of four copy genes encoding alpha globin chains. Determination of regional mutation diversity is important to prevent alpha thalassemia, which has a wide phenotypic variety ranging from silent carriers to hydrops fetalis. In our study, 8 different alpha globin copy number changes were determined. Seven of them were deletions of different sizes of the alpha globin gene cluster and regulatory elements, and the remaining one copy number variation type was the  $-\alpha^{3.7}$  triplication.

$\alpha^+$  thalassemia are caused by deletions or rare point mutations in one of the duplicated alpha globin genes.  $-\alpha^{3.7}$  or  $-\alpha^{4.2}$  deletions, resulting from unequal crossing

**Table 1:** Genotypes of the patients and mean and standard deviation values of hematological parameters according to their genotypes

Genotype	n	(%)	ES (4.63-6.08)	Hemoglobin (13.7-17.5) (g/dl)	Mean corpuscular volume (79-92.2)(fl)	Red cell distribution width (11.6-14.4)(%)
- $\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$	36	46.20	5.247±0.730	12.088±2.212	71.597±6.569	17.253 ±7 .357
- $\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$	7	8.90	5.354±0.588	11.371±1.619	65.88±3.387	15.642±1.081
- $\alpha^{20.5}/\alpha\alpha$	8	10.30	5.366±0.339	11.09±0.765	64.175±5.912	16.15±0.85
- $\alpha^{MED}/\alpha\alpha$	3	3.80	4.82±0.991	9.8±2.389	67.733±7.804	20.33±8.220
- $\alpha^{3.7}/-\alpha^{SEA}$	2	2.50	4.895±0.261	8.835±0.09	55.75±2.474	21.95±4.03
Whole gene deletion	3	3.80	5.75±0.277	12.066±0.288	66.166±3.536	15±1.014
$\alpha\alpha\alpha^{anti-3.7}/\alpha\alpha$	13	16.70	5.1±0.611	11.13± 2.227	66.753±10.809	17.815±4.765
$\alpha\alpha\alpha^{anti-3.7}/\alpha\alpha\alpha^{anti-3.7}$	1	1.30	5.34	14.3	74.4	34.1
- $\alpha^{SEA}/\alpha\alpha$	1	1.30	-	12	68	-
- $\alpha^{HS40}/\alpha\alpha$	1	1.30	6.24	13.7	67.1	16.1
- $\alpha^{3.7}/-\alpha^{20.5}$	1	1.30	5.28	9.5	61.4	22.2
- $\alpha^{3.7}/-\alpha^{MED}$	1	1.30	5.28	8.8	55.9	33.3
- $\alpha^{3.7}/-\alpha^{4.2}$	1	1.30	6.26	12.3	62.6	15
Total	78	100				

**Table 2:** Distribution of alpha globin variants among the total number of chromosomes

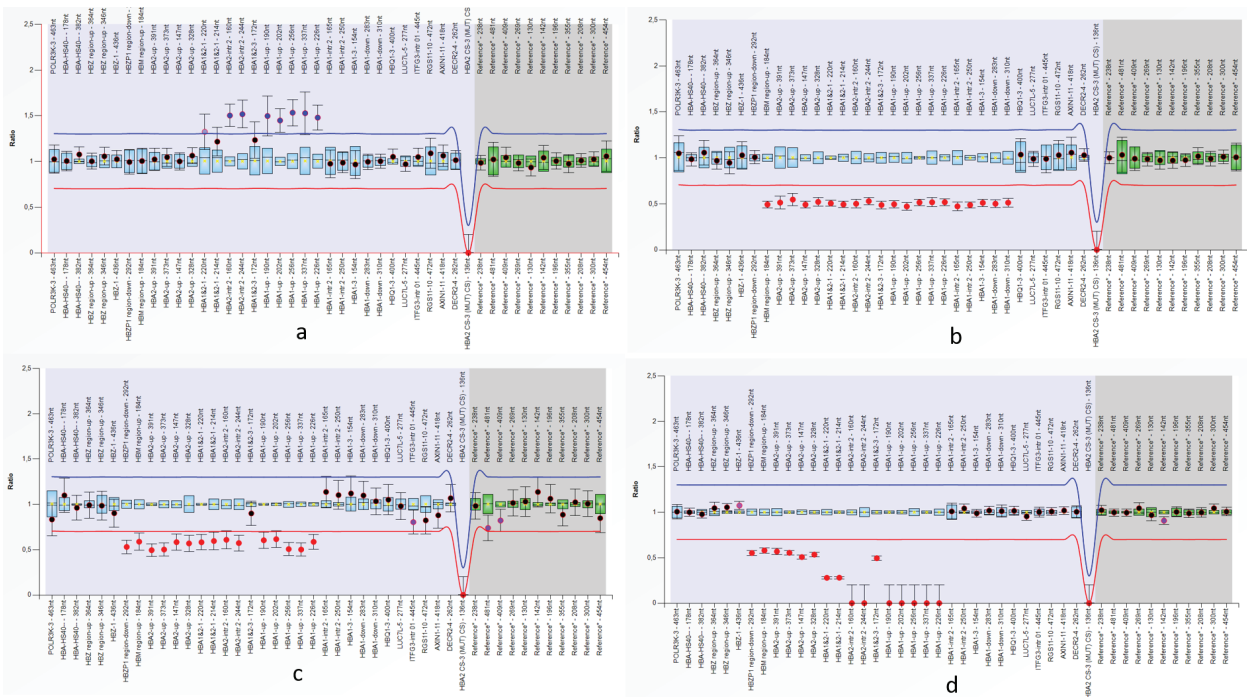
Alpha globin variant	Affected chromosome count	%
$\alpha\alpha$ (Normal)	65	41.7
- $\alpha^{3.7}$	55	35.3
- $\alpha^{20.5}$	9	5.8
-MED	4	2.6
$\alpha\alpha\alpha^{anti-3.7}$	15	9.6
- $\alpha^{SEA}$	3	1.9
- $\alpha^{HS40}$	1	0.6
- $\alpha^{4.2}$	1	0.6
Whole gene deletion	3	1.9
Total	156	100

over in meiosis, causes deletional  $\alpha^+$  thalassemias and the most common cause has been reported as the - $\alpha^{3.7}$  deletion (3). The frequency of - $\alpha^{3.7}$  deletions was reported as 52.28% in the study performed by Onay et al. in the Aegean Region of Turkey (4). In a study performed by Çelik et al. in the southern region of Turkey, - $\alpha^{3.7}$  deletion frequency was reported as 43.2% (10). Karakaş et al. reported the frequency of - $\alpha^{3.7}$  deletion as 39% in a study they performed on patients with hypochromic mi-

crocytic anemia living in Istanbul (11). Our data are in accordance with the results of this study carried out in Istanbul, which is located close to the Trakya region. - $\alpha^{4.2}$ , another type of deletion underlying  $\alpha^+$  thalassemias, is reported less frequently than the - $\alpha^{3.7}$  deletion. Karakaş et al. reported the frequency of - $\alpha^{4.2}$  deletion as 4.2%, and Onay et al. reported that they did not detect any - $\alpha^{4.2}$  deletion (6, 11). In our study, the - $\alpha^{4.2}$  deletion was found in only one case as compound heterozygous with the - $\alpha^{3.7}$  deletion.

The second most common deletion in our study was - $\alpha^{20.5}$  with a ratio of 5.8%. This mutation has been rarely reported in Asia, the Middle East, and in Arab countries, but it was reported to be the second most frequent deletion in the studies conducted by Onay and Çürük et al. (4, 6). The - $\alpha^{20.5}$  deletion was followed by the - $\alpha^{MED}$  and - $\alpha^{SEA}$  deletions with a frequency of 2.6% and 1.9%, respectively, in our study. In the Turkish population - SEA deletion was reported for the first time in the study of Onay et al. (4) and it was found as compound heterozygous with the - $\alpha^{3.7}$  deletion in a patient in our study, too.

It is challenging to predict alpha globin genotypes based on hematological parameters, though some studies and reports have investigated this. Studies report that patients with two functional alpha globin genes have higher Mean Corpuscular Volume (MCV) values compared to patients with a defected alpha globin gene (15, 16). Guvenc et al. and Onay et al. reported that that MCV value



**Figure 1:** Coffalyser views of triplication (a);  $-\alpha^{\text{MED}}$  deletion (b);  $-\alpha^{20.5}$  deletion (c); and biallelic  $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{20.5}$  deletion (d)

was the lowest for the genotype  $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{\text{MED}}$ , and highest for the  $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$  genotype in their studies (6,9). Although the patient population is small for performing a statistical comparison, we also found that MCV values were lower in the patients with compound heterozygous  $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{\text{MED}}$  ve  $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{\text{SEA}}$  deletions compared to patients with  $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$  genotypes.

One of the common copy number changes of the alpha globin gene cluster is triplications (17). In our study, we found heterozygous triplications in 13 cases and homozygous  $\alpha\alpha^{\text{anti-3.7}}$  triplication in one case. Although the thalassaemic effect of these triplications is generally not expected, it is reported in the literature that when accompanied by beta globin gene (HBB) mutations, it can be an important modulator of the hemoglobinopathy phenotype (18-21). In our study, a pathogenic HBB variation was accompanied in 6/10 of the cases with  $-\alpha^{3.7}$  triplication (data not shown), emphasizing the importance of these triplications in terms of genetic counseling of hemoglobinopathies.

Heterozygous HS-40 regulatory region deletion was determined in one of our patients with a mild anemia phenotype. Heterozygous deletion of the HS-40 regulatory region has been reported to reduce the  $\alpha$ -globin expression. However, it was proposed that HS-40 regulatory region deletion can have a prominent down-regulatory effect which may reflect phenotypically if it is homozygous or in trans position with another deletion (22, 23).

The deletion of the HS-40 regulatory site reduced the expression of HS-40 heterozygous deletion manifested as mild anemia, which was of the microcytic hypochromic type. When compounded with  $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ , it manifested as Hb H disease, and when compounded with  $-\text{SEA}/\alpha\alpha$ , it manifested as Hb Bart's fetus.

MLPA is a hybridization-based method that has been used for many years to screen deletions and duplications. For this reason, the MLPA method is often used to elucidate the genetic basis of alpha thalassemias (24). The advantages of the MLPA method over other methods in the genetic basis of alpha thalassemia have been reported in the studies of Yüreğir and Colosimo et al. (13, 25). However, other methods, such as reverse dot blot hybridization, are needed to detect non-deletion type mutations. Although it has been reported in studies conducted in Turkey and around the world that alpha globin mutations are mostly deletions, non-deletion type mutations are also encountered in some cases. Therefore, the limitation of this study is the inability to detect alpha thalassemias that are not deletion type.

In conclusion, our study is the first to show a high level of diversity of alpha globin gene copy number variations in the Trakya Region. In addition, it supports the findings of other studies that the MLPA method is useful for detecting copy number variations in the alpha globin cluster.

**Ethics Committee Approval:** This study was approved by the Scientific Research Ethical Committee of the Trakya University, Faculty of Medicine (TUTF-BAEK 2020/380).



**Informed Consent:** Written consent was obtained from the participants.

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

**Author Contributions:** Conception/Design of Study- S.D., H.G.; Data Acquisition- S.D., D.E., E.A.; Data Analysis/Interpretation- S.D., S.Y., E.İ.A.; Drafting Manuscript- S.D., S.Y., E.İ.A., E.A.; Critical Revision of Manuscript- H.K., M.Ö.; Final Approval and Accountability- S.D., D.E., H.G., S.Y., E.İ.A., E.A.

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

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

**Etik Komite Onayı:** Bu çalışma için etik komite onayı Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır (TUTF-BAEK 2020/380).

**Bilgilendirilmiş Onam:** Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Çalışma Konsepti/Tasarım- S.D., H.G.; Veri Toplama- S.D., D.E., E.A.; Veri Analizi/Yorumlama- S.D., S.Y., E.İ.A.; Yazı Taslağı- Y.K.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- S.D., S.Y., E.İ.A., E.A.; Son Onay ve Sorumluluk- S.D., D.E., H.G., S.Y., E.İ.A., E.A.

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

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






## REFERENCES

- Hartevelde CL, Higgs DR. Alpha-thalassaemia. *Orphanet J Rare Dis* 2010;5:13. [CrossRef]
- Patrinou GP, Kollia P, Papadakis MN. Molecular diagnosis of inherited disorders: lessons from hemoglobinopathies. *Hum Mutat* 2005;26(5):399-412. [CrossRef]
- Farashi S, Hartevelde CL. Molecular basis of  $\alpha$ -thalassaemia. *Blood Cells Mol Dis* 2018;70:43-53. [CrossRef]
- Onay H, Aykut A, Karaca E, Durmaz A, Solmaz AE, Çoğulu Ö, et al. Molecular spectrum of  $\alpha$ -globin gene mutations in the Aegean region of Turkey: first observation of three  $\alpha$ -globin gene mutations in the Turkish population. *Int J Hematol* 2015;102(1):1-6. [CrossRef]
- Canatan D, Oğuz N, Güvendik I, Yıldırım S. The Incidence of Alpha-Thalassaemia in Antalya-Turkey. *Turk J Haematol* 2002;19:433-4.
- Cürük MA. HbH (beta4) disease in Cukurova, Southern Turkey. *Hemoglobin* 2007;31:265-71. [CrossRef]
- Basak AN. The molecular pathology of beta-thalassaemia in Turkey: the Bogaziçi University experience. *Hemoglobin* 2007;31:233-41. [CrossRef]
- Acemoglu H, Beyhun NE, Vancelik S, Polat H, Guraksin A. Thalassaemia screening in a non-prevalent region of a pre-valent country (Turkey): is it necessary? *Public Health* 2008;122(6):620-4. [CrossRef]
- Guvenc B, Yildiz SM, Tekinturhan F, Dincer S, Akyuzluer I, Okten S, et al. Molecular characterization of alpha-Thalassaemia in Adana, Turkey: A single center study. *Acta Haematol* 2010;123(4):197-200. [CrossRef]
- Celik MM, Gunesacar R, Oktay G, Duran GG, Kaya H. Spectrum of  $\alpha$ -thalassaemia mutations including first observation of H-(FIL) deletion in Hatay Province, Turkey. *Blood Cells Mol Dis* 2013;51(1):27-30. [CrossRef]
- Karakaş Z, Koç B, Temurhan S, Elgün T, Karaman S, Asker G, et al. Evaluation of alpha-thalassaemia mutations in cases with hypochromic microcytic anemia: the İstanbul perspective. *Turk J Haematol* 2015;32(4):344-50. [CrossRef]
- Ünal S, Oktay G, Acipayam C, İlhan G, Gali E, Celkan T, et al. Hemoglobin H disease in Turkey: experience from eight centers. *Turk J Haematol* 2016;5;33(1):56-9. [CrossRef]
- Yuregir OO, Ayaz A, Yalcintepe S, Canbek S, Acik DY, Yilmaz BT, et al. Detection of  $\alpha$ -Thalassaemia by Using Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification as an Additional Method for Rare Mutations in Southern Turkey. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2016;32(4):454-59. [CrossRef]
- Ihaka R, Gentleman R. R: A language for data analysis and graphics. *J Comput Graph Stat* 1996;5:299-314. [CrossRef]
- Akhavan-Niaki H, Youssefi Kamangari R, Banihashemi A, Kholghi Oskooei V, Azizi M, Tamaddon A, et al. Hematologic features of alpha thalassaemia carriers. *Int J Mol Cell Med* 2012;1(3):162-7.
- Velasco-Rodríguez D, Blas C, Alonso-Domínguez JM, Vega G, Soto C, García-Raso A, et al. Cut-Off values of hematologic parameters to predict the number of alpha genes deleted in subjects with deletional alpha thalassaemia. *Int J Mol Sci* 2017;18(12):2707. [CrossRef]
- Wu MY, Zhou JY, Li J, Li DZ. The Frequency of  $\alpha$ -Globin Gene Triplication in a Southern Chinese Population. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2016;32(Suppl 1):320-22. [CrossRef]
- Ma SK, Au WY, Chan AY, Chan LC. Clinical phenotype of triplicated alpha-globin genes and heterozygosity for beta0-thalassaemia in Chinese subjects. *Int J Mol Med* 2001;8(2):171-5. [CrossRef]
- Moosavi SF, Amirian A, Zarbakhsh B, Kordafshari A, Mirzahoseini H, Zeinali S, et al. The carrier frequency of  $\alpha$ -globin gene triplication in an Iranian population with normal or borderline hematological parameters. *Hemoglobin* 2011;35(4):323-30. [CrossRef]
- Guvenc B, Canataroglu A, Unsal C, Yildiz SM, Turhan FT, Bozdogan ST, et al.  $\alpha$ -globin chain abnormalities with coexisting  $\alpha$ -thalassaemia mutations. *Arch Med Sci* 2012;8(4):644-9. [CrossRef]
- Farashi S, Bayat N, Faramarzi Garous N, Ashki M, Montajabi Niat M, Vakili S, et al. Interaction of an  $\alpha$ -globin gene triplication with  $\alpha$ -globin gene mutations in Iranian Patients with  $\alpha$ -Thalassaemia intermedia. *Hemoglobin* 2015;39(3):201-6. [CrossRef]
- Coelho A, Picanço I, Seuanes F, Seixas MT, Faustino P. Novel large deletions in the human alpha-globin gene cluster: Clarifying the HS-40 long-range regulatory role in the native chromosome environment. *Blood Cells Mol Dis* 2010;15;45(2):147-53. [CrossRef]
- Luo S, Chen X, Zhong Q, Wang Q, Xu Z, Qin L, et al. Analysis of rare thalassaemia caused by HS-40 regulatory site deletion. *Hematology* 2020;25(1):286-291. [CrossRef]

24. Suemasu CN, Kimura EM, Oliveira DM, Bezerra MA, Araújo AS, Costa FF, et al. Characterization of alpha thalassemic genotypes by multiplex ligation-dependent probe amplification in the Brazilian population. *Braz J Med Biol Res* 2011;44(1):16-22. [\[CrossRef\]](#)
25. Colosimo A, Gatta V, Guida V, Leodori E, Foglietta E, Rinaldi S, et al. Application of MLPA assay to characterize unsolved  $\alpha$ -globin gene rearrangements. *Blood Cells Mol Dis* 2011;15;46(2):139-44. [\[CrossRef\]](#)

# DOES SEVERE OBESITY EFFECT EARLY POSTOPERATIVE RECOVERY AND SURGICAL OUTCOMES IN PATIENTS UNDERGOING PERCUTANEOUS NEPHROLITHOTOMY UNDER SPINAL ANESTHESIA?

AĞIR OBEZİTE HASTALARIN SPİNAL ANESTEZİ ALTINDA PERKÜTAN NEFROLİTİTOMİ UYGULANMASI POSTOPERATİF ERKEN DÖNEM İYİLEŞME VE CERRAHİ SONUÇLARINI ETKİLER Mİ?

Ahmed Ömer HALAT<sup>1</sup> , Muhammet İrfan DÖNMEZ<sup>2</sup> , Murat GÖNEN<sup>1</sup> , Ömer Erkam ARSLAN<sup>3</sup> , Betül BAŞARAN<sup>4</sup> 

<sup>1</sup>University of Health Sciences, Konya Training and Research Hospital, Clinic of Urology, Konya, Turkey

<sup>2</sup>Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Department of Urology, Istanbul, Turkey

<sup>3</sup>Antalya Kepez State Hospital, Clinic of Urology, Antalya, Turkey

<sup>4</sup>University of Health Sciences, Konya Training and Research Hospital, Anestezi ve Reanimasyon, Konya, Turkey

**ORCID IDs of the authors:** A.Ö.H. 0000-0003-4434-9274; M.İ.D. 0000-0002-2828-7942; M.G. 0000-0001-7994-8790; Ö.E.A. 0000-0002-8849-5567; B.B. 0000-0001-5994-3861

**Cite this article as:** Halat AO, Donmez MI, Gonen M, Arslan OE, Basaran B. Does severe obesity effect early postoperative recovery and surgical outcomes in patients undergoing PNL under spinal anesthesia? J Ist Faculty Med 2021;84(3):354-9. doi: 10.26650/IUITFD.2021.839546

## ABSTRACT

**Objective:** The primary aim of this study is to evaluate if severe obesity has any deleterious effect on the early postoperative course in patients undergoing percutaneous nephrolithotomy (PNL) under spinal anesthesia, and the secondary aim is to determine whether severe obesity changes surgical results.

**Material and Method:** The study included 100 patients who underwent a PNL operation for kidney stones of  $\geq 2$ cm in our clinic. Accordingly, those with BMI  $< 35$  kg/m<sup>2</sup> formed the first while the severely obese BMI  $\geq 35$  kg/m<sup>2</sup> formed the second group. Age, gender, stone burden, pre/postoperative hemoglobin levels, number and regions of access, duration of surgery, perioperative complications and Visual Analogue Scale score at 24h, PACU admission/discharge Aldrete scores, and PACU length of stay were recorded.

**Results:** The VAS score was  $5.0 \pm 1.3$  in group 1 while it was  $5.3 \pm 1.8$  in group 2 ( $p=0.32$ ). The length of the hospital stay was  $3.3 \pm 1.3$  days in patients with BMI  $< 35$  kg/m<sup>2</sup> and  $3.0 \pm 1.0$  in patients with BMI  $\geq 35$  kg/m<sup>2</sup> ( $p=0.36$ ). A 98% stone-free rate was found in the severely obese group and 96% in the normal BMI group, and there was no significant difference between the groups ( $p=0.672$ ). There was a statistically significant difference in terms of PACU discharge Aldrete scores between groups

## ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmanın birincil amacı, spinal anestezi altında perkütan nefrolitotomi (PNL) uygulanan hastalarda ağır obezitenin erken postoperatif seyir üzerinde zararlı bir etkisinin olup olmadığını değerlendirmektir. İkinci olarak, ağır obezitenin cerrahi sonuçları değiştirip değiştirmediğini belirlemektir.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmaya kliniğimizde  $\geq 2$ cm böbrek taşı nedeniyle PNL operasyonu yapılan 100 hasta dahil edildi. Buna göre birinci grupta VKİ  $< 35$  kg/m<sup>2</sup> olanlar, ikinci grupta ise ciddi derecede obez BKİ  $\geq 35$  kg/m<sup>2</sup> olanlar oluşturuldu. Yaş, cinsiyet, taş yükü, ameliyat öncesi/sonrası hemoglobin seviyeleri, giriş sayısı ve bölgeleri, ameliyat süresi, perioperatif komplikasyonlar ve 24. saatte Görsel Analog Skala skoru, PACU yatış/taburculuk Aldrete skorları ve PACU kalış süresi kaydedildi.

**Bulgular:** Grup 1'de VAS puanı  $5,0 \pm 1,3$  iken grup 2'de  $5,3 \pm 1,8$  idi ( $p=0,32$ ). Hastanede kalış süresi VKİ  $< 35$  kg/m<sup>2</sup> olan hastalarda  $3,3 \pm 1,3$  gün, VKİ  $\geq 35$  kg/m<sup>2</sup> olan hastalarda  $3,0 \pm 1,0$  idi ( $p=0,36$ ). Ağır obez grupta %98, normal vücut kitle indeksi grubunda %96 taşsızlık oranı saptandı ve gruplar arasında anlamlı fark yoktu ( $p=0,672$ ). Gruplar arasında PACU taburcu Aldrete skorları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark vardı (Grup 1 ve

**Corresponding author/İletişim kurulacak yazar:** ahmed-halat@hotmail.com

**Submitted/Başvuru:** 15.11.2020 • **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 03.02.2021 •

**Last Revision Received/Son Revizyon:** 21.02.2021 • **Accepted/Kabul:** 23.02.2021 • **Published Online/Online Yayın:** 12.07.2021



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

( $9.9\pm 0.3$  vs.  $9.6\pm 0.4$  in groups 1 and 2, respectively) ( $p=0.03$ ). Finally, the time interval in PACU was  $39.0\pm 7.5$  mins in group 1 while it was  $58.8\pm 14.0$  mins in group 2 ( $p<0.0001$ ).

**Conclusions:** Severe obesity does not alter surgical outcomes in patients undergoing PNL under spinal anesthesia, and in our opinion, spinal anesthesia in PNL is a safe and effective anesthesia modality for renal stone(s) in obese and morbidly obese patients.

**Keywords:** obesity, PACU, PNL, spinal anesthesia, prospective

2'de sırasıyla  $9,9\pm 0,3$  ve  $9,6\pm 0,4$  ( $p=0,03$ ). Son olarak PACU'da zaman aralığı grup 1'de  $39,0\pm 7,5$  dk iken grup 2'de  $58,8\pm 14,0$  dk idi ( $p<0,0001$ ).

**Sonuç:** Şiddetli obezite, spinal anestezi altında PNL uygulanan hastalarda cerrahi sonuçları değiştirmez ve bize göre PNL'de spinal anestezi, obez ve morbid obez hastalarda renal taş(lar) için güvenli ve etkili bir anestezi yöntemidir.

**Anahtar Kelimeler:** obezite, PACU, PNL, spinal anestezi, prospektif

## INTRODUCTION

Obesity is a major worldwide health problem, and nowadays, as a result of a sedentary lifestyle, decreased physical activity, and high-fat diet, the number of obese individuals has rapidly increased in both developed and developing countries (1, 2). Although no single etiology is known to be fully responsible for the association between obesity and urolithiasis, with increasing BMI, metabolic disorders such as hypercalciuria, hyperoxaluria, hyperinsulinemia, and low urine volume may be contributing factors in patients with metabolic syndromes (3). Because of all these, obese patients are more likely to be faced with a renal stone disease (4). Consequently, it can be considered that urologists everywhere will encounter obese patients with kidney stones more frequently.

Currently, many treatment methods to eliminate renal stones are available, including extracorporeal shock wave lithotripsy (SWL), flexible ureterorenoscopy (f-URS), and percutaneous nephrolithotomy (PNL). Due to technical reasons such as thicker skin and subcutaneous tissue in obese patients, the inability to obtain clear images under fluoroscopy, and the incompatibility with a SWL table, SWL is insufficient for most cases, especially on large stones (5). The effectiveness of f-URS on kidney stones smaller than 2 cm in size has been shown in obese patients, but the need for multiple interventions as the stone size increases is a significant disadvantage (6, 7). Recently, PNL remains one of the most important treatment options for renal stone treatment (4).

Percutaneous nephrolithotomy is an effective minimally invasive surgical treatment method that is generally applied under general anesthesia in the treatment of large, multiple, and complex stones in the upper urinary system (8). On the other hand, many studies conducted in recent years have shown that regional anesthesia can be performed safely and effectively in patients undergoing PNL (9, 10). However, data regarding PNL under spinal anesthesia in obese patients is limited.

The primary aim of this comparative prospective study is to evaluate if severe obesity has any deleterious effect on the early postoperative course in patients undergoing

PNL under spinal anesthesia. Secondly, it is to determine whether severe obesity changes surgical results.

Complications related to the respiratory tract during and after operations are more common in obese patients due to general anesthesia and may show a destructive course. In addition, patients can more easily tolerate the common pain problems after surgery with spinal anesthesia, and their analgesic needs are reduced. For the anesthesiologist, the separation of obese patients from postoperative positive pressure ventilators is quite challenging, and it requires great effort to provide spontaneous breathing (9, 10). Considering all this, we think that the prevention of complications due to general anesthesia that may be encountered during early postoperative period will increase the surgical success by all means.

## MATERIAL AND METHOD

Patients undergoing PNL were prospectively included between May 2017 and November 2017 for this study that took place in the Urology Clinic of Health Sciences University Konya Training and Research Hospital. The patients were divided into 2 groups according to their body mass index (BMI). Accordingly, those with  $BMI<35$  kg/m<sup>2</sup> formed the first group while the severely obese  $BMI>35$  kg/m<sup>2</sup> formed the second group. Exclusion criteria were defined as chronic renal failure, congenital anomalies of the kidney (horseshoe kidney, etc.), and patients with solitary kidneys. Age, gender, median stone burden, pre/postoperative hemoglobin (Hb) levels, number and regions of access, duration of surgery, perioperative complications and Visual Analogue Scale (VAS) score at 24 hours, Post Anesthesia Care Unit (PACU) admission/discharge Aldrete scores, and PACU length of stay were recorded. The Aldrete score is utilized to evaluate patients to see if they can be safely discharged from the PACU (11). Patients should be scored at least 9 out of 10 to be discharged from the PACU. Additionally, the time interval between the admission and discharge from the PACU seems to be a good marker for early postoperative recovery. The stone burden was obtained by the formula  $length \times width \times \pi \times 0.25$  in mm<sup>2</sup>.

All surgeries were performed by the same team. Prior to the procedure, all patients were hydrated using a 20 mg/

kg saline bolus to prevent hypotension. Spinal anesthesia was performed in the sitting position using a 25 Gauge Whitacre needle at the estimated L3-4 or L4-5 interspace, and 15 mg of hyperbaric bupivacaine was injected. Sensory block height was examined using ice, and 5 minutes after spinal anesthesia, the dermatome level was recorded. It is left to the anesthesiologist to decide whether the operation will be started or not. After spinal anesthesia induction, all patients were sedated using bolus doses of 1 mg midazolam to reach the 2 mg Ramsey sedation score, and the same bolus doses were used to maintain the same sedation level.

After the 6 Fr open-ended ureteral catheter and 14 Fr Foley catheter were placed in the lithotomy position, the patients were placed in the prone position for PNL. A fluoroscopy was used to determine access and obtain stone status during surgery. For access, a 0.038-inch guidewire was used to guide the dilation achieved through an 18 Gauge needle and Amplatz dilators (up to 30 Fr). The stones were visualized using a 26 Fr nephroscope, and a pneumatic lithotripter was used for lithotripsy. Stones were removed using forceps. A 14 Fr nephrostomy tube was placed in all patients. The urethral catheter was removed, and Hb values were obtained on the first postoperative day. The nephrostomy tubes of the patients were removed on the second postoperative day, and the patient was discharged on the same day after observing that there was no leakage from the Access point. When patients needed analgesics on the first postoperative day, paracetamol was used initially, and tramadol was added to the treatment if sufficient pain palliation was not achieved. The total permissible doses of paracetamol and tramadol were 4 g/day and 400 mg/day, respectively.

Continuous variables for statistical analysis were given as mean or median (interquartile range) when necessary. Categorical values are given as frequency or percentage. T-test, Welch T-test, and Mann Whitney U tests were used for continuous variables. A chi-square test was used for categorical variables. A p value of <0.05 was considered statistically significant. SAS University Edition was used for statistical analysis.

Approval for this study was obtained from the Ethics Committee of Selçuk University (Date: 13.04.2017, No: 137).

## RESULTS

The whole study cohort consisted of 100 patients (50 patients in both groups) with a mean age of 49.6±13.4 years. There were 62 males (62%) and 38 females (38%). The mean age of patients in group 1 was 46.5±15.2 while it was 52.2±10.8 in group 2 (p=0.02). Group 1 consisted of 36 males (72%) and 14 females (28%) whilst group 2 included 26 males (52%) and 24 females (48%) (p=0.04) (Table 1).

Mean BMIs were 22.3±2.8 kg/m<sup>2</sup> and 37.6±4.9 kg/m<sup>2</sup> in groups 1 and 2, respectively (p<0.001). The duration of surgery was 68.3±25.6 mins in group 1, and it was 77.5±28.6 mins in group 2 (p=0.09). The median stone burden of the first group was 282.3 mm<sup>2</sup> (range 131.7-477.3 mm<sup>2</sup>) while the second group had a median 289.7mm<sup>2</sup> (range 139.3-520.9 mm<sup>2</sup>) stone burden (p=0.08). An overview of the patient data is given in Table 1.

Pre and postoperative Hb levels were similar in both groups (14.3±2.0 and 12.3±1.9 in group 1, 14.2±1.9 and 12.2±1.8 in group 2) (p=0.86). Subcostal access was used in 45 patients (90%) in group 1, and intercostal access

**Table 1:** Overview of two groups

	<b>Group 1 BMI &lt;35 kg/m<sup>2</sup></b>	<b>Group 2 BMI ≥35 kg/m<sup>2</sup></b>	<b>P</b>
<b>Patient number</b>	50	50	1
<b>Gender (%)</b>			
<b>Male</b>	36 (72%)	26 (52%)	<b>0.04</b>
<b>Female</b>	14 (28%)	24 (48%)	
<b>Mean age, year (SD)</b>	46.58 (15,24)	52.62 (10.81)	<b>0.02</b>
<b>Mean BMI, kg/m<sup>2</sup> (SD)</b>	22.30 (2,86)	37.65 (4.98)	
<b>Laterality, n (%)</b>			
<b>Right</b>	20 (40%)	22 (44%)	0.69
<b>Left</b>	30 (60%)	28 (56%)	
<b>Access site (%)</b>			
<b>Subcostal</b>	45 (90%)	39 (78%)	0.1
<b>Intercostal</b>	5 (10%)	11 (22%)	
<b>Duration of surgery, min (SD)</b>	68.36 (25,63)	77.50 (28.60)	0.09

**Table 2:** Postoperative parameters of patients

	<b>Group 1 BMI &lt;35 kg/m<sup>2</sup></b>	<b>Group 2 BMI ≥35 kg/m<sup>2</sup></b>	<b>P</b>
<b>Time interval at the PACU, min (SD)</b>	39.04 (7.54)	58.48 (14.06)	<b>&lt;0.0001</b>
<b>PACU admission Aldrete score, n (SD)</b>	9.02 (.071)	8.2 (0.88)	<b>&lt;0.0001</b>
<b>PACU discharge Aldrete score, n (SD)</b>	9.9 (0.3)	9.62 (0.49)	<b>0.03</b>
<b>Total Parasetamol dose, mg (Q1-Q3)</b>	500 (0-1000)	500 (0-500)	0.15
<b>Total Tramadol dose, mg (Q1-Q3)</b>	100 (100-200)	100 (0-200)	0.91
<b>VAS score at 24<sup>th</sup> hour (SD)</b>	5.02 (1.35)	5.34 (1.84)	0.32
<b>Length of hospital stay, day (SD)</b>	3.30 (1.34)	3.08 (1.07)	0.36

was used in 5 (10%) while 39 patients (78%) in group 2 received subcostal access whereas 11 (22%) received intercostal access ( $p=0.1$ ). VAS score at the postoperative 24<sup>th</sup> hour was  $5.0\pm 1.3$  in group 1 while it was  $5.3\pm 1.8$  in group 2 ( $p=0.32$ ). On the other hand, the length of the hospital stay was  $3.3\pm 1.3$  days in patients with BMI <35 kg/m<sup>2</sup> and  $3.0\pm 1.0$  in patients with BMI ≥35 kg/m<sup>2</sup> ( $p=0.36$ ).

Stone-free status was achieved in 97 patients in the study. Therefore, the overall stone-free rate (SFR) rate was 97%. According to the groups, a 98% stone-free rate was found in the severely obese group and a 96% rate in the normal BMI group, and there was no significant difference between the groups ( $p=0.672$ ).

PACU admission Aldrete scores showed a statistically significant difference ( $9.0\pm 0.7$  in group 1 and  $8.2\pm 0.8$  in group 2,  $p<0.0001$ ). Also, there was a statistically significant difference in terms of PACU discharge Aldrete scores between groups ( $9.9\pm 0.3$  vs.  $9.6\pm 0.4$  in groups 1 and 2, respectively) ( $p=0.03$ ). Finally, the time interval in the PACU was  $39.0\pm 7.5$  mins in group 1 while it was  $58.8\pm 14.0$  mins in group 2 ( $p<0.0001$ ).

In regards to the analgesic dose required, the mean paracetamol and tramadol use in the first 24 hours was 500 mg (0-1000) and 100 mg (100-200), respectively in group 1 where it was 500 mg (0-500) and 100 mg (0-200) in group 2. There was no statistically significant difference between the groups ( $p=0.15$  and  $0.91$  for paracetamol and tramadol, respectively). Table 2 gives a summary of the postoperative findings.

## DISCUSSION

To our knowledge, there is inadequately published literature on the use of regional anesthesia in obese patients who are undergoing PNL. This forms the basis of our current study.

In obese patients, anesthetic, surgical techniques, and pre-surgical problems can be challenging for urologists

(12). Excessive fat tissue decreases the image quality of fluoroscopy screening and reduces the accuracy of defining the appropriate calyx or stone during access. Additionally, identifying a landmark at the beginning of the operation is complicated in obese patients. Also, accessing the pelvicalyceal system and dilating the tract is more challenging. Additionally, an adequate length of a working sheath and working instruments in obese patients has adverse effects on PNL outcomes (13, 14).

PNL was originally performed under general anesthesia (15). Particularly in obese patients, with general anesthesia, there is a risk of tube displacement during change of position from supine to prone, and this carries a higher risk of pulmonary complications, such as reduction in total lung capacity, expiratory lung volume, and functional residual capacity (16). For this reason, a PNL operation was performed in some centers in a supine position instead of a prone position, and it was shown that the operation time was shorter while stone-free, complication, blood transfusion, and postoperative fever rates were similar (17, 18).

Spinal anesthesia generally has a less side effect profile than general anesthesia and is a more economical method (19, 20). Also, the ability to easily change the patient's position during anesthesia is another advantage of spinal anesthesia.

The first description of PNL with regional anesthesia was reported in 1988. The authors evaluated 112 patients who underwent PNL with epidural anesthesia. The authors reported that when compared with local anesthesia associated with sedative analgesia or general anesthesia, epidural anesthesia appeared to be more convenient (21).

Various studies reported comparatively similar results in obese patients in terms of the duration of surgery, the length of the hospital stay, and the Hb drop, in addition to a global study that looked at 5803 patients with different BMI groups and revealed only a longer duration of surgery in morbidly obese patients (22-24). In a recent meta-analysis, PNL in obese patients was shown to have

similar surgical outcomes compared with non-obese counterparts, along with shorter lengths of hospital stays (2). In the study by Kuzgunbay et al. comparing the PNL operations performed under spinal and general anesthesia, they found no statistically significant difference between the two groups in terms of stone-free and complications (16).

Our results show similar results for PNL under spinal anesthesia with no statistically significant differences between the two groups in terms of duration of surgery, Hb drop, and the length of hospital stay. Furthermore, our results indicate there is no difference in mean analgesic use in obese patients, which is in accordance with previous studies.

Another aspect of surgery that should be taken into account is the recovery period. Patients are transferred to PACU after extubating and stay there until they become fit for discharge to their rooms. The Aldrete scoring system is the most widely used clinical tool to assess the physical status of patients recovering from anesthesia (26). Patients need to have at least 9 points out of 10 for a safe discharge. In a study comparing general anesthesia and segmental epidural anesthesia for PNL, the time it took to reach Aldrete's score of 9 was  $27.2 \pm 5.6$  for general anesthesia and  $10.4 \pm 4.1$  for segmental epidural anesthesia. The mean BMI of the study cohort was  $22 \text{ kg/m}^2$  with no statistical difference between groups (27). Our results revealed a lower PACU admission Aldrete score, a lower PACU discharge score, and a longer interval in PACU for patients with  $\text{BMI} \geq 35 \text{ kg/m}^2$ . Therefore, severely obese patients may be informed that it would take a longer time for them to be brought back to their rooms. Moreover, the result of our study showed VAS scores at the postoperative 24<sup>th</sup> hour are similar in the two groups.

The main limitation of our prospective study is the relatively small number of patients. In addition, age groups were not statistically similar even though the difference between means of the groups is 6 years. We believe that this is a consequence of the peak incidence of obesity, which is observed between 55-65 years of age (28). Also, females were statistically more frequent in group 2 which is possibly a result of female predominance in obesity in the world, as well as in our country (29).

## CONCLUSION

Severe obesity does not alter surgical outcomes in patients undergoing PNL under spinal anesthesia, and in our opinion, spinal anesthesia in PNL is a safe and effective anesthesia modality for renal stone(s) in obese and morbidly obese patients. The role of spinal anesthesia must be investigated by further prospective, randomized studies with larger patient volumes.

**Ethics Committee Approval:** This study was approved by the Selçuk University, Non-Interventional Clinical Research Ethics Committee (Date: 13.04.2017, No: 137).

**Informed Consent:** Written consent was obtained from the participants.

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

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

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

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

**Etik Komite Onayı:** Bu çalışma için etik komite onayı Selçuk Üniversitesi, Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Tarih: 13.04.2017, No: 137).

**Bilgilendirilmiş Onam:** Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

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

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

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

## REFERENCES

1. Keheila M, Leavitt D, Galli R, Motamedinia P, Theckumparampil N, Siev M, et al. Percutaneous nephrolithotomy in super obese patients (body mass index  $\geq 50 \text{ kg/m}^2$ ): overcoming the challenges. *BJU Int* 2016;117(2):300-6. [CrossRef]
2. Zhou X, Sun X, Chen X, Gong X, Yang Y, Chen C, et al. Effect of Obesity on Outcomes of Percutaneous Nephrolithotomy in Renal Stone Management: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Urol Int* 2017;98(4):382-90. [CrossRef]
3. Scales CD Jr, Smith AC, Hanley JM, Saigal CS. Urologic Diseases in America Project. Prevalence of kidney stones in the United States. *Eur Urol* 2012;62(1):160-5. [CrossRef]
4. Ozgor F, Ucpinar B, Binbay M. Effect of Obesity on Prone Percutaneous Nephrolithotomy Outcomes: A Systemic Review. *Urol J* 2016;13(1):2471-8. PMID: 26945649.
5. Pareek G, Hedican SP, Lee FT Jr, Nakada SY. Shock wave lithotripsy success determined by skin-to-stone distance on computed tomography. *Urology* 2005;66(5):941-4. [CrossRef]

6. Doizi S, Letendre J, Bonneau C, Gil Diez de Medina S, Traxer O. Comparative study of the treatment of renal stones with flexible ureterorenoscopy in normal weight, obese, and morbidly obese patients. *Urology* 2015;85(1):38-44. [\[CrossRef\]](#)
7. Sari E, Tepeler A, Yuruk E, Resorlu B, Akman T, Binbay M, et al. Effect of the body mass index on outcomes of flexible ureterorenoscopy. *Urolithiasis* 2013;41(6):499-504. [\[CrossRef\]](#)
8. Ramakumar S, Segura JW. Renal calculi. Percutaneous management. *Urol Clin North Am* 2000;27(4):617-22. [\[CrossRef\]](#)
9. Nouralizadeh A, Ziaee SA, Hosseini Sharifi SH, Basiri A, Tabibi A, Sharifiaghdas F. et al. Comparison of percutaneous nephrolithotomy under spinal versus general anesthesia: a randomized clinical trial. *J Endourol* 2013;27(8):974-8. [\[CrossRef\]](#)
10. Singh V, Sinha RJ, Sankhwar SN, Malik A. A prospective randomized study comparing percutaneous nephrolithotomy under combined spinal-epidural anesthesia with percutaneous nephrolithotomy under general anesthesia. *Urol Int* 2011;87(3):293-8. [\[CrossRef\]](#)
11. Aldrete JA. The post-anesthesia recovery score revisited. *J Clin Anesth* 1995;7(1):89-91. [\[CrossRef\]](#)
12. Wu SD, Yilmaz M, Tamul PC, Meeks JJ, Nadler RB. Awake endotracheal intubation and prone patient self-positioning: anesthetic and positioning considerations during percutaneous nephrolithotomy in obese patients. *J Endourol* 2009;23(10):1599-602. [\[CrossRef\]](#)
13. Gofrit ON, Shapiro A, Donchin Y, Bloom AI, Shenfeld OZ, Landau EH. et al. Lateral decubitus position for percutaneous nephrolithotripsy in the morbidly obese or kyphotic patient. *J Endourol* 2002;16(6):383-6. [\[CrossRef\]](#)
14. Nguyen TA, Belis JA. Endoscopic management of urolithiasis in the morbidly obese patient. *J Endourol* 1998;12(1):33-5. [\[CrossRef\]](#)
15. Basiri A, Kashi AH, Zeinali M, Nasiri MR, Valipour R, Sarhangnejad R. Limitations of Spinal Anesthesia for Patient and Surgeon During Percutaneous Nephrolithotomy. *Urol J* 2018;15(4):164-7. [\[CrossRef\]](#)
16. Kuzgunbay B, Turunc T, Akin S, Ergenoglu P, Aribogan A, Ozkardes H. Percutaneous nephrolithotomy under general versus combined spinal-epidural anesthesia. *J Endourol* 2009;23(11):1835-8. [\[CrossRef\]](#)
17. Mazzucchi E, Vicentini FC, Marchini GS, Danilovic A, Brito AH, Srougi M. Percutaneous nephrolithotomy in obese patients: comparison between the prone and total supine position. *J Endourol* 2012;26(11):1437-42. [\[CrossRef\]](#)
18. Liu L, Zheng S, Xu Y, Wei Q. Systematic review and meta-analysis of percutaneous nephrolithotomy for patients in the supine versus prone position. *J Endourol* 2010;24(12):1941-6. [\[CrossRef\]](#)
19. Borendal Wodlin N, Nilsson L, Carlsson P, Kjølhed P. Cost-effectiveness of general anesthesia vs spinal anesthesia in fast-track abdominal benign hysterectomy. *Am J Obstet Gynecol* 2011;205(4):326.e1-7. [\[CrossRef\]](#)
20. McLain RF, Kalfas I, Bell GR, Tetzlaff JE, Yoon HJ, Rana M. Comparison of spinal and general anesthesia in lumbar laminectomy surgery: a case-controlled analysis of 400 patients. *J Neurosurg Spine* 2005;2(1):17-22. [\[CrossRef\]](#)
21. Ballestrazzi V, Zboralski C, Smith-Morel P, Bouillet M, Willot I, Hochart D. et al. Intérêt de l'anesthésie péridurale suspendue dans la néphrolithotomie percutanée. A propos de 112 patients du service des voies urinaires du C.H.R. de Lille [Importance of suspended peridural anesthesia in percutaneous nephrolithotomy. Apropos of 112 patients in the urology service of the Regional Hospital Center of Lille]. *Cah Anesthesiol* 1988;36(2):85-8. French. PMID: 3365593.
22. Koo BC, Burt G, Burgess NA. Percutaneous stone surgery in the obese: outcome stratified according to body mass index. *BJU Int* 2004;93(9):1296-9. [\[CrossRef\]](#)
23. El-Assmy AM, Shokeir AA, El-Nahas AR, Shoma AM, Eraky I, El-Kenawy MR. et al. Outcome of percutaneous nephrolithotomy: effect of body mass index. *Eur Urol* 2007;52(1):199-204. [\[CrossRef\]](#)
24. Fuller A, Razvi H, Denstedt JD, Nott L, Pearle M, Cauda F. et al: CROES PCNL Study Group. The CROES percutaneous nephrolithotomy global study: the influence of body mass index on outcome. *J Urol* 2012;188(1):138-44. [\[CrossRef\]](#)
25. Shohab D, Ayub R, Alam MU, Butt A, Sheikh S, Assad S. et al. Effect of body mass index on operative time, hospital stay, stone clearance, postoperative complications, and postoperative analgesic requirement in patients undergoing percutaneous nephrolithotomy. *Turk J Urol* 2015;41(4):177-80. [\[CrossRef\]](#)
26. Phillips NM, Street M, Kent B, Haesler E, Cadeddu M. Post-anaesthetic discharge scoring criteria: key findings from a systematic review. *Int J Evid Based Healthc* 2013;11(4):275-84. [\[CrossRef\]](#)
27. Parikh DA, Patkar GA, Ganvir MS, Sawant A, Tendolkar BA. Is segmental epidural anaesthesia an optimal technique for patients undergoing percutaneous nephrolithotomy? *Indian J Anaesth* 2017;61(4):308-314. [\[CrossRef\]](#)
28. Satman I, Omer B, Tutuncu Y, Kalaca S, Gedik S, Dincag N. et al. TURDEP-II Study Group. Twelve-year trends in the prevalence and risk factors of diabetes and prediabetes in Turkish adults. *Eur J Epidemiol* 2013;28(2):169-80. [\[CrossRef\]](#)
29. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *Lancet* 2016;387(10026):1377-96. [\[CrossRef\]](#)



# VITAMİN D EKSİKLİĞİ DID NOT AUGMENT THE PROGRESSION OF HIGH-FRUCTOSE-INDUCED NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE IN RATS

## VİTAMİN D EKSİKLİĞİ SIÇANLARDA ALKOLE BAĞLI OLMAYAN YAĞLI KARACİĞER HASTALIĞININ PROGRESYONUNU ARTTIRMADI

İlknur BİNGÜL<sup>1</sup> , Canan KÜÇÜKGERGİN<sup>1</sup> , Abdurrahman Fatih AYDIN<sup>1</sup> , Işın DOĞAN EKİCİ<sup>2</sup> , Semra DOĞRU ABBASOĞLU<sup>1</sup> , Müjdat UYSAL<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Department of Medical Biochemistry, Istanbul, Turkey

<sup>2</sup>Acibadem Mehmet Ali Aydınlar University, Acibadem University Medical Faculty, Department of Pathology, Istanbul, Turkey

**ORCID IDs of the authors:** İ.B. 0000-0002-6432-3541; C.K. 0000-0002-1797-5889; A.F.A. 0000-0002-3336-4332; I.D.E. 0000-0003-4062-9519; S.D.A. 0000-0003-3467-9763; M.U. 0000-0002-8802-8766

**Cite this article as:** Bingul I, Kucukgergin C, Aydin AF, Dogan Ekinci I, Dogru Abbasoglu S, Uysal M. Vitamin D deficiency did not augment the progression of high-fructose-induced nonalcoholic fatty liver disease in rats. J Ist Faculty Med 2021;84(3):360-9. doi: 10.26650/IUITFD.2021.849531

### ABSTRACT

**Objective:** Vitamin D has antioxidant, anti-inflammatory and antiglycation activities, and hepatoprotective potential. There is a relationship between vitamin D deficiency (VDD) and the severity of liver disorders. VDD has been proposed to contribute to the progression of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). However, experimental results are not clear. Therefore, in this study, the effects of a VDD diet on high fructose (HFr) drinking-induced NAFLD was evaluated.

**Material and Method:** Male Wistar rats were divided into four groups as control, HFr, VDD+HFr, and VDD. Control and HFr groups were fed a control diet, and other groups with a VDD-diet for 12 weeks. HFr (30%; w/v; in drinking water) was given in the last 8 weeks. Insulin resistance (IR), serum lipids, hepatic triglyceride, lipid peroxide, protein carbonyl, advanced glycation end products (AGEs) and inflammation (TNF- $\alpha$  and myeloperoxidase) parameters, and histopathological changes were investigated.

**Results:** Increases in serum transaminases, hypertriglyceridemia, and IR were observed in HFr and VDD+HFr groups. Increased liver triglyceride, lipid and protein oxidation products, protein glycation and inflammation markers as well as microvesicular hepatic steatosis and hepatocyte ballooning were observed in both groups. Although IR and hepatic inflammation markers were higher in the VDD+HFr group, serum transaminases, hepatic triglyceride, lipid and protein oxidation products, and glycation indicators in the liver did not alter between the two groups. However, Nrf2 mRNA expression and superoxide dismutase and

### ÖZET

**Amaç:** Vitamin D antioksidan, antiinflamatuvar ve antiglikasyon etkinliğe ve karaciğeri koruyucu potansiyele sahiptir. Vitamin D eksikliği/yetersizliği (VDD/VDI) ile karaciğer bozukluklarının ciddiyeti arasında bir ilişki bulunmaktadır. VDD'nin alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığının (NAFLD) progresyonunda etkili olduğu bildirilmiştir. Fakat deneysel sonuçlar yeterli değildir. Bu nedenle, bu çalışmada VDD'nin yüksek fruktozlu (HFr) içme suyu uygulanarak oluşturulan NAFLD üzerine etkisi incelendi.

**Gereç ve Yöntemler:** Erkek Wistar sıçanlar kontrol, HFr, VDD+Fr ve VDD olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Kontrol ve HFr grupları Vit D3 içeren, diğerleri ise Vit D3 içermeyen yemle 12 hafta beslendiler. HFr (%30; w/v) içme suyu ile son 8 hafta uygulandı. İnsülin direnci (IR), serum lipitleri, hepatic trigliserit, lipit peroksit, protein karbonil, ileri glikasyon ürünleri (AGEs) ve inflamasyon (TNF- $\alpha$  ve miyeloperoksidaz) göstergeleri tayin edildi.

**Bulgular:** HFR ve VDD+HFr gruplarında serumda transaminazlar arttı, hipertrigliseridemi, ve insülin direnci oluştu. Her iki grupta da karaciğerde trigliserit düzeyleri, lipit ve protein oksidasyon ürünleri, protein glikasyon ve inflamasyon göstergeleri arttı, mikroveziküler steatoz ve hepatosit balonlaşması saptandı. IR ve inflamasyon göstergeleri VDD+HFr grubunda daha yüksek olmasına rağmen, iki grup arasında serum transaminazları, karaciğer trigliserit, lipit ve protein oksidasyon ürünleri ve glikasyon göstergeleri düzeylerinde bir farklılık bulunmadı. Ancak Nrf2 mRNA ekspresyonu ile süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidazın mRNA ekspresyonları ve aktiviterinin VDD+HFr grubunda

**Corresponding author/İletişim kurulacak yazar:** ilknur.bingul@istanbul.edu.tr

**Submitted/Başvuru:** 29.12.2020 • **Accepted/Kabul:** 16.04.2021 • **Published Online/Online Yayın:** 14.07.2021



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

glutathione peroxidase mRNA expression and activities were significantly higher in the VDD+HFr group.

**Conclusion:** Our results show that VDD did not augmented HFr-induced hepatotoxicity and glycooxidative stress in the liver of rats.

**Keywords:** Vitamin D deficiency, high fructose diet, nonalcoholic liver disease, glycooxidative stress, antioxidant, inflammation

daha yüksek olduğu bulundu.

**Sonuç:** Sonuçlarımız VDD'nin HFr ile oluşturulan karaciğer hasarı ve glikooksidatif strese bir değişiklik oluşturmadığını göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Vitamin D yetersizliği, yüksek fruktozlu diyet, alkolik olmayan karaciğer hastalığı, glikooksidatif stres, antioksidanlar, inflamasyon

## INTRODUCTION

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) refers to an accumulation of fat in the liver due to causes other than alcohol. NAFLD is accepted as the hepatic manifestation of the metabolic syndrome. NAFLD starts with simple steatosis and it can progress to more serious conditions, such as steatohepatitis (NASH), fibrosis and cirrhosis. According to a two-hit hypothesis, the presence of steatosis (first hit) makes the liver susceptible to some factors such as oxidative stress, endotoxemia, inflammation and mitochondrial dysfunction as the second hit (1). Advanced glycation end products (AGEs) also play an important role as a contributing factor in the pathogenesis of NAFLD (2).

A high-fructose (HFr) diet affects glucose and lipid metabolism and causes various metabolic disorders such as insulin resistance (IR), hypertriglyceridemia and NAFLD (3). A HFr diet is one of the good dietary models of NAFLD in animals (4). Increased lipogenesis, oxidative stress and inflammation, and decreased  $\beta$ -oxidation are strongly associated with HFr-induced NAFLD (5). Increases in non-enzymatic protein glycation result in the accumulation of advanced glycation end products (AGEs) in HFr rats (6). These products are known to affect structures and functions of proteins and cause further increased oxidative stress and inflammation by interacting with their receptors (2, 6). Therefore, AGEs were accepted to be effective in the progression of NAFLD (6).

There are two main forms of Vitamin D: Vit D<sub>2</sub> (ergocalciferol) and Vit D<sub>3</sub> (cholecalciferol). Vit D<sub>2</sub> is derived from the diet, but Vit D<sub>3</sub> is both derived from diet and synthesized from 7-dehydrocholesterol with the effect of ultraviolet light on the human skin. Dietary or synthesized Vit D are hydroxylated in the liver to 25-hydroxyvitamin D [25(OH) D]. It is subsequently hydroxylated in the kidney into 1,25-dihydroxyvitamin D [1,25(OH)<sub>2</sub> D] which is the biologically active form of Vit D (7).

1,25(OH)<sub>2</sub> D induces biological effects by binding to a vitamin D receptor (VDR) located in the nucleus of target cells. Its classical role is in calcium/phosphate homeostasis. Additionally, it has multiple functions and target organs and influences the expression of several genes and plays important roles in the regulation of cell proliferation and differentiation, immune function, oxidative stress,

protein glycation, inflammation, and apoptosis (7-9). Therefore, Vit D has been reported to be effective in preventing many diseases such as diabetes, hypertension, cardiovascular and hepatic diseases and cancer (10-12).

Vit D deficiency (VDD) is quite common in the world. Sedentary lifestyle, inadequate sunlight exposure and the lack of Vit D in the food has resulted in VDD (13,14). Serum 25(OH)D levels are used as an indicator of Vit D stores. Although there are some differences in clinical guidelines, the Institute of Medicine (Washington; USA) defines VDD as a 25(OH)D level of <20 ng/mL and severe VDD as <10 ng/mL (15). VDD alone may induce IR, oxidative stress, inflammation, and mitochondrial dysfunction (8, 10, 14). However, epidemiological and laboratory evidence have shown that VDD may be associated with some common diseases such as tumors, bone diseases, immune disorders, cardiovascular diseases, diabetes mellitus, and chronic liver disorders (12-14). VDD has also been reported to be a secondary factor in the onset and progression of NAFLD, but a clear result has not been reached in clinical and experimental studies (7, 10, 11, 16, 17).

In this study, we aimed to examine whether a diet deficient in VitD<sub>3</sub> has a progressive effect on HFr-induced NAFLD in rats. For this reason, parameters affecting the progression of NAFLD such as IR, hepatic prooxidant and antioxidant parameters, protein glycation and inflammation markers together with histopathological changes were evaluated in the liver.

## MATERIAL AND METHOD

### Chemicals

Fructose (Fr) and other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MI, USA).

### Animals

Male Wistar rats (140-160 g) were provided from the Aziz Sancar Experimental Medical Research Institute of Istanbul University. The animals were supplied with food and water *ad libitum*. They were kept in polypropylene cages (three to four per cage) at 22°C, with 12-h light and 12-h darkness without shielding from ultraviolet B radiation (290-320 nm).

### Diets and experimental design

Rats were randomly assigned into four groups as control (n=6), HFr (n=7), HFr+VDD (n=8) and VDD (n=8) groups. Control and HFr groups were fed on PicoLab Rodent diet 5053 (2300 IU Vit D3/kg added); however, VDD+HFr and VDD groups were fed on Modified LabDiet 5053 (Vit D3 not added) for 12 weeks. These diets were supplied from LabDiet (St. Louis-Missouri, USA). Fructose (30%, w/v) was added to drinking water for the last 8 weeks to HFr and VDD+HFr groups.

### Samples

The animals were fasted overnight and anesthetized with ketamine (35 mg/kg, i.p., Pfizer, USA) and xylazine HCl (15 mg/kg, i.p., Bioveta, Czech Republic). Blood was collected into dry tubes by cardiac puncture and centrifuged at 1,500xg for 10 min to get serum.

Liver tissues were removed, washed with ice-cold 0.9% NaCl and homogenized in ice-cold PBS (phosphate-buffered saline; 0.01M, pH:7.4). Liver homogenates were centrifuged at 600 g for 10 min at 4°C to obtain the postnuclear fraction (PNF). Serum and postnuclear fraction of liver were stored at -80°C until they were analyzed. The liver index was calculated as liver weight/body weightx100.

### Determinations in serum

Serum fasting glucose, triglyceride (TG), calcium and inorganic phosphorus levels, and alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities were measured using a Cobas Integra 800 autoanalyzer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Serum 25(OH)D<sub>3</sub> and insulin levels were determined by ELISA kits (Abbkine, Wuhan-China). Homeostasis model assessment (HOMA) index was used to evaluate insulin resistance (IR) and calculated using the formula: fasting insulin concentration (pmol/L)xfasting glucose concentration (mmol/L)/135. High HOMA scores indicate IR (low insulin sensitivity).

### Determinations in the liver

#### TG, hydroxyproline (Hyp), tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) levels and myeloperoxidase (MPO) activity

TG levels were determined in hepatic lipid extracts by using kits provided by Biolabo Biochemistry and Coagulation (Maizy, France). Liver tissues were homogenized in 10 volumes of PBS with a glass homogenizer on ice. Tissue homogenates were sonicated, and then centrifuged at 5,000 g for 5 min to get the supernatants. Hyp (Bioassay Technology Laboratory, Shanghai, China) and TNF- $\alpha$  (USCN, Wuhan, China) levels were determined in these supernatants by using ELISA kits.

To determine MPO activity, liver tissue was homogenized in 0.5% hexadecyltrimethylamine bromide in 50 mM phosphate buffer, pH 6. The homogenates were

sonicated, freeze-thawed three times and centrifuged at 10,000xg. MPO activity was measured in the supernatant samples (18).

#### Hepatic reactive oxygen species (ROS), lipid peroxide and protein oxidation products

ROS generation was determined by the method described by Wang and Joseph (19). After excitation at 485 nm, the fluorescence emission of 2',7'-dichlorofluorescein at 538 nm was recorded using a microplate fluorometer and luminometer (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Scientific Inc, USA).

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and diene conjugate (DC) levels were measured to assess hepatic lipid peroxidation. TBARS levels were determined according to Buege and Aust and calculated from absorption at 532 nm by using the molar extinction coefficient of  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  (20). DC levels were determined spectrophotometrically at 233 nm. For this assay, liver lipids were extracted in chloroform/methanol (2:1; v/v) mixture, and then the extracted lipids were dissolved in cyclohexane. DC levels were calculated using a molar extinction coefficient of  $2.52 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (20).

PC levels were evaluated according to the method of Reznick and Packer, which is based on the measurement of protein hydrazones (21). Results were calculated from the maximum absorbance (360 nm) using a molar extinction coefficient of  $22,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### Protein glycation products in liver and serum

Hepatic advanced oxidation products of protein (AOPP) levels were measured spectrophotometrically at 340 nm (22). AGEs levels were determined spectrofluometrically in the liver and serum. For this reason, liver homogenates or serum were diluted with PBS (pH 7.4) and the fluorescence intensity ( $\lambda_{\text{emission}}$ : 440 nm;  $\lambda_{\text{excitation}}$ : 350 nm) was determined (23). N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl)lysine (CML) levels were measured using ELISA kits (Abbkine, Wuhan, China).

#### Determination of antioxidant system parameters

Hepatic ferric reducing anti-oxidant power (FRAP) levels were determined spectrophotometrically to evaluate antioxidant power in liver. Reducing a ferric-tripyridyltriazine complex to the ferrous form by the antioxidants in liver homogenates is monitored by measuring the change in absorption at 593 nm (24). Hepatic glutathione (GSH) levels were determined by using 5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoate) at 412 nm (25).

Superoxide dismutase (SOD) activity was determined according to Mylorie et al., and calculated using a standard curve prepared by bovine SOD (26). Glutathione peroxidase (GSH-Px) activity was measured using cumene hydroperoxide as a substrate (27). The reaction was followed spectrophotometrically (340 nm) at 37°C, and ac-

tivity was calculated using the extinction coefficient of NADPH ( $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Catalase (CAT) activity was measured spectrophotometrically at 240 nm by using hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) as substrate (28). One unit of CAT was considered as the activity of enzyme needed to degrade 1  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  per min at 25°C.

#### Determination of mRNA expressions of nuclear erythroid factor 2-related factor (Nrf2) superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and catalase (CAT)

In order to obtain mRNA expressions of Nrf2, SOD, GSH-Px and CAT in liver, the tissue was homogenized using a handheld homogenizer (SCIOGEX D160, USA). Total RNA was isolated using an RNA isolation kit (NucleoSpin RNA Kit, #740955, Macherey-Nagel, Germany). cDNA was synthesized with a SCRIPT cDNA Synthesis Kit (Jena Bioscience, GmbH, Jena, Germany) by using 5 ng RNA. Nrf2 (F: 5'-GTGGATCTGTCAGCTACTCCC-3'; R: 5'-CTGGGAATATCCAGGGCAAGC-3'), SOD (F: 5'-GGTCCAGCGGATGAAGAG-3'; R: 5'-GGACACATTGGCCACACC-3'), GSH-Px (F: 5'-CGACATCGAACCCGATATAGA-3'; R: 5'-ATGCCTTAGGGTTGCTAGG-3'), CAT (F: 5'-AGGTGCTTTTGATACTTTGAGG-3'; R: 5'-CGACTGTGGAGAATCGGACGG-3') primers, and the housekeeping gene GAPDH (F: 5'-CAGGGCTGCCTTCTCTTG-3'; R: 5'-AACTTGCCGTGGGTAGAGTC-3') were purchased from LGC Biosearch Technologies (Denmark). Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) was performed using qPCR Green Master with UNG (Jena Bioscience, GmbH, Jena, Germany) in a real-time PCR system (Biorad CFX Connect, California, USA). The expression levels of mRNAs were quantified using the  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  method.

#### Protein levels

Protein levels were determined spectrophotometrically using bicinchoninic acid (29).

#### Histopathologic examination

Livers were fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin, sectioned and stained with hematoxylin and eosin (H&E) for histologic examinations. Masson's trichrome (MTC) staining was also performed to show reticulin fibers of fibrotic areas. Steatosis, liver damage and fibrosis scores were made according to the protocol proposed by Goodman, as previously described in detail in our previous study (30, 31).

#### Statistical analysis

Statistical analysis was evaluated by using the Statistical Package for The Social Sciences program (21.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) program. All variables were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Data distributions and test of normality were investigated by Kolmogorov-Smirnov test. One-way ANOVA test (post-hoc Tukey's test) was used to assess the parameters with normal distribution. Homogeneity of variances was evaluated with Levene test. Kruskal-Wallis test (post-hoc Mann Whitney-U test) was used to compare the parameters without normal distribution. In all cases, a difference was considered significant when  $p < 0.05$ .

#### RESULTS

Final body weight did not change, but liver weight and liver index were elevated in HFr and VDD+HFr groups as compared to control group. Serum 25(OH) $\text{D}_3$  levels did not alter in the HFr group, but it decreased (47.3%) in the VDD+HFr group. Calcium and inorganic phosphorus levels remained unchanged in both groups as compared to the control (Table 1).

Significant increases in glucose, TG and HOMA levels, ALT and AST activities were detected in the HFr and VDD+HFr groups as compared to the control. However, insulin levels remained unchanged in both groups. Glucose and HOMA levels were higher in the VDD+HFr group than the HFr group (Table 2).

**Table 1:** The effect of vitamin D deficiency (VDD) on body weight, liver weight, and liver index\* values and serum levels of 25(OH) $\text{D}_3$ , calcium, and phosphorus in high fructose (HFr)-treated rats (Mean  $\pm$  SD)

	Control (n=6)	VDD (n=8)	HFr (n=7)	VDD+HFr (n=8)
Body weight (g)	299.5 $\pm$ 16.1	315.5 $\pm$ 29.8	312.1 $\pm$ 31.5	336 $\pm$ 16.5
Liver weight (g)	8.25 $\pm$ 0.93	7.55 $\pm$ 0.70	10.3 $\pm$ 1.46 <sup>a2</sup>	10.9 $\pm$ 0.83 <sup>a1</sup>
Liver index (%)	2.75 $\pm$ 0.21	2.41 $\pm$ 0.36	3.28 $\pm$ 0.27 <sup>a2</sup>	3.22 $\pm$ 0.21 <sup>a3</sup>
25(OH) $\text{D}_3$ (ng/mL)	28.4 $\pm$ 3.09	15.7 $\pm$ 1.07 <sup>a2</sup>	25.3 $\pm$ 5.88	15.0 $\pm$ 1.51 <sup>a2,b1</sup>
Calcium (mmol/L)	2.42 $\pm$ 0.16	2.50 $\pm$ 0.18	2.36 $\pm$ 0.12	2.39 $\pm$ 0.15
Phosphorus (mmol/L)	2.55 $\pm$ 0.18	2.58 $\pm$ 0.26	2.30 $\pm$ 0.16	2.40 $\pm$ 0.29

<sup>a1</sup> $p < 0.001$ , <sup>a2</sup> $p < 0.01$ , <sup>a3</sup> $p < 0.05$  as compared to control; <sup>b1</sup> $p < 0.001$  HFr vs VDD+HFr  
 \*Liver index= Liver weightx100/body weight

**Table 2:** The effect of vitamin D deficiency (VDD) on some biochemical parameters in serum of high fructose (HFr)-treated rats. (Mean±SD)

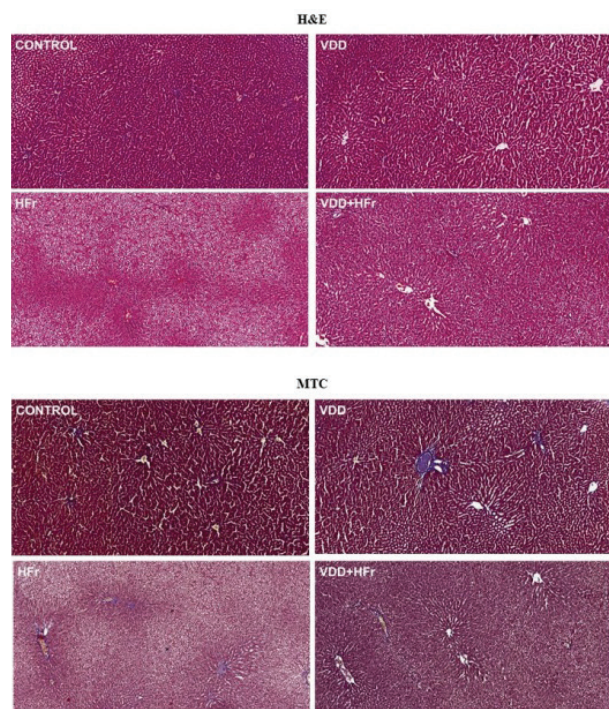
	Control (n=6)	VDD (n=8)	HFr (n=7)	VDD+HFr (n=8)
Glucose (mmol/L)	7.53±1.44	9.76±1.04 <sup>a3</sup>	12.2±1.09 <sup>a1</sup>	14.3±1.67 <sup>a1,b3</sup>
Insulin (mmol/L)	29.2±4.37	29.3±2.98	24.5±2.01	27.9±5.29
HOMA-IR	1.61±0.33	2.10±0.21 <sup>a2</sup>	2.21±0.23 <sup>a2</sup>	2.96±0.68 <sup>a2,b3</sup>
TG (mmol/L)	0.48±0.09	1.13±0.26 <sup>a2</sup>	0.79±0.18 <sup>a2</sup>	0.71±0.05 <sup>a3</sup>
ALT (U/L)	43.3±13.1	53.6±8.53	58.0±4.86 <sup>a3</sup>	67.9±10.3 <sup>a1</sup>
AST (U/L)	108.0±10.2	114.6±19.0	139.6±22.1 <sup>a2</sup>	148.8±27.1 <sup>a2</sup>

<sup>a1</sup>p< 0.001, <sup>a2</sup>p< 0.01, <sup>a3</sup>p< 0.05 as compared to control; <sup>b3</sup>p<0.05 HFr vs VDD+HFr

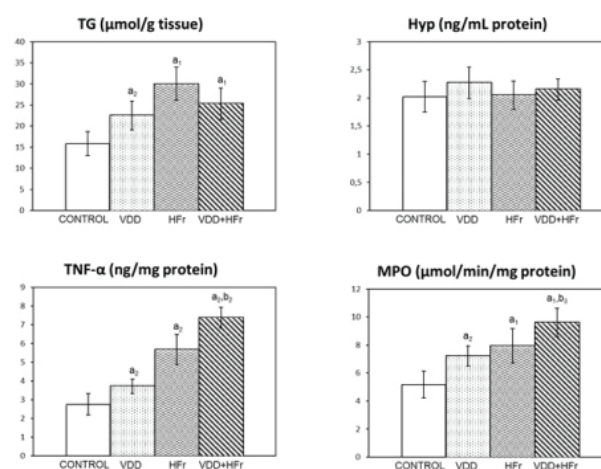
In hematoxylin and eosin (H&E) and Masson's trichrome (MTC) staining of liver sections, the HFr group exhibited marked microvesicular steatosis and hepatocyte ballooning without fibrotic changes. Some alleviations in histopathological findings were obtained in the VDD+HFr group (Figure 1). Steatosis score decreased significantly in the VDD+HFr (1.63±0.52) group as compared to HFr (3.00±0.00). However, the ballooning score did not change significantly in the VDD+HFr (1.63±0.52) as compared to HFr (2.00±0.00) group.

Hepatic TG and TNF-α levels and MPO activity were elevated, but Hyp levels remained unchanged in the HFr and

VDD+HFr groups as compared to the control. TNF-α levels and MPO activity, but not TG and Hyp levels were higher in the VDD+HFr group than the HFr group (Figure 2).



**Figure 1:** The effect of vitamin D deficiency (VDD) on histopathological changes in liver tissues of high fructose (HFr)-treated rats (H&E and MTC, x100)



**Figure 2.** The effect of vitamin D deficiency (VDD) on hepatic triglyceride (TG), hydroxyproline (Hyp), tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) levels and myeloperoxidase (MPO) activities in high fructose (HFr)-treated rats (Mean±SD). <sup>a1</sup>p< 0.001, <sup>a2</sup>p< 0.01, <sup>a3</sup>p< 0.05 as compared to control; <sup>b1</sup>p<0.001, <sup>b3</sup>p<0.05 HFr vs VDD+HFr

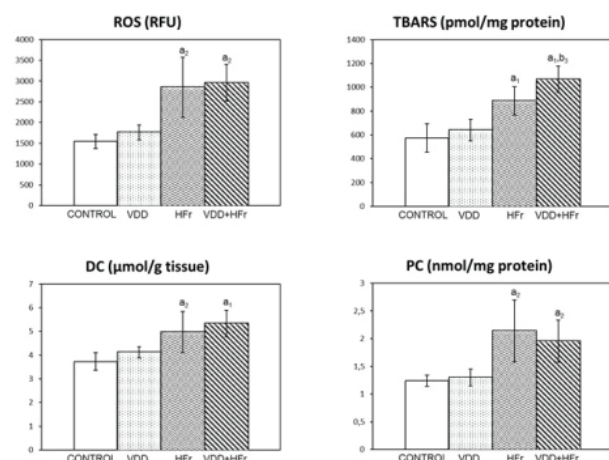
Hepatic ROS, TBARS, DC and PC levels were elevated in both groups. However, the TBARS levels were higher in the VDD+HFr group than the HFr group (Figure 3). Hepatic AGEs and AOPP together with serum AGE and CML levels were increased in the HFr and VDD+HFr groups as compared to the control (Table 3).

There were no changes in FRAP and GSH levels in the HFr and VDD+HFr groups. Hepatic SOD and GSH-Px activities diminished significantly, but CAT activity did not alter in the HFr group as compare to the control. The VDD+HFr and control groups did not differ in terms of antioxidant enzymes activities. When the HFr and VDD+HFr

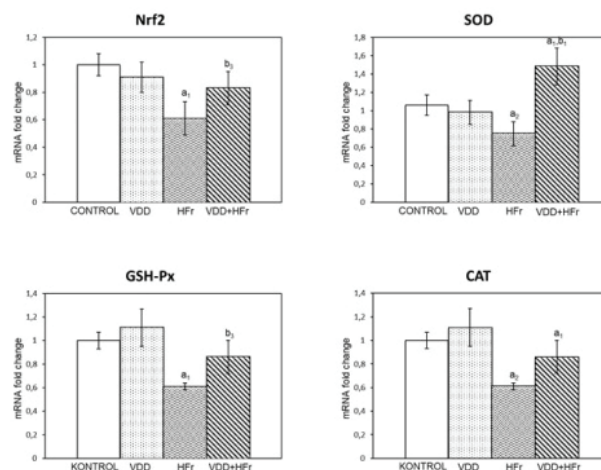
groups were compared, increases in SOD (30.8%), GSH-Px(16.6%) and CAT (20.7%) activities were increased in the VDD+HFr group. However, increases in GSH-Px and CAT activities were not significant (Table 4).

mRNA expressions of Nrf2, SOD, GSH-Px, and CAT were decreased in the HFr group. In the VDD+HFr group,

mRNA expression of SOD increased significantly as compared to the control, and Nrf2 and GSH-Px mRNA expressions returned to control levels. However, Nrf2, SOD and GSH-Px expressions were significantly higher than the HFr group. mRNA expression of CAT did not alter among the groups (Figure 4).



**Figure 3.** The effect of vitamin D deficiency (VDD) on hepatic reactive oxygen species (ROS), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), diene conjugates (DC) and protein carbonyl (PC) levels in high fructose (HFr)-treated rats (Mean±SD). <sup>a1</sup>p<0.001, <sup>a2</sup>p<0.01 as compared to control; <sup>b3</sup>p<0.05 HFr vs VDD+HFr



**Figure 4.** The effect of vitamin D deficiency (VDD) on hepatic mRNA expressions of nuclear erythroid factor 2-related factor (Nrf2) superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and catalase (CAT) in high fructose (HFr)-treated rats (Mean±SD). <sup>a1</sup>p<0.001, <sup>a2</sup>p<0.01 as compared to control; <sup>b1</sup>p<0.001, <sup>b3</sup>p<0.05 HFr vs VDD+HFr

**Table 3:** The effect of vitamin D deficiency (VDD) on serum advanced glycation end products (AGE) and carboxymethyllysine (CML) levels as well as hepatic advanced oxidized protein products (AOPP) and AGE in high fructose (HFr)-treated rats (Mean±SD)

	Control (n=6)	VDD (n=8)	HFr (n=7)	VDD+HFr (n=8)
Serum AGE (RFU)	186.3±15.4	185.1±17.3	250.6±29.8 <sup>a1</sup>	260.5±17.6 <sup>a1</sup>
Hepatic AGE (RFU)	351.3±18.1	330.5±20.7	549.5±22.8 <sup>a2</sup>	589.5±82.4 <sup>a2</sup>
Hepatic AOPP (nmol/mg protein)	22.8±0.96	24.5±1.89	28.7±3.02 <sup>a1</sup>	30.6±2.46 <sup>a1</sup>
Serum CML (µg/L)	12.3±1.75	13.7±4.35	17.34±3.00 <sup>a3</sup>	16.9±1.20 <sup>a3</sup>

<sup>a1</sup>p< 0.001, <sup>a2</sup>p< 0.01, <sup>a3</sup>p< 0.05 as compared to control

**Table 4:** The effect of vitamin D deficiency (VDD) on hepatic ferric reducing antioxidant power (FRAP), and glutathione (GSH) levels as well as hepatic superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), and catalase (CAT) activities in high fructose (HFr)-treated rats (Mean±SD)

	Control (n=6)	VDD (n=8)	HFr (n=7)	VDD+HFr (n=8)
FRAP ((nmol/mg protein)	80.3±11.9	76.9±15.8	65.6±12.4	77.5±11.8
GSH (nmol/mg protein)	23.9±3.02	24.0±6.30	19.4±4.02	17.3±4.16
SOD (U/mg protein)	20.1±2.89	18.7±1.43	16.4±1.78 <sup>a3</sup>	21.47±2.98 <sup>b2</sup>
GSH-Px (nmol/min/mg protein)	520.9±64.1	433.0±71.9	383.7±32.5 <sup>a2</sup>	447.4±60.5
CAT (µmol/min/mg protein)	352.6±47.7	366.3±76.2	314.4±36.4	379.4±44.7

<sup>a2</sup>p< 0.01, <sup>a3</sup>p< 0.05 as compared to control, <sup>b2</sup>p<0.01 HFr vs VDD+HFr

In the VDD group, there were significant decreases in serum 25(OH)D<sub>3</sub> and TG levels and significant increases in glucose and HOMA values as compared to the controls. In addition, hepatic TG and TNF- $\alpha$  levels and MPO activity were also increased. There were no changes in oxidative stress and protein glycation parameters and histopathological findings remained unchanged.

## DISCUSSION

Several dietary models such as high fat, HFr, western and methionine choline deficiency are used to produce NAFLD/NASH (4). Some investigators have reported that the HFr diet resulted in increased oxidative stress, increases in cytokines and AGEs levels in serum and liver (32-36). This diet caused hepatic lesions such as fatty liver, hepatocyte ballooning and lobular inflammation (32-36). Therefore, in this study, the role of the VDD diet in the pathogenesis of NAFLD was investigated by examining hepatic glycooxidative stress, inflammation and histopathology together with IR in a HFr-induced NAFLD model.

In the current study, rats received 30% fructose containing drinking water for eight weeks as previously reported (35, 36). Prooxidant status was evaluated by determining ROS, oxidation products of lipids (TBARS and DC) and proteins (PC and AOPP). AGEs are heterogenous products, and fluorescent AGEs and non-fluorescent CML levels were determined as protein glycation indicators (6). AOPP was reported to have some homologies with AGEs and to reflect protein glycooxidation (37). Determinations of TNF- $\alpha$  levels and MPO activity were used to examine hepatic inflammation. According to our results, the HFr diet caused IR, hypertriglyceridemia, increases in glycooxidative stress and inflammation together with histopathological changes (marked microvesicular steatosis, hepatocyte ballooning and no fibrosis) in rats. These findings indicate that the hepatic lesions were produced successfully in the HFr-induced NAFLD model.

Nrf2 is a transcription factor that is the main regulator of the antioxidant system. It regulates redox homeostasis by increasing the expression of many antioxidant enzymes such as SOD, GSH-Px, and CAT and plays a key role in combating oxidative stress (12, 14). The antioxidant potential of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> is related to its direct antioxidant potential and the upregulation of Nrf2 and its target antioxidant genes (8, 12, 14, 38). It has a suppressive effect against oxidative stress in dietary NAFLD models due to these properties (39-41).

On the other hand, VDD was reported to have an additional effect in the experimental dietary model of NAFLD as a second hit (42-45). However, some contradictory results are also available (46, 47). VDD diet exacerbated high fat diet (HFD)- (42, 43) or HFD+HFr (44)-induced metabolic changes and progressed NAFLD into NASH

by increasing IR, inflammation and lipogenesis and decreasing  $\beta$ -oxidation. Similarly, long term feeding of VDD plus HFr-diet was reported to cause progression of NAFLD into NASH by increasing hepatic steatosis, inflammatory lesions and interstitial fibrosis (45). Contrarily, VDD alleviated HFD-induced overweight, hyperinsulinemia, and hepatic steatosis through promoting fatty acid  $\beta$ -oxidation (46). It has also been reported that there was no difference between HFr and VDD+HFr groups in terms of inflammation, steatosis and expressions of genes related to lipogenesis and  $\beta$ -oxidation (47). However, there is not enough information about how VDD affects glycooxidative stress and antioxidant system parameters in dietary NAFLD models. For this reason, this subject was focused on in our study.

Serum 25(OH)D levels were reported as 27-30 ng/ml in normal mice fed on standard rodent chow containing Vit D<sub>3</sub> (1,500 IU/kg). In the same study, it was reported that the administration of a diet containing low doses of Vit D<sub>3</sub> (50 and 250 IU/kg, respectively) resulted in serum 25(OH)D levels compatible with severe VDD and VDD, respectively, as early as four weeks, and these levels were maintained for 3-4 months (48). Therefore, in our study, HFr drinking was started four weeks after VDD diet application and continued for eight weeks and then serum Vit (OH)D levels were found between 10-20 ng/ml in rats fed on a diet to which Vit D<sub>3</sub> is not added (48).

Some authors have reported that VDD diet alone resulted in moderate steatosis, inflammation, IR together with upregulation of genes related to lipogenesis and inflammation in the liver of rodents (43, 47). However, some investigators have found that there were no changes in metabolic parameters and liver damage markers due to a VDD diet (46). There is limited knowledge about prooxidant-antioxidant status due to VDD (49, 50). In this study, the VDD diet alone was observed not to alter hepatic prooxidant-antioxidant balance, mRNA expressions of Nrf2 and antioxidant enzymes, protein glycation parameters and histopathological findings despite increased inflammation, liver TG levels and IR.

In this study, when VDD and HFr diets were combined, the VDD diet did not augment HFr-induced oxidative stress, protein glycation, and hepatic damage. However, IR and inflammation parameters were higher in the VDD+HFr group than HFr. There was no difference in GSH and FRAP levels and CAT activity between the VDD+HFr and HFr groups. Although SOD and GSH-Px activities decreased in the HFr group, these activities returned to normal in the VDD+HFr group. This situation may be related to increases in gene expressions of these enzymes. Indeed, interestingly, Nrf2, SOD and GSH-Px mRNA expressions were significantly higher in the VDD+HFr group than the HFr group. These changes in the

antioxidant system may provide a protection against an additional increase in prooxidant status and HFr-induced liver damage in the VDD+HFr group.

## CONCLUSION

Our results indicate that VDD augmented HFr-induced insulin resistance and hepatic inflammation, and upregulated Nrf2 and antioxidant enzymes while exhibiting no change in glycooxidative stress and histopathological changes. These results suggest that more studies are necessary to elucidate the effect of VDD on NAFLD progression.

**Ethics Committee Approval:** This study was approved by The Animal Care and Use Committee of the University of Istanbul (Date: 29.03.2018, No: 2108/28).

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

**Author Contributions:** Conception/Design of Study- İ.B., M.U.; Data Acquisition- İ.B., C.K., A.F.A., İ.D.E.; Data Analysis/Interpretation- İ.B., S.D.A., M.U.; Drafting Manuscript- İ.B., M.U.; Critical Revision of Manuscript- A.F.A., S.D.A.; Final Approval and Accountability- İ.B., C.K., A.F.A., İ.D.E., S.D.A., M.U.

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

**Financial Disclosure:** The present work was supported by The Research Fund of Istanbul University (Project Number: TSA-2018-30443).

**Etik Komite Onayı:** Bu çalışma için etik komite onayı İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulundan alınmıştır (Tarih: 29.03.2018, No: 2108/28).

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Çalışma Konsepti/Tasarım- İ.B., M.U.; Veri Toplama- İ.B., C.K., A.F.A., İ.D.E.; Veri Analizi/Yorumlama- İ.B., S.D.A., M.U.; Yazı Taslağı: İ.B., M.U.; İçeriğin Eleştirel İncelenmesi- A.F.A., S.D.A.; Son Onay ve Sorumluluk- İ.B., C.K., A.F.A., İ.D.E., S.D.A., M.U.

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

**Finansal Destek:** Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından ile desteklenmiştir (Proje Numarası: TSA-2018-30443).

## REFERENCES

1. Ibrahim MA, Kelleni M, Geddaya A. Nonalcoholic fatty liver disease: Current and potential therapies. *Life Sci* 2013;92(2):114-8. [CrossRef]
2. Fernando DH, Forbe JM, Angus PW, Herath CB. Development and progression of non-alcoholic fatty liver disease: The role of advanced glycation end products. *Int J Mol Sci* 2019;20(20):5037. [CrossRef]
3. Alwahsh SM, Gebhardt R. Dietary fructose as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Arch Toxicol* 2017;91(4):1545-63. [CrossRef]
4. Takahashi Y, Soejima Y, Fukusato T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 2012;18(19):2300-8. [CrossRef]
5. Jegatheesan P, De Bandt JP. Fructose and NAFLD: Multifaceted aspects of fructose metabolism. *Nutrients* 2017;9(3):230. [CrossRef]
6. Gugliucci A. Formation of fructose-mediated advanced glycation end products and their roles in metabolic and inflammatory diseases. *Adv Nutr* 2017;8(1):54-62. [CrossRef]
7. Kwok RM, Torres DM, Harrison SA. Vitamin D and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): Is it more than just an association? *Hepatology* 2013;58(3):1166-74. [CrossRef]
8. Uberti F, Morsanuto V, Molinari C. Vitamin D in oxidative stress and diseases. 'A Critical Evaluation of Vitamin D-Basic Overview. Ed: Sivakumar Joghi Thatha Gowder, IntechOpen, Chapter 2, pp 47-73. 2017. [CrossRef]
9. Kheirouri S, Alizadeh M. Vitamin D and advanced glycation end products and their receptors. *Pharmacol Res* 2020;158:104879. [CrossRef]
10. Khan S, Ali A, Khan S, Bakillah A, Damanhoury G, Khan A, et al. Current therapies in alleviating liver disorders and cancers with a special focus on the potential of vitamin D. *Nutr Metab* 2018;15:13. [CrossRef]
11. Eliades M, Spyrou E. Vitamin D: A new player in non-alcoholic fatty liver disease? *World J Gastroenterol* 2015;21(6):1718-27. [CrossRef]
12. Berridge MJ. Vitamin D signalling in health and disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;460(1):53-71. [CrossRef]
13. Wang H, Chen W, Li D, Yin X, Zhang X, Olsen N, et al. Vitamin D and chronic diseases. *Aging Dis* 2017;8(3):346-53. [CrossRef]
14. Wimalawansa SJ. Vitamin D deficiency: Effects on oxidative stress, epigenetics, gene regulation and aging. *Biology* 2019;8(2):30-45. [CrossRef]
15. Institute of Medicine. Dietary references intakes for calcium and vitamin D. Eds: Ross AC, Taylor CL, Yaktine AL, Del Valle HB, Washington-DC, National Academies Press (US), 2011.
16. Elangovan H, Chahal S, Gunton JE. Vitamin D in liver disease: Current evidence and potential directions. *Biochim Biophys Acta* 2017;1863(4):907-16. [CrossRef]
17. Karatayli E, Stokes CS, Lammert F. Vitamin D in preclinical models of fatty liver disease. *Anticancer Res* 2020;40(1):527-34. [CrossRef]
18. Rachmilewitz D, Stamler JS, Karmeli F, Mullins ME, Singel DJ, Loscalzo J, et al. "Peroxy-nitrite-induced rat colitis - a new model of colonic inflammation". *Gastroenterology* 1993;105(6):1681-8. [CrossRef]
19. Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 1999;27(5-6):612-6. [CrossRef]
20. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978;52:302-10. [CrossRef]
21. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 1994;233:357-63. [CrossRef]
22. Hanasand M, Omdal R, Norheim KB, Gøransson LG, Brede C, Johnson G. Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. *Clin Chim Acta* 2012;413(9-10):901-6. [CrossRef]



23. Münch G, Keis R, Wessels A, Riederer P, Bahner U, Heidland A, et al. Determination of advanced glycation end products in serum by fluorescence spectroscopy and competitive ELISA. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997;35(9):669-77. [\[CrossRef\]](#)
24. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996;239(1):70-6. [\[CrossRef\]](#)
25. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963;61:882-8.
26. Mylorie AA, Collins H, Umbles C, Kyle J. Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate. *Toxicol Appl Pharmacol* 1986;82(3):512-20. [\[CrossRef\]](#)
27. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976;425(3):503-9. [\[CrossRef\]](#)
28. Worthington V. Catalase. In: *Worthington Enzyme Manuel: Enzymes and related biochemicals*. New Jersey: Worthington Biochemical Corporation, pp.77-80, 1993.
29. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985;150(1):76-85. [\[CrossRef\]](#)
30. Goodman ZD. Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases. *J Hepatol* 2007;47(4):598-607. [\[CrossRef\]](#)
31. Bingül I, Aydın AF, Başaran-Küçükgergin C, Doğan-Ekici I, Çoban J, Doğru-Abbasoğlu S, et al. High-fat diet plus carbon tetrachloride-induced liver fibrosis is alleviated by betaine treatment in rats. *Int Immunopharmacol* 2016;39:199-207. [\[CrossRef\]](#)
32. Bagul PK, Middela H, Matapally S, Padiya R, Bastia T, Madhusudana K, et al. Attenuation of insulin resistance, metabolic syndrome and hepatic oxidative stress by resveratrol in fructose-fed rats. *Pharmacol Res* 2012;66(3):260-8. [\[CrossRef\]](#)
33. Giriş M, Doğru-Abbasoğlu S, Kumral A, Olgaç V, Koçak-Toker N, Uysal M. Effect of carnosine alone or combined with  $\alpha$ -tocopherol on hepatic steatosis and oxidative stress in fructose-induced insulin-resistant rats. *J Physiol Biochem* 2014;70(2):385-95. [\[CrossRef\]](#)
34. Li W, Lu, Y. Hepatoprotective effects of sophoricoside against fructose-induced liver injury via regulating lipid metabolism, oxidation, and inflammation in mice. *J Food Sci* 2018;83(2):552-8. [\[CrossRef\]](#)
35. Yang Y, Wang J, Zhang Y, Li J, Sun W. Black sesame seeds ethanol extract ameliorates hepatic lipid accumulation, oxidative stress, and insulin resistance in fructose-induced nonalcoholic fatty liver disease. *J Agric Food Chem* 2018;66(40):10458-69. [\[CrossRef\]](#)
36. Pai SA, Munshi RP, Panchal FH, Gaur IS, Juvekar AR. Chrysin ameliorates nonalcoholic fatty liver disease in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2019;392(12):1617-28. [\[CrossRef\]](#)
37. Capeillere-Blandin C, Gausson V, Descamps -Latscha B, Witko-Sarsat V. Biochemical and spectrophotometric significance of advanced oxidized protein products. *Biochim Biophys Acta* 2004;1689(2):91-102. [\[CrossRef\]](#)
38. Mokhtari Z, Hekmatdoost A, Nourian M. Antioxidant efficacy of vitamin D. *J Parathyroid Dis* 2017;5(1):11-6.
39. Zhu CG, Liu YX, Wang H, Wang BP, Qu HQ, Wang BL, et al. Active form of vitamin D ameliorates non-alcoholic fatty liver disease by alleviating oxidative stress in a high-fat diet rat model. *Endocr J* 2017;64(7):663-73. [\[CrossRef\]](#)
40. Liu Y, Wang M, Xu W, Zhang H, Qian W, Li X, et al. Active vitamin D supplementation alleviates and progression of non-alcoholic liver disease by repressing the p53 pathway. *Life Sci* 2020;241:117086. [\[CrossRef\]](#)
41. Ma M, Long Q, Chen F, Zhang T, Wang W. Active vitamin D impedes the progression of non-alcoholic cell senescence in a rat model. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2020;44(4):513-23. [\[CrossRef\]](#)
42. Kong M, Zhu L, Bai L, Zhang X, Chen Y, Liu S, et al. Vitamin D deficiency promotes nonalcoholic steatohepatitis through impaired enterohepatic circulation in animal model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2014;307(9):G883-G893. [\[CrossRef\]](#)
43. Su D, Nie Y, Zhu A, Chen Z, Wu P, Zhang L. et al. Vitamin D signaling through induction of paneth cell defensins maintains gut microbiota and improves metabolic disorders and hepatic steatosis in animal models. *Front Physiol* 2016;7:498. [\[CrossRef\]](#)
44. Roth CL, Efers CT, Figlewicz DP, Melhorn SJ, Morton GJ, Hoofnagle A, et al. Vitamin D deficiency in obese rats exacerbates nonalcoholic fatty liver disease and increases hepatic resistin and Toll-like receptor activation. *Hepatology* 2012;55(4):1103-11. [\[CrossRef\]](#)
45. Li W, Zhang L, Liu Y, Wang C, Long Y, Huang Z, et al. Metabolite profiling of mice under long-term fructose drinking and vitamin D deficiency: increased risks for metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease. *J Physiol Biochem* 2020;76(4):587-98. [\[CrossRef\]](#)
46. Liu XJ, Wang BW, Zhang C, Xia MZ, Chen YH, Hu CQ, et al. Vitamin D deficiency attenuates high-fat diet-induced hyperinsulinemia and hepatic lipid accumulation in male mice. *Endocrinology* 2015;156(6):2103-13. [\[CrossRef\]](#)
47. Maia-Ceciliano TC, Dutra RR, Aguila MB, Mandarim-De-Lacerda CA. The deficiency and the supplementation of vitamin D and liver: Lessons of chronic fructose-rich diet in mice. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2019;192:105399. [\[CrossRef\]](#)
48. Mallya SM, Corrado KR, Saria EA, Yuan FNF, Tran HQ, Saucier K, et al. Modeling vitamin D deficiency and moderate deficiency in adult mice via dietary cholecalciferol restriction. *Endocrin Res* 2016;41(4):290-9. [\[CrossRef\]](#)
49. Bhat M, Ismail A. Vitamin D treatment protects against and reverses oxidative stress induced muscle proteolysis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2015;152:171-9. [\[CrossRef\]](#)
50. Tao S, Yuan Q, Mao L, Chen FL, Ji F, Cui ZH. Vitamin D deficiency causes insulin resistance by provoking oxidative stress in hepatocytes. *Oncotarget* 2017;8(40):67605-13. [\[CrossRef\]](#)

## TİP 2 DİYABETLİ HASTALARIN TEDAVİSİNDE KILAVUZLARA NE KADAR UYGUN HAREKET EDİYORUZ?

### HOW DO WE FOLLOW THE GUIDELINES IN THE TREATMENT OF PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES?

İlkim Deniz TOPRAK<sup>1</sup> , Özlem KANDEMİR ALİBAKAN<sup>2</sup> , Betül KÖSTEK<sup>2</sup> , Mehmet Alptekin ACAR<sup>2</sup> , İpek Bilge ASLAN<sup>2</sup> , Uğur YILMAZ<sup>2</sup> , Hasan ERUZUN<sup>3</sup> , Yücel ARMAN<sup>2</sup> , Tufan TÜKEK<sup>4</sup> 

<sup>1</sup>Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gaziosmanpaşa Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İç Hastalıkları Kliniği, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup>Prof. Dr. Cemil Taşçıoğlu Şehir Hastanesi, İç Hastalıkları Kliniği, İstanbul, Türkiye

<sup>3</sup>Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Samsun Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İç Hastalıkları Kliniği, Samsun, Türkiye

<sup>4</sup>İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

**ORCID IDs of the authors:** İ.D.T. 0000-0002-9320-1252; Ö.K.A. 0000-0002-5452-6273; B.K. 0000-0002-2666-2470; M.A.A. 0000-0003-0784-8410; İ.B.A. 0000-0001-5253-4336; U.Y. 0000-0001-9398-5774; H.E. 0000-0003-0355-1820; Y.A. 0000-0002-9584-6644; T.T. 0000-0002-4237-1163

**Cite this article as:** Toprak ID, Kandemir Alibakan O, Kostek B, Acar MA, Aslan IB, Yilmaz U, et al. How do we follow the guidelines in the treatment of patients with type 2 diabetes? J Ist Faculty Med 2021;84(3):369-75. doi: 10.26650/IUITFD.2021.828573

#### ÖZET

**Amaç:** Biz bu çalışma ile, Tip 2 diabetes mellitusta (DM) güncel tedavi yaklaşımları ve hedeflere yönelik hekimlerin farkındalığını artırmak için retrospektif olarak kılavuzlara uygunluğu araştırmayı hedefledik.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmamız retrospektif, kesitsel, analitik bir çalışma olarak tasarlandı. Ocak 2018-Ocak 2019 tarihleri arasında Tip 2 DM nedeniyle tedavi alan hastalar, randomize olarak tespit edildi. Hastaların son bir yıllık takiplerindeki laboratuvar değerleri, eşlik eden hastalıkları ve kullandıkları ilaçlar kaydedildi.

**Bulgular:** Çalışmaya toplam 1154 hasta dahil edilmiştir. Üç ayda bir düzenli kontrole gelenler ile gelmeyenler karşılaştırıldığında, başlangıç hemogloblin A1c (HbA1c) değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmaz iken (%7,83±%1,94 ve %7,99±%1,97), bir yılın sonunda, düzenli kontrole gelenlerin HbA1c değerleri kontrole gelmeyenlere göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha düşüktü (%7,18±%1,85 ve %7,91±%1,96). Toplam 1154 hastanın, 887'si (%76,8) düzenli olarak metformin kullanmaktaydı. Hastalarımızın 149'unda, başlangıç HbA1c düzeyi %10'un üzerinde idi ve bu hastaların 120'sine (%80,5) insülin tedavisi hemen başlanmıştır.

**Sonuç:** Tip 2 diyabetli hastalarda takip sıklığı, metformin ve insülin tedavisinin düzenlenmesi konusunda genel olarak kılavuzlara uyumun iyi olduğu ancak yeni anti-diyabetik ilaç grupları olan GLP-1 reseptörü agonisti veya SGLT2 inhibitörlerinin kullanım oranlarının düşük olduğu ve statin tedavisi ile hedeflenen sonuç-

#### ABSTRACT

**Objective:** We aimed to retrospectively investigate compliance with guidelines in order to increase the awareness of physicians towards current treatment approaches and goals in Type 2 diabetes mellitus (DM).

**Material and Method:** Our study was designed as a retrospective, cross-sectional, analytical study. Patients who received treatment for Type 2 DM between January 2018 and January 2019 were randomly identified. Laboratory values, accompanying diseases, and medications used by the patients in their last one-year follow-up were recorded.

**Results:** A total of 1,154 patients were included in the study. When the patients who came for regular check-ups every three months and those who did not were compared, there was no statistically significant difference between the initial hemoglobin A1c (HbA1c) and the final values (7.83±1.94% and 7.99±1.97%). At the end of one year, HbA1c values were statistically significantly lower than those of patients who did not come for control (7.18±1.85% and 7.91±1.96%). 887 (76.8%) of a total of 1154 patients were using metformin regularly. In 149 of our patients, the initial HbA1c level was above 10% and insulin treatment was started immediately in 120 (80.5%) of these patients.

**Conclusion:** In patients with Type 2 Diabetes, the frequency of follow-up and regulation of metformin and insulin treatment is generally good, but the use of GLP-1 receptor agonists or SGLT2 inhibitors, which are new anti-diabetic drug groups, is low. The

**İletişim kurulacak yazar/Corresponding author:** hasanerezun@gmail.com

**Başvuru/Submitted:** 25.11.2020 • **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 06.01.2021 •

**Son Revizyon/Last Revision Received:** 13.03.2021 • **Kabul/Accepted:** 13.04.2021 • **Online Yayın/Published Online:** 13.07.2021



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

lara ulaşılamayan dislipidemik hastalarda ikincil tedavi eklenmesi oranlarının çok düşük olduğu saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Diyabet tedavisi, kılavuzlar, diyabet, insülin

rate of adding secondary therapy in dyslipidemic patients who do not achieve the targeted results with statin therapy has been found to be very low.

**Keywords:** Treatment of diabetes, guidelines, diabetes, insulin

## GİRİŞ

Tip 2 diabetes mellitus (DM) toplumda sıklığı giderek artan genel bir sağlık sorunudur. Diyabetin komplikasyonlarının vücudun hemen hemen her dokusunu etkilediği ve diyabetin kardiyovasküler morbidite ve mortalite, körlük, böbrek yetmezliği ve amputasyonların en önde gelen nedeni olduğu da bilinmektedir. Bu nedenle bu hastalıkta terapötik müdahale için en iyi stratejileri tasarlamak hayati önem taşımaktadır (1, 2). Tüm dünyada bu hastalığın yönetimi için çeşitli kılavuzlar yayımlanmakta ve sıklıkla her sene güncellenmektedir. Özellikle son yıllarda çeşitli antidiyabetik ilaçların piyasaya sürülmesiyle hekimlerin ilaç alternatifleri çoğalmıştır. Bu hususta 2019 yılında yayımlanan American Diabetes Association (ADA) kılavuzunda metforminin ilk seçenek olması; hemoglobin A1c (HbA1c) düzeyi %10' un üzerinde olan hastalarda erken insülin tedavisine başlanması; aterosklerotik kardiyovasküler hastalığı olan diyabetik hastalarda kardiyovasküler yararı kanıtlanmış olan sodyum glukoz kotransporter 2 (SGLT2) inhibitörlerinden veya glukagon benzeri peptid 1 (GLP-1) reseptörü agonistlerinin anti-hiperglisemik tedavinin bir parçası olması; kronik böbrek hasarı olan diyabetik hastalarda SGLT2 inhibitörü ya da GLP-1 reseptör agonistinin progresyonu azaltmasından dolayı tedaviye eklenmesi; hipertansif diyabetik hastalarda antihipertansif tedavide öncelikle anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörü, anjiyotensin reseptör blokörleri (ARB), tiazid grubu diüretikler, ya da dihidropiridin grubu kalsiyum kanal blokörlerinin başlanması; aterosklerotik kalp hastalığı olan diyabetik hastalarda maksimum doz statin tedavisine rağmen serum LDL değeri kolesterol 70 mg/dL ve üzerinde ise tedaviye ezetimib veya Proprotein konvertaz subtilisin/keksin tip 9 (PCSK9) inhibitörü gibi ek LDL-düşürücü tedavinin eklenmesi önerilmektedir (3).

Biz bu çalışma ile, Tip 2 DM güncel tedavi yaklaşımları ve hedeflere yönelik hekimlerin farkındalığını artırmak için retrospektif olarak kılavuzlara uygunluğu araştırmayı hedefledik.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız gözleme dayalı, retrospektif, kesitsel, analitik bir çalışma olarak dizayn edildi. 01 Ocak 2018 ile 01 Ocak 2019 tarihleri arasında Tip 2 DM nedeniyle tedavi alıp, üçüncü basamak sağlık merkezinde, iç hastalıkları hekimlerince takip edilen hastalar, hastane işletim sistemi

üzerinden tespit edildi. Bunun için Tip 2 DM tanısıyla iç hastalıkları polikliniklerine başvuran ya da iç hastalıkları servisinde yatan tüm hastalar incelendi. Yerel etik kurul onayı alındıktan sonra Tip 2 DM tanılı hastaların son bir yılda kullanmış oldukları ilaçlar incelendi. İlaç tedavisinde hastaların bir ilacı düzenli olarak zamanında aldığı tespit edildiğinde o ilacı kullanmış olduğu kabul edilmiştir.

Veri toplama alanında deneyimli hekimler tarafından, hastane işletim sistemi üzerinden tespit edilen hastaların yaş, cinsiyet, son bir yılda kullanmakta oldukları tüm ilaçları, kronik böbrek hasarı, periferik arter hastalığı, serebrovasküler hastalık, koroner arter hastalığı, kronik karaciğer hastalığı varlığı açısından bilgileri hastanemiz sisteminden retrospektif olarak tespit edildi. Tip 2 DM tanılı hastaların kontrol süreleri genel olarak üç ayda bir olarak önerildiği için, hastaların kontrole gelme periyodları kaydedildi. Kronik böbrek hasarı için kreatinin değerlerine göre değerlendirme yapıldı. Kreatinin değeri ile hastanemizde otomatik olarak laboratuarda hesaplanan glomerüler filtrasyon hızı (GFR) değeri 60 ml/dk/1,73 m<sup>2</sup>'nin altında olan ve bu değer en az iki ay süreyle idame ettiğinin gösterildiği hastalar kronik böbrek hastalığı mevcut olarak kabul edildi. Periferik arter hastalığı ve serebrovasküler hastalık varlığı için hastanın kayıtlı görüntülemeleri ve girilen tanılar kontrol edildi. Görüntülemelerde hastalık tespit edilmişse ya da tanı kodu girilmiş ve buna yönelik asetilsalisilik asit ya da antiplatelet ajanlar başlanmışsa hastalık mevcut olarak değerlendirilmiştir. Koroner arter hastalığı için hasta üzerine hastanemiz sisteminde kayıtlı koroner anjiyografiler incelenmiş, raporlarda hastalık tespit edilmişse ya da tanı kodu girilmiş ve buna yönelik ACE inhibitörü, ARB, beta blokör, asetilsalisilik asit ve/veya antiplatelet kullanımı bulunuyorsa hastalık mevcut olarak değerlendirilmiştir. Kronik karaciğer hastalığı için siroz tanısı girilmiş olan hastalar hastalık mevcut olarak kabul edilmiştir.

Hastalar eşlik eden komplikasyonlara göre dört gruba ayrıldı.

Grup 1: Periferik arter hastalığı, serebrovasküler hastalık varlığı ve/veya koroner arter hastalığı olan hastalar, grup 2: Kronik böbrek hasarı olan hastalar, grup 3: Karaciğer yağlanması ya da kronik karaciğer hastalığı olan hastalar ve grup 4: Bu hastalıklardan herhangi birinin eşlik etmediği Tip 2 diyabetli hastalar. Her grubun kullanmış olduğu tüm ilaçların Statistical Package for Social Sciences (SPSS, version 20) programında ortalama tercih edilme oranı he-

saplanmış ve her grup için ortalama olarak en sık tercih edilmiş ilaç grubu tespit edilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen tüm hastaların hastanemiz sisteminde kayıtlı olan ultrasonografi/bilgisayarlı tomografi ya da manyetik rezonans incelemelerinden herhangi birinde hepatosteatoz tespit edilenler not edilmiştir.

Ayrıca hastaların hastanemiz sisteminde kayıtlı olan en az iki ölçümde LDL Kolesterol düzeyi >70 mg/dL olan ve trigliserit düzeyi >150 mg/dL olan hastalardaki statin ve fenofibrat kullanımını değerlendirilmiştir.

### İstatistiksel analizler

Elde edilen veriler istatistiksel analiz yapılmak üzere SPSS (version 20) programına yüklendi. SPSS programında tanımlayıcı istatistiksel yöntemler kullanılmıştır. Normal dağılıma sahip sürekli değişkenler ortalama±standart sapma (SD) olarak ifade edildi ve normal olmayan dağılıma sahip değişkenler medyanlar ile bildirildi. Kategorik değişkenler sayı (%) olarak sunulmuştur. İki grup arasında verileri karşılaştırmak için iki bağımsız örnek t-testi yapıldı. Gruplar arası kategorik verilerin karşılaştırılmasında ki-kare testi kullanıldı.  $p < 0,05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### BULGULAR

Çalışmaya toplam 1154 hasta dahil edilmiştir. Bu hastaların 744 (%64,5)'ü kadın, 410 (%35,5)'u ise erkekti. Çalışmaya dahil edilen hastaların ortalama yaşları  $60,34 \pm 11,78$  (dağılım: 19-94 yaş) olarak saptandı. Hastaların cinsiyetlerine göre yaş ortalamaları karşılaştırıldığında, kadın ( $61,22 \pm 11,07$ ) ve erkekler ( $58,74 \pm 12,82$ ) arasında istatistiksel anlamlı farklılık mevcuttu ( $p=0,001$ ).

Çalışmaya dahil edilen 1154 hastanın sadece 313'ü (%27,1) son bir yıl içinde, üç ayda bir düzenli olarak kontrollere gelmişti. Üç ayda bir düzenli kontrole gelenler ile gelmeyenler karşılaştırıldığında, her iki grubun başlangıç HbA1c değerleri arasında istatistiksel anlamlı bir fark yokken, bir yılın sonunda, düzenli kontrole gelenlerin HbA1c değerleri kontrole gelmeyenlere göre istatistiksel anlamlı olacak şekilde daha düşüktü.

Toplam 1154 hastanın, 887'si (%76,8) düzenli olarak metformin kullanmakta idi. Hastalarımızın 149'unda, başlangıç HbA1c düzeyi %10'un üzerinde idi ve bu hastaların 120'sine (%80,5) insülin tedavisi hemen başlanmıştır.

Hastaların kronik hastalıkları kaydedildi. Hastaların 414'ünde (%35,8) kardiyovasküler hastalık, 190'ında kro-

**Tablo 1:** Üç ayda bir kontrole gelen hastalar ile gelmeyenlerin HbA1c düzeylerinin karşılaştırılması

	Üç ayda bir düzenli kontrole gelenler (n=313)	Üç ayda bir düzenli kontrole gelmeyenler (n=841)	P
Başlangıç HbA1c	7,83±1,94	7,99±1,97	0,075
Son HbA1c (Bir yılın sonunda)	7,18±1,85	7,91±1,96	0,001

**Tablo 2:** Eşlik eden kronik hastalıkların varlığına göre kullanılan ilaçların dağılımı

	Kardiyovasküler hastalık (n=414)	Kronik böbrek hasarı (n=190)	Hepatosteatoz (n=612)	Sadece diyabet (n=332)
Metformin, n (%)	298 (71,9)	89 (46,8)	485 (79,2)	266 (80,1)
İnsülin, n (%)	213 (51,4)	118 (62,1)	252 (41,1)	132 (39,7)
Sulfonilüre, n (%)	74 (17,8)	21 (11,0)	131 (21,4)	56 (16,8)
Glitazon, n (%)	26 (6,3)	13 (6,8)	53 (8,6)	28 (8,4)
Alfa glikozidaz inhibitörleri, n (%)	23 (5,5)	9 (4,7)	28 (4,6)	17 (5,1)
GLP-1 reseptör agonisti (Liraglutid- Eksenatid), n (%)	12 (2,9)	2 (1,0)	23 (3,7)	7 (2,1)
DPP4 inhibitörleri, n (%)	285 (68,7)	140 (73,6)	286 (46,7)	171 (51,5)
SGLT2 inhibitörleri (Empagliflozin Dapagliflozin), n (%)	77 (18,6)	14 (7,3)	139 (22,7)	65 (19,6)
ACE inh- ARB, n (%)	279 (67,4)	128 (67,3)	356 (58,1)	157 (47,2)
Statin, n (%)	329 (79,4)	90 (47,3)	287 (46,9)	132 (39,7)
Fibrat, n (%)	33 (7,9)	15 (7,9)	54 (8,8)	22 (6,6)

nik böbrek hasarı, 612'sinde (%53) hepatosteatoz ve 20'sinde (%1,7) kronik karaciğer hastalığı vardı. Hastalarımızın 332'sinde (%28,7) eşlik eden kronik bir hastalık saptanmadı. Bu farklı gruplarda ilaç kullanım oranları Tablo 2'de özetlenmiştir. Kardiyovasküler hastalıkları ya da hepatosteatozu olan ya da eşlik eden başka bir kronik hastalığı olmayan hastalarda en sık kullanılan ilaç metformin idi. Ancak metformin kullanımı, kronik böbrek hastalığı olanlarda diğer gruplara göre düşüktü. Kronik böbrek hastalığı olanlarda, insülin kullanımı diğer gruplara göre yüksekti. GLP-1 reseptör agonistleri en sık kardiyovasküler hastalıkları ya da hepatosteatozu olan hastalarda kullanılmakta idi; ancak genel kullanım oranları %2 civarında idi. SGLT 2 inhibitörleri de en az oranda kronik böbrek hasarı olan hastalarda tercih edilmekte idi.

Toplam 414 hastada eşlik eden aterosklerotik kardiyovasküler hastalık tespit edilmişti ve bunların 12'si GLP-1 reseptör agonisti ve 77'si SGLT2 inhibitörlerinden birini kullanıyordu (toplam 99 hasta, %23,9). Aterosklerotik hastalığı olan 414 hastanın, 329'u (%79,4) statin tedavisi altında idi ancak bunların 180'inde (%54,7) tedaviye rağmen LDL kolesterol düzeyi 70 mg/dL'nin üzerinde idi. Bu hastaların sadece 24'ü (%13,3) statin tedavisine ek ikincil bir tedavi almakta idi.

Hastaların 190'ında eşlik eden kronik böbrek hasarı tespit edilmişti ve bunların sadece 2'si GLP-1 reseptör agonisti ve 14'ü SGLT2 inhibitörlerinden birini kullanıyordu (toplam 16 hasta, %8,4).

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Toplam 1154 diyabetik hastanın bir yıllık takiplerinin incelendiği bu çalışmada; 1) Hastaların yaklaşık sadece dörtte birinin üç ayda bir düzenli olarak kontrollere geldiği; 2) Üç ayda bir düzenli kontrole gelenlerin bir yılın sonunda HbA1c değerlerinin kontrole gelmeyenlere göre istatistiksel anlamlı şekilde daha düşük olduğu; 3) En sık kullanılan anti-diyabetik ajanın %76,8 oranı ile metformin olduğu ve metformin kullanımının kronik böbrek hastalığı olanlarda diğer gruplara göre daha düşük olduğu; 4) Başlangıç HbA1c düzeyi %10'un üzerinde olan hastaların %80,5'inde insülin tedavisine hemen başlandı; 5) Kronik böbrek hastalığı olanlarda, insülin kullanımının diğer gruplara göre daha yüksek olduğu; 6) GLP-1 reseptör agonistlerinin en sık kardiyovasküler hastalıkları ya da hepatosteatozu olan hastalarda kullanılmakta olduğu; ancak genel kullanım oranlarının %2 civarında olduğu; 7) Aterosklerotik kardiyovasküler hastalık tespit edilen hastaların %23,9'unun GLP-1 reseptörü agonisti veya SGLT2 inhibitörlerinden birini kullandığı ancak bu oranın kronik böbrek hasarı olan hastalarda %8,4 olduğu; 8) Hastaların yaklaşık %65'inin ACE inhibitörü ya da ARB tedavisi almakta olduğu; 9) Aterosklerotik hastalığı olan hastaların büyük çoğunluğunun statin tedavisi almakta olduğu, ancak bunların yarıdan fazlasında tedaviye rağmen LDL

kolesterol düzeyinin 70 mg/dL'nin üzerinde olduğu ve bu hastaların sadece %13,3'ünün ikincil bir dislipidemi tedavisi aldığı tespit edilmiştir.

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, yetişkinler arasında diyabetin küresel yaygınlığı 1980'de %4,7'den 2018'te %8,5'e yükselmiştir (4). Bu sayı giderek artmaktadır. Diyabet sadece yaşam kalitesini ve beklenen yaşam süresini düşürmekle kalmaz, aynı zamanda körlüğe, böbrek yetmezliğine, miyokard enfarktüsüne, felce ve uzuvların kesilmesi gerekliliğine yol açan bir dizi mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonların ana nedenidir. Bu nedenle dünya çapında diyabetle ilişkili komplikasyonların yükü önemli bir sağlık sorunudur (5).

Genel olarak kılavuzlar, diyabetik hastaların her üç ayda bir izlenmesini önermektedir (6, 7). Tip 2 diyabetli hastalarda, düzenli takibin daha düşük glisemik yük ve daha düşük komplikasyon insidansı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (8-10). Benzer şekilde, bizim çalışmamızda da üç ayda bir düzenli kontrole gelenlerin bir yılın sonunda HbA1c değerlerinin kontrole gelmeyenlere göre daha düşük olduğu saptanmıştır.

Metformin, tüm dünyada Tip 2 DM için önerilen ilk tedavidir (11). Glisemik faydalarının yanında, metformin tipik olarak kilo alımına veya hipoglisemiye neden olmaz ve daha düşük mortalite ile ilişkilendirilmiştir (12). Bizim çalışmamızda da en sık kullanılmakta olan anti-diyabetik ajanın %76,8 oranı ile metformin olduğu tespit edildi. Metforminin, laktik asidoz riski nedeniyle, ilacın atılımını bozabilecek kronik böbrek hastalığı durumunda dikkatli kullanılması önerilmektedir. Ancak literatürde, metformin ve laktik asidoz arasında net bir ilişki kurulamamıştır ve özellikle hafif ve orta dereceli kronik böbrek hastalarında güvenli olduğu bildirilmektedir (13-16). Çalışmamızda kronik böbrek hastalığı olanlar, hastalığın derecesine göre sınıflandırılmadı, bu çalışmanın kısıtlamalarından biridir. Bizim çalışmamızda da metformin kullanımının kronik böbrek hastalığı olanlarda diğer gruplara göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Tüm hastalarda metformin kullanımı %70-80 arasında iken, kronik böbrek hastalığı olanların yarısından azı metformin kullanılmaktadır. Bu da, genel olarak bu konuda kılavuzlara uyulduğunu göstermektedir.

Hemoglobin A1c değeri, önceki 8-12 hafta boyunca ortalama gliseminin bir ölçüsüdür ve diyabetli hastalarda metabolik kontrolün izlenmesinde "altın standart" olarak kabul edilir. Tip 2 diabetes mellitustan sorumlu olan ana patofizyolojik kusurlar,  $\beta$  hücre disfonksiyonu ve azalmış insülin duyarlılığıdır. Pankreas  $\beta$  hücresi disfonksiyonu, diyabetin başlangıcından itibaren disgliseminin belirlenmesinde önemli bir rol oynar. Hemoglobin A1c düzeyindeki bir artışa genellikle pankreas  $\beta$  hücre fonksiyonunda bir düşüşün eşlik ettiği bildirilmiştir (17-19). Bu nedenle 2019 yılında yayımlanan ADA kılavuzunda HbA1c düzeyi

%10'un üzerinde olan hastalarda erken insülin tedavisine başlanması önerilmektedir. Bizim çalışmamızda da HbA1c düzeyi %10'un üzerinde olan hastaların %80,5'inde insülin tedavisine başlandığı tespit edilmiştir. Haymana ve ark'nın yapmış olduğu çalışmada insülin kullanım oranları %44,8 olarak saptanmıştır (20). Ancak bizim çalışmamızdan farklı olarak Haymana ve ark. HbA1c seviyesine göre hastaları gruplandırmamışlardır. Bizim çalışmamızda insülin kullanmakta olan hastaların toplam hasta sayısına oranı %43,7 idi ve bu oran Haymana ve ark'nın çalışmasında saptanmış oran ile yakınlık göstermektedir (20).

Glukagon benzeri peptid-1, nöroproteksiyon, artmış bilişsel işlev, kardiyolojik koruma, hipertansiyonun düzenlenmesi ve inflamasyondan korunma gibi çeşitli farmakolojik etkileri olan inkretin bir hormondur. En güçlü etkileri, kan şekeri kontrolüne ilişkin Tip-2 diyabetli hastalarda glikoza bağlı insülinotropik ve glukagonostatik etkiler, hücre proliferasyonunun uyarılması, artırılmış insülin salgılanması ve kilo alımının azalmasıdır. Son dönemde yapılan çalışmalarda liraglutid, semaglutid ve albuglutidin majör advers kardiyak olay riskini azalttığı gösterilmiştir (21, 22). Ayrıca liraglutidin steatohepatit patogenezinde anahtar metabolik organlarda metabolik disfonksiyonu, insülin direncini ve lipotoksisteyi azalttığı gösterilmiştir (23). Bizim çalışmamızda da GLP-1 reseptör agonistlerinin en sık kardiyovasküler hastalıkları ya da hepatosteatozu olan hastalarda kullanılmakta olduğu; ancak genel kullanım oranlarının %2 civarında olduğu bulunmuştur. Bu düşük oran, büyük ihtimalle, ilacın kullanım şeklinin enjeksiyon yolu ile olmasından, pahalı olmasından ve ülkemizde geri ödemeye ilişkin iç hastalıkları uzman hekimlerinin yetki kısıtlılığından kaynaklanmaktadır.

Yine çalışmamızda aterosklerotik kardiyovasküler hastalık tespit edilen hastaların yaklaşık dörtte biri GLP-1 reseptör agonisti veya SGLT2 inhibitörlerinden birini kullanmakta idi. Kılavuzlarda aterosklerotik kardiyovasküler hastalığı olanlarda önerilen bu ilaçların kullanım oranının dörtte birde kalmasının sebebi, bu ilaçların günlük pratikte son yıllarda kullanılmaya başlanması ve fiyatlarının yüksek olması ile açıklanabilir. Ülkemizde SGLT2 inhibitörlerinin geri ödemeye ilişkin iç hastalıkları uzman hekimlerine yetki verilmesi yakın zamanda yürürlüğe girerken GLP-1 agonistleri için bu durum söz konusu değildir. SGLT2 inhibitörleri için kullanım oranının giderek artması muhtemeldir. Ayrıca, kronik böbrek hasarı olan Tip 2 diyabet hastalarında SGLT2 inhibitörü ya da GLP-1 reseptör agonistinin progresyonu azaltmasından dolayı tedaviye eklenmesi önerilmektedir. Ancak çalışmamızda kronik böbrek hastalığı olan hastalarda bu ilaçların kullanım oranı %8 civarında bulunmuştur. Biz bu çalışmada kronik böbrek hasarını GFR değerinin 60 ml/dk/1,73 m<sup>2</sup>'nin altında olması ve bu durumun üç ay boyunca sebat etmesi olarak kabul ettik. Kılavuzlarda önerilen bu ilaçların düşük kullanım oranları yine ilacın kullanıma yeni girmiş olmasına ve fi-

yatına bağlanabilir. Bu çalışmada sadece kronik böbrek hasarına bakıldı, GFR değerlendirilmedi. Dolayısıyla GFR 30'un altında SGLT2 inhibitörü kontraendike olduğu için kronik böbrek hasarı olan hastalarımızda SGLT2 inhibitörü kullanımını %8 olarak düşük saptamış olabiliriz. Asya'da yapılan kapsamlı bir çalışmada, Tip 2 DM tedavisi için yeni ilaç başlanan 3.917.551 hastanın 249.348'inde (%6,3) SGLT2 inhibitörlerinin tercih edildiği bildirilmiştir (24). Bu ilaçlarla ilgili özellikle kardiyovasküler olaylardaki etkinlikleri ile ilgili çalışmalar arttıkça, ilaçların kullanımının da hem ülkemizde hem de tüm dünyada daha da artacağı inancındayız.

Son kılavuzlarda hipertansif diyabetik hastalarda antihipertansif tedavide öncelikle ACE inhibitörü, ARB'ler, tiazid grubu diüretikler, ya da dihidropiridin grubu kalsiyum kanal blokörlerinin başlanması önerilmektedir. Biz çalışmamızda hastalarımızda hipertansiyon varlığını kaydetmedik. Ancak ilaç kullanım oranlarına bakıldığında, çalışmaya dahil edilen hastaların yaklaşık %65'inin ACE inhibitörü ya da ARB tedavisi almakta olduğu tespit edilmiştir. Eşlik eden aterosklerotik kalp hastalığı ya da kronik böbrek hastalığı olanlarda ACE-inhibitörü ya da ARB kullanım oranları yaklaşık %67 civarında iken, bu oran eşlik eden hastalığı olmayanlarda %47 civarında bulunmuştur. Bu konuda genel olarak kılavuzlara uyulduğunu düşünmekteyiz.

Kılavuzlarda lipid profili normal olan diyabetik bir hastada en az yılda bir defa lipid profili görülmesi gerektiği önerilmektedir (6). Bu hususta çalışmamızın diğer önemli bulgusu da aterosklerotik hastalığı olan diyabetik hastaların büyük çoğunluğunun (%79,4) statin tedavisi almakta olduğu, ancak bunların yarısından fazlasında (%54,7) tedaviye rağmen LDL kolesterol düzeyinin, istenen değer olan 70 mg/dL'nin üzerinde olduğu tespitidir. Diyabet, kardiyovasküler hastalıklar için iyi bilinen bir risk faktörüdür. Özellikle, Tip 2 diyabetli hastaların büyük bir kısmında lipid metabolizması anormallikleri görülmektedir (25, 26).

Diyabet hastaları, kardiyovasküler hastalıklar için artmış risklerine katkıda bulunan daha aterojenik bir lipid profiline sahiptir. Statinler diyabette birinci basamak tedavilerdir ve hastaların büyük çoğunluğu statinlerden fayda görür (6, 27, 28). Çalışmamızda da hastaların yaklaşık %80'ine statin tedavisi başlanmıştı ancak hastalarımızın yarısından azında hedeflenen LDL düzeylerine ulaşılabilmişti. Bunun nedeni toplumumuzun genetik özellikleri, yeme alışkanlıkları ya da egzersiz yetersizliği olabilir. Bir diğer açıdan değerlendirildiğinde de iç hastalıkları uzman hekimlerinin reçetelerine ilişkin yüksek doz statin SGK geri ödeme kapsamında olmadığından doktorların ilaç dozunu arttırmada ya da yeni tedaviler eklemeye zorlandıkları düşünülebilir. Ayrıca sosyal medya ile gündeme gelen yan etkiler hastaların ilacı kabul etmede direnç göstermelerine sebep olmaktadır. Bu konuda daha geniş kapsamlı ve prospektif çalışmalara ihtiyaç olduğu aşikardır.

Bu çalışmanın bazı kısıtlılıkları vardır. Öncelikle retrospektif bir dizayn olması nedeniyle hasta dataları geriye dönük olarak taranmıştır; bu da bazı verilere ulaşmamızı kısıtlamış ve hasta sayımızı düşürmüştür. Hastalar yaşa göre ya da eşlik eden hastalıklarının derecesine göre gruplandırılmamıştır. Sadece eşlik eden hastalık varlığı kaydedilmiştir. Kan basıncı ölçümü olmadığından hastalar hipertansiyon açısından detaylı incelenememiştir.

Sonuç olarak; biz bu çalışmada günlük pratikte, Tip 2 diyabet tedavisinde kılavuzlara ne kadar uyum sağladığımızı araştırmayı amaçladık ve bu hastalarda takip sıklığı, metformin ve insülin tedavisinin düzenlenmesi, ACE inhibitörü ya da ARB tedavilerinin başlanması konusunda genel olarak kılavuzlara uyumun iyi olduğu ancak yeni anti-diyabetik ilaç grupları olan GLP-1 reseptörü agonisti veya SGLT2 inhibitörlerinin kullanım oranlarının hala düşük olduğu ve statin tedavisi ile hedeflenen sonuçlara ulaşamayan dislipidemik hastalarda ikincil tedavi eklenmesi oranlarının çok düşük olduğu saptanmıştır. Bu bilgiler, diyabetik hastalarda tedavi rejimimizi düzenlemede ve yeni tedavi stratejileri oluşturmada bize ışık tutacaktır.

**Etik Komite Onayı:** Bu çalışma için etik komite onayı Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Tarih: 19.02.2019, No: 1141).

**Bilgilendirilmiş Onam:** Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Çalışma Konsepti/Tasarım- İ.D.T., Ö.K.A.; Veri Toplama- M.A.A., B.K.,U.Y., H.E., Ö.K.A., İ.B.A.; Veri Analizi/Yorumlama- Y.A., İ.D.T.,H.E.; Yazı Taslağı- İ.D.T., Y.A., Ö.K.A., M.A.A., B.K.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- T.T., Y.A., H.E., U.Y., İ.B.A.; Son Onay ve Sorumluluk- İ.D.T., Ö.K.A.,B.K., M.A.A.,İ.B.A.,U.Y., H.E., Y.A., T.T.

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

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

**Ethics Committee Approval:** This study was approved by the Clinical Research Ethical Committee of the Health Sciences University, Okmeydanı Training and Research Hospital (Date: 19.02.2019, No: 1141).

**Informed Consent:** Written consent was obtained from the participants.

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

**Author Contributions:** Conception/Design of Study- İ.D.T., Ö.K.A.; Data Acquisition- M.A.A., B.K.,U.Y., H.E., Ö.K.A., İ.B.A.; Data Analysis/Interpretation- Y.A., İ.D.T., H.E.; Drafting Manuscript- İ.D.T., Y.A., Ö.K.A., M.A.A., B.K.; Critical Revision of Manuscript-

T.T., Y.A., H.E., U.Y., İ.B.A.; Final Approval and Accountability- İ.D.T., Ö.K.A.,B.K., M.A.A., İ.B.A.,U.Y., H.E., Y.A., T.T.

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

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

## KAYNAKLAR/REFERENCES

1. Kleinberger JW, Pollin TI. Personalized medicine in diabetes mellitus: current opportunities and future prospects. *Ann N Y Acad Sci* 2015;1346(1):45-56. [CrossRef]
2. Schmidt AM. Highlighting Diabetes Mellitus: The Epidemic Continues. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2018;38(1):e1-8. [CrossRef]
3. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes-2019 Abridged for Primary Care Providers. *Clin Diabetes* 2019;37(1):11-34. [CrossRef]
4. World Health Organization. WHO Fact Sheets on Palliative Care. <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/palliative-care>
5. Kanter JE, Bornfeldt KE. Impact of Diabetes Mellitus. *ArteriosclerThrombVasc Biol* 2016;36(6):1049-53. [CrossRef]
6. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Kılavuzu-2020 14. Baskı (Çevrimiçi Yayın): 25 Haziran 2020 (Güncellenmiş Baskı). (Erişim Tarihi: 01.07.2020, [http://temd.org.tr/admin/uploads/tbl\\_kilavuz/20200625154506-2020tbl\\_kilavuz86bf012d90.pdf](http://temd.org.tr/admin/uploads/tbl_kilavuz/20200625154506-2020tbl_kilavuz86bf012d90.pdf))
7. Sekimoto M, li M. Supplier-Induced Demand for Chronic Disease Care in Japan: Multilevel Analysis of the Association between Physician Density and Physician-Patient Encounter Frequency. *Value Health Reg Issues* 2015;6:103-10. [CrossRef]
8. Anjana RM, Shanthirani CS, Unnikrishnan R, Mugilan P, Amutha A, Nair HD, et al. Regularity of follow-up, glycemic burden, and risk of microvascular complications in patients with type 2 diabetes: a 9-year follow-up study. *Acta Diabetol* 2015;52(3):601-9. [CrossRef]
9. Javorsky E, Robinson A, Boer Kimball A. Evidence-based guidelines to determine follow-up intervals: a call for action. *Am J Manag Care* 2014;20(1):17-9.
10. Hu M, Zhou Z, Zeng F, Sun Z. Effects of frequency of follow-up on quality of life of type 2 diabetes patients on oral hypoglycemics. *Diabetes Technol Ther* 2012;14(9):777-82. [CrossRef]
11. American Diabetes Association, Standards of Medical Care in Diabetes-2016: Summary of Revisions. *Diabetes Care* 2016;39(Suppl 1):S4-5. [CrossRef]
12. Bolen S, Tseng E, Hutfless S, Segal JB, Suarez-Cuervo C, Berger Z, et al. Diabetes Medications for Adults With Type 2 Diabetes: An Update, Comparative Effectiveness Reviews 173. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US), 2016 Apr. Report No.: 16-EHC013-EF.
13. Tuot DS, Lin F, Shlipak MG, Grubbs V, Hsu CY, Yee J, et al. CDC CKD Surveillance Team. Potential Impact of Prescribing Metformin According to eGFR Rather Than Serum Creatinine. *Diabetes Care* 2015;38(11):2059-67. [CrossRef]
14. Inzucchi SE, Lipska KJ, Mayo H, Bailey CJ, McGuire DK. Metformin in patients with type 2 diabetes and kidney disease: a systematic review. *JAMA* 2014;312(24):2668-75. [CrossRef]

15. Flory JH, Hennessy S. Metformin use reduction in mild to moderate renal impairment: possible inappropriate curbing of use based on food and drug administration contraindications. *JAMA Intern Med* 2015;175(3):458-9. [\[CrossRef\]](#)
16. Crowley MJ, Diamantidis CJ, McDuffie JR, Cameron CB, Stanifer JW, Mock CK, et al. Clinical Outcomes of Metformin Use in Populations With Chronic Kidney Disease, Congestive Heart Failure, or Chronic Liver Disease: A Systematic Review. *Ann Intern Med* 2017;166(3):191-200. [\[CrossRef\]](#)
17. DeFronzo RA, Abdul-Ghani MA. Preservation of  $\beta$ -cell function: the key to diabetes prevention. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(8):2354-66. [\[CrossRef\]](#)
18. Nathan DM, Kuenen J, Borg R, Zheng H, Schoenfeld D, Heine RJ; A1c-Derived Average Glucose Study Group. Translating the A1C assay into estimated average glucose values. *Diabetes Care* 2008;31(8):1473-8. Erratum in: *Diabetes Care* 2009;32(1):207. [\[CrossRef\]](#)
19. Hou X, Liu J, Song J, Wang C, Liang K, Sun Y, et al. Relationship of Hemoglobin A1c with  $\beta$  Cell Function and Insulin Resistance in Newly Diagnosed and Drug Naive Type 2 Diabetes Patients. *J Diabetes Res* 2016;2016:8797316. [\[CrossRef\]](#)
20. Haymana C, Sonmez A, Demirci I, Yaylalı GF, Nuhoglu İ, Sancak S, et al., TEMD Study Group. Patterns and preferences of antidiabetic drug use in Turkish patients with type 2 diabetes - A nationwide cross-sectional study (TEMD treatment study). *Diabetes Res Clin Pract* 2021;171:108556. [\[CrossRef\]](#)
21. Sharma D, Verma S, Vaidya S, Kalia K, Tiwari V. Recent updates on GLP-1 agonists: Current advancements & challenges. *Biomed Pharmacother* 2018;108:952-62. [\[CrossRef\]](#)
22. Andrikou E, Tsioufis C, Andrikou I, Leontsinis I, Tousoulis D, Papanas N. GLP-1 receptor agonists and cardiovascular outcome trials: An update. *Hellenic J Cardiol* 2019;60(6):347-51. [\[CrossRef\]](#)
23. Armstrong MJ, Hull D, Guo K, Barton D, Hazlehurst JM, Gathercole LL, et al. Glucagon-like peptide 1 decreases lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2016;64(2):399-408. [\[CrossRef\]](#)
24. Kosiborod M, Lam CSP, Kohsaka S, Kim DJ, Karasik A, Shaw J, et al; CVD-REAL Investigators and Study Group. Cardiovascular Events Associated With SGLT-2 Inhibitors Versus Other Glucose-Lowering Drugs: The CVD-REAL 2 Study. *J Am Coll Cardiol* 2018;71(23):2628-39. [\[CrossRef\]](#)
25. Sillars A, Sattar N. Management of Lipid Abnormalities in Patients with Diabetes. *Curr Cardiol Rep* 2019;21(11):147. [\[CrossRef\]](#)
26. Fox CS, Pencina MJ, Wilson PW, Paynter NP, Vasan RS, D'Agostino RB Sr. Lifetime risk of cardiovascular disease among individuals with and without diabetes stratified by obesity status in the Framingham heart study. *Diabetes Care* 2008;31(8):1582-4. [\[CrossRef\]](#)
27. Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration, Baigent C, Blackwell L, Emberson J, Holland LE, Reith C, Bhalra N, et al. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. *Lancet* 2010;376(9753):1670-81. [\[CrossRef\]](#)
28. Newman CB, Preiss D, Tobert JA, Jacobson TA, Page RL, Goldstein LB, et al. A Scientific Statement From the American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2019;39(2):e38-81. Erratum in: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2019;39(5):e158.



# GEBELİKTE BESLENME DURUMU İLE GLUKOZ TOLERANSI ARASINDAKİ İLİŞKİLER

## THE RELATIONSHIP BETWEEN NUTRITIONAL STATUS AND GLUCOSE TOLERANCE IN PREGNANCY

Merve YABACI<sup>1</sup>, Cemile İDİZ<sup>2</sup>, Fulya ÇALIKOĞLU<sup>2</sup>, Atıl YÜKSEL<sup>3</sup>, Beyhan ÖMER<sup>4</sup>, Birsen DEMİREL<sup>1</sup>, Emel ÖZER<sup>5</sup>, İlhan SATMAN<sup>2,6</sup>

<sup>1</sup>İstanbul Bilgi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup>İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Dahili Tıp Bilimleri Bölümü, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

<sup>3</sup>İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

<sup>4</sup>İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

<sup>5</sup>Diyabet Diyetisyenliği Derneği, İstanbul, İstanbul, Türkiye

<sup>6</sup>Türkiye Halk Sağlığı ve Kronik Hastalıklar Enstitüsü, İstanbul, Türkiye

**ORCID IDs of the authors:** M.Y. 0000-0003-4019-9256; C.İ. 0000-0001-6635-5996; F.Ç. 0000-0001-9263-3531; A.Y. 0000-0002-6487-0860; B.Ö. 0000-0001-7938-6281; B.D. 0000-0003-3897-1446; E.Ö. 0000-0002-4394-8761; İ.S. 0000-0001-8613-1797

**Cite this article as:** Yabaci M, Idiz C, Calikoglu F, Yuksel A, Omer B, Demirel B, et al. The relationship between nutritional status and glucose tolerance in pregnancy. J Ist Faculty Med 2021;84(3):376-85. doi: 10.26650/IUITFD.2021.803339

### ÖZET

**Amaç:** Gestasyonel diabetes mellitus (GDM), gebelik esnasında ortaya çıkan ve tedavi edilmediğinde hem maternal hem de fetal açıdan olumsuz sonuçlara neden olabilen bir diyabet formudur. Çalışmamızda; gebelikte beslenme özellikleri ile GDM ve gestasyonel glukoz intoleransı (GGİT) gelişimi arasındaki ilişkilerin incelenmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmaya oral glukoz tolerans testi (OGTT-50 g ve 100 g) sonuçlarına göre; normal glukoz toleransı (NGT, n=60), GGİT (n=60) ve GDM (n=60) olmak üzere üç grup gebe dahil edilmiştir. Katılımcıların demografik özellikleri, sağlık durumları ve beslenme alışkanlıkları sorgulanmış, ayrıca hastalardan üç günlük besin tüketim kayıtları istenmiştir.

**Bulgular:** Gestasyonel diabetes mellitus ve GGİT gruplarında ortalama yaş, vücut ağırlığı, günlük karbonhidrat ve protein alım miktarları ve ailede diyabet öyküsü sıklığı NGT grubundan daha yüksek bulunmuş; GDM grubunda ayrıca yağ alım miktarının da, NGT ve GGİT gruplarından daha yüksek olduğu saptanmıştır (p<0,05). Lojistik regresyon modellerine göre yaş; günlük protein, karbonhidrat ve yağ tüketimleri; daha önce gebe kalmamış olmak ve gebelik öncesi vücut kitle indeksinin (VKI)>25 kg/m<sup>2</sup> olması GDM riski ile; benzer şekilde yaş, günlük protein tüketimi, daha önce iri bebek doğurmuş olmak ve sigara kullanmak GGİT riski ile pozitif yönde ilişkili bulunmuştur.

### ABSTRACT

**Objective:** Gestational diabetes mellitus (GDM) is a form of diabetes that appears during pregnancy and can cause both maternal and fetal consequences if left untreated. The aim of this study was to investigate the relationship between the nutritional characteristics of pregnancy and the development of GDM and gestational glucose intolerance (GGIT).

**Material and Method:** Three groups of pregnant women were included in the study. They were grouped according to the results of the oral glucose tolerance test (OGTT-50 g and 100 g) as follows: normal glucose tolerance (NGT, n=60), GGIT (n=60), and GDM (n=60). The demographic characteristics, health conditions, and nutritional habits of the participants were questioned, and a 3-day food consumption record was requested from the patients.

**Results:** Average age, body weight, daily carbohydrate and protein intakes, and the frequency of diabetes history in the family were found to be higher in the GDM and GGIT groups than in the NGT group. It was also found that the amount of fat intake was higher in the GDM group than in the NGT and GGIT groups (p<0.05). According to logistic regression models, age, daily protein, carbohydrate, and fat consumption, not being pregnant before, and having a body mass index (BMI)>25 kg/m<sup>2</sup> before pregnancy were the factors associated with the risk of GDM.

**İletişim kurulacak yazar/Corresponding author:** cemileidiz@gmail.com

**Başvuru/Submitted:** 01.10.2020 • **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 12.04.2021 •

**Son Revizyon/Last Revision Received:** 28.04.2021 • **Kabul/Accepted:** 09.05.2021 • **Online Yayın/Published Online:** 14.07.2021



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

**Sonuç:** Gebelerde beslenme alışkanlıkları ile birlikte fenotipik özellikler, ailede diyabet öyküsü ve daha önceki obstetrik sorunların; GDM veya GGİT riski ile yakından ilişkili olduğu saptanmıştır. Özellikle yüksek riskli gebelerde genel sağlığa ve dengeli beslenmeye özel bir önem atfedilmelidir.

**Anahtar Kelimeler:** Gestasyonel diabetes mellitus, gestasyonel glukoz intoleransı, beslenme tarzı, oral glukoz tolerans testi

Similarly, age, daily protein consumption, having a macrosomic baby, and current smoking were positively associated with the risk of GGIT.

**Conclusion:** The phenotypic characteristics, family history of diabetes, and previous obstetric problems in pregnant women were found to be closely related to GDM or GGIT risk. Special attention should be paid to general health and balanced nutrition, especially in high-risk pregnant women.

**Keywords:** Gestational diabetes mellitus, gestational glucose intolerance, nutrition style, oral glucose tolerance test

## GİRİŞ

Gestasyonel diabetes mellitus (GDM); genellikle ilk kez gebelik sırasında ortaya çıkan geçici bir diyabet formudur. Bu genellikle gebeliğin 24-28. haftalarında ortaya çıkar; ancak daha erken veya daha geç dönemde de görülebilir (1, 2). Gebe kadınların %6-9'unda diyabet geliştiği ve bu kadınların %90'ının GDM olduğu bildirilmiştir (3). Ülkemizde ise fazla çalışma bulunmamakla birlikte GDM prevalansı %8,4-9,2 aralığında saptanmıştır (4, 5).

Gebelik diyabeti, plasental hormonlar nedeniyle insülinin etkisinin azalması sonucu ortaya çıkar. İleri yaşta gebe kalmak, fazla kiloluluk veya obezite, gebelikte aşırı kilo alımı, ölü doğum, doğumsal anormalliği olan bebek doğurmak ve ailede diyabet öyküsü GDM için önemli risk faktörleridir. GDM genelde doğumla birlikte düzelir. Bununla birlikte GDM öyküsü olan kadınların sonraki gebeliklerinde GDM'nin tekrarlanma riski yüksektir. Ayrıca GDM öyküsü olan kadınların yaklaşık yarısında doğumdan sonraki 5 ile 10 yıl içinde Tip 2 diabetes mellitus (T2DM) gelişir. GDM'li annelerden doğan bebeklerde yaşam boyu obezite ve T2DM gelişme riski, gebelikte normal glukoz toleransı (NGT) bulunan kadınlara göre, daha yüksektir (6).

GDM'li kadınlar, gebeliğin olumsuz sonuçları açısından risk altındadır. Bunlara hipertansiyon ve fetal makrozomi gibi doğumun zor ve riskli olmasına yol açan durumlar da dahildir. Gebelikte hipergliseminin tanımlanması ve glukoz kontrolünün sağlanması ile bu riskler azaltılabilir (6, 7).

Daha önce Tayvan'da yapılan bir çalışmada hamile kadınlarda; %45-50 karbonhidrat, %15-20 protein ve %30-35 yağdan oluşan, sebze ve yüksek lifli yiyecekler içeren tıbbi beslenme tedavisinin gebelikte sınırdaki glukoz intoleransı (gestasyonel glukoz intoleransı: GGİT) üzerindeki etkisi araştırılmış, beslenme tedavisinin sınırdaki glukoz intoleransı olan kadınlarda olumsuz gebelik sonuçlarını etkilediğini göstermiştir (8). 2015 yılında yapılan bir çalışmada sadece GDM teşhisi konulan gebeler ele alınarak gebelikte çeşitli beslenme modellerinin GDM riski ile ilişkisi araştırılmıştır (9).

Çalışmamızda İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi'ne başvuran gebelerde beslenme alışkanlıkları ile birlikte risk faktörlerinin, GDM veya GGİT gelişmesi üzerindeki

etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Literatürdeki diğer çalışmalardan farklı olarak, sadece GDM veya sadece GGİT grubu yerine her iki grubu da ele alarak NGT grubuyla kıyaslama yapılmıştır. Gebelik sürecindeki beslenme alışkanlıklarının ve obstetrik öykünün gebenin glukoz toleransı üzerine etkisi incelenerek daha ileri sonuçların elde edilmesi hedeflenmiştir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma 03.01.2018 ile 02.01.2019 tarihleri arasında İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi'nde gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın katılımcıları Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı ile İç Hastalıkları Anabilim Dalı Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı Gestasyonel Diyabet Polikliniği'ne başvuran hastalar arasından, başvuru sırasına ve gönüllülük esasına göre seçilmiş ve yazılı bilgilendirilmiş onamları alınmıştır. Çalışma İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Tarih: 21.11.2017, No: 1348). Çalışmada kullanılan iki aşamalı GDM testleri İstanbul Tıp Fakültesi Merkez Biyokimya Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Araştırma katılımcıları daha önce bilinen sistemik bir hastalığı olmayan ve 50 g glukoz kullanılarak yapılan OGTT tarama testinde 1. saat plazma glukozunun (PG)>140 mg/dl bulunması veya GDM risk faktörleri olması nedeniyle yapılan 100 g glukoz kullanılarak yapılan OGTT sonuçlarına göre; NGT, GGİT (bir PG eşik değerinin aşılması) ve GDM (en az iki PG eşik değerinin aşılması) saptanan kadınlardır ve her grupta 60 gebe yer almıştır.

Araştırmaya katılan gebelere genel demografik özelliklerini, sağlık durumlarını ve beslenme alışkanlıklarını saptamak amacıyla bir anket uygulanmış ve açlık kan örneklerinde glukoz, HbA1c, HDL-kolesterol ve total kolesterol bakılmıştır. Ek olarak hafta içi iki ardışık olmayan gün ve hafta sonu bir gün olmak üzere toplam üç günlük besin tüketim kayıtları istenmiş ve veriler Beslenme Bilgi Sistemi (BEBİS) programında referans değerlerine göre besin öğelerinin ihtiyacı karşılama yüzdeleri ile değerlendirilmiştir. Besin öğelerinin günlük ihtiyacı karşılama yüzdeleri <%66 düzeyi yetersiz, %66-133 düzeyi normal, >%133 düzeyi ise yüksek besin öğesi alımı olarak kabul edilmiştir.

Günlük alınan enerjiye göre karbonhidrat, protein ve yağ oranları sırasıyla; %45-50, %18-20 ve %30-35 olarak referans alınmıştır (3).

### İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler için NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007 (Kaysville, Utah, USA) programı kullanılmıştır. Çalışma verileri tanımlayıcı istatistiksel metodlar (ortalama, standart sapma, medyan, yüzde, minimum ve maksimum) kullanılmıştır. Nicel verilerin normal dağılıma uygunlukları Shapiro-Wilk testi ve grafik incelemeler ile sınanmıştır. Normal dağılım göstermeyen değişkenlerin iki grup arası karşılaştırmalarında Mann-Whitney U testi, normal dağılım gösteren değişkenlerin ikiden fazla grup karşılaştırmalarında one-way ANOVA, gruplar arasındaki farklılığın belirlenmesinde Games-Howell ve Bonferroni düzeltmeleri kullanılmıştır. Normal dağılım göstermeyen nicel değişkenlerin ikiden fazla grup karşılaştırmalarında Kruskal-Wallis ve Dunn-Bonferroni testleri kullanılmıştır. Nitel verilerin karşılaştırılmasında Pearson Chi-square ( $\chi^2$ ) ve Fisher-Freeman-Halton exact testleri kullanılmıştır. Multivariate değerlendirmelerde lojistik regresyon analizi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi  $p < 0,05$  olarak kabul edilmiştir.

### BULGULAR

Yaş aralığı 19-46 ve ortalama yaşı  $31,6 \pm 5,4$  olan toplam 180 gebenin bulunduğu çalışma gruplarının (NGT, GGİT ve GDM) yaş, ağırlık, VKİ, sigara kullanımı, ailede DM öyküsü, ana ve ara öğün sayıları ile bunların post-hoc analizleri Tablo 1'de verilmiştir. Grupların yaş ortalaması ve yaş dağılımı, gebelik öncesi vücut ağırlığı ve VKİ, OGTT sırasındaki ağırlığı ve ailede DM öyküsü arasında anlamlı farklılık bulunmaktadır ( $p < 0,05$ ).

Tablo 1'de görüldüğü gibi OGTT sonucuna göre GDM ve GGİT gruplarının yaş ortalamaları, NGT grubundan anlamlı düzeyde yüksektir. GDM grubunun gebelik öncesi ağırlık ve VKİ ortalamaları, NGT grubundan anlamlı düzeyde yüksektir. GDM ve GGİT gruplarında normal VKİ sıklığı, NGT grubuna göre anlamlı olarak düşük olup ailede diyabet sıklığı anlamlı düzeyde yüksektir.

Katılımcıların obstetrik öyküleri incelendiğinde gebelik haftasının (ort $\pm$ SS) NGT grubunda ( $26,3 \pm 2,8$ ), GGİT ( $28,8 \pm 2,8$ ) ve GDM ( $28,9 \pm 3,3$ ) gruplarından daha düşük bulunması ( $p = 0,001$ ) dışında; daha önceki gebelik sayısı, spontan abortus, canlı doğum, ölü doğum ve dış gebelik bakımından gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir. İri bebek öyküsü GGİT (%13) ve GDM (%10) gruplarında NGT (%1,7) grubundan nümerik olarak daha sık bulunmuştur ( $p = 0,059$ ).

Grupların biyokimyasal bulguları değerlendirildiğinde (Tablo 2); GDM grubunun açlık glukoz düzeyi, NGT ve GGİT gruplarından daha yüksek olduğu saptanmıştır ( $p < 0,01$ ).

Tablo 3'te verilen enerji, karbonhidrat, protein, yağ, lif ve kolesterol alımının miktar ve ihtiyacı karşılama oranlarına bakıldığında; enerji, karbonhidrat, protein, yağ, lif, tekli ve çoklu doymamış yağ, doymuş yağ, besinlerle alınan kolesterol ve önerilenlerin yüzde oranlarında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ( $p < 0,05$ ).

GDM veya GGİT üzerine etki eden risk faktörlerinden yaş, daha önceki gebelik, canlı doğum, düşük, ölü doğum, makrozomik bebek öyküsü, gebelik öncesi kilo, gebelik öncesi VKİ  $> 25 \text{ kg/m}^2$ ; gebelikte ağırlık artışı, ailede DM öyküsü, sigara kullanımı; alınan günlük enerji, karbonhidrat, protein, yağ, lif ve çoklu doymamış yağın etkileri Lojistik Regresyon Analizi ile değerlendirilmiştir. Backward Stepwise Lojistik Regresyon Analizi ile yapılan değerlendirmede; modelin anlamlı bulunduğu ve modelin açıklıcılık katsayısının (%83,3) çok iyi düzeyde olduğu görülmüştür. Yaş, iri bebek öyküsü, gebelik öncesi VKİ  $> 25 \text{ kg/m}^2$  olması ve alınan günlük protein miktarı 11. adım sonunda modelde kalmıştır. Diğer değişkenlerin multivariate değerlendirmede anlamlı etkileri bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ).

Gebe yaşının bir yıl ileri olması GDM veya GGİT riskini %13 (%95 GA:1,035-1,236) artırmakla ilişkili bulunmuştur ( $p = 0,007$ ). Benzer şekilde gebenin daha önce iri bebek doğmuş olması GDM veya GGİT riskini 17,1 (%95 GA:1,45-201,34) kat ( $p = 0,024$ ); gebelik öncesi VKİ  $> 25 \text{ kg/m}^2$  olması ise riski 3,4 (%95 GA:1,48-8,024) kat artırmakla ilişkili bulunmuştur ( $p = 0,004$ ). Ek olarak günlük alınan protein miktarındaki her bir gramlık artışın GDM veya GGİT riskini %10 (%95 GA:1,058-1,133) artırmakla ilişkili olduğu görülmüştür ( $p < 0,001$ ).

Gestasyonel diabetes mellitus dışında bırakılarak Backward Stepwise lojistik regresyon analizi uygulandığında; modelin anlamlı bulunduğu ve modelin açıklıcılık katsayısının (%79,2) iyi düzeyde olduğu görülmüştür (Tablo 4). Yaş, iri bebek öyküsü, sigara ve günlük protein alımı 12. step sonunda modelde kalmıştır. Diğer değişkenlerin multivariate değerlendirmede anlamlı etkileri bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ).

Gebe yaşının bir yıl ileri olması GGİT riskini %14 (%95 GA:1,029-1,258) artırmakla ilişkili bulunmuştur ( $p = 0,011$ ). Benzer şekilde gebenin daha önce iri bebek doğmuş olması GGİT riskini 11,7 (%95 GA:1,014-136,02) kat ( $p = 0,049$ ) ve gebenin sigara kullanıyor olması 6,6 (%95 GA:1,001-44,499) kat artırmakla ilişkili bulunmuştur ( $p = 0,050$ ). Ayrıca günlük alınan protein miktarındaki her bir gram artışın, gene GGİT riskini %7 (%95 GA:1,033-1,108) artırmakla ilişkili olduğu saptanmıştır ( $p < 0,001$ ).

GGİT dışında bırakılarak Backward Stepwise lojistik regresyon analizi yapıldığında; modelin anlamlı bulunduğu ve modelin açıklıcılık katsayısının (%82,5) iyi düzeyde ol-

**Tablo 1:** Grupların tanımlayıcı özellikleri

		OGTT grupları			p
		NGT	GGİT	GDM	
Yaş (yıl)	Min-Maks (Medyan)	19-42 (30,5)	21-46 (33,5)	20-42 (33)	
	Ort±SS	29,8±5,1	32,7±5,3	32,4±5,6	<sup>a</sup> 0,007
	≤30 Yaş	30 (50,0)	20 (33,3)	21 (35,0)	
	31-35 Yaş	24 (40,0)	22 (36,7)	21 (35,0)	<sup>b</sup> 0,047
	≥36 Yaş	6 (10,0)	18 (30,0)	18 (30,0)	
Pre-gestasyonel ağırlık (kg)	Min-Maks (Medyan)	50-120 (61)	33-107 (69)	43-106 (72)	
	Ort±SS	65,1±14,1	69,6±14,2	73,1±13,4	<sup>a</sup> 0,008
Pre-gestasyonel VKİ (kg/m <sup>2</sup> )	Min-Maks (Medyan)	18,59-41,52 (23,2)	14,67-41,8 (26,5)	20,3-40,4 (27,9)	
	Ort±SS	24,8±5,1	26,5±4,9	28,5±5,2	<sup>a</sup> 0,001
	Zayıf	0 (0,0)	2 (3,3)	0 (0,0)	
	Normal	37 (61,7)	23 (38,3)	15 (25,0)	<sup>c</sup> 0,001
	Fazla kilolu	13 (21,7)	23 (38,3)	25 (41,7)	
	Obez	10 (16,7)	12 (20,0)	20 (33,3)	
OGTT sırasındaki ağırlık (kg)	Min-Maks (Medyan)	54-115 (69,5)	45-110 (79,5)	49-114 (81)	
	Ort±SS	72,6±13,0	79,1±14,2	81,3±12,6	<sup>a</sup> 0,001
Gebelikte ağırlık değişimi (kg)	Min-Maks (Medyan)	-15-25 (7)	0-27 (8)	-1,6-23 (7)	
	Ort±SS	7,5±5,3	9,6±5,5	8,2±5,2	<sup>d</sup> 0,148
Sigara	Yok	58 (96,7)	53 (88,3)	53 (88,3)	
	Var	2 (3,3)	7 (11,7)	7 (11,7)	<sup>b</sup> 0,180
Kronik hastalık	Yok	43 (71,7)	44 (73,3)	45 (75,0)	
	Var	17 (28,3)	16 (26,7)	15 (25,0)	<sup>b</sup> 0,918
Ailede DM öyküsü	Yok	36 (60,0)	17 (28,3)	19 (31,7)	
	Var	24 (40,0)	43 (71,7)	41 (68,3)	<sup>b</sup> 0,001
Ana öğün	2 öğün	22 (36,7)	13 (21,7)	23 (38,3)	
	3 öğün	38 (63,3)	47 (78,3)	37 (61,7)	<sup>b</sup> 0,099
Ara öğün	Yok	4 (6,7)	3 (5,0)	1 (1,7)	
	1 öğün	16 (26,7)	22 (36,7)	12 (20,0)	<sup>c</sup> 0,301
	2 öğün	31 (51,7)	28 (46,7)	34 (56,7)	
	≥3 öğün	9 (15,0)	7 (11,7)	13 (21,7)	

<sup>a</sup>Oneway ANOVA, <sup>b</sup>Pearson Chi-Square Test, <sup>c</sup>Fisher Freeman Halton Test, <sup>d</sup>Kruskal Wallis Test

\*Sigara kullanım miktarı NGT grubundaki sayı az olduğundan karşılaştırmaya dahil edilmemiştir.

Post-Hoc Karşılaştırmalar:

Yaş; NGT ve GGİT: p=0,011, NGT ve GDM: p=0,030, pregestasyonel ağırlık; NGT vs GDM: p=0,006; pre-gestasyonel VKİ; NGT ve GDM: p=0,001; OGTT sırasındaki ağırlık değişimi; NGT ve GGİT: p=0,024, NGT ve GDM: p=0,001

**Tablo 2:** Grupların biyokimyasal bulguları

		OGTT grupları			p
		NGT	GGİT	GDM	
<b>HbA1c (%)</b>	n	4	22	35	*0,495
	Min-Maks (Medyan)	5-5,6 (5,2)	4,6-7 (5,4)	4,9-6 (5,4)	
	Ort±SS	5,3±0,3	5,4±0,6	5,5±0,3	
<b>(mmol/mol)</b>		33,9±2,9	35,8±5,9	36,6±3,6	
<b>Açlık glukoz (mg/dl)</b>	n	15	36	42	*0,002
	Min-Maks (Medyan)	69-99 (77)	56-125 (83)	64-147 (89)	
	Ort±SS	79,2±9,2	83,6±13,6	93,1±17,8	
<b>HDL-K (mg/dl)</b>	n	4	27	36	*0,892
	Min-Maks (Medyan)	45-77 (63,5)	43-92 (67)	39-92 (65)	
	Ort±SS	62,25±13,45	66,19±12,76	65,25±12,52	
<b>LDL-K (mg/dl)</b>	n	4	30	37	*0,280
	Min-Maks (Medyan)	107-179,8 (137,5)	67-218 (152)	58-215 (135)	
	Ort±SS	140,45±31,12	152,50±38,08	137,81±40,06	
<b>Trigliserid (mg/dl)</b>	n	4	26	34	*0,994
	Min-Maks (Medyan)	143-246 (228,5)	68-454 (208,5)	102-475 (203,5)	
	Ort±SS	211,5±47,1	222,9±79,3	230,4±103,7	

\*Kruskal Wallis Test

duğu görülmüştür (Tablo 4). Yaş, önceki gebelik, gebelik öncesi VKİ>25 kg/m<sup>2</sup> olması; alınan günlük protein, karbonhidrat ve yağ 11. step sonunda modelde kalmıştır. Diğer değişkenlerin multivariate değerlendirmede anlamlı etkileri bulunmamıştır (p>0,05).

Gebe yaşının bir yaş ileri olması GDM riskini %13 (%95 GA:1,001-1,259) artırmakla ilişkili bulunmuştur (p=0,05). Benzer şekilde daha önce gebelik geçirmemiş olması (ilk gebeliğinin olması) GDM riskini 3,5 (%95 GA:1,002-12,470) kat ve gebelik öncesi VKİ>25 kg/m<sup>2</sup> olması 5,4 (%95 GA:1,798-16,243) kat artırmakla ilişkilidir (p=0,002). Ek olarak günlük alınan protein miktarındaki her bir gramlık artış %7 (%95 GA:1,012-1,132) (p=0,018); karbonhidrattaki bir gramlık artış %2 (%95GA:1,005-1,033) (p=0,008); yağdaki bir gramlık artış %3 (%95 GA:1,001-1,068) artırmakla ilişkili bulunmuştur (p=0,040).

## TARTIŞMA

Bu çalışmada gebelikte beslenme alışkanlıkları ile GDM ya da GGİT gelişmesi arasındaki ilişkiler incelenmiştir.

Çalışmamızda GGİT ve GDM gruplarının medyan yaşlarının NGT'li gruptan anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır (p=0,007). GDM ve GGİT gruplarının gebe yaşının 36 veya üzerinde olmasının, NGT grubundan anlamlı düzeyde yüksek olduğu görülmüştür (p=0,047). Yapılan farklı lojistik regresyon analizi modellerinde, gebe yaşının bir yıl ileri olması; GDM veya GGİT riskini %13 (p=0,007), yalnız başına GGİT riskini %14 (p=0,011), yalnız başına GDM riskini ise %13 (p=0,05) artırmakla ilişkili bulunmuştur.

Anne yaşının gebelik sonuçlarına etkisinin incelendiği bir çalışmada ileri yaşlardaki (≥35 yaş) gebeliklerde daha sık GDM görüldüğü bildirilmiştir. Bununla birlikte aynı çalışmada ileri yaş gebeliklerde düşük doğum ağırlıklı bebek, prematüre bebek, yeni doğan ölümü ve preeklampsinin de daha sık olduğu görülmüştür (10). Çin'de yapılan bir araştırmanın sonucu da ileri yaşlardaki gebeliklerin GDM riskini artırdığını desteklemektedir (11).

Çalışmamızda; GDM grubunun gebelik öncesi ağırlığı ve VKİ değerinin, NGT grubundan anlamlı düzeyde yüksek olduğu görülmüştür (p<0,05). Ek olarak GDM ve GGİT gruplarının

**Tablo 3:** Günlük enerji, karbonhidrat, protein, yağ, lif ve kolesterol alımının miktar ve ihtiyacı karşılama oranları

		OGTT grupları			p
		NGT	GGİT	GDM	
<b>Enerji (kcal/gün)</b>	Min-Maks (Medyan)	1109-2181 (1729)	1093-3440 (1868)	1311-3256 (2080)	<b><sup>a</sup>0,001</b>
	Ort±SS	1719±232	1936±417	2125±368	
<b>Enerji (önerilenin % oranı)</b>	Min-Maks (Medyan)	57-113 (90)	57-178 (97)	68-168 (108)	<b><sup>a</sup>0,001</b>
	Ort±SS	89±120	100±22	1109±19	
<b>Karbonhidrat (g/gün)</b>	Min-Maks (Medyan)	26-306 (177)	81-546 (191)	121-367 (220)	<b><sup>a</sup>0,001</b>
	Ort±SS	175±43	206±73	228±56	
<b>Karbonhidrat (önerilenin % oranı)</b>	Min-Maks (Medyan)	30-111 (65)	29-198 (70)	44-133 (80)	<b><sup>a</sup>0,001</b>
	Ort±SS	64±14	75±26	83±20	
<b>Protein (g/gün)</b>	Min-Maks (Medyan)	36-106 (65)	37-119(79)	60-120(80)	<b><sup>a</sup>0,001</b>
	Ort±SS	64±14	78±15	82±14	
<b>Protein (önerilenin % oranı)</b>	Min-Maks (Medyan)	64-186 (114)	65-209 (139)	105-209 (140)	<b><sup>a</sup>0,001</b>
	Ort±SS	113±25	137±27	144±25	
<b>Yağ (g/gün)</b>	Min-Maks (Medyan)	42-149 (81)	43-138 (82)	46-174 (96)	<b><sup>a</sup>0,001</b>
	Ort±SS	81±17	87±19	96±22	
<b>Yağ (karşılama %)</b>	Min-Maks (Medyan)	63-227 (124)	65-211 (125)	71-265 (146)	<b><sup>a</sup>0,001</b>
	Ort±SS	124±25	132±29	146±34	
<b>Lif (g/gün)</b>	Min-Maks (Medyan)	9,4-39,6 (21,4)	14,3-46,7 (23,6)	14,4-42,8 (26,2)	<b><sup>a</sup>0,001</b>
	Ort±SS	22,2±5,8	24,5±6,2	26,4±5,6	
<b>Lif (karşılama %)</b>	Min-Maks (Medyan)	8-132 (71)	47-156 (79)	48-143 (87)	<b><sup>a</sup>0,001</b>
	Ort±SS	73±21	82±21	88±19	
<b>Tekli doymamış yağ (g/gün)</b>	Min-Maks (Medyan)	13-54 (26)	14-45 (28)	14-64 (31)	<b><sup>a</sup>0,004</b>
	Ort±SS	27,2±6,3	28,7±6,3	31,5±8,5	
<b>Çoklu doymamış yağ (g/gün)</b>	Min-Maks (Medyan)	9-39 (18)	6-39 (19)	13-33 (20)	<b><sup>a</sup>0,035</b>
	Ort±SS	18,4±5,5	19,5±5,7	20,7±4,3	
<b>Çoklu doymamış yağ (karşılama %)</b>	Min-Maks (Medyan)	88-385 (180)	57-386 (192)	131-333 (200)	<b><sup>a</sup>0,040</b>
	Ort±SS	184,0±54,8	194,9±57,2	206,9±42,5	
<b>Doymuş yağ (g/gün)</b>	Min-Maks (Medyan)	15-65 (29)	19-70 (29)	9-82 (37)	<b><sup>a</sup>0,001</b>
	Ort±SS	30,1±8,4	32,1±9,7	36,7±11,4	
<b>Besinlerle alınan kolesterol (mg/gün)</b>	Min-Maks (Medyan)	94-656 (309)	112-816(390)	177-902 (415)	<b><sup>a</sup>0,001</b>
	Ort±SS	311,3±115,3	402,2±127,1	443,7±149,9	
<b>Bitkisel protein (g/gün)</b>	Min-Maks (Medyan)	13-46 (24)	18-81 (28)	16-51 (30)	<b><sup>a</sup>0,001</b>
	Ort±SS	24,4±5,9	29,6±10,2	31,4±7,7	
<b>Fruktoz (g/gün)</b>	Min-Maks (Medyan)	2,3-42,5 (14,9)	4,3-32,3 (14,45)	5-39,5 (14,35)	<sup>a</sup> 0,953
	Ort±SS	15,8±8,2	15,7±6,6	15,4±7	
<b>Disakkaritler (g/gün)</b>	Min-Maks (Medyan)	6,9-68,9 (32)	7,5-68 (29,9)	5,2-86,1 (38,2)	<b><sup>a</sup>0,010</b>
	Ort±SS	32,4±12,6	32,7±13,4	39,1±14,3	
<b>Nişasta (g/gün)</b>	Min-Maks (Medyan)	44-225 (91)	46-443 (115)	53-276 (137)	<b><sup>a</sup>0,001</b>
	Ort±SS	101,0±35,9	129,2±60,5	142,4±48,8	
<b>Glikojen (g/gün)</b>	Min-Maks (Medyan)	0-2,8 (0,1)	0-0,3 (0,1)	0-3,2 (0,1)	<sup>b</sup> 0,732
	Ort±SS	0,17±0,45	0,11±0,1	0,24±0,59	
<b>EPA (g/gün)</b>	Min-Maks (Medyan)	0-0,6 (0)	0-0,6 (0)	0-0,3 (0)	<sup>b</sup> 0,070
	Ort±SS	0,03±0,09	0,06±0,1	0,03±0,06	
<b>DHA (g/gün)</b>	Min-Maks (Medyan)	0-1,8 (0,1)	0-1,1 (0,1)	0-0,6 (0,1)	<b><sup>b</sup>0,037</b>
	Ort±SS	0,14±0,24	0,17±0,17	0,16±0,12	

<sup>a</sup>Oneway ANOVA, <sup>b</sup>Kruskal Wallis Test

**Tablo 4:** Gestasyonel diabetes mellitus veya gestasyonel glukoz intoleransı ile ilişkili risk faktörleri (lojistik regresyon analizi)

Gestasyonel glukoz intoleransı			Gestasyonel diabetes mellitus		
Bağımsız değişken	p	OR (%95 GA)	Bağımsız değişken	p	OR (%95 GA)
Yaş	0,011	1,14 (1,03-1,26)	Yaş	0,050	1,13 (1,00-1,26)
Sigara	0,050	6,64 (1,00-44,46)	Gebe öncesi VKİ >25 kg/m <sup>2</sup>	0,002	5,40 (1,80-16,24)
Makrozomik bebek öyküsü	0,049	11,74 (1,01-136,0)	İlk gebelik	0,049	3,51 (1,00-12,47)
Protein tüketimi	<0,001	1,07 (1,03-1,11)	Protein tüketimi	0,018	1,07 (1,01-1,13)
-	-	-	Karbonhidrat tüketimi	0,008	1,02 (1,01-1,03)
-	-	-	Yağ tüketimi	0,040	1,03 (1,00-1,07)

Modele dahil edilen değişkenler: Yaş, önceki gebelik, spontan abortus, canlı doğum, ölü doğum, makrozomik bebek öyküsü, gebelik öncesi VKİ>25 kg/m<sup>2</sup> olması, gebelikte ağırlık artışı, ailede diyabet; halen sigara kullanmak; enerji, karbonhidrat, protein, yağ, lif, çoklu doymamış yağ tüketimi  
(OR: Odds ratio, GA: Güven aralığı, VKİ: Vücut kitle indeksi)

OGTT sırasındaki medyan kilosunun da NGT grubundan daha yüksek olduğu saptanmıştır (p=0,001). Farklı lojistik regresyon analizi modellerinde gebelik öncesi VKİ'nin >25 kg/m<sup>2</sup> olması GDM veya GGİT riskini 3,4 (%95 GA: 1,48-8,02, p=0,004) kat; yalnız başına GDM riskini ise 5,4 (%95 GA: 1,80-16,24, p=0,002) kat artırmakla ilişkili bulunmuştur.

Gebelik öncesindeki VKİ'nin gebelikte oluşabilecek olumsuz sonuçlara etkisini araştıran bir çalışmada; gebelik öncesi VKİ'nin %10 artmasının, GDM riskinde en az %10 oranında artış ile ilişkili olduğu saptanmıştır (12). Ehrlich ve ark.'nın yapmış olduğu bir araştırmada; iki gebelik arasındaki VKİ artışının GDM riskini artırabileceği; VKİ'deki azalmanın ise özellikle aşırı kilolu/obez kadınlarda koruyucu olabileceği sonucuna varılmıştır (13).

Hedderson ve ark.'nın çalışmasında gebeliğin özellikle erken döneminde fazla kilo alınmasının, GDM riskini artırabileceği sonucuna varılmıştır (14). Gebelikler arası kilo değişiminin perinatal sonuçlar üzerindeki risklerinin araştırıldığı bir çalışmada; birinci ve ikinci hamilelik arasındaki kilo alınımının düşük kilolu ve normal kilolu kadınlarda bile perinatal komplikasyon riski artışı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (15). Bir başka çalışmada, gebelik öncesi obezite, aşırı gestasyonel kilo artışı ve GDM'nin tümü; artmış sezaryen, doğum ağırlığının gebelik yaşına göre fazla olması (large for gestational age: LGA) ve makrozomi oranları ile ilişkili bulunmuştur (16).

Çalışmamızda GGİT ve GDM gruplarında gebelik sırasında ortalama kilo artışları NGT olan gruptan nümerik olarak daha fazla bulunmuştur (NGT, GGİT ve GDM gruplarında sırasıyla 7,5±5,3 kg, 9,6±5,5 kg ve 8,2±5,2 kg, p=0,148). Bununla beraber kilo artışları arasındaki fark; NGT grubunda GDM tarama testinin diğer iki gruba nispetle daha erken yapılmış olması ile ilişkili olabilir (medyan gebelik

haftası; NGT, GGİT ve GDM gruplarında sırasıyla 26 hafta, 28 hafta ve 29 hafta, p=0,001). Bu durum, GDM ya da GGİT bulunan gebelerde diyabet farkındalığının muhtemelen daha düşük olması ile açıklanabilir.

Çalışmamızda; GDM ve GGİT gruplarının ailelerinde diyabet öyküsü görülme oranının NGT grubundan anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır (p=0,001). Yang ve ark.'nın çalışmalarında; ailede diyabet öyküsü olmasının GDM riskinin artmasıyla ilişkili olduğunu bildirmiş ve ailesinde T2DM öyküsü olan kadınların GDM riskinin ailesinde T2DM öyküsü olmayan kadınlara kıyasla iki kat daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (11).

Çalışmamızda yer alan GDM ve GGİT gruplarında iri bebek öyküsü görülme oranı istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte dikkat çekici düzeyde yüksek bulunmuştur (p=0,059). Farklı lojistik regresyon analizi modellerinde; gebenin daha önce iri bebek doğurmuş olması GDM veya GGİT riskini 17,1 (%95 GA:1,45-201,34, p=0,024) kat; yalnız başına GGİT riskini ise 11,7 (%95 GA: 1,014-136,02, p=0,049) kat artırmakla ilişkili bulunmuştur.

Kim ve ark.'nın bir çalışmasında LGA prevalansı; gestasyonel kilo alımı yeterli, normal kilolu ve GDM olmayan kadınlarda %5,7 bulunmuşken; VKİ≥25 kg/m<sup>2</sup> olan, gebelikte aşırı kilo alan ve GDM'li kadınlarda sırasıyla %12,6, %13,5 ve %17,3 bulunmuştur. Bu sonuçlara göre GDM olması, fazla kiloluluk/obezite ve gebelikte aşırı kilo alınımının LGA ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (17).

Çalışmamızda GGİT ve GDM gruplarında sigara kullanım oranı NGT grubundan nümerik olarak daha yüksek bulunmuştur. Lojistik regresyon modeline göre; gebenin sigara içmesi GGİT riskinin 6,6 (%95 GA:1,00-44,50, p=0,050) kat artması ile ilişkili bulunmuştur.

Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir çalışmada gebeliği sırasında sigara içen daha önce doğum yapmamış kadınlarda 50 g glukoz sonrası 1 saat PG, sigara içmeyen kadınlara göre daha yüksek bulunmuş (sigara içen kadınlarda 112,6 mg/dl, sigara içmeyenlerde 108 mg/dl), aynı çalışmada sigara içen kadınlarda GDM riskinin %90 oranında arttığı bildirilmiştir (18). Çin'de yapılan bir çalışmada ise pasif sigara maruziyeti yaşayan kadınlarda GDM riski, pasif maruziyet yaşamayan kadınlara göre daha yüksek; sigara içen kadınlarda GDM sıklığı daha yüksek bulunmuştur (%7,9 vs. %6,3) (19).

Çalışmamızda GDM ve GGİT gruplarının günlük protein tüketim miktarları, NGT grubundan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p=0,001$ ). Farklı lojistik regresyon analizi modellerinde günlük protein tüketim miktarındaki her bir gramlık artış; GDM veya GGİT riskini %10 (%95 GA: 1,06-1,13,  $p<0,001$ ), yalnız başına GGİT riskini %7 (%95 GA: 1,03-1,11,  $p<0,001$ ), yalnız başına GDM riskini ise %7 (%95 GA: 1,01-1,13,  $p=0,018$ ) artırmakla ilişkili bulunmuştur.

Liang ve ark.'nın gebelik öncesi ve süresince protein alımının GDM riski ile ilişkisini inceleyen bir çalışmasında; gebeliğin ortalarında yüksek toplam proteinli ve yüksek hayvansal proteinli beslenmenin Çinli kadınlarda GDM riskinin artması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Hamilelik öncesi veya hamilelik döneminde bitkisel protein tüketimi GDM riski ile ilişkili bulunmamıştır. Ayrıca gebeliğin ortasında daha yüksek et ya da süt tüketimi olan katılımcıların daha yüksek GDM riski taşıdığı sonucuna varılmıştır (20). Çin'de yapılan gebelik sırasında düşük karbonhidratlı diyet ile glukoz metabolizması arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışmada ise; yüksek hayvansal protein ve yağ içeren düşük karbonhidratlı bir diyet modelinin, Çinli hamile kadınlarda daha yüksek yemek sonrası bir saatlik glukoz seviyeleri ile ilişkili olduğu gözlenmiştir (21).

Çalışmamızda gruplar arası bitkisel protein alımı kıyaslamasında GDM ve GGİT gruplarının bitkisel protein alım miktarı, normal olan gruba göre anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır ( $p=0,001$ ). Çalışmamızın kesitsel tasarımı nedeniyle sebep sonuç ilişkisine varmak zordur.

Son on yılda yapılan araştırmalar anne adayının gebelik sırasında enerji-yoğun, yağdan zengin, karbonhidrat ve liften fakir ve glisemik yükü yüksek diyetler gibi yanlış beslenme biçimlerinin GDM riskini artırdığını ortaya koymuştur (22-24). Annenin yeme alışkanlıkları ile GDM gelişme riski arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışmada; hamileliğin ilk yarısı ve hamilelik öncesinde "Batı beslenme modeli" ve toplam yağ ve doymuş yağ asidinden yüksek enerji alımının, GDM gelişme riskinin artmasına katkıda bulunabileceği sonucuna varılmıştır (25).

Çalışmamızda grupların günlük enerji alımı ve tükettikleri yağ ve karbonhidrat miktarları arasında istatistiksel olarak

anlamlı farklılıklar saptanmıştır. Genel olarak GDM grubunun enerji alımı ile birlikte yağ (özellikle doymuş yağ ve kolesterol) ve karbonhidrat tüketimi; GGİT olan grubun ise enerji alımı ile birlikte kolesterol ve karbonhidrat tüketimi NGT'li gruptan daha yüksektir. Ancak lojistik regresyon analizi modelleri oluşturulduğunda günlük yağ ve karbonhidrat tüketim miktarları yalnızca GDM riski ile pozitif ilişkili bulunmuştur. Buna göre günlük yağ tüketimindeki her bir gramlık artış GDM riskini %3 (%95 GA:1,00-1,07,  $p=0,040$ ) ve günlük karbonhidrat tüketimindeki her bir gramlık artış ise GDM riskini %2 (%95 GA:1,01-1,03,  $p=0,008$ ) oranında artırmakla ilişkilidir.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler yağ tüketim miktarının yüksek olmasının GDM üzerinde etkili olduğunu bildiren literatürdeki çalışmaları desteklemektedir (22, 23). Ancak karbonhidrat ve lif tüketimi için ise tam tersi durum geçerlidir. Karbonhidrat ve lif tüketimi GDM grubunda diğer gruplara göre beklendiğinden yüksek olmuştur. Şüphesiz bu değerler hasta beyanına dayanmakta olup çalışmaya katılan gebelerin subjektif olarak yedikleri miktarları yanlış yorumlamış olmaları ihtimal dahilindedir.

Gebeliğin 24-28. haftalarında besin alımı değerlendirilen 3060 Çinli gebeyi kapsayan bir kohort çalışmasında He ve ark. diyet lifi alımının ve bitkisel kaynaklı beslenme modelinin GDM gelişme riski ile karşıt (negatif) ilişkili olduğunu göstermiştir (26). Diğer bir çalışmada ise bu konuda çelişkili bir sonuç verilmiştir. GDM'li kadınlarda yapılan bir pilot çalışma yüksek lifli diyetlerin düşük glukoz düzeyleriyle ilişkili olmadığını göstermiştir (27).

Bizim çalışmamızda günlük lif alımı genel olarak tüm gruplarda önerilenin altında olmakla birlikte; özellikle GDM grubunda biraz daha yüksektir. Bu yüzden bizim sonuçlarımıza göre diyet lifi alımının GDM riskini azalttığına dair bir sonuca varamayız. GDM grubunda lif alımının yüksek olmasının nedeni GGİT ve NGT gruplarına göre total kalori ve karbonhidrat alımının GDM grubunda daha yüksek olmasından kaynaklanabilir. Bu durum besin tüketim sıklığı incelendiğinde mikro besin öğelerinin genellikle GDM grubunda daha yüksek çıkmasını da açıklayabilir.

Katılımcı sayımızın kısıtlı (her grupta 60 hasta) olması ve takip süresinin yedi güne sınırlı olması nedeniyle çalışmamızın sonuçlarını genellemek doğru olmayabilir. Konu hakkında daha net sonuçların elde edilmesi adına çok sayıda hastanın dahil edildiği ve daha uzun süre takip edilmiş çalışmalara ihtiyaç vardır.

## SONUÇ

Gebelikte beslenme alışkanlıkları ile GDM veya GGİT gelişimi arasındaki ilişkilerin incelenmesini amaçladığımız çalışmamızda gebenin fenotipik özellikleri, obstetrik öykü ve ailede diyabet öyküsü ile birlikte; beslenme alışkanlıklarının GDM veya GGİT riski ile yakından ilişkili olduğu



sonucuna vardık. Gebenin yaşı, daha önce gebe kalmamış olması ve gebelik öncesi VKİ'nin yüksek olması; ayrıca günlük protein, karbonhidrat ve yağ tüketimi GDM ile ilişkili önemli risk faktörleri iken; gebenin yaşı, daha önce iri bebek doğurmuş olması, halen sigara kullanıyor olması ve günlük protein tüketiminin GGİT için önemli risk faktörleri olduğunu saptadık. Günümüzde popüler olan yüksek proteinli beslenme modeli göz önüne alındığında; yüksek protein alımının hem GDM hem de GGİT açısından risk faktörü olarak belirlenmiş olması dikkat çekicidir.

Çalışmamızdan çıkan sonuçlar; kadınların gebelik öncesinde fazla kiloluluk ya da obeziteden kaçınmaları, sigara kullanmamaları ve erken yaşta gebe kalmaları yönünde eğitilmelerinin GDM riskini azaltmak açısından yararlı olacağını düşündürmektedir.

Sonuç olarak GDM kadar "OGTT'de sadece bir değer yüksek bulunduğu" GGİT de gebe ve fetus için önemli bir sağlık sorunu olarak görülmeli, GDM açısından yüksek riskli gebelere sağlıklı yaşam ve dengeli beslenme konusunda eğitim ve destek verilmelidir.

**Etik Komite Onayı:** Bu çalışma için etik komite onayı İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Tarih: 21.11.2017, No: 1348).

**Bilgilendirilmiş Onam:** Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Çalışma Konsepti/Tasarım- M.Y., İ.S., A.Y., B.Ö., B.D., E.Ö.; Veri Toplama- C.İ., F.Ç.; Veri Analizi/Yorumlama-İ.S.; Yazı Taslağı- M.Y., C.İ., F.Ç., B.D.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- İ.S., A.Y., B.Ö., E.Ö.; Son Onay ve Sorumluluk- M.Y., İ.S., C.İ., F.Ç., A.Y., B.Ö., B.D., E.Ö.

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

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

**Ethics Committee Approval:** This study was approved by the Clinical Research Ethical Committee of the Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine (Date: 21.11.2017, No: 1348).

**Informed Consent:** Written consent was obtained from the participants.

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

**Author Contributions:** Conception/Design of Study- M.Y., İ.S., A.Y., B.Ö., B.D., E.Ö.; Data Acquisition- C.İ., F.Ç.; Data Analysis/ Interpretation- İ.S.; Drafting Manuscript- M.Y., C.İ., F.Ç., B.D.; Critical Revision of Manuscript- İ.S., A.Y., B.Ö., E.Ö.; Final Approval and Accountability- M.Y., İ.S., C.İ., F.Ç., A.Y., B.Ö., B.D., E.Ö.

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

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


## KAYNAKLAR/REFERENCES

1. Silva-Zolezzi I, Samuel TM, Spieldenner J. Maternal nutrition: opportunities in the prevention of gestational diabetes. *Nutr Rev* 2017;75(Suppl. 1):32-50. [CrossRef]
2. Zhang C, Ning Y. Effect of dietary and lifestyle factors on the risk of gestational diabetes: review of epidemiologic evidence. *Am J Clin Nutr* 2011;94(6 Suppl.):1975S-9S. [CrossRef]
3. Satman İ, Salman S, İmamoğlu Ş, Dinççağ N, Deyneli O, Sönmez YA, et al. TEMD Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Kılavuzu. 12. Baskı, Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği (TEMED) Yayınları, Ankara; 2019. Retrieved from <http://www.temd.org.tr>
4. Özdemir Ö, Sarı ME, Arpacı Ertuğrul F, Selimova Şakar V, Özcanlı G, Atalay C. Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği'ne başvuran gebelerde gestasyonel diyabet sıklığı. *Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst* 2014;24(1):24-9.
5. Özyurt R, Aşıcıoğlu O, Gültekin T, Güngördük K, Boran B. İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği'ne başvuran gebelerde gestasyonel diyabet sıklığı. *JOPP Derg* 2013;5(1):7-12.
6. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, Ninth edition, IDF Publ. Brussels, 2019. Available at [https://www.diabetesatlas.org/upload/resources/material/20200302\\_133351\\_IDFATLAS9e-final-web.pdf](https://www.diabetesatlas.org/upload/resources/material/20200302_133351_IDFATLAS9e-final-web.pdf). Erişim: 25 Nisan 2021.
7. Rasmussen L, Wolff Poulsen C, Kampmann U, Smedegaard SB, Ovesen PG, Fuglsang J. Diet and healthy lifestyle in the management of gestational diabetes mellitus. *Nutrients* 2020;12(10):3050. [CrossRef]
8. Ho TC, Yan YH, Lu MC, Yu CW, Wang P. Influence of medical nutrition therapy on borderline glucose intolerance in pregnant Taiwanese women. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2016;29(7):1181-6. [CrossRef]
9. Shin D, Lee KW, Song WO. Dietary patterns during pregnancy are associated with risk of gestational diabetes mellitus. *Nutrients* 2015;7(11):9369-82. [CrossRef]
10. Lean SC, Derricott H, Jones RL, Heazell AEP. Advanced maternal age and adverse pregnancy outcomes: A systematic review and meta-analysis. *Plos One* 2017;12(10):1-15. [CrossRef]
11. Yang H, Wei Y, Gao X, Xu X, Fan L, He J, et al. Risk factors for gestational diabetes mellitus in Chinese women - a prospective study of 16 286 pregnant women in China. *Diabetic Med* 2009;26:1099-04. [CrossRef]
12. Schummers L, Hutcheon JA, Bodnar LM. Risk of adverse pregnancy outcomes by prepregnancy body mass index: a population-based study to inform prepregnancy weight loss counseling. *Obstet Gynecol* 2016;125(1):133-43. [CrossRef]
13. Ehrlich SF, Hedderson MM, Feng J, Davenport ER. Change in body mass index between pregnancies and the risk of gestational diabetes in a second pregnancy. *Obstet Gynecol* 2012;117(6):1323-30. [CrossRef]
14. Hedderson MM, Gunderson EP, Ferrara A. Gestational weight gain and risk of gestational diabetes mellitus. *Obstet Gynecol* 2011;115(3):597-604. [CrossRef]
15. Bogaerts A, Van den Bergh BRH, Ameye L, Witters I, Martens E, Timmerman D, et al. Interpregnancy weight change and risk for adverse perinatal outcome. *Obstet Gynecol* 2013;122(5):999-1009. [CrossRef]

16. Su WJ, Chen YL, Huang PY, Shi XL, Yan FF, Chen Z, et al. Effects of prepregnancy body mass index, weight gain, and gestational diabetes mellitus on pregnancy outcomes: A population-based study in Xiamen, China, 2011-2018. *Ann Nutr Metab* 2019;75(1):31-8. [\[CrossRef\]](#)
17. Kim SY, Sharma AJ, Sappenfield W. Association of maternal body mass index, excessive weight gain, and gestational diabetes mellitus with large-for-gestational-age births. *Obstet Gynecol* 2015;123(4):737-44. [\[CrossRef\]](#)
18. England LJ, Levine RJ, Qian C, Soule LM, Schisterman EF, Yu KF, et al. Glucose tolerance and risk of gestational diabetes mellitus in nulliparous women who smoke during pregnancy. *Am J Epidemiol* 2004;160(12):1205-13. [\[CrossRef\]](#)
19. Leng J, Wang P, Shao P, Zhang C, Li W, Li N, et al. Passive smoking increased risk of gestational diabetes mellitus independently and synergistically with pre-pregnancy obesity in Tianjin, China. *Diabetes Metab Res Rev* 2017;33(3). [\[CrossRef\]](#)
20. Liang Y, Gong Y, Zhang X, Yang D, Zhao D, Quan L. Dietary protein intake, meat consumption, and dairy consumption in the year preceding pregnancy and during pregnancy and their associations with the risk of gestational diabetes mellitus: a prospective cohort study in Southwest China. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018;9:596. [\[CrossRef\]](#)
21. Chen Q, Chen Y, Wu W, Tang N, Wang D, Chen Y, et al. Low-carbohydrate-diet and maternal glucose metabolism in Chinese pregnant women. *Br J Nutr* 2020;1-9. [\[CrossRef\]](#)
22. Saldana TM, Siegariz AM, Adair LS. Effect of macronutrient intake on the development of glucose intolerance during pregnancy. *Am J Clin Nutr* 2004;79:479-86. [\[CrossRef\]](#)
23. Zhang C, Liu S, Solomon C, Hu F. Dietary fiber intake, dietary glycemic load, and the risk for gestational diabetes. *Diabetes Care* 2006;29(10):2223-30. [\[CrossRef\]](#)
24. Aminianfar A, Soltani S, Hajianfar H, Azadbakht L, Shahshahan Z, Esmailzadeh A. The association between dietary glycemic index and load and risk of gestational diabetes mellitus: a prospective study. *Diabetes Res Clin Pract* 2020;170:108469. [\[CrossRef\]](#)
25. Mizgier M, Jarzabek-Bielecka G, Mruczyk K. Maternal diet and gestational diabetes mellitus development. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2021;34(1):77-86. [\[CrossRef\]](#)
26. He J, Yuan M, Chen N, Lu J, Hu C, Mai W, et al. Maternal dietary patterns and gestational diabetes mellitus: a large prospective cohort study in China. *British Journal of Nutrition* 2015;113(8):1292-300. [\[CrossRef\]](#)
27. Georgoulis M, Kontogianni MD, Yiannakouris N. Mediterranean diet and diabetes: prevention and treatment. *Nutrients* 2014;6(4):1406-23. [\[CrossRef\]](#)

# OKUL ÖNCESİ ASTIMLI ÇOCUKLARDA YATMADAN ÖNCEKİ BESLENME: ÜST SOLUNUM YOLU SEMPTOMLARINI VE ASTIM KONTROLÜNÜ ETKİLER Mİ?

## FEEDING BEFORE BEDTIME IN PRESCHOOL CHILDREN WITH ASTHMA: DOES IT AFFECT UPPER RESPIRATORY SYMPTOMS AND ASTHMA CONTROL?

Ayşe SÜLEYMAN<sup>1</sup> , Esra ÖZEK YÜCEL<sup>1</sup> , Zeynep HIZLI DEMİRKALE<sup>1</sup> , Sevgi SİPAHİ ÇİMEN<sup>1</sup> ,  
Cevdet ÖZDEMİR<sup>1,2</sup> , Zeynep TAMAY<sup>1</sup> , Nermin GÜLER<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim dalı, Çocuk İmmunoloji ve Allerji Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye  
<sup>2</sup>İstanbul Üniversitesi, Çocuk Sağlığı Enstitüsü, Pediatrik Temel Bilimler Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

**ORCID IDs of the authors:** A.S.0000-0002-9190-6849; E.Ö.Y. 0000-0003-3712-2522; Z.H.D. 0000-0001-6159-9895; S.S.Ç. 0000-0003-3026-0906; C.Ö. 0000-0002-9284-4520; Z.T. 0000-0002-3200-5493; N.G. 0000-0002-9702-0491

**Cite this article as:** Suleyman A, Ozek Yucel E, Hizli Demirkale Z, Sipahi Cimen S, Ozdemir C, Tamay Z, et al. Feeding before bedtime in preschool children with asthma: does it affect upper respiratory symptoms and asthma control? J Ist Faculty Med 2021;84(3):386-95. doi: 10.26650/IUITFD.2020.0031

### ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmada amacımız okul öncesi astımlı çocuklarda yatmadan önceki son beslenme saati, uykuda beslenmeleri, gece yatma saati, sabah kalkma saati ve sosyal çevresi ile ilgili faktörlerin üst solunum yolu semptomları ve astım kontrolü üzerindeki etkilerini araştırmaktır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışma, okul öncesi astımlı çocuklar ile benzer cinsiyet, yaş dağılımına sahip sağlıklı çocuklarda yapıldı.

**Bulgular:** Çalışma grubuna 103'ü (%47,5) astım, 114'ü (%52,5) sağlıklı olmak üzere 217 çocuk alındı. Gece yatmadan önce son 2 saat içinde beslenme sıklığı astımlı çocuklarda %47,6 iken sağlıklı çocuklarda %82,5 idi ( $p<0,001$ ). Astımlı çocuklarda yatmadan 0-2 saat içinde beslenme ile ses kısıklığı ( $r=0,429$ ,  $p=0,001$ ), horlama ( $r=0,430$ ,  $p=0,001$ ), burun akıntısı ( $r=0,429$ ,  $p=0,001$ ) ve burun tıkanıklığı ( $r=0,469$ ,  $p=0,001$ ) arasında pozitif yönde korelasyon vardı. Sağlıklı çocuklarda ise yatmadan 0-2 saat arasında beslenme ile horlama ( $r=0,227$ ,  $p=0,016$ ) ve otit sayısı ( $r=0,294$ ,  $p=0,002$ ) pozitif yönde korelasyon vardı. Kontrolsüz astım için risk faktörleri çocuğa anne dışında birinin bakması, çocuğun sabah geç uyanması ve gece uyanma sıklığı idi.

**Sonuç:** Okul öncesi astımlı çocuklarda yatmadan 0-2 saat içinde beslenme üst solunum yolu semptomalarında artışa neden olabileceğinden kaçınılmalıdır.

**Anahtar Kelimeler:** Astım, okul öncesi çocuk, uyku

### ABSTRACT

**Objective:** In this study, our aim was to investigate the effects of feeding habits such as the last feed before bedtime, feeding during sleep, bedtime, waking time and factors associated with the social environment on upper airway tract symptoms and asthma control.

**Material and Method:** The study was conducted on children with preschool asthma and their age and sex matched healthy children.

**Results:** The study group included 217 children, 103 of whom have asthma and 114 were (52.5%) healthy. The frequency of feeding in the last 2 hours before going to bed was 47.6% in children with asthma and 82.5% in healthy children ( $p<0.001$ ). In children with asthma, there was a positive correlation between feeding within 0-2 hours before going to bed and hoarseness ( $r=0.429$ ,  $p=0.001$ ), snoring ( $r=0.430$ ,  $p=0.001$ ), rhinorrhea ( $r=0.429$ ,  $p=0.001$ ) and nasal congestion ( $r=0.469$ ,  $p=0.001$ ). In healthy children, the same positive correlation was detected with snoring ( $r=0.227$ ,  $p=0.016$ ) and the number of otitis ( $r=0.294$ ,  $p=0.002$ ). Caregivers other than mothers, the late awakening and the number of wake-ups during night were determined as risk factors for uncontrolled asthma.

**Conclusion:** Not feeding in 0-2 hours before bedtime seems to be advisable for asthmatic preschool children since it can cause an increase in upper respiratory symptoms.

**Keywords:** Asthma, preschool children, sleep

İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: draysesuleyman@yahoo.com

Başvuru/Submitted: 02.04.2020 • Kabul/Accepted: 15.06.2020 • Online Yayın/Published Online: 12.07.2021



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

## GİRİŞ

Astımda semptomların gece arttığı ve atakların da daha çok gece olduğu bilinmektedir (1). Astımlı hastalarda gastroözofageal reflü (GER) önemli bir komorbidite olarak bildirilmektedir (2). Astımın gece kötüleşmesinde hastalığın sirkadiyen özellik göstermesi, uykuda vagal tonusun artması, kortizol düzeyinin gece düşmesi ve astımın önemli bir komorbiditesi olan reflünün gece kötüleşmesi öne sürülen sebeplerden bazılarıdır (1, 2). Sağlıklı çocuklarda yatmadan önce beslenme önerilebilse de astımlı hastalarda semptomlara yol açabileceği de bir gerçektir (2, 3). Yatmadan hemen önce beslenmenin bir sakıncası da kalori alımının artması ve azalmış uyku süresidir (4).

Astım semptomlarındaki günlük değişim ve gece semptomları göz önüne alındığında, astımlı okul öncesi çocuklarda gece yatma ve sabah kalkma saatlerinin sağlıklı çocuklardan daha farklı olabileceği düşünülebilir. Bu hastalarda yatmadan hemen önce beslenme uyku kalitesini ve süresini de etkileyebilir. Beslenme ve uyku sirkadiyen ritmi etkileyebileceği gibi astım semptomlarını da etkileyebilir. Bildiğimiz kadarı ile astımlı okul öncesi çocukların gece uyuma saati, sabah uyanma saati, gece uyumadan önceki son beslenme zamanı gibi tutum ve davranışları ile üst solunum yolu semptomları ve astım kontrol düzeyinin arasındaki ilişkinin değerlendirildiği bir çalışma yoktur.

Bu çalışmada amacımız astım tanılı okul öncesi çocukların uyku ve gece beslenme alışkanlıkları ile üst solunum yolu semptomları arasındaki ilişkiyi ve bu faktörlerin astım kontrol düzeyine etkisinin değerlendirilmesidir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya İstanbul Tıp Fakültesi, Çocuk İmmünolojisi ve Alerji Hastalıkları Bilim Dalı'ndan astım tanısı ile izlenen ve düzenli kontrol edici tedavi alan 5 yaş ve altı çocuklar alındı. Kontrol grubu olarak Çocuk Sağlığı İzlem Polikliniği'nden takipli altta yatan herhangi bir kronik hastalığı olmayan çocuklar ve hastane çalışanlarımızın sağlıklı çocukları alındı. Ey-

lül 2019 ve Kasım 2019 tarihleri arasında prospektif kesitsel bir araştırma olarak yapıldı. Çalışmanın Etik onamı, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulundan alındı (Tarih: 24.04.2019, No: 667).

### Dahil edilme kriterleri

Çalışmaya 5 yaş altı astım tanısı ile takipli veya yeni tanısı konan ve çalışmaya katılmaya rıza gösteren ailelerin çocukları alındı.

### Dışlama kriterleri

Altta yatan astım dışında kronik hastalığı olanlar (kistik fibrozis, bronkopulmoner displazi, primer siliyer diskinezi, primer immün yetmezlik, kardiyasküler hastalık ve obliteran bronşiolit vb.), obezitesi olanlar (vücut kitle indeksi (VKI) >95 persantil ve tartısı >97 persantil), kronik ilaç kullanımını gerektirecek hastalığı olanlar, okur yazar olmayan veya anketi cevaplayabilecek düzeyde Türkçe bilmeyen hastalar çalışma dışı bırakıldı.

Astım tanısı, kontrol edici tedavi başlama endikasyonları ve son dört haftalık kontrol düzeyi uluslararası rehber GINA (Global Initiative for Asthma 2019) kriterlerine göre değerlendirildi. Kontrol düzeyinin değerlendirilmesi son dört haftada gündüz semptomları, aktivite kısıtlaması, semptom giderici ilaç ihtiyacı, astıma bağlı gece öksürüğü veya gece uyanması değerlendirilerek yapıldı. Hiçbiri yok ise kontrol altında olarak değerlendirildi (GINA 2019, Tablo 1).

Verilerin toplanmasında çocukların yaşı, güncel tartı ve boyu, kardeş sayısı, çocuğun bakımını kimin verdiği, anne sütü ile beslenme süresi ve ek gıda başlama yaşı, gece yatmadan önceki son beslenme zamanı, gece yatma saati, sabah kalkma saati ve uyku süresi, uykuda beslenme sayısı, horlama, burun akıntısı, burun tıkanıklığı, doktor tanılı otit geçirme öyküsü, son dört hafta için astımın tam kontrol altında olup olmadığı ile ilgili soruları içeren anket formu hazırlandı. Pilot uygulama olarak anket formu rastgele seçilen 20 hasta annesine doldurtuldu ve soruların anlaşılabilir olduğu görüldü. Tüm anket formları birimizde çocuğun annesi tarafından gözetim altında dolduruldu.

**Tablo 1:** Son dört haftalık astım kontrol düzeyi (5)

Son 4 haftada, çocukta bu bulgular oldu mu?	E	H	Kontrol altında	Kısmen kontrol altında	Kontrol altında değil
· Haftada birden fazla, birkaç dakikadan uzun süren gündüz semptomları					
· Astıma bağlı herhangi bir aktivite kısıtlaması (Diğer çocuklara göre daha az oynuyor/ koşuyor, diğer çocuklara göre daha kolay yoruluyor)			Hiçbiri	1-2 tanesi	3-4 tanesi
· Haftada 1'den daha sık semptom giderici ilaç ihtiyacı					
· Astıma bağlı gece öksürüğü veya gece uyanması					

E: evet, H: hayır

## İstatistiksel inceleme

İstatistiksel analiz için SPSS paket programı 23.0 (IBM Corp. Released 2015. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY.) kullanıldı. Kategorize olan verilerin karşılaştırılmasında Pearson chi-Square test veya Fisher's exact test kullanıldı. Sürekli değişkenler için dağılımın normal olup olmadığını değerlendirmek için Kolmogorov Smirnov testi ve Shapiro Wilks testi ile skewness- kurtosis kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen verilerin karşılaştırılmasında nonparametrik testler (Kruskall -Wallis veya Mann Whitney U testi) kullanıldı. Sürekli değişkenlerden normal dağılım göstermeyenler medyan ve çeyrekler arası açıklık (interquartile range, IQR) veya range (maksimum-minimum) olarak verildi. Uykudan önce ve uyku sırasında beslenme alışkanlıkları, yatma-kalkma saatleri, uyku süresi bunu etkileyen sosyal faktörler ile üst solunum yolu semptomları arasındaki ilişki yaş kontrollü parsiyel korelasyon analizi ile değerlendirildi. Kontrolsüz astım risk faktörlerini belirlemek için lojistik regresyon analizi yapıldı. İstatistiksel anlamlılık için  $p < 0,05$  olarak kabul edildi.

## BULGULAR

Çalışmaya astım grubunda 103 (55 erkek, 48 kız), sağlıklı çocuk grubunda 114 (57 erkek, 57 kız) olmak üzere toplam 217 çocuk alındı. Astımlı ve sağlıklı çocuklarda medyan yaş 2 yıl idi, her iki grup arasında cinsiyet, anne eğitim düzeyi, kardeş sayısı, kreşe gitme, anne sütü alma açısından bir fark yoktu. Astımlı çocuklarda gündüzleri çocuğa annenin bakım veriyor olması anlamlı olarak daha yüksekti ( $p < 0,001$ ). Astımlı ve sağlam çocukların özellikleri Tablo 2'de verilmiştir.

Astımlı çocuklarda sağlıklı çocuklara göre horlama, beslenme sonrası ses kısıklığı, öksürük, burun tıkanıklığı, burun akıntısı şikayeti anlamlı olarak daha fazla idi. Astımlı çocukların gece yatmadan önceki son iki saat içinde beslenme sıklığı daha düşük, gece yatma saati daha geç, sabah uyanma saati daha erken, gece uyku süreleri daha kısa ve uyanma sıklığı da anlamlı olarak daha fazla idi. Çocukların uyku düzenleri, uyku ile ilişkili beslenme alışkanlıkları ile üst solunum yolu semptomlarının sıklıklarının karşılaştırılması Tablo 3'te verilmiştir.

Astımlı çocuklar gece beslenme alışkanlıkları açısından kendi aralarında karşılaştırıldıklarında; gece yatmadan önceki son iki saat içinde beslenenlerde ses kısıklığı ( $p < 0,001$ ), horlama ( $p < 0,001$ ), burun akıntısı ( $p < 0,001$ ), burun tıkanıklığı ( $p < 0,001$ ) anlamlı olarak daha fazla idi. Sağlıklı çocuklar kendi aralarında karşılaştırıldıklarında ise bu şekilde beslenenlerde uyku süresi daha uzun ( $p = 0,012$ ), horlama ( $p = 0,004$ ), burun akıntısı (0,040) ve gece boyunca en az bir kez ek olarak beslenme ( $p = 0,002$ ) sıklığı daha fazla idi; gece yatmadan önce beslenenlerin yaşı daha küçüktü ( $p < 0,001$ ). Astımlı ve sağlam çocukların yatmadan önceki son beslenme saatlerine göre uyku düzenleri, uyku ile ilişkili beslenme alışkanlıkları ve üst solunum yolu semptom sıklıkları Tablo 4'te verilmiştir.

**Tablo 2:** Astımlı ve sağlıklı çocukların sosyal özelliklerinin karşılaştırılması

	Astımlı n=103	Sağlıklı n=114	p
Yaş, medyan, (IQR) yıl	2 (1-3)	2 (1-3)	0,977
Erkek cinsiyet, n (%)	55 (53,4)	57 (50)	0,617
Annenin eğitim durumu n (%)			
İlköğretim mezunu	48 (46,6)	46 (40,4)	0,352
İlköğretim üzeri	55 (53,4)	68 (59,6)	
Gündüzleri çocuğun bakıldığı yer			
Kreş	7 (6,8)	14 (12,3)	0,172
Kendi evi	96 (93,2)	100 (87,7)	
Gündüzleri bakım veren kişi			<b>&lt;0,001</b>
Anne	82 (79,6)	55 (48,2)	
Anne dışında	21 (20,4)	59 (51,8)	
Kardeş sayısı, medyan, (IQR)	2 (1-3)	2 (1-2)	0,446
Ailedeki fert sayısı, medyan (IQR)	5 (4-6)	5 (4-6)	0,953
Toplam anne sütü alma (ay), medyan, (IQR)	12 (6-22)	12 (7-15)	0,362

IQR: İnterquartile range (25-75p)

Astımlı çocuklarda gece yatmadan önce son iki saat içindeki beslenme ile; horlama, burun tıkanıklığı, burun akıntısı, ses kısıklığı arasında pozitif yönde korelasyon saptandı. Sağlıklı çocuklarda ise böyle bir ilişki sadece horlama ve otit sayısı için bulundu (Tablo 5). Annenin eğitim düzeyi ile çocuğun beslenme şekli arasında bir ilişki saptanmadı.

## Astımlı hastalarda astım kontrolüne ait verilerin değerlendirilmesi

Astımlı çocukların son dört haftalık astım kontrol düzeyi değerlendirildiğinde 30'unda (%29,1) astım tam kontrol altında, 40'ı (%38,8) kısmi kontrolü, 33'ü (%32) ise kontrol altında değildi (Tablo 6). Kontrolsüz grupta annenin ilköğretim mezunu olması anlamlı olarak daha fazla idi ( $p = 0,017$ ). Ayrıca kontrolsüz grubun gece yatma saatleri daha geç ( $p < 0,001$ ) ve uyku süreleri daha kısa ( $p < 0,001$ ) idi.

Kontrolsüz astım ile uyku süresi ( $r = -0,686$ ,  $p < 0,001$ ), ve sabah kalkma saati ( $r = -0,452$ ,  $p < 0,001$ ) arasında negatif korelasyon, gece yatma saati ( $r = 0,444$ ,  $p < 0,001$ ), gece uyanma sayısı ( $r = 0,236$ ,  $p = 0,016$ ), annenin ilköğretim mezunu olması ( $r = 0,276$ ,  $p = 0,005$ ) gündüzleri anne dışında birinin bakım vermesi ( $r = 0,272$ ,  $p = 0,005$ ) arasında ise pozitif yönde korelasyon saptandı (Tablo 7).

**Tablo 3:** Çocukların uyku düzenleri ve uyku ile ilişkili beslenme alışkanlıkları ile üst solunum semptomlarının sıklıklarının karşılaştırılması

	Astımlı n=103	Sağlıklı n=114	p
Akşam yatma saati, medyan (IQR)	23:00 (22:30-23:59)	23:00 (22:00-23:00)	<b>0,004</b>
Sabah kalkma saati, medyan (IQR)	08:00 (07:00-9:00)	09:00 (08:00-09:00)	<b>0,002</b>
Uyku süresi, medyan (IQR) saat	09:00 (08:00-10:00)	10:00 (09:00-11:00)	<b>&lt;0,001</b>
Gece yatmadan önce son beslenme zamanı n (%)			
0-2 saat	49 (47,6)	94 (82,5)	<b>&lt;0,001</b>
>2 saat	54 (52,4)	20 (17,5)	
Yatmadan önce ne ile beslendiği			
Katı veya yarı katı (yoğurt, muhallebi vb.)	33 (67,3)	60 (63,8)	
Sıvı besin (inek sütü, anne sütü, formüla vb.)	16 (32,7)	34 (36,2)	0,676
Uykuda en az bir kez beslenme	43 (41,7)	46 (40,3)	0,835
Gece uyanma sayısı, medyan, IQR	1 (0-1)	0 (0-1)	<b>&lt;0,001</b>
Horlama			<b>0,001</b>
Yok	46 (44,7)	77 (67,5)	
Var	57 (55,3)	37 (32,5)	
Beslenme sonrası ses değişikliği			<b>&lt;0,001</b>
Yok	59 (57,3)	93 (81,6)	
Var	44 (42,7)	21 (18,4)	
Beslenme sonrası öksürük, hırıltı			<b>&lt;0,001</b>
Yok	71 (68,9)	102 (89,5)	
Var	32 (31,1)	12 (10,5)	
Burun akıntısı			<b>&lt;0,001</b>
Yok	35 (34)	81 (71,1)	
Var	68 (66)	33 (28,9)	
Burun tıkanıklığı			<b>&lt;0,001</b>
Yok	24 (23,3)	78 (68,4)	
Var	79 (76,7)	36 (31,6)	
Otit sayısı	0 (0-0)	0 (0-1)	0,122

IQR: Interquartile range (25-75p).

Kontrolsüz astım için annenin ilköğretim mezunu olması, gündüzleri çocuğa anne dışında birinin bakması, gece uyanma sayısı ve sabah kalkma saatinin geç olması risk faktörleri olarak belirlendi. Kontrolsüz astım için regresyon analizi Tablo 8'de verilmiştir.

## TARTIŞMA

Bu çalışmada okul öncesi astımlı çocukların uyku düzenlerinin, uyku ile ilgili beslenme alışkanlıklarının ve sosyal özelliklerinin üst solunum yolu semptomları ile ilişkisi, benzer yaş ve cinsiyetteki sağlıklı çocuklarla karşılaştırılarak incelendi. Okul öncesi astımlı hastalarda horlama, burun tıkanıklığı, burun akıntısı, ses değişikliği daha fazla; gece yatmadan son iki saatteki beslenme sıklığı sağlıklı çocuklara göre daha düşük idi. Astımlı hastaların gece

yatma saatleri daha geç, sabah uyanma saatleri daha erken ve toplam uyku süreleri de daha kısa idi. Gece yatmadan önce son iki saat içindeki beslenme alışkanlığı ile solunum semptomları arasındaki ilişki incelendiğinde, astımlı çocuklarda burun akıntısı, burun tıkanıklığı, horlama, ses kısıklığı ile, sağlıklı çocuklarda ise horlama ve geçirilmiş otit sayısı ile pozitif yönde ilişki olduğu gösterildi. Ayrıca annenin ilköğretim mezunu olması, çocuğa gündüzleri anne dışında birinin bakım vermesi, gece uyanma sayısı ve sabah kalkma saatinin geç olması astım kontrolün, etkileyen risk faktörleri olarak belirlendi.

Fizyolojik ve hücrel fonksiyonların 24 saatlik döngü halinde düzenlenmesi sirkadiyen ritim olarak adlandırılmaktadır. Sirkadiyen ritim uyku-uyanıklık döngüsünü senkronize etmenin yanı sıra hastalıkların patogenezi

**Tablo 4:** Çocukların gece yatmadan önce son beslenme saatine göre uyku düzenleri ve uyku ile ilişkili beslenme alışkanlıkları ile üst solunum semptom sıklıklarının karşılaştırılması

		Tanı					
		Sağlıklı			Astımlı		
		Son beslenme zamanı		p	Son beslenme zamanı		p
		0-2 saat	> 2 saat		0-2 saat	> 2 saat	
n=94(%)	n=20(%)		n=49(%)	n=54(%)			
Yaş, medyan, IQR		2 (1-3)	2 (1-4)	<0.001	2 (1-3)	3,5 (2-5)	0,352
Ses kısıklığı	Yok	75 (79,8)	18 (90)	0,359*	17 (34,7)	42 (77,8)	<0,001
	Var	19 (20,2)	2 (10)		32 (65,3)	12 (22,2)	
En az bir kez gece beslenme	Yok	50 (53,2)	18 (90)	<b>0,002</b>	27 (55,1)	33 (61,1)	0,537
	Var	44 (46,8)	2 (10)		22 (44,9)	21 (38,9)	
Horlama	Yok	58 (61,7)	19 (95)	<b>0,004</b>	11 (22,4)	35 (64,8)	<0,001
	Var	36 (38,3)	1 (5)		38 (77,6)	19 (35,2)	
Burun tıkanıklığı	Yok	61 (64,9)	17 (85)	0,079	1 (2)	23 (42,6)	<0,001
	Var	33 (35,1)	3 (15)		48 (98)	31 (57,4)	
Burun akıntısı	Yok	63 (67)	18 (90)	<b>0,040</b>	6 (12,2)	29 (53,7)	<0,001
	Var	31 (33)	2 (10)		43 (87,8)	25 (46,3)	
Otit sayısı, medyan, IQR		0 (0-0)	0 (0-1)	0,689	0 (0-1)	0 (0-1)	0,312
Geçirilmiş otit	Yok	72 (76,6)	16 (80)	0,742	36 (73,5)	30 (55,6)	0,058
	Var	22 (23,4)	4 (20)		13 (26,5)	24 (44,4)	
Yatma saati		23:00 (22:00-23:00)	23:00 (22:00-23:00)	0,278	23:00 (22:30-23:49)	23 (22:00-23:59)	0,172
Uyanma saati		09:00 (08:00-09:00)	08:00 (07:00-09:00)	0,140	08:00 (07:00-09:00)	08:00 (07:00-08:00)	0,208
Uyku süresi, medyan (IQR) saat		10 (9-11)	9 (9-10)	<b>0,012</b>	10 (9-11)	10 (9-10)	0,465
Gece uyanma sayısı, medyan, IQR		0 (0-1)	0 (0-1)	0,462	1 (0-1)	0 (0-1)	0,311

IQR: Interquartile range (25-75p). \*Fisher testi yapıldı.

ve şiddetinde de önemli bir rol oynar. Bu hastalıklardan biri de astımdır. Bu nedenle astımlı hastalarda sirkadiyen ritmin sürdürülebilmesi hastalığın kontrolü üzerine etkili olmaktadır. Sirkadiyen ritmin en önemli düzenleyicisinin ışık olduğu düşünüldüğünde uyuma saatinin geç olması sirkadiyen ritmi etkileyebilmektedir (1, 6).

Beş yaş ve altı sağlıklı çocuklarda uyku alışkanlığı oluşturmak için ninni söyleme, kitap okuma, masaj, diş fırçalama ve beslenme gibi aktiviteler yapılmaktadır. Bunlar arasında özellikle uyku öncesi beslenme çocuklarda sıkça başvurulan bir yöntemdir (3). Yatmadan hemen önceki beslenme ile fazla kalori alınması uyku süresinin kısa olmasına yol açmaktadır (7). Bu nedenle uyku öncesi beslenmede anne sütü veya sıvı içeriği fazla olmayan besinler, fazla kalori alımına yol açmayacak sağlıklı atıştırmalıklar önerilmektedir (8).

Açlık ve uyku sirkadiyen ritmin üzerine etkili ve birbiri ile ilişkili olan süreçlerdir (9). Hayvan deneyleri sirkadiyen ritim bozulması ve uyku yoksunluğunun enerji ve açlık belirtilerini etkileyebileceğini göstermiştir (10). Bu bulgulara paralel olarak tokluğun uykuya geçişe katkıda bulunduğu düşünüldüğünde, özellikle beslenme gereksiniminin ve beslenme sıklığının arttığı erken bebeklik döneminde yatmadan önce beslenmenin uykuyu arttırıcı etkisi olabilir. Ancak yatmadan hemen önce beslenme tartı artışı, uyku süresinin yetersiz olması ve özellikle fazla sıvı içeren besinler alınmışsa uykunun miksiyon ihtiyacı nedeni ile kesilmesi gibi sorunlara da neden olabilmektedir (7). Bu sebeplerle sağlıklı çocuklarda uykuya hazırlık aktivitesi olarak önerilse de astımlı hastalarda solunum yolu semptomlarında artışa neden olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

**Tablo 5:** Çocuklarda gece yatmadan önce son 2 saat içindeki beslenme ile üst solunum yolu semptomları arasında korelasyon analizi

Yaş kontrolünde değişkenler		Astımlı n=103					Sağlıklı n=114				
		Horlama	Burun akıntısı	Burun tıkanıklığı	Otit sayısı	Ses kısıklığı	Horlama	Burun tıkanıklığı	Otit sayısı	Burun akıntısı	Ses kısıklığı
Yatmadan 0-2 saat içinde beslenme	r	<b>0,430**</b>	<b>0,429**</b>	0,469**	AD	<b>0,429**</b>	<b>0,227*</b>	AD	<b>0,294**</b>	AD	AD
	p	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>		<b>0,001</b>	<b>0,016</b>		<b>0,002</b>		
Yatma saati	r	AD	AD	AD	AD	AD	<b>0,189*</b>	<b>0,226</b>	AD	AD	<b>-0,226*</b>
	p						<b>0,044</b>	<b>0,016</b>			<b>0,016</b>
Kalkma saati	r	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD
	p										
Gece uyku süresi	r	AD	<b>0,231*</b>	AD	AD	AD	AD	<b>-0,230*</b>	AD	<b>-0,192</b>	AD
	p		<b>0,020</b>					<b>0,014</b>		<b>0,041</b>	
Gece beslenme	r	AD	AD	AD	AD	AD	<b>0,190*</b>	AD	AD	AD	AD
	p						0,044				
Gece uyanma sayısı	r	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	<b>0,235*</b>	AD	<b>-0,201</b>
	p								<b>0,012</b>		<b>0,033</b>

AD: Anlamli değil, r: korelasyon kat sayısı, \*korelasyon seviyesi 0,05 seviyesinde anlamlı, \*\*korelasyon seviyesi 0,01 seviyesinde anlamlı  
Not: İstatistiksel anlamlı değerler koyu renk ile gösterilmiştir.

Gece astımın kötüleştiği bilinmektedir. Klinik olarak da astım alevlenmelerinin çoğu sabaha karşı saat 04:00 sularında olmaktadır. Bu da astımın sirkadiyen ritim göstermesinden kaynaklanmaktadır (1, 6). Hatta alerjik rinit, atopik dermatit gibi diğer hastalıkların da sirkadiyen ritim gösterdiği bildirilmektedir (11). Astımın bu özelliği göz önüne alındığında bu hastaların gece yatma-sabah kalkma saatleri, uyku süreleri ve gece uyanma sayılarının sağlıklı çocuklardan daha farklı olması beklenen bir sonuçtur. Ayrıca astımda kullanılan glukokortikoidler ve beta<sub>2</sub> agonistlerin de sirkadiyen ritmi etkileyebileceği bildirilmiştir (12, 13). Gece yatma-sabah kalkma saatleri, açlık-tokluk gibi süreçler de doğrudan sirkadiyen ritim üzerine etkili olduğundan astımlı hastalarda sirkadiyen ritmin desenkronize olması da bir kısır döngü yaratarak semptomların daha da kötüleşmesine sebep olabilir (6). Çalışmamızda kontrolsüz astım için risk faktörü olarak belirlediğimiz sabah uyanma saati ve gece boyu uyanma sıklığı hastalığın kontrolünün sirkadiyen ritim ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Astımı kontrol altında olmayan çocuklarda gece semptomları nedeni ile uyku düzeninin bozulması sirkadiyen ritmi kesintiye uğrayabilir, bununla birlikte astımlı çocuklardaki biyolojik saatin işleyişi sağlıklı çocuklardan daha farklı olabilir.

Astımın kendisinin sirkadiyen bir ritim göstermesi ve kontrol altında olmaması nedeni ile sirkadiyen ritmin bozulması, bozulan sirkadiyen ritmin astım kontrolünü daha

da olumsuz etkilemiş olabileceği görüşüne dayanarak astımlı hastalarda tedavinin zamanlaması ve sirkadiyen ritmin senkronizasyonunun sürdürülmesinin önemi dikkat çekmektedir (6, 14). Bu nedenle ritim üzerine doğrudan etkili olabilecek açlık-tokluk, karanlık-aydınlık maruziyeti sebebiyle gece yatma ve sabah kalkma saatleri astımlı hastalarda semptom kontrolünde daha önemli olabilir.

Çalışmamızda astımlı grupta gece yatmadan son iki saat önceki beslenme sıklığı daha az olmasına rağmen burun akıntısı, burun tıkanıklığı ve horlama gibi şikayetler daha fazla saptandı. "Tek hava yolu, tek hastalık" kapsamında bir bütünün parçası olarak astımlı hastalarda bronşiyal aşırı duyarlılığa çoğunlukla üst solunum yollarındaki aşırı duyarlılığın da eşlik etmesi ve üst solunum yolu semptomlarına eğilim olması, ek olarak alerjik rinitin astım komorbiditesi olarak eşlik edebilme olasılığı astımlı çocuklarda bu semptomların daha fazla görülmesine neden olabilir (15, 16). Gece yatmadan önceki beslenme sıklığının astımlı çocuklarda daha düşük olmasının en önemli sebebi astımlı hastalarımızın annelerine beslenme konusunda eğitim vermemizdir.

Astımlı çocuklarda GER'ye sık rastlanmakla birlikte iki hastalık arasındaki nedensellik tartışmalıdır (17). Reflü'nün vagal uyarı yaparak bronkospazmı tetikleyebileceği gibi astımda akciğerlerdeki havalanma artışı ve kullanılan



**Tablo 6:** Astım kontrol düzeyine göre astımlı çocukların özelliklerinin karşılaştırılması

		Son dört haftalık astım kontrol düzeyi			P
		Tam kontrol n= 30	Kısmi kontrol n=40	Kontrolsüz n=33	
Cinsiyet n (%)	Erkek	15 (50)	22 (55)	18 (54,5)	0,906
	Kız	15 (50)	18 (45)	15 (45,5)	
Yaş, medyan (IQR) yıl		1 (1-2,5)	2 (1,5-3)	2 (1-4)	<b>0,038<sup>a</sup></b>
Anne eğitim düzeyi n (%)	İlköğretim	10 (33,3)	16 (40)	22 (66,7)	<b>0,017<sup>a1</sup></b>
	İlköğretim üzeri	20 (66,7)	24 (60)	11 (33,3)	
Çocuğa gündüzleri bakan kişi n (%)	Anne dışında	7 (23,3)	2 (5)	12 (36,4)	<b>0,004<sup>b</sup></b>
	Anne	23 (76,7)	38 (95)	21 (63,6)	
Ek gıdaya başlama zamanı, medyan (IQR), ay		6 (4-6)	6 (6-6)	4 (2-6)	0,469
Toplam anne sütü alma süresi, medyan (IQR) ay		11,5 (6-14)	8 (5-18)	15 (7-24)	0,062
Yatmadan önceki beslenme n (%)	0-2 saat	12 (40)	21 (52,5)	16 (48,5)	0,580
	> 2 saat	18 (60)	19 (47,5)	17 (51,5)	
Yatma saati, medyan (IQR)		22:30 (22:00-23:00)	22:00 (22:00-23:59)	23:59 (23:00-23:59)	<b>&lt;0,001<sup>d</sup></b>
Kalkma saati, medyan (IQR)		08:00 (07:00-08:00)	09:00 (08:00-10:00)	07:00 (07:00-08:00)	<b>&lt;0,001<sup>c</sup></b>
Gece uyku süresi, medyan (IQR) saat		09:30 (08:30-10:00)	09:00 (09:00-11:00)	07:00 (07:30-08:00)	<b>&lt;0,001<sup>d</sup></b>
Gece uyanma sayıları, medyan (IQR)		0 (0-1)	0 (0-1)	1 (0-2)	0,055
Gece beslenme sayıları, medyan (IQR)		1 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0,083

IQR: Inter quartil range (25-75p), a:tam kontrollü ve kısmi kontrollü arasında,a1:tam kontrollü ve kontrolsüz grup arasında, b:kısmi kontrollü ve kontrolsüz grup arasında, c:her üç grup arasında,d:kontrolsüz grup ile diğer ikisi arasında

ilaçlar reflüyü kolaylaştırabilmektedir (2). Çocuklarda reflünün solunumsal şikayetlerle ortaya çıkması yaşa bağlı değişmektedir. Süt çocuklarında stridor ve apne, laringomalazi gibi sorunlara neden olabilirken daha büyüklere otit, sinüzit, lenfoid hiperplazi, ses kısıklığı, vokal kord nodülü, astım ve/veya larenjit gibi semptomlara ve klinik tablolara sebep olabilir. Ancak yaşamın ilk yıllarında fizyolojik reflü de olabilir. Yaşam tarzı değişikliği, kilo vermek, yatmadan önce son 3 saat içinde beslenmekten kaçınmak gibi önlemlerin reflüyü azalttığı randomize kontrollü çalış-

malarda gösterilemese de rehberlerde yerini almıştır ve semptomların kontrolüne faydalı olabileceğini düşünülmektedir (18). Tüm bu bilgiler ışığında gece yatmadan önce beslenme konusunda hastalar bireysel olarak değerlendirilmeli ve buna göre karar verilmelidir.

Kontrolsüz astım için çocuğa anne dışında birinin bakım vermesi risk faktörü olarak saptandı. Bu durum annenin düşük eğitim seviyesi ile ilişkili olarak düşük sağlık okur yazarlığına bağlı olabilir. Astımın düşük sosyoekonomik düzey

**Tablo 7:** Kontrolsüz astım için korelasyon analizi

Değişkenler		Kontrolsüz astım	Kardeş sayısı	Annenin ilkököl mezunu olması	Gündüz anne dışın-da birinin bakması	Horlama	Burun tıkanıklığı	Burun akıntısı	Yaş
Kontrolsüz astım	r	AD	AD	<b>0,276**</b>	<b>0,272**</b>	AD	AD	AD	AD
	p			<b>0,005</b>	<b>0,005</b>				
Yatmadan 0-2 saat içinde beslenme	r	AD	AD	AD	<b>-0,289**</b>	<b>0,426**</b>	<b>0,479**</b>	<b>0,437**</b>	AD
	p				<b>0,003</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	
Yatma saati	r	<b>0,444**</b>	AD	AD	AD	AD	AD	AD	<b>0,232*</b>
	p	<b>0,001</b>							<b>0,019</b>
Kalkma saati	r	<b>-0,452**</b>	AD	AD	<b>-0,301**</b>	<b>0,221*</b>	<b>0,198*</b>	<b>0,195*</b>	AD
	p	<b>0,001</b>			<b>0,002</b>	<b>0,025</b>	<b>0,045</b>	<b>0,048</b>	
Gece uyku süresi	r	<b>-0,686**</b>	AD	AD	<b>-0,358**</b>	AD	AD	<b>0,251*</b>	<b>-0,206*</b>
	p	<b>0,001</b>			<b>0,001</b>			<b>0,011</b>	<b>0,037</b>
Gece beslenme	r	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD	<b>-0,883**</b>
	p								<b>0,001</b>
Gece uyanma sayısı	r	<b>0,236*</b>	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD
	p	<b>0,016</b>							

AD: Anlamli değil, r: korelasyon kat sayısı, \*korelasyon seviyesi 0,05 seviyesinde anlamlı\*\*korelasyon seviyesi 0,01 seviyesinde anlamlı  
Not: İstatistiksel anlamlı değerler koyu renk ile gösterilmiştir.

**Tablo 8:** Kontrolsüz astım için regresyon analizi

	B	S.E.	Wald	Sig.	Exp(B)	% 95 GA için EXP(B)	
						Alt	Üst
Yatmadan 0-2 saat içinde beslenme	0,690	0,614	1,263	0,261	1,993	0,599	6,636
Kalkma saati	0,000	0,000	11,137	<b>0,001</b>	1,000	0,999	1,000
Yatma saati	0,000	0,000	0,115	0,734	1,000	1,000	1,000
Gece uyanma sayısı	1,081	0,332	10,593	<b>0,001</b>	2,948	1,537	5,653
Yaş	0,086	0,388	0,049	0,824	1,090	0,509	2,333
Annenin ilkököl mezunu olması	1,561	0,613	6,485	<b>0,011</b>	4,764	1,433	15,840
Çocuğa gündüzleri anne dışında birinin bakması	1,954	0,831	5,531	<b>0,019</b>	7,058	1,385	35,969
Gece beslenme sayısı	0,156	0,934	0,028	0,867	1,169	0,187	7,292
Sabit	7,364	4,012	3,369	0,066	1578,189		

GA: Güven aralığı

Not: İstatistiksel anlamlı değerler koyu renk ile gösterilmiştir.

ve fakirlikle ilişkisi bilinmektedir, özellikle büyük şehirlerde bu durum belirgindir (19). Çalışmamızda astımlı çocukların annesi tarafından bakılma sıklığı yüksek bulursa da, özellikle kontrolsüz astımlı olanlarda evde annesi tarafından bakılma sıklığı düşük bulundu. Bu grupta annenin ilkököl mezunu olma oranı da daha yüksekti, bu da annelerin ekonomik sebeplerle çalışıyor olabileceğini düşündürdü.

Anne sütü alma, kardeş sayısı, kreşe gitme gibi dolaylı olarak enfeksiyon geçirme ile ilgili değişkenlerin astımla ilişkisi tartışmalıdır. Eski çalışmalarda kardeş sayısının fazla olması nedeniyle erken yaşta daha fazla enfeksiyon geçiren çocuklarda astımın daha az görülebileceğini işaret etmişken son bilgiler bunun tersini göstermiştir (20, 21). Anne sütü ile beslenme erken dönemde hişilti epizotlarını

azaltır ancak persistan astım gelişimini önlemediği kabul edilmektedir (5, 22).

İstisnai birkaç durum dışında ilk 6 ay sadece anne sütü ile beslenme ve sonrasında iki yaşına kadar anne sütü ile beslenme astım gelişiminden bağımsız tüm ailelere önerilmelidir. Çalışmamızda astımlı ve sağlıklı çocuklarda kardeş sayıları ve toplam anne sütü ile beslenme zamanları astımlı ve sağlıklı çocuklarda benzer, ek gıdaya başlama zamanı astımlı hastalarda daha erkendi.

## SONUÇ

Sonuç olarak çalışmamızda okul öncesi astımlı hastalarda gece uykudan önceki son iki saat içinde beslenme ile burun tıkanıklığı, burun akıntısı, horlama, ses değişikliği gibi üst solunum yolu semptomları arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Ayrıca sabah uyanma saatinin geç olmasının son dört haftalık astım kontrolüne olumsuz etki edebileceğini düşündürdü. Astımlı çocukların annelerine gece yatmadan önceki son iki saatte çocuklarını beslenmeye konusunda gerekli eğitimler verilmeli ve uyku alışkanlıkları içerisinde yer almaması önerilmelidir. Çocuk hekimleri astımlı çocuklarda gece semptomlarını sorgularken gece yatış saati ile birlikte son beslenme saatini de mutlaka göz önüne almalıdır.

**Etik Komite Onayı:** Çalışmanın Etik onamı, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulundan alındı (Tarih: 24.04.2019 No: 667).

**Bilgilendirilmiş Onam:** Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Çalışma Konsepti/Tasarım- A.S., E.Ö.Y., S.S.Ç., Z.H.D., Z.T., C.Ö., N.G.; Veri Toplama- A.S., S.S.Ç.; Veri Analizi/ Yorumlama- A.S., E.Ö.Y., Z.H.D.; Yazı Taslağı- A.S.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- N.G., C.Ö., Z.; Son Onay ve Sorumluluk- A.S., E.Ö.Y., S.S.Ç., Z.H.D., Z.T., C.Ö., N.G.

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

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

**Ethics Committee Approval:** This study was approved by the Ethical Committee of the Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine (Date: 24.04.2019, No: 667).

**Informed Consent:** Written consent was obtained from the participants.

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

**Author Contributions:** Conception/Design of Study- A.S., E.Ö.Y., S.S.Ç., Z.H.D., Z.T., C.Ö., N.G.; Data Acquisition- A.S., S.S.Ç.; Data Analysis/Interpretation- A.S., E.Ö.Y., Z.H.D.; Drafting Manuscript- A.S.; Critical Revision of Manuscript- N.G., C.Ö., Z.T.; Final Approval and Accountability- A.S., E.Ö.Y., S.S.Ç., Z.H.D., Z.T., C.Ö., N.G.

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

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

## KAYNAKLAR/REFERENCES

1. Truong KK, Lam MT, Grandner MA, Sassoos CS, Malhotra A. Timing matters: Circadian rhythm in sepsis, obstructive lung disease, obstructive sleep apnea, and cancer. *Ann Am Thorac Soc* 2016;13(7):1144-54. [CrossRef]
2. de Benedictis FM, Bush A. Respiratory manifestations of gastro-oesophageal reflux in children. *Arch Dis Child* 2018;103(3):292-6. [CrossRef]
3. Mindell JA, Williamson AA. Benefits of a bedtime routine in young children: Sleep, development, and beyond. *Sleep Med Rev* 2018;40:93-108. [CrossRef]
4. Leung AK, Hon KL. Gastroesophageal reflux in children: an updated review. *Drugs Context* 2019;17(8):212591. [CrossRef]
5. Global initiative for Asthma, Global strategy for asthma management and prevention. 2019 Available from: www.ginasthma.org Erişim tarihi: 02.03.2020.
6. Nakao A. Clockwork allergy: How the circadian clock underpins allergic reactions. *J Allergy Clin Immunol* 2018;142(4):1021-31. [CrossRef]
7. Hess JM, Jonnalagadda SS, Slavin JL. What Is a snack, why do we snack, and how can we choose better snacks? A Review of the definitions of snacking, motivations to snack, contributions to dietary intake, and recommendations for improvement. *Adv Nutr* 2016;7(3):466-75. [CrossRef]
8. McDonald L, Wardle J, Llewellyn CH, Johnson L, van Jaarsveld CH, Syrad H et al. Sleep and nighttime energy consumption in early childhood: A population-based cohort study. *Pediatr Obes* 2015;10(6):454-60. [CrossRef]
9. VanTallie TB. Sleep and energy balance: Interactive homeostatic systems. *Metabolism* 2006;55(10 Suppl 2):S30-5. [CrossRef]
10. Nicolaidis S. Metabolic mechanism of wakefulness (and hunger) and sleep (and satiety): role of adenosine triphosphate and hypocretin and other peptides. *Metabolism* 2006;55(10 Suppl 2): S24-9. [CrossRef]
11. Paganelli R, Petrarca C, Di Gioacchino M. Biological clocks: Their relevance to immune-allergic diseases. *Clin Mol Allergy* 2018;16:1. [CrossRef]
12. Burioka N, Fukuoka Y, Takata M, Endo M, Miyata M, Chikumi H, et al. Circadian rhythms in the CNS and peripheral clock disorders: function of clock genes: influence of medication for bronchial asthma on circadian gene. *J Pharmacol Sci* 2007;103(2):144-9. [CrossRef]
13. Lamia KA, Papp SJ, Yu RT, Barish GD, Uhlenhaut NH, Jonker JW, et al. Cryptochromes mediate rhythmic repression of the glucocorticoid receptor. *Nature* 2011;480(7378):552-6. [CrossRef]
14. Krakowiak K, Durrington HJ. The role of the body clock in asthma and COPD: Implication for treatment. *Pulm Ther* 2018;4(1):29-43. [CrossRef]
15. Paiva Ferreira LKD, Paiva Ferreira LAM, Monteiro TM, Bezerra GC, Bernardo LR, Piuvezam MR. Combined allergic rhinitis and asthma syndrome (CARAS). *Int Immunopharmacol* 2019;74:105718. [CrossRef]

17. Rosen R, Vandenplas Y, Singendonk M, Cabana M, DiLorenzo C, Gottrand F, et al. Pediatric gastroesophageal reflux clinical practice guidelines: Joint recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition and the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2018;66(3):516-54. [\[CrossRef\]](#)
18. Poddar U. Gastroesophageal reflux disease (GERD) in children. *Paediatr Int Child Health* 2019;39(1):7-12. [\[CrossRef\]](#)
19. Cooper PJ, Rodrigues LC, Barreto ML. Influence of poverty and infection on asthma in Latin America. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2012;12(2):171-8. [\[CrossRef\]](#)
20. Ball TM, Castro-Rodriguez JA, Griffith KA, Holberg CJ, Martinez FD, Wright AL. Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. *N Engl J Med* 2000;343(8):538-43. [\[CrossRef\]](#)
21. van Meel ER, den Dekker HT, Elbert NJ, Jansen PW, Moll HA, Reiss IK, et al. A population-based prospective cohort study examining the influence of early-life respiratory tract infections on school-age lung function and asthma. *Thorax* 2018;73(2):167-73. [\[CrossRef\]](#)
22. Azad MB, Vehling L, Lu Z, Dai D, Subbarao P, Becker AB et al. CHILd Study Investigators. Breastfeeding, maternal asthma and wheezing in the first year of life: A longitudinal birth cohort study. *Eur Respir J* 2017;49(5):1602019. [\[CrossRef\]](#)

# İKİNCİ BASAMAK DEVLET HASTANESİ SAĞLIK KURULUNDA BİLİŞSEL DURUM DEĞERLENDİRMESİ YAPILAN ÇOCUKLARIN LABORATUVAR BULGULARI

LABORATORY FINDINGS OF CHILDREN ASSESSED IN RELATION TO COGNITIVE STATE BY THE HEALTH COMMITTEE OF A SECOND LEVEL STATE HOSPITAL

Fatma Gül DEMİRKAN<sup>1</sup> , Şeyma KARATEKİN<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Romatoloji Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye  
<sup>2</sup>Samsun Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği, Samsun, Türkiye

**ORCID IDs of the authors:** F.G.D. 0000-0001-9950-2489; Ş.K. 0000-0003-3766-2617

**Cite this article as:** Demirkan FG, Karatekin S. Laboratory findings of children assessed in relation to cognitive state by the health committee of a second level state hospital. J Ist Faculty Med 2021;84(3):396-401. doi: 10.26650/IUITFD.2021.809729

## ÖZET

**Amaç:** Çalışmanın amacı, çocukluk çağında sık karşılaşılan ve okul başarısını etkileyen bir durum olan bilişsel gerilik bulguları nedeniyle sağlık kuruluna başvuran hastaların anemi, vitamin eksikliği ve tiroid fonksiyon bozukluğu ile bilişsel durumları arasındaki ilişkiyi araştırmaktır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmada Ocak 2016-Haziran 2018 tarihleri arasında bilişsel gerilik bulguları nedeniyle ikinci basamak devlet hastanesi sağlık kuruluna başvuran 71 çocuk hastanın serum vitamin B12, ferritin değerleri, hemogram ve tiroid fonksiyon testleri geriye dönük olarak değerlendirildi.

**Bulgular:** Kayıtlarına ulaşılan 71 hastanın %35,2'si (n=25) kız; %64,8'i (n=46) erkekti. Yaş ortalaması 11,5±2,1'di. Hastaların %9'unda demir eksikliği tespit edildi. %53,5'inde vitamin B12 düzeyi normal bulunurken diğer yarısında çeşitli derecelerde eksiklik olduğu görüldü. Hiçbir hastada tiroid fonksiyon bozukluğu tespit edilmedi. Her iki cinsiyette de vitamin B12 (p=0,2) ve ferritin (p=0,6) düzeyleri açısından anlamlı fark olmadığı görüldü. Olguların 16 (%22,5)'sında normal zekâ puanı tespit edildi. Vitamin B12 eksikliği olan hastaların (n=33) 8'inde hafif derecede zekâ geriliği, 19 hastada sınır ve donuk zekâ, 6 hastada ise normal zekâ puanı tespit edilmişti. Eksiklik olmayan 38 hastanın 10'unda zekâ seviyesi normalden 28'inde en az bir düzeyde zekâ geriliği mevcuttu. Vitamin B12 eksikliği olan hastalar ile normal olan hastaların zekâ puanları karşılaştırıldığında anlamlı fark tespit edilmedi (p=0,13). En az bir seviyede zekâ geriliği olan ve zekâ puanı tamamen normal olan hastalar arasında karşılaştırma yapıldığında ise vitamin B12 ve ferritin seviyeleri açısından anlamlı fark bulunmadı (p=0,2; p=0,9).

## ABSTRACT

**Objective:** The aim of this study is to investigate the relation between anemia, vitamin deficiency, thyroid dysfunction, and the cognitive status of patients admitted to the medical board due to symptoms of cognitive retardation, a condition that is common in childhood and affects school success negatively.

**Materials and Methods:** In this study, between January 2016-June 2018, serum vitamin B12, ferritin, hemogram and thyroid function tests of 71 pediatric patients, who were found to have had cognitive deficiencies and were admitted to the secondary level state hospital to obtain a medical committee report, were assessed retrospectively.

**Results:** Among 71 children included in the study, 35.2% (n=25) were female and 64.8% (n=46) were male. Mean age was 11.5±2.1. Iron deficiency was detected in 9% of them. While 53.5% of them had normal vitamin B12 levels, the remaining had various degrees of vitamin B12 deficiencies. Thyroid dysfunction was not detected in any patient. There was no significant difference in vitamin B12 (p=0.2) and ferritin (p=0.6) levels in both genders. Normal intelligence score was obtained in 16 (22.5%) of all cases. Mild mental retardation was detected in 8 of the patients with vitamin B12 deficiency, borderline cognitive dysfunction was detected in 19 patients and cognitive dysfunction scores in 6 patients. While 10 of 38 patients without deficiency had normal intelligence quotient scores, 28 had at least 1 level of mental retardation. When the intelligence quotient of the patients with vitamin B12 deficiency and those with normal serum vitamin B12 were compared, no significant difference was found (p=0.13). There was no significant difference in vitamin B12 and

**İletişim kurulacak yazar/Corresponding author:** fatmagy@gmail.com

**Başvuru/Submitted:** 13.10.2020 • **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 14.12.2020 •

**Son Revizyon/Last Revision Received:** 01.04.2021 • **Kabul/Accepted:** 01.04.2021 • **Online Yayın/Published Online:** 05.07.2021



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

**Sonuç:** Bilişsel gerilik tanısı konmadan hastaların ilk muayenede nutrisyonel vitamin ve mineral eksikliği ile anemi durumu değerlendirilip tedavi sonrasında bilişsel durumları tekrar değerlendirilmelidir.

**Anahtar Kelimeler:** Bilişsel gerilik, vitamin B12, ferritin

ferritin levels when comparing patients with at least one level of mental retardation and normal intelligence scores ( $p=0.2$ ;  $p=0.9$ ).

**Conclusion:** During the evaluation of the patients with cognitive retardation, nutritional vitamin-mineral deficiency and anemia status should be evaluated at the initial examination and the cognitive status of the patients should be re-evaluated after treatment.

**Keywords:** Cognitive dysfunction, vitamin B12, ferritin

## GİRİŞ

Gelişme geriliği genel anlamda; konuşma-dil, işitme ya da görme gibi iletişim, motor beceri, sosyal gelişim ve bilişsel gelişim alanlarındaki gecikme şeklinde tanımlanır (1). Gelişme geriliği yalnızca tek bir alanda sınırlı olarak ortaya çıkabileceği gibi, global olarak birden fazla alanda da görülebilir. Gelişme geriliklerinin erken yaşta tanınmasıyla özel eğitim, fizik tedavi, rehabilitasyon ve diğer tedavi yaklaşımlarının zamanında uygulanabilmesi, çocuğun normal gelişimi yakalama şansı açısından oldukça önemlidir. Gelişme geriliği için risk yaratan faktörler arasında maternal depresyon veya zihinsel hastalık, annede düşük eğitim düzeyi, kurşun intoksikasyonu, erken doğum öyküsü, erkek cinsiyet ve malnutrisyon (büyüme geriliği ve anemi) sayılabilir (2).

Gelişme geriliğinin klinisyen tarafından standardize edilmiş araçlarla değerlendirilmesi bu durumun saptanma oranı açısından önemli farklar yaratır. Ülkemizde gelişim değerlendirmesinde sık kullanılan ve standardize edilmiş araçlardan bazıları şunlardır: Gazi Erken Çocukluk Gelişimi Değerlendirme Aracı (GEÇDA), Erken Gelişim Evreleri Envanteri (EGE), Ankara Gelişim Tarama Envanteri (AGTE), Denver-II, Gelişimi İzleme ve Destekleme Rehberi (GİDR) (3, 4).

Gelişim alanları arasında sayılan bilişsel gelişim; akıl yürütme, algı, bakış açısı, sezgiler, dikkat, hafıza, muhakeme, problem çözme gibi zihinsel süreçleri kapsamaktadır. Bu basamaklarda gelişimin çeşitli nedenlere bağlı olarak sekteye uğraması sonucu 6 yaştan küçüklerde bilişsel gelişim geriliği olarak tanımlanan durum, 6 yaş sonrasında ise zekâ geriliği olarak tanımlanmaktadır (4, 5). Fetal hayattan başlayarak bilişsel ve zekâ gelişiminde genetik ve çevresel faktörlerin etkili olduğu kesin olarak bilinmektedir. Etiyolojide organik nedenler olabileceği gibi altta yatan hiçbir yapısal neden olmaksızın da bilişsel gerilik ya da zekâ geriliği ortaya çıkabilmektedir (5, 6).

Ülkemizde en sık kullanılan 3 bireysel zekâ-gelişim değerlendirme test yöntemi şunlardır:

**1. Wechsler Bireysel Zekâ Testi-Gözden Geçirilmiş Form (WISC-R) (Wechsler Individual Intelligence Test Revised Form (WISC-R)):** İlk önce yetişkinlerde uygulanan bu test, çocuklar için yeniden düzenlenmiştir. Türk

çocuklarına uyarlaması ise Savaşır ve Şahin tarafından 1995'te yapılmıştır. Test, 6–16 yaş arası çocuk ve ergen bireylerde zekâ düzeyini ölçmeye yönelik bir testtir. Kendi içinde sözel ve performans olacak şekilde iki ana bölüme ayrılır. Bu 2 ana bölüm bir yedek test ve 5 ana test olmak üzere altışar alt testten meydana gelmektedir. Bir alt test bozuk olması durumunda, o alt testin bulunduğu bölümdeki yedek test uygulanır. Bu 2 test sonucunda çıkan puanlardan "toplam puan" oluşturulur. Sonuçta toplam puanı 70'in altında saptanan çocuklara zihinsel gerilik tanısı konmaktadır. Wisc-r zekâ testi günümüzde ülkemizde sıkça kullanılan zekâ testleri arasında güvenilirlik ve geçerliliği oldukça yüksek olan bir testtir (7).

**2. Kent egy zekâ testi (Kent egy intelligence test):** Bu test, 6-14 yaş arası çocuklar ve zekâ geriliği şüphesi olan yetişkinler için uygundur. 1941'de Kent, Grace H. tarafından geliştirilmiştir. Sözel performansa dayalı bir kâğıt kalem testidir. Sözel ifade, konuşma ve işitme problemi olmayan kişilere uygulanabilir. Uygulamada süre veya zaman kısıtlaması yoktur. On adet oldukça basit sorudan oluşmaktadır (8).

**3. Porteus labirentler testi:** Çocuklar, gençler ve yetişkinlerde zekâ kapasitesini değerlendirmek ve öngörü oluşturmak için tasarlanmış sözsüz bir performans değerlendirme testidir. Psikoloji profesörü Stanley Porteus tarafından geliştirilmiş, ülkemize uyarlamasını Beglan Toğrol yapmıştır. Yaklaşık 15-30 dakika süren çeşitli zorluktaki labirentlerin çıkış noktasına ulaşılmaya çalışılan testtir. Bireysel zekâ testi olarak kullanılır (9).

Çocuklarda bilişsel gelişim sürecinin kalıtsal olduğu, ancak nutrisyonel ve çevresel uyarıların da bilişsel gelişim üzerinde olumlu veya olumsuz etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Vitamin B12 ve folik asitin beyin dokusunda metilasyonda gerekli olduğu, hipometilasyon durumunda bilişsel yetersizlik ve duyu durum bozuklukları ortaya çıkabileceği gösterilmiştir (10, 11). Demir eksikliği varlığı, çocuklarda zihinsel gelişim sürecini, bilişsel gelişimi, duyu durum ve motor beceri testlerini olumsuz etkilemektedir ve tedavi edilmediğinde zekâ puanlarında kalıcı düşmeye neden olmaktadır (12).

Bütün bu bulgular ışığında uygun vitamin, mineral ve tiroid fonksiyon değerlerinin bilişsel fonksiyonlarda önemli

rol oynadığı düşünülmüştür. Bu çalışmada, bilişsel gerilik bulguları nedeniyle sağlık kuruluna yönlendirilen çocukların hemogram, tiroid fonksiyon testleri (TSH, sT4), vitamin B12 ve demir eksikliği açısından laboratuvar parametreleri incelenmiştir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Ocak 2016-Haziran 2018 tarihleri arasında bilişsel gerilik düşünülen ve ikinci basamak devlet hastanesi sağlık kuruluna rapor almak için yönlendirilen 137 hastanın kayıtları retrospektif olarak değerlendirildi. Çalışmaya Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Tarafından 26.02.2020 tarihli 2020-19 sayılı kararlar etik kurul onamı alınmıştır. Hastaların bir kısmına gelişim değerlendirmesi için psikiyatri kliniği tarafından WISC-R bir kısmına Kent EGY ve porteus zekâ testi uygulanmıştır. Puanlama sistemi; >90 normal, 70-89 sınır ve donuk, 50-69 hafif, 35-55 orta, <35 ağır zekâ geriliği olarak tanımlandı (7-9). Nörolojik defisiti olan (konvulziyon sekeli, organik beyin hasarına sekonder nörolojik fonksiyonlarda gerilik, epilepsi), son bir yıl içinde vitamin ya da başka destek tedavisi alanlar, iştme ya da konuşma engeli olan, kronik sistemik hastalık öyküsü olan hastalar çalışma dışı bırakıldı. Hastaların sosyodemografik ve klinik verileri, sağlık kurulu başvuru sebepleri, psikiyatrik tanıları, geriye dönük olarak çocuk sağlığı ve hastalıkları ve psikiyatri poliklinik kayıtları üzerinden taranmış ve 71 hastanın verilerine ulaşılabilmektedir. Bu 71 hastanın hemogram, vitamin B12, ferritin ve tiroid fonksiyon testleri geriye dönük değerlendirilmiştir.

Vitamin B12, kemiluminesan mikropartikül intrinsik faktör yöntemiyle Abbot Laboratuvarı'nın sağladığı ticari kitler ile ölçüldü. Folat ise yine kemiluminesan mikropartikül folat bağlama proteini ile ve Abbot Laboratuvarı'nın sağladığı ticari kitler ile çalışıldı. Cihaz standartlarına göre vitamin B12 için 187–883 pg/ml, ferritin için 12 ng/ml, tsh için 0,51-4,3 uIU/mL, sT4 için 1-1,6 ng/dL aralıkları (range) normal olarak kabul edildi.

Vitamin B12 seviyeleri ağır eksiklik (<100 pg/ml), orta derecede eksiklik (100-200 pg/ml), hafif eksiklik (201-300 pg/ml) ve normal(>300 pg/ml) olarak gruplandırıldı (13, 14). Ferritin <12 ng/ml eksik; ≥12 ng/ml normal olarak kabul edildi (15).

## İstatistik

Verilerin değerlendirmeleri SPSS 22.0 software ile yapıldı. Normal dağılımı belirlemek amacıyla Shapiro–Wilk testi

uygulandı. Normal dağılım göstermeyen sayısal değişkenler medyan (minimum–maksimum) olacak şekilde belirtildi. Tanımlayıcı istatistikler normal dağılım gösteren sayısal değişkenler için ortalama değer ± standart sapma (SD) şeklinde yapıldı. Kategorik değişkenler yüzde (%) olarak belirtildi. Gruplar arasında anlamlı farklılık olup olmadığı, normal dağılan değişkenler için student–t testi ile normal dağılım göstermeyen değerler için ise Mann Whitney–U testi ile değerlendirildi. Kategorik veriler Ki–kare testiyle karşılaştırıldı. p<0,05 değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

Yetmiş bir hastanın %35,2'si (n=25) kız; %64,8'i (n=46) erkekti. Ortalama yaşları 11,5±2,1'di. Hastaların karakteristik özellikleri ve serum vitamin ortalama değerleri Tablo 1'de özetlenmiştir. Her iki cinsiyette de vitamin B12 (p=0,24) ve ferritin (p=0,66) düzeyleri açısından anlamlı fark olmadığı Tablo 2'de görülmektedir.

Hastaların %53,5'inde vitamin B12 düzeyi normal bulunurken diğer yarısında çeşitli derecelerde eksiklik tespit edildi. Ölçüm yapılmayan 4 hasta çıkarıldığında hastaların %9'unda demir eksikliği tespit edildi. Hiçbir hastada tiroid fonksiyon bozukluğu yoktu.

Zekâ puanlama sistemi, >90 normal, 70-89 sınır ve donuk, 50-69 hafif, 35-55 orta, <35 ağır zekâ geriliği olacak şekilde

**Tablo 1:** Demografik özellikler ve laboratuvar bulgularının ortalamaları

Hasta sayısı	n=71
Cinsiyet (Kız/erkek) (n)	25/46
Yaş (ortalama±SD) (yıl)	11,5±2,1
IQ puanı (ortalama±SD)	75±13
Ferritin (mg/dl)	34,84±22,49
Hemoglobin (g/dl)	12,71±1,18
Hct	37,3±2,7
MCV	77,6±4,7
Vitamin B12 (pg/ml)	337,75±151,89
TSH	2,53±0,97
sT4	1,2924±0,25

Hct: Hemotokrit, MCV: ortalama eritrosit hacmi

**Tablo 2:** Cinsiyete göre ortalama ferritin ve vitamin B12 düzeyi karşılaştırması

	Vitamin B12 (pg/ml)	Ferritin (mg/dl)
Kız (Ortalama) ±SD	362,24±135,01	33,61±24,05
Erkek (Ortalama) ±SD	324,43±160,16	35,48±21,88
p	0,24	0,66

de tanımlandı. On altı (%22,5) hastada zekâ puanı normal olarak bulunurken, hastaların %77,5'inde en az bir düzeyde zekâ geriliği tespit edildi. Ferritin düzeyleri ile birlikte vitamin B12 eksiklik dereceleri ve zekâ puan dağılımı Tablo 3'te özetlenmiştir.

**Tablo 3:** Serum vitamin B12, ferritin seviyeleri ve zekâ seviyesi grupları dağılımı

	n	%
<b>Vitamin B12</b>		
Ağır eksiklik (<100 pg/ml)	1	1,4
Orta derecede eksiklik (100-200 pg/ml)	10	14,1
Hafif eksiklik (201-300 pg/ml)	22	31,0
Normal (>300 pg/ml)	38	53,5
<b>Ferritin</b>		
Eksik <12 ng/ml	9	12,7
Normal ≥12 ng/ml	58	81,7
<b>Zekâ seviyesi</b>		
Orta derecede zekâ geriliği (35-55)	2	2,8
Hafif derecede zekâ geriliği (50-69)	19	26,8
Sınır ve donuk zekâ geriliği (70-89)	34	47,9
Normal (>90)	16	22,5

Vitamin B12 eksikliği olan hastaların 8 (%24,2)'inde hafif derecede zekâ geriliği, 19 (%57,6) hastada sınır ve donuk zekâ, 6 (%18,2) hastada ise normal zekâ puanı tespit edilmişti. Eksiklik olmayan grup içinde bakıldığında toplam 38 hastanın 10 (%26,3)'unda zekâ seviyesi normal tespit edilmişken, 28 (%73,7)'inde en az bir düzeyde zekâ geriliği mevcuttu. Serum vitamin B12 eksikliği olan hastalar ile düzeyi normal olan hastaların zekâ puanları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi ( $p=0,13$ ) (Tablo 4). En az bir seviyede zekâ geriliği olan ve zekâ puanı tamamen normal olan hastalar arasında karşılaştırma yapıldığında ise serum vitamin B12 ve ferritin seviyeleri açısından anlamlı fark bulunmadı ( $p=0,2$ ;  $p=0,9$ ).

Hastaların 9'u daha önceden bilişsel gerilik tanısı almış ve rapor yenilemek için başvurmuştu. Bu dokuz hastanın son 5 yılda hiçbirine ait serum vitamin B12 ve ferritin kaydı yoktu.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Zekâ geriliği, yaygın gelişimsel bozukluk, bilişsel gerilik, dil ve konuşma bozuklukları olan çocuklar özel eğitim ihtiyacı açısından sağlık kurullarında değerlendirilmeli ve uygun programa alınmalıdır. Bu çalışmada bilişsel gerilik açısından özel eğitime başvurmak için hastanemiz sağlık kurulunda değerlendirilen olgularda hemogram, demir ve vitamin B12 düzeyleri ve tiroid fonksiyonları değerlendirildi. Çalışmamızda çocuklarda öğrenme güçlüğüne neden olabilecek ve tedavi edildiğinde özel eğitim gereksinimi ortadan kalkacak medikal durumların kurul raporu öncesi değerlendirilmesinin gerekliliğini vurgulamayı amaçladık.

Belirli miktarda serum vitamin B12 düzeyi, sağlıklı nörolojik gelişim için gereklidir. Vitamin B12 folik asitle birlikte beyin dokusunda S-adenozilmetionin gibi nörotransmitterlerin, fosfolipidlerin ve myelin gibi birçok temel molekül için gereken metil kaynağını meydana getirir (8, 10). Erişkin hasta gruplarında yapılan bir çalışmada, bu vitamin eksikliğinin bilişsel fonksiyonlarda belirgin azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (9). Çalışmamızda hastaların %53'ünde vitamin B12 düzeyi normal olarak tespit edilirken %47'sinde farklı düzeylerde eksiklik mevcuttu. Bu oran, vitamin B12 eksikliğinin kanıtlanmış etkileri de düşünülüğünde bilişsel geriliği olan çocuklarda tanı aşamasında vitamin B12 seviyelerinin değerlendirilmesi gerekliliğini göstermektedir. IQ puanı düşük olan gruplarda vitamin B12 eksikliği daha belirgin görülmektedir. 2018 yılında yapılan bir çalışmada ise folat düzeyi özgül öğrenme bozukluğu olan hasta grubunda anlamlı olarak düşük bulunmuşken, vitamin B12 ve homosistein düzeylerinde anlamlı derecede farklılık tespit edilmemiştir (16). Çalışmamızda hastaların serum folik asit ve homosistein düzeylerine ait kayıtlara ulaşılamadığı için bilişsel gerilik ile arasındaki ilişki karşılaştırılamamıştır. Hastaların hiçbirinde tiroid fonksiyonlarına yönelik patoloji görülmemiştir.

Gashu ve arkadaşlarının 2016'da Etiyopya'da yapılan bir çalışmada boy kısalığının ve ona neden olan selenyum eksikliği ve aneminin bilişsel fonksiyonları olumsuz yönde etkilediği gösterilmiştir (17). Aynı çalışmada demir eksikliği ile kognitif fonksiyonlar arasında belirgin ilişki bulunmamıştır. Ancak farklı araştırmacılar dopamin yolağında ve hipokampusun nörokimyasal profilinde değişikliğe sebep olarak demir eksikliğinin bilişsel performansta azalmaya yol açtığını göstermişlerdir (18-20). Çalışmamızda anemi açısından değerlendirme yapıldığında tüm hasta-

**Tablo 4:** Laboratuvar değerlerine göre zekâ puanlarının karşılaştırılması

	Zekâ puanı (ortalama±SD) (eksiklik var)	Zekâ puanı (ortalama±SD) (eksiklik yok)	p
<b>Vitamin B12</b>	73,71±14,32	77,64±13,58	0,13
<b>Ferritin</b>	70,11±9,13	77,37±14,6	0,09



ların yaşları 9 yaş ve üstü olması nedeniyle hemoglobin değeri <12 g/dl anemi açısından referans kabul edilmiştir (21). Elli sekiz (%81,7) hastada anemi yokken geri kalan 13 (%18,3) hastada anemi görüldü. Ferritin düzeyleri ve anemi açısından zekâ seviyeleri farklı olan gruplarda anlamlı farklılık görülmemiştir ( $p=0,09$  ve  $p=0,7$ ).

Bu çalışmada birtakım kısıtlılıklar mevcuttur. Daha fazla sayıda hasta ve sağlıklı kontrol grubuyla değerlendirme yapmak istatistiksel olarak daha anlamlı sonuçlara götürecektir. Vitamin B12 yanında folik asit, vitamin B6 gibi diğer vitaminlerin de ölçülmesi daha bilgi verici olabilir. Demir eksikliği açısından demir ve demir bağlama kapasitesi değerlendirmesi de tanı açısından daha faydalı olacaktır. Aynı zamanda tedavi sonrası uzun dönem takipler yapılarak vitamin B12 ya da ferritin eksikliği giderildiğinde bilişsel fonksiyonlarda düzelme olup olmadığına bakmak oldukça faydalı olacaktır.

Normal bilişsel gelişim için önemli parametreler olan tiroit fonksiyonları, B12 metabolizması ve demir metabolizmasının yeterli ve dengeli bir düzende olması gerekmektedir. Bu çalışmadaki hasta grubunda tiroit fonksiyonları ile ilgili belirgin bozukluk tespit edilmesinde de anemi ve vitamin B12 eksikliği varlığı tedavi edilebilen nedenler olarak karşımıza çıkmıştır. Bu çalışmayla da görülmüştür ki; hastalar değerlendirilirken ilk muayenede bu parametrelere bakılıp tedavi sonrası hastalar tekrar değerlendirilmelidir. Bu sayede hem hastalar uygun tedaviyle normal bilişsel fonksiyonlara sahip olabilir ve normal hayatlarına devam edebilir hem de gereksiz bilişsel gerilik tanısı ve sağlık harcamalarının önüne geçilebilir.

**Etik Komite Onayı:** Bu çalışma için etik komite onayı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Tarih: 26.02.2020, No: 2020-19).

**Bilgilendirilmiş Onam:** Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Çalışma Konsepti/Tasarım- Ş.K.; Veri Toplama-Ş.K.; Veri Analizi/Yorumlama- F.G.D.; Yazı Taslağı- Ş.K.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- F.G.D., Ş.K.; Son Onay ve Sorumluluk-F.G.D., Ş.K.

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

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

**Ethics Committee Approval:** This study was approved by the Haseki Training and Research Hospital Clinical Research Ethics Committee (Date: 26.02.2020, No: 2020-19).

**Informed Consent:** Written consent was obtained from the participants.

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

**Author Contributions:** Conception/Design of Study- Ş.K.; Data Acquisition- Ş.K.; Data Analysis/Interpretation- F.G.D.; Drafting Manuscript- Ş.K.; Critical Revision of Manuscript- F.G.D., Ş.K.; Final Approval and Accountability- F.G.D., Ş.K.

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

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

## KAYNAKLAR

1. Oberklaid F, Efron D. Developmental delay identification and management. *Aust Fam Physician* 2005;3(9):739-742.
2. Sices L. Developmental screening in primary care : the effectiveness of current practice and recommendations for improvement. Fund reports. The Commonwealth Fund: 2007 December. Report No:1082. Available from: URL: <https://www.commonwealthfund.org/publications/fund-reports/2007/dec/developmental-screening-primary-care-effectiveness-current>
3. Tunçeli Hİ, Zembat R. Erken çocukluk döneminde gelişimin değerlendirilmesi ve önemi. *Eğitim Kuram ve Uygulama Araştırmaları Dergisi* 2017;3(3):1-12.
4. Demirci A, Kartal M. Çocukluk dönemine ait önemli bir sorun: Gelişme geriliği ve erken tanının önemi. *The Journal of Turkish Family Physician* 2012;3(4):1-6.
5. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 5th ed. American Psychiatric Publishing, Arlington, VA;2013. <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596> [CrossRef]
6. Köroğlu E (ed). *Amerikan Psikiyatri Birliği. Psikiyatride hastalıkların tanımlanması ve sınıflandırılması el kitabı. (Çeviri Editörü). 4 üncü Baskı. Ankara: Hekimler Yayın Birliği, 2001.*
7. Savasir I, Sahin N. Wechsler çocuklar için zekâ ölçeği (WISC-R). *Turkish Psychological Association, Ankara* 1995.
8. Riggs KM, Spiro All, Tucker K, Rush D. Relations of vitamin B-12, vitamin B-6, folate, and homocysteine to cognitive performance in the Normative Aging Study. *Am J Clin Nutr* 1996;63(3):306-14. [CrossRef]
9. Selhub J, Bagley LC, Miller J, Rosenberg IH. B vitamins, homocysteine, and neurocognitive function in the elderly. *Am J Clin Nutr* 2000;71(2):614-20. [CrossRef]
10. Moore E, Mander A, Ames D, Carne R, Sanders K, Watters D. Cognitive impairment and vitamin B12: a review. *Int Psychogeriatr* 2012;24(4):541-56. [CrossRef]
11. Esnafoglu E, Yaman E. Vitamin B12, folic acid, homocysteine and vitamin D levels in children and adolescents with obsessive compulsive disorder. *Psychiatry Research* 2017;254:232-7. [CrossRef]
12. Widdowson EM, Spray CM. Chemical development in utero. *Arch Dis Child* 1951;26:205-14. [CrossRef]
13. Koç A, Koçyigit A, Ulukanligil M, Demir N. Şanlıurfa yöresinde 9-12 yaş grubu çocuklarda B12 vitamini ve folik asit eksikliği sıklığı ile bağırsak solucanlarıyla ilişkisi, *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2005;48:308-15.
14. Emen B, Öztürk Kılıç Y, Eren MA, Özdemir E, Öztürk F, Düzenli E, et al. B12 Vitamin eksikliği bulunan hastalarda etiyolojik faktörler ile laboratuvar verileri arasındaki ilişkinin geriye dönük değerlendirilmesi. *Tepecik Eğitim Hast Derg* 2013;23(1):19-23. [CrossRef]

15. Halterman JS, Kaczorowski JM, Aligne CA, Auinger P, Szilagyi PG. Iron deficiency and cognitive achievement among school-aged children and adolescents in the United States Pediatrics, 2001; pp. 1381-6. [\[CrossRef\]](#)
16. Esnafoğlu E. Özgül öğrenme bozukluğu bulunan çocuklarda serum folat, vitamin B12, homosistein ve vitamin D seviyeleri. Bozok Tıp Dergisi 2018;8(3):59-64. [\[CrossRef\]](#)
17. Gashu D, Stoecker BJ, Bougma K, Adish A, Haki GD, Marquis GS. Stunting, selenium deficiency and anemia are associated with poor cognitive performance in preschool children from rural Ethiopia. Nutr J 2016;15:38. [\[CrossRef\]](#)
18. Lozoff B. Early iron deficiency has brain and behavior effects consistent with dopaminergic dysfunction. J Nutr 2011;141(4):740S-6S. [\[CrossRef\]](#)
19. Konofal E, Lecendreux M, Arnulf I. Iron deficiency in children with attention- deficit/hyperactivity disorder. Arch Pediatr Adolesc Med 2004;158:1113-15. [\[CrossRef\]](#)
20. Rao R, Tkac I, Townsend EL, Gruetter R, Georgieff MK. Perinatal iron deficiency alters the neurochemical profile of the developing rat hippocampus. J Nutr 2003;133:3215-21. [\[CrossRef\]](#)
21. Kılıç SÇ. Hemogramın yorumlanması. Güncel Pratik Tıp El Kitabı, Dökmetaş HS(ed) içinde. 1.Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2013. ss:48.

# OKÜLT HEPATİT B VİRÜSÜNÜN GENOTİP, SUBGENOTİP VE SUBTİP ANALİZİ

## ANALYSIS OF GENOTYPE, SUBGENOTYPE AND SEROTYPE OF OCCULT HEPATITIS B VIRUS

Bülent ÇAKAL<sup>1</sup> , Alp ATASOY<sup>2</sup> , Bilger ÇAVUŞ<sup>2</sup> , Aslı ÖRMECİ<sup>2</sup> , Mehveş PODA<sup>3</sup> , Mesut BULAKÇI<sup>4</sup> ,  
Mine GÜLLÜOĞLU<sup>5</sup> , Mehmet Güven GÜNVER<sup>6</sup> , Filiz AKYÜZ<sup>2</sup> 

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

<sup>2</sup>İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

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

<sup>4</sup>İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Radyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

<sup>5</sup>İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

<sup>6</sup>İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

**ORCID IDs of the authors:** B.Ç. 0000-0002-1254-844X; A.A. 0000-0003-1791-897X; B.Ç. 0000-0003-2203-4255; A.Ö. 000-0001-6297-8045; M.P. 0000-0002-1957-6072; M.G. 0000-0002-3967-0779; M.B. 0000-0003-0993-6465; M.G.G. 0000-0002-4628-8391; F.A. 0000-0001-7498-141X

**Cite this article as:** Cakal B, Atasoy A, Cavus B, Ormeci A, Poda M, Bulakci M, et al. Analysis of genotype, subgenotype and serotype of Occult Hepatitis B Virus. J Ist Faculty Med 2021;84(3):402-10. doi: 10.26650/IUITFD.2020.0093

### ÖZET

**Amaç:** Okült Hepatit B Virus (HBV) enfeksiyonu (Occult HBV infection; OBI) mevcut serolojik testler ile HBV yüzey antijeni (Surface antigen; HBsAg) negatif tespit edilen bireylerin karaciğerinde HBV genomunun uzun süreli persistan varlığı ile karakterizedir. Bu çalışmada OBI tanılı hastalardan elde edilen HBV'lerin genotip, subgenotip ve subtip profillerinin karakteristiğinin irdelenmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmaya HBsAg negatif farklı klinik endikasyonlar nedeniyle karaciğer parankim biyopsisi gerçekleştirilen hastaların karaciğer biyopsi örneklerinde Nested PCR yöntemiyle HBV DNA varlığı tanımlanan 32 OBI tanılı hasta ile 17 kronik hepatit B hastası dahil edildi. HBV S gen MHR bölgesini hedefleyen DNA fragmanları nested PCR kullanılarak amplifiye edildi. HBV'nin genotip, subgenotip ve subtip/serotiplerinin belirlemek için Sanger sekans metodu kullanıldı.

**Bulgular:** Bu çalışmada OBI ve kronik hepatit B hastalarından izole edilen HBV'lerin tümünün genotipi D, subgenotipler sırasıyla HBV/D1 (%75,5), HBV/D2 (%6,1) ve HBV/D3 (%18,4) serotipler sırasıyla ayw2 (%73,5) ve ayw3 (%26,5) olarak belirlenmiştir. OBI'li hastaların %28,1'nin subgenotipi HBV/D3 olarak belirlenmesine karşın kronik hepatit B hastalarının hiç birinde HBV/D3 subgenotipi saptanmamıştır.

**Sonuç:** Subgenotip HBV/D3'ün viral biyogenezin dinamiği üzerindeki potansiyel etkileri HBsAg negatifliği ve düşük replikasyon

### ABSTRACT

**Objective:** Occult hepatitis B infection (OBI) can be characterized by the long-term persistence of HBV DNA in the liver of individuals who test negative for the hepatitis B surface antigen (HBsAg) using the currently available assays. This study aimed to evaluate genotype, subgenotype and subtype profiles of HBVs obtained from patients with OBI.

**Material and Method:** The study included 32 patients with OBI who were diagnosed with HBV DNA by Nested PCR method in liver biopsy samples of patients who underwent liver parenchymal biopsy due to HBsAg negative different clinic indications and 17 chronic hepatitis B patients. The MHR region of the HBV S gene was amplified using nested PCR. Sanger sequencing method was used to determine the genotype, subgenotypes and subtype/serotype of HBV.

**Results:** In this study it was determined that the genotypes of all HBVs isolated from OBI and chronic hepatitis B patients were HBV/D, subgenotypes were respectively HBV/ D1 (75.5%), HBV/ D2 (6.1%) and HBV/D3 (18.4%), serotypes were respectively ayw2 (73.5%) and ayw3 (26.5%). Although the subgenotype of 28.1% of patients with OBI was determined as HBV/D3, none of the chronic hepatitis B patients had the HBV/D3 subgenotype.

**Conclusion:** The potential effects of subgenotype HBV/D3 on the dynamics of viral biogenesis may be associated with OBI,

**İletişim kurulacak yazar/Corresponding author:** bulentcakal@yahoo.com

**Başvuru/Submitted:** 04.08.2020 • **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 15.10.2020 •

**Son Revizyon/Last Revision Received:** 30.10.2020 • **Kabul/Accepted:** 04.11.2020 • **Online Yayın/Published Online:** 12.07.2021



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

yetkinliği ile karakterize OBI ile ilişkili olabilir.

**Anahtar Kelimeler:** OBI, Genetik varyasyon, Genotip, Subgenotip, HBsAg Subtipleri, Hepatit B virüsü

characterized by low replication competence and HBsAg negativity.

**Keywords:** OBI, Genetic diversity, Genotypes, Subgenotypes, HBsAg Subtypes, Hepatitis B virus

## GİRİŞ

HBV enfeksiyonları HBsAg içeren immünizasyon yolu ile genellikle önlenemez olmasına karşın, nihai kürene yönelik anti-viral tedavi olanakları olmaması nedeniyle, tüm dünyada önemli bir halk sağlığı problemi olmaya devam etmektedir (1). OBI enfekte hepatositlerinin nükleusunda kromatize serbest epizomal formda kovalent bağlarla bağlı kapalı DNA halkasının (covalently closed circular DNA; cccDNA) persistan varlığı ve düşük düzeyde replikasyon yetkinliği ile karakterize olup, mevcut ulaşılabılır testler ile HBsAg negatif tespit edilen bireylerin karaciğer dokusunda ve/veya kanında HBV DNA'nın varlığı olarak tanımlanır (2).

OBI klinik açıdan; okült virüsün kan transfüzyonu, doğum (perinatal bulaş), hemodiyaliz ve ortotopik karaciğer gibi organ nakli yolu ile bulaşını takiben alıcıda tipik yeni HBV enfeksiyonuna neden olabilmesi, immünoşüpresyon koşullarında OBI reaktivasyonu ve takiben HBV ilişkili (akut ve fulminan hepatit) karaciğer hastalıkları, özellikle kronik C hepatitli hastalarda karaciğer hastalığının progresyonu üzerine olası etkileri ve hepatokarsinogenez sürecindeki rolü yönüyle önem taşımaktadır (3-5).

OBI virüse ve enfekte konağa ait faktörler ile çevresel faktörlerin zemininde gelişen genetik, epigenetik ve immünolojik mekanizmaların karşılıklı etkileşimi ile şekillenen, kronik HBV enfeksiyonunun doğal seyri içerisinde muhtemelen safhalarından biri olarak değerlendirilmesine karşın, HBV enfeksiyonunun bu özgün formuna neden olan mekanizmalar henüz tam olarak belirlenememiştir (6). Bununla birlikte OBI vakaların bir kısmında viral yüzey ve polimeraz genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonucu sırasıyla yüzey kaçış mutasyonları ve replikasyon defekti ile HBV replikasyonu ve gen ekspresyonunun güçlü bir şekilde süpresyonuna neden olabilen konak immün denetim mekanizmalarındaki aksaklıklar ve viral biosentezin regülasyonunda rol alan epigenetik mekanizmaları içeren konak faktörleri ile ilişkilendirilmektedir (7, 8).

Ayrıca gerek güvensiz cinsel temas gerekse damar içi uyandırıcı kullanımı ve madde bağımlılığı gibi sosyal davranışlar sonucu oluşabilen re-enfeksiyon ve viral re-kombinasyonlar da farklı ve/ya yeni subgenotip ve viral mutasyonların oluşmasına imkan tanıyarak hem aşikar HBV hem de OBI enfeksiyonu oluşmasına neden olabilen önemli risk faktörleridir (9, 10).

HBV genomu kısmen birbiri ile örtüşen sırasıyla yüzey (PreS/S), kor (PreC/C) polimeraz (P) ve X'den oluşan 4

adet açık okuma çerçevesi (open-reading frames; ORF) içerir. PreS/S ORF viral yüzey proteininin yapısına katılan alternatif başlangıç kodonları PreS1, PreS2 ve PreS tarafından sentezlenen aminoasit (aa) boyutlarına göre sırasıyla büyük (Large, LHBs) orta (Middle, MHBs) ve küçük (Small, SHBs; HBsAg) olarak adlandırılan üç viral yüzey proteinini kodlar (11). HBsAg, HBV enfeksiyon tanısı, anti-HBV tedavi takibi ve kan donörlerinin taramasında kullanılan elzem bir serolojik markerdir. HBsAg immünojen özelliğe sahip en az 3 hidrofilik ve 2 hidrofobik domain içeren 226 aa'lık bir proteindir. 2. hidrofilik bölgede yer alan 99-169 aa'leri arasındaki majör hidrofilik bölgenin (MHR) içerisinde disülfid köprüleri ile bağlı 5 sistein residüsünden oluşan ve 124-147 aa'ler arasında yer alan "a" determinanı HBsAg'nin konfirmasyonundan ve kararlılığından sorumlu olması yanında immünojenitesi nedeniyle de HBsAg'ne spesifik antikorlar ve immün hücreler için en kritik tanıma bölgesi olup, 124-137 ile 139-147 aa rezidüleri arasında disülfid bağları ile oluşturulan iki adet halka içerir. HBsAg'nin 'a' determinantının üçüncül yapısının belirlenmesinde kritik öneme sahip aa rezidülerinde meydana gelen varyasyonlar/mutasyonlar, viral yüzey proteinin antijenik konformasyonu ve immünojenik epitoplarında değişimlere neden olarak, HBsAg'nin serolojik tanısında, aşılama, hepatit B immünglobin tedavisi, anti-viral tedavide başarısızlık, OBI ile ilişkili olabilmektedir (12-15).

HBV gerek özgün biyogenezi gerekse bireysel ve popülasyon düzeyindeki konak faktörleri etkisi altında dinamik bir viral çeşitlik sergiler. Viral genom düzeyindeki varyasyonlar, gerek viral biyogenezin dinamiği gerekse kronik hepatit B hastalığının doğal seyri, progresyonu ve tedavi yanıtları üzerinde belirleyici etkinliğe sahiptir (16).

Bu çalışmada HBsAg seronegatif ve farklı klinik endikasyonlar nedeniyle karaciğer biyopsi işlemi gerçekleştirilen, biyopsi örneklerinde HBV DNA varlığı saptanarak OBI tanımlanan hastalardan izole edilen HBV izolatlarının genotip, subgenotip ve subtiplerinin belirlenerek OBI ile ilişkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

**Hastalar:** Bu çalışmaya Ocak 2017 ile Ekim 2019 tarihleri arasında İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Gastroenterohepatoloji Kliniği tarafından kronik hepatit C'li hastalar ile farklı klinik endikasyonlar nedeniyle (Tablo 2), karaciğer parankim biyopsisi gerçekleştirilen 142 hastanın karaciğer biyopsi örneklerinde Nested PCR yöntemiyle HBV DNA varlığı tanımlanarak, OBI tespit edilen 36

(%25,3) hastadan HBV MHR gen bölgesinin amplifikasyonu gerçekleştirilmiş 32 hasta ile kronik hepatit B hastalığı nedeniyle takip edilen, histolojik tanı ve anti-viral tedavi planlaması ve/vaya değerlendirilmesi amacıyla karaciğer parankim biyopsisi işlemi planlanan 17 hasta dahil edildi. Kronik Hepatit C'li hastalar haricinde, çalışmaya dahil edilen hastaların anti-HCV ve anti- human immunodeficiency virus (HIV) antikörleri negatif serolojideydi.

**Klinik materyal:** Çalışma kapsamında klinik materyal olarak, karaciğer biyopsi örnekleri ile eş zamanlı alınan kan (serum) örnekleri kullanıldı. Karaciğer biyopsi işlemleri İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD'nin Gastroenterohepatoloji bilim dalı ve Radyoloji AD girişimsel radyoloji birimlerinde gerçekleştirilmiştir.

#### Örnek alma ve saklama koşulları

**Karaciğer biyopsi örnekleri:** Karaciğer biyopsi işlemleri radyolojik görüntüleme (ultrason) eşliğinde perkutan iğne biyopsi yöntemi ile manuel (Menghini; 17-gauge, Hepafix®, B. Braun Melsungen AG 34209) ve/ya otomatik kesici iğneler (TruCut; 18-gauge, Bard MaxCore, Covington, GA) kullanılarak, sırasıyla İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD'nin Gastroenterohepatoloji Bilim Dalı

Kliniği ve Radyoloji AD girişimsel radyoloji birimlerinde gerçekleştirildi. Karaciğer biyopsi örnekleri alınır alınmaz sıvı nitrojenle fresh frozen olarak fikse edilerek kriyopresipitasyonu gerçekleştirilerek ve Nested PCR analizleri yapılabildiği kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

**Serum örnekleri:** Biyopsi örnekleri ile eş zamanlı ve normal kan alma (venöz) prosedürü uyarınca uygun tüplere alınan hasta kan örnekleri santrifüj edilerek serumları ayrıldıktan sonra steril ependorf tüplere transfer edilerek laboratuvar çalışmaları için -80°C'de muhafaza edilmiştir.

**Karaciğer dokusundan HBV DNA izolasyonu:** Karaciğer biyopsi örneklerinden ticari bir kit (QIAamp DNA Mini kit, Qiagen GmbH, Hilden, Germany) kullanılarak total DNA izolasyonu sonrası viral genomun en az iki farklı bölgesinin Nested PCR yöntemi ile gösterilmesi ile OBI tanımlanan 36 hastaya ait DNA örnekleri sekans analizleri için -20°C'de muhafaza edilmiştir.

**Nested PCR:** Bu çalışmada OBI'li hastalara ait HBV genomlarından HBsAg'nin immün epitoplarını içeren 99 ve 170 aa arasında yer alan MHR bölgesinin amplifikasyonu hedef bölgeye özgü tasarlanan primerler (Tablo 1) kullanılarak Nested PCR yöntemi ile çoğaltıldı. Nested PCR'ın ilk aşaması için 5µl HBV DNA ekstraktı, 25

**Tablo 1:** HBV Pre-S gen amplifikasyonu için kullanılan primerler

Nested I Primerler	Dizi (5'-3')	Polarite	Domain	Pozisyon
HBVSNIF1	GCCTCATTMTGTGGGTCACCATA	Sense	PreS	2801-2824
HBVSNIF2	AATCCAGATTGGGACTTCAA	Sense	PreS	2932-2951
HBVSNIF3	CCTGCTGGTGGCTCCAGTTCA	Sense	PreS	56-76
HBVSNIF4	CATGGAGAACATCACATCAGG	Sense	PreS	155-174
HBVSNIF5	TTGGCCAAAATTCGCGAGTC	Sense	PreS	300-318
HBVSNIR1	GCTAGGAGTCCGCGAGTATGG	Antisense	PreS	1286-1266
HBVSNIR2	TTCCGCGAGTATGGATCGGCAG	Antisense	PreS	1278-1258
HBVSNIR3	GGTTGCGTCAGCAAACACTTG	Antisense	PreS	1197-1177
HBVSNIR4	CGTTGACAGACTTTCCAATCAAT	Antisense	PreS	995-973
HBVSNIR5	CAGACTTTCCAATCAATAGG	Antisense	PreS	989-970
HBVSNIR6	AAATGGCACTAGTAAACTGAGCCA	Antisense	PreS	693-670
Nested II Primerler	Dizi (5'-3')	Polarite	Domain	Pozisyon
HBVSNIF1	CATGGAGAACATCACATCAGG	Sense	PreS	155-174
HBVSNIF2	GAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTC	Sense	PreS	246-269
HBVSNIF3	TCGTGGTGGACTTCTCTCAATT	Sense	PreS	257-278
HBVSNIF4	TTGGCCAAAATTCGCGAGTC	Sense	PreS	300-318
HBVSNIF5	TGCTGCTATGCCTCATCTTC	Sense	PreS	414-433
HBVSNIR1	GGTTGCGTCAGCAAACACTTG	Antisense	PreS	1197-1177
HBVSNIR2	CGTTGACAGACTTTCCAATCAAT	Antisense	PreS	995-973
HBVSNIR3	CAGACTTTCCAATCAATAGG	Antisense	PreS	989-970
HBVSNIR4	AAATGGCACTAGTAAACTGAGCCA	Antisense	PreS	693-670

µl 2X PCR master mix (HS Prime Taq Premix; GeNet Bio) ve hedef bölgenin amplifikasyonuna yönelik dış primerleri (200 nm/µl) içeren 50 µl PCR reaksiyonu hazırlandı. Amplifikasyon 95°C'de 10 dak. başlangıç denatürasyonu sonrası sırasıyla 95°C'de 30 sn denatürasyon, 55-60°C'de 30 sn bağlanma, 72°C'de 45 sn uzatmayı içeren toplam 40 PCR döngüsünü takiben 72°C 10 dak. son uzatmayı içeren PCR koşullarında T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Nested PCR'ın ikinci aşaması için 5µl ilk PCR ürünü, 25 µl 2X PCR master mix (ExPrime Taq premix; GeNet Bio) ve hedef bögeninin amplifikasyonuna yönelik iç primerleri (200 nm/µl) içeren 50 µl PCR reaksiyonu hazırlandı. Amplifikasyon 95°C'de 5 dak. başlangıç denatürasyonu sonrası sırasıyla 95°C'de 30 sn denatürasyon, 55-60°C'de 30 sn bağlanma, 72°C'de 45 sn uzatmayı içeren toplam 35 döngüyü takiben 72°C 10 dak. son uzatmayı içeren PCR koşullarında T100 Thermal Cycler (Bio-Rad) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

**Jel elektrofrez ve DNA saflaştırma:** Elde edilen PCR ürünleri %2'lik agaroz içeren elektoreferez işleminden sonra, jel görüntüleme sistemi kullanılarak değerlendirildi. Hedef bölgeye spesifik ve istenilen boyutlardaki HBV DNA varlığı DNA boyutunun ölçümü için referans olarak kullanılan 100 bp'lik bir DNA belirteci (100bp DNA Marker; GeNet Bio) ile karşılaştırılması ile belirlendi. İstenilen uzunlukta bandlara sahip PCR ürünleri sekans işlemi öncesi E.Z.N.A.® Cycle Pure Kit (Omega) kullanılarak saflaştırılmıştır.

**HBV DNA sekans:** Purifiye edilen amplifikasyon ürünlerinin sekans işlemleri gerektiğinde çift yönlü olacak şekilde amplifikasyon primerleri kullanılarak, genetik analizatör (Becman Coulter CEQ 8000) aracılığıyla gerçekleştirilmiştir.

**HBV genotip, subgenotip ve subtip analizi:** Sekans işlemi sonrası elde edilen HBV PreS gene ait nükleotid dizilerinin Chromas programı kullanılarak düzenlendikten sonra confirmasyonu ve biyoinformatik analizleri NCBI websitesi (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) üzerinde gerçekleştirildi. Genotiplerin belirlenmesinde HBV S gen bölgesi ve HBV referans sekansları içeren NCBI websitesi ([www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping)) kullanıldı. Subgenotiplerin belirlenmesi HBV S gen ve polimeraz (pol) gen bölgelerinin dizi analizlerine (anti-viral direnç platformu) yönelik hazırlanan *HIV grade HBV Drug Resistance Interpretation and Geno2Pheno* biyoinformatik programı aracılığı ile gerçekleştirildi. HBV serotiplerinin belirlenmesi ise HBsAg'nin "a" determinantını kodlayan bölgede yer alan ve spesifik pozisyonları (a.a.122,160,127,159,140) ve antikor reaktiviteleri bilinen aminoasitler baz alınarak gerçekleştirildi. d/y varyasyonlarının ayırımı "a" determinantı içerisinde yer alan 122. pozisyonundaki aa'nin sırasıyla Lizin (Liz) veya Arginin (Arg)

varlığı, w/r varyasyonlarının ayırımı a' determinantı içerisinde yer 160 pozisyonundaki aa'nin sırasıyla Liz veya Arg varlığı baz alınarak gerçekleştirildi. HBsAg'nin "a" determinantını 122, 160, 127, 159 ve 140. aa sırasıyla Arg, Liz ve Prolin (Pro) harici, Alanin (Ala) harici ve Serin (Ser) harici aa içermesi ayw2 olarak, 122, 160 ve 127. aa sırasıyla Arg, Liz ve Tirozin (Thr) içermesi ise ayw3 olarak tanımlandı (17, 18).

Hastaların demografik, klinik ve histolojik verileri hasta dosyaları ve/veya gerektiğinde hastanenin elektronik kayıtlarından elde edildi (Tablo 1).

### İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler SPSS (16.0 software, SPSS Inc., Chicago, IL) programı kullanılarak gerçekleştirildi. Veriler arasındaki kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında Ki-kare testi ve/ya Fisher testi, kategorik olmayan verilerin karşılaştırılmasında ise Mann-Whitney U ve One-Way ANOVA testleri kullanıldı. Sonuçlar ortalama ve standart sapmaları ile ifade edildi. p<0,05 değerleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık olarak kabul edildi.

### BULGULAR

#### Hastaların demografik, klinik ve histolojik özellikleri

Çalışmaya dahil edilen hastaların demografik, klinik ve histolojik verileri Tablo 2'de özetlenmiştir. Çalışmaya OBI tespit edilen 4'ü erkek 8'i kadın toplam 12 kronik hepatit C hastası ve 10'u erkek 10'u kadın toplam 20 kronik hepatit C dışı non-viral karaciğer hastalığı olan hasta ile 9'u erkek 8'i kadın toplam 17 kronik B hepatitli hasta dahil edilmiştir. Hastaların yukarıda belirtilen gruplara göre yaş ortalamaları sırasıyla 58,83±14,55 44,85±11 ve 42,75±13,44 olarak dağılım göstermekteydi. Kronik hepatit C'li hastaların yaş ortalaması hem kronik hepatit C dışı non-viral karaciğer hastalığı olan hastalardan hem de kronik B hepatitli hastaların yaş ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı farklılık içermekteydi (p<0,05) (Tablo 2).

OBI tanımlanan kronik hepatit C'li hastalar ile kontrol grubu olarak tanımlanan kronik hepatit B'li hastaların ortalama nekroenflamatuvar aktivite dereceleri sırasıyla 6,25±2,17 ve 3,94±2,7, fibrozis evre düzeyleri ise sırasıyla 2,58±1,16 ve 1,76±1,78 olarak tespit edilmiştir. Viral hepatit gruplarının nekroenflamatuvar aktivite dereceleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmesine (p=0,02) karşın fibrozis evre düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmemiştir (p=0,17) (Tablo 2).

**HBV genotip ve subgenotip dağılımı:** Bu çalışmada OBI ve kronik hepatit B hastalarından izole edilen HBV'lerin hepsinin (%100) genotipi D, majör genotip HBV/D1 ve majör serotip ise ayw2 olarak belirlenmiştir. Çalışmaya dahil edilen kontrol grubu dahil tüm hastaların 37'sinin (%75,5) HBV subgenotipi D1, 3'ünün (%6,1) HBV subgenotipi D2 ve 9'nun (%18,4) HBV subgenotipi ise D3 olarak

**Tablo 2:** Hastaların demografik, klinik ve histolojik özellikleri

Değişkenler	OBI (n=32)		Kronik hepatit B (n=17)	p
	Kronik hepatit C (n=12)	Viral hepatit dışı KC hastalığı (n=20)		
Yaş, Yıl (ort±SD)	58,8±14,5	44,8±11,1	42,7±1,4	<0,05*
Cinsiyet, n (E/K)	4/8	10/10	9/8	0,54
<b>Biyopsi endikasyonu</b>				
Kronik C hastalığı	12			
Metabolik karaciğer hastalığı*		8		
Nedeni bilinmeyen karaciğer enzim yüksekliği		5		
Kolestatik karaciğer hastalığı**		2		
Vasküler karaciğer hastalığı		2		
Siroz		1		
Otoimmün antikor yüksekliği		2		
<b>Karaciğer Histopatoloji</b>				
Nekroenflamatuvar aktivite (Grade), (ort±SD)	6,2±2,1		3,9±2,7	0,02
Fibrozis evre (Stage), (ort±SD)	2,5±1,1		1,7±1,7	0,17
Nonalkolik steatohepatit (NASH)***		7		
Nonalkolik karaciğer yağlanması (NAFLD)****		2		
Non-spesifik değişiklik*****		7		
Vasküler karaciğer hastalığı		2		
Toksik hepatit		1		
Siroz		1		

\*Gruplar arasındaki yaş farkı istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,05$ ). Kronik hepatit C'li hastalar ve kronik hepatit C dışı non-viral karaciğer hastalığı olan hastalar ( $p=0,03$ ), kronik hepatit C'li hastalar ve kronik B hepatitli hastalar ( $p=0,018$ ); \*Karaciğer yağlanması, Hemokromatozis, Wilson hastalığı, \*\*Primer biliyer kolanjit (PBK), Primer sklerozan kolanjit (PSK), \*\*\*Nonalcoholic steatohepatitis, \*\*\*\*Nonalcoholic fatty liver disease, \*\*\*\*\*Histopatolojik tanıda; minimal portal ve lobüler enflamatuvar infiltrat, fibrosis yok, yapısal değişiklik yok

belirlenmiştir. OBI tespit edilen 32 hastanın ise 22'sinin (%68,8) HBV subgenotipi D1, 1'inin (%3,1) HBV subgenotipi D2 ve 9'nun (%28,1) ise HBV subgenotipi D3 olarak belirlenmiştir. OBI tespit edilen 12 kronik hepatit C hastasının 8'inin HBV subgenotipi D1, 4'ünün (%33,3) HBV subgenotipi D3 olarak belirlenmiş, bu grupta HBV subgenotip D2 tespit edilmemiştir. Non-viral karaciğer hastalığı olan ve OBI tanımlanan 20 hastanın 14'ünün (%70) HBV subgenotipi D1, 1'inin HBV subgenotipi D2 ve 5'inin ise (%25) HBV subgenotipi D3 olarak belirlenmiştir. OBI tespit edilen kronik hepatit C ve HCV dışı non-viral karaciğer hastalığı olan hastaların arasında HBV subgenotip dağılımları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilememiştir ( $p=0,121$ ) (Tablo 3).

Kronik hepatit B'li hastaların 15'inin (%88,2) HBV subgenotipi D1, 2'sinin (%11,8) HBV subgenotipi D2 olarak belirlenmiştir. Buna karşın bu grupta HBV subgenotip D3, tespit edilememiştir. Bu çalışmada, OBI ve kronik hepatit B hastalarından izole edilen HBV'lerin subgenotip dağı-

lımları ve sıklığı arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ( $p=0,035$ ) (Tablo 3). HBV D/D3 subgenotip OBI'li hastaların %28,1'de saptanmasına karşın kronik hepatit B hastalarının hiç birinde saptanmamıştır.

**HBV'lerin subtip/serotip prevalansı:** Bu çalışmada HBsAg'nin "a" determinantını kodlayan bölge üzerindeki spesifik pozisyonları bilinen aminoasitlerin (a.a.122,160,127,159,140) varlığı baz alınarak gerçekleştirilen analizlerde tüm hastalardan (49) izole edilen HBV D genotip ilişkili serotipler ayw2 ve ayw3 olarak belirlendi. Bu çalışmaya dahil edilen 49 hastanın 36'sinin (%73,5) HBV serotipi ayw2, 13'nün (%26,5) serotipi ise ayw3 olarak belirlenmiştir (Tablo 3).

OBI'li hastalardan izole edilen 22 HBV D/D1 genotip/subgenotipin tamamının serotipi ayw2, 1 HBV D/D2 genotip/subgenotipin serotipi ayw3, 9 HBV D/D3 genotip/subgenotipin tamamının serotipi de ayw3 olarak belirlenmiştir. OBI tespit edilen kronik hepatit C ve viral hepatit dışı kara-

**Tablo 3:** OBI ve Kr. hepatit B hastalarının genotip, subgenotip ile serotip dağılımı

HBV/D Subgenotipler	OBI (n=32)		Kronik hepatit B (n=17) n (%)	Total (n=49) n (%)	P	Serotip	OBI (n=32)		Kronik hepatit B (n=17)	Total (n=49) n (%)	P
	HCV (n=12) n (%)	Viral hepatit dışı KC hastalığı (n=20) n (%)					HCV (n=12)	Viral hepatit dışı KC hastalığı (n=20)			
D1	8 (66,7)	14 (70)	15 (88,2)	37 (75,5)	0,121 <sup>a</sup>	ayw2	8	14	14	36 (97,3)	0,305 <sup>c</sup>
						ayw3	0	0	1	1 (2,7)	
D2	0	1 (5)	2 (11,8)	3 (6,1)		ayw2	0	0	0	0	
						ayw3	0	1	2	3 (100)	
D3	4 (33,3)	5 (25)	0	9 (18,4)		ayw2	0	0	0	0	
						ayw3	4	5	0	9 (100)	
Total	(12)	(20)	(17)	(49)	0,035 <sup>b</sup>	Total ayw2	(8)	(14)	(14)	36 (73,5)	0,578 <sup>d</sup>
						Total ayw3	(4)	(6)	(3)	13 (26,5)	

<sup>a</sup>OBI'li hastalar arasında subgenotip dağılımı, <sup>b</sup>OBI ve Kronik hepatit B hastaları arasındaki subgenotip dağılımı

<sup>c</sup>OBI'li hastalar arasında subtip/serotip dağılımı, <sup>d</sup>OBI ve Kronik hepatit B hastaları arasındaki subtip/serotip dağılımı

çiğer hastalığı olan hastaların arasında HBV subtiplerinin dağılımları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir (p>0,05) (Tablo 3).

Mevcut çalışmada, kronik hepatit B'li hastalardan izole edilen 15 HBV D/D1 genotip/subgenotipin 14'nün serotipi ayw2, 1'nin serotipi ise ayw3, 2 HBV D/D2 genotip/subgenotipin 2'sinin de serotipi ayw3 olarak belirlenmiştir. OBI'li 32 hastadan izole edilen HBV D genotiplerinin 10'nun (%32,3) serotipi ayw3 olmasına karşın 17 kronik hepatit B hastasından izole edilen HBV D genotiplerinin yalnızca 3'nün (%17,6) serotipi ayw3 olarak belirlenmiştir. Buna karşın OBI ve kronik hepatit B hastalarından izole edilen HBV'lerin subtip dağılımları ve sıklığı arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilememiştir (p=0,305) (Tablo 3).

## TARTIŞMA

HBV genomunda evrimsel süreç içerisinde konak hücre faktörleri ve çevresel faktörlerin etkisiyle meydana gelen varyasyonları yansıtan genotip ve subgenotiplerin viral biyogenez üzerindeki potansiyel virolojik etkileri, enfeksiyonun doğal seyri ve klinik sonuçları üzerinde de etkili olabilmektedir (19, 20). *Hepadnaviridae* ailesi Orthohepadnavirus cinsi içerisinde sınıflandırılan insan hepatitis B virüsü, tüm genom düzeyinde nükleotid farklılığı >%7,5 olan, 9 konfirme genotip (A-I), henüz konfirme edilmemiş bir genotip (J), her bir genotip de kendi

arasında nükleotid farklılığı yaklaşık %4-8 olan ve spesifik coğrafik dağılımları olan 35'den fazla alt genotip içerir. Buna karşın özellikle HBV subgenotiplerinin nihai tanı ve sınıflandırılmasına dair henüz net bir standardizasyon yoktur. HBV genotip D Güney Amerika hariç tüm dünyada yaygın olmasına karşın özellikle Akdeniz kuşağı, Orta Doğu, Afrika ve Hindistanda daha yüksek yayılım gösterir. HBV genotip D, D1-D6 olarak adlandırılan altı subgenotip içerir. HBV subgenotip D1 daha çok Orta Doğu ve Orta Asyada; D2, Avrupa ve Lübnanda; D3 tüm Dünyada; D4 Pasifik adaları ve arktrik toplumlarda; D5 Hindistanda; D6 Afrika bölgesinde yayılım gösterir (21).

HBV Avustralya antijeni ilk defa Blumberg tarafından HBsAg'nin immünolojik epitoplarını içeren bir bölge olarak tanımlandıktan sonra, sırasıyla 'a' determinantı içerisinde yer alan 122, 160, 127, 159, 140. pozisyonlarındaki a.a.'lerin allel varyasyonları (d/y ve w/r) ve spesifik antikor reaksiyonları baz alınarak 9 immünolojik subtipi (ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adwq, adr, ve adrq) tanımlanmıştır (22, 23). HBV genotip D ayw2 ve ayw3 ile bu genotipler için nadir gözlemlenen ayw4 ve adw3 olarak tanımlanan dört serotip içerir (17-19).

Bu çalışmada OBI ve kronik hepatit B hastalarından izole edilen HBV'lerin tümünün genotipi D, subgenotipleri dağılım sıklığına göre sırasıyla HBV/D1 (%75,5), HBV/D3 (%18,4) ve HBV/D2 (%6,1), serotiplerin dağılımı ise sıklığına göre sırasıyla ayw2 (%73,5) ve ayw3 (%26,5) olarak



belirlenmiştir. Çalışmada özetle, HBV D genotipi ile enfekte hastaların büyük çoğunluğunun subgenotipi HBV/D1, serotipi ise ayw2 olarak tespit edilmiştir. Çalışmanın yapıldığı coğrafik bölge uyarınca HBV genotip, subgenotip ve subtiplerine ilişkin elde edilen verilerin öngörülebilir olduğu anlaşılmaktadır.

Çalışma kapsamında OBI tespit edilen 22 hastanın 9'nun (%28,1) subgenotipi HBV/D3 olarak belirlenmesine karşın kronik hepatit B hastalarının hiç birinde HBV/D3 subgenotipi saptanmamıştır ( $p=0,035$ ). Dolayısıyla bu çalışmada OBI ve kronik hepatit B hastalarından izole edilen HBV'lerin subgenotip dağılımları ve sıklığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir (Tablo 3).

HBV'nin kompleks genom organizasyonu ile genlerin kodlanan ve düzenleyici bölgelerinde meydana gelen mutasyonlar viral dinamiği şekillendirebilmektedir. OBI'li bireylerde S gen varyasyonları aşikar enfeksiyonlu bireylere göre daha sıktır (24). HBV polimeraz enziminin RT domaini, 3.5-kb'lik pregenomik RNA'yı infeksiyöz Dane partiküllerinde bulunan yaklaşık 3.2 kb'lik kısmı (parsiyel) çift iplikli HBV genomuna dönüşümünü katalize etmesi nedeniyle viral replikasyon döngüsü için kritik öneme sahiptir (25). HBV genomunda yer alan genlerin çakışması virüse son derece efektif bir genomik organizasyon imkanı tanınmasına karşın bu özgün yapının istenmeyen olumsuz etkileri de olabilmektedir. Örneğin HBV S geninin RNA bağımlı DNA polimeraz/revers transkriptaz (P/RT) enzimini kodlayan polimeraz geni ile veya tersine P geninin S geni ile örtüştüğü bölgelerde meydana gelen mutasyonlar, viral replikasyon kapasitesi ve HBsAg yapısında değişimlere neden olarak, sırasıyla serum HBV DNA düzeylerinde azalma ve HBsAg sentezinin azalması ve/ya sekresyonunun bozulmasına neden olabildiği bunun da HBsAg negatifliği ve düşük replikasyon varlığı ile karakterize OBI ile ilişkili olabileceği ifade edilmektedir (26-29).

HBV/D'nin çoklu coğrafik yayılım ve yüksek heterojenite içeren genotiplerden biri olması, daha yüksek oranda S gen mutasyon/varyasyon içermesi, HBV/D3'ün OBI'li bireylerde diğer subgenotiplere oranla daha fazla varyasyon içerdiği, kronik hepatit B hastaları arasında ise diğer subgenotiplere oranla daha az HBV DNA yükü, daha yavaş hastalık progresyonu ve daha düşük onkojenik potansiyel ile daha düşük replikasyon kapasitesi ile karakterize olduğu yönündeki veriler bu yaklaşımı destekler niteliktedir (30-32). HBV/D3 subgenotipinin bazı coğrafik bölgelerde HBsAg seronegatif kan donörleri ile OBI için risk faktörü olarak kabul edilen damar içi uyuşturucu kullananlar ve madde bağımlıları ile HIV ile ko-enfekte OBI vakalarında daha sık tespit edildiğine dair veriler de HBV/D3'ün OBI ile ilişkili olabileceğine işaret etmektedir (33). Kan donörlerinin %2,96'sının OBI olarak tanımlandığı bir çalışmada; OBI'li vakaların %87'si HBV/D genotipi, HB-

V/D genotipi ile ilişkili subgenotipler HBV/D1, HBV/D2 ve HBV/D3 sırasıyla %7, %26 ve %65 oranında, tüm HBV/D1 izolatlarının serotipi ayw2, biri hariç tüm HBV/D2 izolatlarının serotipi ayw3 ve tüm HBV/D3 izolatlarının serotipi de ayw3 olarak belirlenmiş ve HBV/D3 subgenotiplerinin OBI ile ilişkili olabileceği ifade edilmiştir (34).

Subgenotip HBV/D3 ile enfekte bireylerin demografik özellikleri nedeniyle potansiyel olarak immünsüpresyona ve çoklu viral enfeksiyonlara yatkın olmaları, anti-HBV immün denetim mekanizmalarındaki aksaklıklar ile ilişkili OBI oluşmasında, re-enfeksiyonlara açık olmaları ise viral genomda çoklu varyasyonların birikmesine ve bu varyasyonların neden olabildiği HBsAg sentezi ve viral replikasyon kapasitenin azalması ile ilişkili OBI oluşmasında rol alabileceği, nihayetinde subgenotip HBV/D3'ün OBI için predispozan bir faktör olabileceği öngörülebilir. Dolayısıyla bu çalışmadan elde edilen veriler subgenotip HBV/D3'ün HBsAg negatifliği, persistan ve düşük replikasyon yetkinliği ile karakterize olan ve ayrıca konak immün denetim mekanizmalarındaki aksaklıkların neden olabildiği OBI ile ilişkili olabileceğini destekler niteliktedir.

Bu çalışmada subgenotip HBV/D1 ile ilişkili serotipler ayw2 ve ayw3 sırasıyla %97,3 ve %2,7, HBV/D2 ile ilişkili serotip ayw3 %100, HBV/D3 ile ilişkili serotip ayw3 %100 oranında tespit edilmiştir. Serotipi ayw3 olarak tanımlanan 13 (%26,5) HBV izolatının 10'nu (%76,9) OBI, 3'ü (%23,1) ise kronik hepatit B tanıli hastalardan izole edilmiştir. Gerek hasta grupları ( $p=0,578$ ) gerekse OBI ve kronik hepatit B hastalar arasında serotip dağılımları ( $p=0,305$ ) açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktu. HBV serotip ayw3 sıklıkla HBV/D2 ve HBD/D3'e spesifiktir (35). Bu çalışmadan HBV serotip dağılımına ilişkin elde edilen verilerin, gerek coğrafik gerekse HBV genotip ve subtipleri ile uyumlu olduğu anlaşılmaktadır.

HBV serotip ayw3 ayw1, ayw2 ve ayw4'den farklı olarak HBsAg 'a' determinant bölgesinde yer alan 127. aa pozisyonunda Tirozin (Thr) içerir. 127Thr varyasyonunun HBsAg'nin antijenitesinde azalmaya neden olarak, serolojik tanı amacıyla kullanılan anti-HBs antikorlarına karşı reaktivitesinde azalma ile ilişkili olabileceği dolayısıyla serolojik tanı amacıyla kullanılan testlerin duyarlılığını olumsuz yönde etkileyebileceği bildirilmiştir (35). Bu çalışmada serotip ayw3 olarak tanımlanan 10 OBI'li hastanın hiçbirinde serum HBV DNA saptanmamıştır. Dolayısıyla bu çalışmadan elde edilen veriler uyarınca HBV serotipleri ile OBI arasında direkt bir ilişkili olmadığı öngörülebilir.

Kontrol grubu olarak çalışılan kronik hepatit B hasta sayısının az olması ile kronik C hepatitli hastalar dışındaki non-viral karaciğer hastalığı grubunun homojen bir grup olmaması ve gruptaki hasta sayılarının kısmi yetersiz olması da bu çalışmayı sınırlandıran faktörlerdir. Bu açıdan HBV/D3'ün OBI patogenezini üzerindeki rolünün moleküler

ler düzeyde aydınlatılması amacıyla genom düzeyinde ileri sekans analizleri ve fonksiyonel virolojik deneylerin yapılması gerekli ve yararlı olacaktır.

Sonuç olarak konak ve popülasyon dinamiği ile ilişkili faktörlerin baskısı altında farklılaşan subgenotip HBV/D3'ün OBI patogenezinde potansiyel rolü olabileceği öngörülebilmektedir.

**Etik Komite Onayı:** Bu çalışma için etik komite onayı İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Tarih: 2015, No: 1519).

**Bilgilendirilmiş Onam:** Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Çalışma Konsepti/Tasarım- B.Ç., F.A.; Veri Toplama- B.Ç., A.A., B.Ç., M.B., A.Ö.; Veri Analizi/Yorumlama- B.Ç., F.A., M.G.; Yazı Taslağı- B.Ç.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- F.A.; Son Onay ve Sorumluluk- B.Ç., A.A., B.Ç., A.Ö., M.P., M.G., M.B., M.G.G., F.A.

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

**Finansal Destek:** Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri kapsamında desteklenmiştir (Proje No: THZ-2018-26422).

**Teşekkür:** İstanbul Tıp Fakültesi Gastroenterohepatoloji Bilim Dalında görevli Sayın Hemşire Nilay Arabacı ve Sayın Hemşire Derya Kaya ile İstanbul Tıp Fakültesi Radyoloji Anabilim Dalı Girişimsel Radyoloji Birimi'nde görevli Sayın Hemşire Arzu Örentel'e projenin gerçekleştirilmesi aşamasındaki bilimsel duyarlılıkları, katkıları ve emeklerinden dolayı şükranlarımızı sunarım.

**Ethics Committee Approval:** This study was approved by the Ethical Committee of the Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine (Date: 2015, No: 1519).

**Informed Consent:** Written consent was obtained from the participants.

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

**Author Contributions:** Conception/Design of Study- B.Ç., F.A.; Data Acquisition- B.Ç., A.A., B.Ç., M.B., A.Ö.; Data Analysis/Interpretation- B.Ç., F.A., M.G.; Drafting Manuscript- B.Ç.; Critical Revision of Manuscript- F.A.; Final Approval and Accountability- B.Ç., A.A., B.Ç., A.Ö., M.P., M.G., M.B., M.G.G., F.A.

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

**Financial Disclosure:** This study was supported by Istanbul University Scientific Research Projects (Project No: THZ-2018-26422)

**Acknowledgement:** Authors sincerely thank to nurses Nilay Arabacı and Derya Kaya, who are working at Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine Division of Gastroenterohepatology

and Arzu Örentel who is working at Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Department of Radiology for their contributions and efforts in this project.

## KAYNAKLAR/REFERENCES

1. Revill PA, Chisari FV, Block JM, Dandri M, Gehring AJ, Guo H, et al. Lancet Gastroenterol. Hepatol 2019;4:545-58.
2. Raimondo G, Locarnini S, Pollicino T, Levrero M, Zoulim F, Lok AS, and the Taormina Workshop on Occult HBV Infection Faculty Members. Update of the statements on biology and clinical impact of occult hepatitis B virus infection. J Hepatol 2019;71(2):397-408. [CrossRef]
3. Raimondo G, Allain JP, Brunetto MR, Buendia MA, Chen DS, Colombo M, et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. J Hepatol 2008;49:652-7. [CrossRef]
4. Torbenson M, Thomas DL. Occult hepatitis B. Lancet Infect Dis 2002;2:479-86. [CrossRef]
5. Chemin I, Trepo C. Clinical impact of occult HBV infections. J Clin Virol 2005;34:15-21. [CrossRef]
6. Pondé RAA. Molecular mechanisms underlying HBsAg negativity in occult HBV infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2015;34:1709-31. [CrossRef]
7. Pollicino T, Raimondo G. Occult Hepatitis B Infection. Journal of Hepatology 2014;61:688-9. [CrossRef]
8. Raimondo G, Caccamo G, Filomia R, Pollicino T. Occult HBV infection. Semin Immunopathol 2013;35:39-52. [CrossRef]
9. Lugoboni F, Quaglio G, Civitelli P, Mezzelani P. Bloodborne viral hepatitis infections among drug users: the role of vaccination. Int J Environ Res Public Health 2009;6(1):400-13. [CrossRef]
10. Chen BF, Chen PJ, Jow GM, Sablon E, Liu CJ, Chen DS, et al. High prevalence of mixed genotype infections in hepatitis B virus infected intravenous drug users. J Med Virol 2004;74(4):536-42. [CrossRef]
11. Locarnini S, Zoulim F. Molecular genetics of HBV infection Antivir Ther 2010;3:3-14. [CrossRef]
12. Seddigh-Tonekaboni S, Waters JA, Jeffers S, Gehrke R, Ofenloch B, Horsch A, et al. Effect of variation in the common "a" determinant on the antigenicity of hepatitis B surface antigen. J Med Virol 2000;60:113-21. [CrossRef]
13. Waters J, Kennedy M, Voet P, Hauser P, Petre J, Carman W, et al. Loss of the common 'a' determinant of hepatitis B surface antigen by a vaccine-induced escape mutant. J Clin Invest 1992;90:2543-47. [CrossRef]
14. Osiowy C. Detection of HBsAg mutants. J Med Virol 2006;78:48-51. [CrossRef]
15. Huang CH, Yuan Q, Chen PJ, Zhang YL, Chen CR, Zheng QB, et al. Influence of mutations in hepatitis B virus surface protein on viral antigenicity and phenotype in occult HBV strains from blood donors. Journal of Hepatology 2012;57:720-9. [CrossRef]
16. McMahon, BJ. The influence of hepatitis B virus genotype and subgenotype on the natural history of chronic hepatitis B Hepatol Int 2009;3:334-42. [CrossRef]
17. Purdy MA, Talekar G, Swenson P, Araujo A, Fields H. A New Algorithm for Deduction of Hepatitis B Surface Antigen Subtype Determinants from the Amino Acid Sequence. Intervirology 2007;50:45-51. [CrossRef]

18. Norder H, Couroucé AM, Coursaget P, Echevarria JM, Lee SD, Mushahwar IK, et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: Genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology* 2004;47:289-309. [\[CrossRef\]](#)
19. Kramvis A. Genotypes and Genetic Variability of Hepatitis B Virus. *Intervirology* 2014;57(3-4):141-50. [\[CrossRef\]](#)
20. Zhang ZH, Wu CC, Chen XW, Li X, Li J, Lu MJ. Genetic variation of hepatitis B virus and its significance for pathogenesis. *World J Gastroenterol* 2016;22(1):126-44. [\[CrossRef\]](#)
21. Revill PA, Tu T, Netter HJ, Yuen LKW, Locarnini SA, Littlejohn M. The evolution and clinical impact of hepatitis B virus genome diversity. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2020. [\[CrossRef\]](#)
22. Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A new antigen in leukemia sera. *JAMA* 1965;191:541. [\[CrossRef\]](#)
23. Bancroft WH, Mundon FK, Russell PK. Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen. *J Immunol* 1972;109: 842-8.
24. Weinberger KM, Bauer T, Bohm S, Jilg W. High genetic variability of the group-specific a-determinant of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and the corresponding fragment of the viral polymerase in chronic virus carriers lacking detectable HBsAg in serum. *J Gen Virol* 2000;81:1165-74. [\[CrossRef\]](#)
25. Raney AK, Johnson JL, Palmer CNA, McLachlan A. Members of the nuclear receptor superfamily regulate transcription from the hepatitis B virus nucleocapsid promoter. *J Virol* 1997;71:1058-71. [\[CrossRef\]](#)
26. Pollicino T, Cacciola I, Saffiotti F, Raimondo G. Hepatitis B virus PreS/S gene variants: Pathobiology and clinical implications. *Journal of Hepatology* 2014;61:408-17. [\[CrossRef\]](#)
27. Sheldon J, Rode's B, Zoulim F, Bartholomeusz A, Soriano V. Mutations affecting the replication capacity of the hepatitis B virus. *Journal of Viral Hepatitis* 2006;13:427-34. [\[CrossRef\]](#)
28. Mirabelli C, Surdo M, Hemert F-V, Lian Z, Salpini R, Cento V. Specific mutations in the C-terminus domain of HBV surface antigen significantly correlate with low level of serum HBV-DNA in patients with chronic HBV infection. *Journal of Infection* 2015;70:288e298. [\[CrossRef\]](#)
29. Huang X, Qin Y, Li W, Shi Q, Xue Y, Li J, et al. Molecular analysis of the hepatitis B virus presurface and surface gene in patients from eastern China with occult hepatitis B. *J Med Virol* 2013;85:979-86. [\[CrossRef\]](#)
30. Chandra PK, Biswas A, Datta S, Banerjee A, Panigrahi R, Chakrabarti S. et al. Subgenotypes of hepatitis B virus genotype D (D1, D2, D3 and D5) in India: differential pattern of mutations, liver injury and occult HBV infection. *J Viral Hepat* 2009;16:749-56. [\[CrossRef\]](#)
31. Datta S, Dasgupta D, Ghosh A, Ghosh S, Manna A, Datta S. Oncogenic potential of hepatitis B virus subgenotype D1 surpasses D3: significance in the development of hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2018;39:283-92. [\[CrossRef\]](#)
32. Khatun M, Mondal RK, Pal S, Baidya A, Bishnu D, Banerjee P, et al. Distinctiveness in virological features and pathogenic potentials of subgenotypes D1, D2, D3 and D5 of Hepatitis B virus. *Sci Rep* 2018;23;8(1):8055. [\[CrossRef\]](#)
33. Alestig E, Söderström A, Norkrans G, Lindh M. Genetic Diversity of Genotype D3 in Acute Hepatitis B. *J Med Virol* 2013;85(7):1148-54. [\[CrossRef\]](#)
34. Biswas A, Panigrahi R, Chandra PK, Banerjee A, Datta S, Pal M. Characterization of the Occult Hepatitis B Virus Variants Circulating among the Blood Donors from Eastern India. *ScientificWorld Journal* 2014;4:212704.
35. Scheiblaue H, El-Nageh M, Diaz S, Nick S, Zeichhardt H, Grunert HP, et al. Performance evaluation of 70 hepatitis B virus (HBV) surface antigen (HBsAg) assays from around the world by a geographically diverse panel with an array of HBV genotypes and HBsAg subtypes *Vox Sanguinis* 2010;98:403-14. [\[CrossRef\]](#)

## HISTORY OF PLASMA THERAPY: A CURRENTLY USED TREATMENT OPTION FOR COVID-19

### PLAZMA TEDAVİSİNİN TARİHİ: COVID-19 ENFEKSİYONU İÇİN GÜNÜMÜZDE KULLANILMAKTA OLAN BİR TEDAVİ SEÇENEĞİ

Esra BİLİR<sup>1</sup> , Emine Elif VATANOĞLU LUTZ<sup>2</sup> , Ayşe Arzu AKALIN<sup>3</sup> 

<sup>1</sup>American University of Sovereign Nations, School of Medicine, Sacaton, AZ, USA

<sup>2</sup>Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Department of Medical History and Ethics, Istanbul, Turkey

<sup>3</sup>Yeditepe University, Faculty of Medicine, Department of Family Medicine, Istanbul, Turkey

**ORCID IDs of the authors:** E.B. 0000-0003-4499-6543; E.E.V.L. 0000-0003-3156-4733; A.A.K. 0000-0001-6384-2035

**Cite this article as:** Bilir E, Vatanoglu Lutz EE, Akalin AA. History of plasma therapy: a currently used treatment option for COVID-19. J Ist Faculty Med 2021;84(3):411-4. doi: 10.26650/IUITFD.2020.0106

#### ABSTRACT

The current pandemic provides the most incredible opportunity to develop convalescent plasma therapy into an effective treatment modality for the coronavirus disease 2019 (COVID-19) caused by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) while a vaccine is still under development. The global reach of this pandemic, and the immediate need for effective treatments for patients with severe and critical COVID-19, is driving both basic and clinical research at an unprecedented rate. Convalescent plasma therapy is a treatment option that has been known since the 1900s and has been used in various disease treatments since then. Convalescent plasma therapy is one of the treatments currently being used in the treatment of patients with COVID-19. We see that this treatment method was likewise used in the Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV), the severe acute respiratory syndrome (SARS), and Ebola epidemics, which occurred worldwide in the recent past. This review aims to provide an overview of plasma therapy's history and the scientists behind this vital discovery. Secondly, we report the recent global advances in convalescent plasma use in COVID-19 treatment.

**Keywords:** COVID-19, convalescent plasma therapy, history

#### ÖZET

İçinde bulunduğumuz mevcut pandemide "Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2" (SARS-CoV-2) virüsünün neden olduğu yeni koronavirüs hastalığı (COVID-19) için aşı geliştirme çalışmaları devam ederken, konvalesan plazma tedavisi de etkili bir tedavi yöntemi olarak bir fırsat sunmaktadır. Bu pandemide, şiddetli ve kritik COVID-19 hastaları için etkili acil tedavilere ihtiyaç duyulmakta, hem temel hem de klinik araştırmalar benzeri görülmemiş bir hızda devam etmekte ve bir çok çalışma konvalesan plazma tedavisine yönlendirmektedir. Konvalesan plazma tedavisi, 1900'lerden beri bilinen ve o zamandan beri çeşitli hastalıklarda kullanılan bir tedavi seçeneğidir. Konvalesan plazma tedavisi halihazırda COVID-19 tanılı hastaların tedavisinde kullanılan tedavi seçeneklerinden birisidir. Yakın geçmişte dünyayı etkisi altına alan the Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV), the severe acute respiratory syndrome (SARS) ve Ebola salgınlarında da bu tedavi yönteminin uygulandığını görmekteyiz. Bu derlemede konvalesan plazma tedavisinin tarihçesine ve bu hayati buluşun arkasındaki bilim insanlarına genel bir bakış atmayı amaçlıyoruz. İkincil olarak, COVID-19'un tedavisinde dünyadaki plazma kullanımındaki küresel gelişmeleri sunmak hedeflendi.

**Anahtar Kelimeler:** COVID-19, konvalesent plazma tedavisi, tarihçe

**Corresponding author/İletişim kurulacak yazar:** drvatanoglu@yahoo.com

**Submitted/Başvuru:** 16.09.2020 • **Accepted/Kabul:** 04.11.2020 • **Published Online/Online Yayın:** 26.05.2021



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

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) was declared a pandemic on March 11, 2020 by the World Health Organization (WHO) (1). Since then scientists and clinicians have been extensively working to find a cure for COVID-19 and also produce an effective vaccine against SARS-CoV-2. High-quality evidence showing the effectiveness of treatments for COVID-19 is scarce, but recent studies are now registered in testing a range of therapies, including immunosuppressants and remdesivir. One therapy being tested is convalescent plasma, also known as an immune plasma or hyperimmune plasma, is a type of passive antibody therapy, in which blood plasma is isolated from people who have recovered from the disease of interest and is administered to those with the disease to suppress viremia and improve clinical symptoms (2). In this review, we aim to briefly present the history of convalescent plasma therapy. As the secondary goal of this review, we report the recent global advances in convalescent plasma use in COVID-19 treatment.

The acquisition of immunity to a disease that a patient has already encountered has been documented for many centuries. Some of the earliest work in the field that has now become known as immunology was performed in the period around 1714-1717 (3). Lady Mary Wortley Montagu pioneered a smallpox inoculation, a course of action unparalleled in medical progress up to that point. Variolation used live smallpox virus in the liquid taken from a smallpox blister in a mild case of the disease and was carried in a nutshell. In 1798, the first smallpox vaccination was more notably demonstrated by Edward Jenner. This was performed by inoculating a boy with the fluid from a cowpox pustule giving him immunity to the very similar but much more severe disease smallpox (3).

Emil von Behring, lived between 1854 and 1917, and studied medicine at the Kaiser-Wilhelm-Akademie in Berlin, an academy for military doctors. He had ascertained that the serum of tetanus-immune white rats contained a substance that neutralized anthrax bacilli in 1887 and saw this as the cause of "resistance" (4). In early 1889, he worked in Berlin with Shibasaburo Kitasato on the isolation and definition of this agent. One of their goals was still the discovery of suitable systemic disinfecting agents, especially against anthrax, for which iodine, gold, and zinc compounds were tested. On December 4, 1890, Behring and Kitasato jointly published their first paper on blood-serum therapy, followed on 11 December by another report, signed by Behring alone, which discussed the blood-serum therapy not only in the treatment of tetanus but also of diphtheria (4). In that article, he stressed four main points:

1- The blood of tetanus-immune rabbits possesses tetanus toxin-destroying properties.

2- These properties are also present in extravascular blood and the cell-free serum obtained from the latter.

3- These properties are so lasting that they remain effective when injected into other animals, thus making it possible to achieve excellent therapeutic effects with blood or serum transfusions.

4- Tetanus toxin-destroying properties are not present in the blood of animals, not immune to tetanus (4).

Behring immediately recognized that evidently, a new principle of defense by the organism against infection had been discovered. Behring won the first Nobel Prize in Physiology or Medicine in 1901 to develop serum therapies against diphtheria (3).

In the same time interval in 1900, we also see Paul Ehrlich, who is regarded as one of the pioneers of modern immunology, proposed the side-chain theory, where he hypothesized that side-chain receptors on cells bind to a given pathogen. He was the first to propose a model for an antibody molecule in which the antibody was branched and consisted of multiple sites for binding to foreign material, known as antigen, and for the activation of the complement pathway. This model agreed with the 'lock and key' hypothesis for enzymes proposed by Emil Fischer and still in general terms holds true today (5).

In 1944, Swedish physician Jan G. Waldenström described a case of macroglobulinemia with symptoms of increased blood viscosity. In 1955, Jan G. Waldenström performed an effective plasmapheresis procedure on a patient with macroglobulinemia and noted an effective reduction of macroglobulin in the blood. Astrid Fagraeus, in 1948 described that plasma B cells were specifically involved in antibody generation. By 1957 Frank Burnet and David Talmage had developed the clonal selection theory. This stated that a lymphocyte makes a single specific antibody molecule that is determined before it encounters an antigen, which was in contrast to the instructive theory developed by Linus Pauling in 1940, where the antigen acted as a template for the antibody (4).

By 1959 Gerald Edelman and Rodney Porter had independently published the molecular structure of antibodies, for which they were later jointly awarded the Nobel Prize in 1972 (6). The first atomic-resolution structure of an antibody fragment was published in 1973. That was quickly followed by the invention of monoclonal antibodies in 1975 by Georges Köhler and César Milstein, signaling the start of the modern era of antibody research and discovery (5). Today the term plasma therapy includes different techniques (filtration or adsorption on plasma), which remove not all, but only specific elements contained in the plasma and altogether allow treatment of a large number of diseases (7).

Our recent history regarding the use of convalescent plasma therapy against viral infections therapy includes the severe acute respiratory syndrome (SARS) epidemic, the Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) epidemic, and the Ebola epidemic (8-10). Human-to-human transmission of SARS and MERS-CoV is through respiratory droplets, but the Ebola virus was transmitted via body fluids, including urine, saliva, sweat, feces, breast milk, and semen (11). In late 2002, the SARS epidemic emerged in China. In nine months, WHO shared the data on the SARS epidemic as over eight thousand people infected, where almost 800 deaths had occurred, leading to a case fatality ratio of 9.6% (12). The results of a study included 80 patients with SARS in Hong Kong supported the use of convalescent plasma therapy in the early phase of SARS (8). In late 2012, the MERS-CoV epidemic started in Saudi Arabia (9). Since the case fatality rate was too high, reaching almost 50%, many experimental therapies evaluated against MERS-CoV infection, where one was convalescent plasma therapy supported by WHO (13). However, a feasibility study, conducted to investigate the use of convalescent plasma therapy against MERS-CoV, did not show the high-titer convalescent plasma for passive immunotherapy of MERS-CoV infection (14). As part of the conclusions, the authors emphasized the need for well-designed clinical trials (14). Thus far, we had seen several Ebola virus outbreaks, where the first one was believed to be in 1976 in Sudan (15). The overall case fatality rate has reached to 40% (15). A study evaluating the use of convalescent plasma therapy against Ebola infection concluded that the therapy did not result in significant improvement in survival where it included a total of 84 patients with confirmed previous Ebola infection (10). These experiences with the use of convalescent plasma therapy showed that there is a need for improvement in this option to work better in the clinic.

According to WHO reports, COVID-19 had caused more than 900,000 deaths and infected more than 28 million people in the world at the time of writing this review (16). While the research being conducted to find an effective medical regimen to treat patients with COVID-19, convalescent plasma therapy remains as one of the options investigated against COVID-19. Many countries, including Turkey encouraged the recovered patients from COVID-19 to donate blood that will be used for convalescent plasma therapy for hospitalized patients with COVID-19. Currently, the optimal antibody titer that should be used in convalescent plasma, is not well known. Thus, we need clinical studies to establish the titer values to make convalescent plasma therapy better. The United States of America's (USA) authority, known as the Food and Drug Administration (FDA) did not give license to convalescent plasma therapy for its use in treating patients with COVID-19. However, the FDA released a letter in response to Robert P. Kadlec's, MD, MTM&H,

MS request on the use of convalescent plasma therapy for COVID-19 on August 23, 2020 and granted its use as Emergency Use Authorization (EUA) (17). Ten days later, on September 2, 2020, the FDA resealed new guidance called "Recommendations for Investigational COVID-19 Convalescent Plasma" (18). Since the clinical trials are the gold standard research tool for investigating the effectiveness of a treatment, we aimed to evaluate the ongoing clinical trials being conducted in a search at www.clinicaltrials.gov where we used "Covid19" as *Condition or disease* and "Convalescent plasma" as *Other terms* on September 12, 2020. This search yielded 148 clinical trials in total, where the majority (37.8%) came from the USA. Ten of these clinical trials were reported to be completed, whereas only one was withdrawn.

Despite its 100-years-plus history, never before has the use of convalescent plasma been so thoroughly tested for use as a viable therapeutic. Whatever the outcome of the many clinical trials being conducted, we will undoubtedly learn a lot about the most efficient ways to collect, process, and safely use convalescent plasma. The medical world is so far hopeful for a positive outcome for convalescent plasma use in COVID-19. Fortunately, our improved understanding of convalescent plasma will also be valuable for pandemics of the future.

---

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

**Author Contributions:** Conception/design of study- E.B., E.E.V.L.; Data acquisition- E.B., E.E.V.L.; Data analysis/interpretation- E.B., E.E.V.L., A.A.A.; Drafting manuscript- E.B., E.E.V.L., A.A.A.; Critical revision of manuscript- E.B., E.E.V.L., A.A.A.; Final approval and accountability- E.B., E.E.V.L., A.A.A.

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

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

---

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Çalışma konsepti/tasarım- E.B., E.E.V.L.; Veri toplama- E.B., E.E.V.L.; Veri analizi/yorumlama- E.B., E.E.V.L., A.A.A.; Yazı taslağı- E.B., E.E.V.L., A.A.A.; İçeriğin eleştirel incelemesi- E.B., E.E.V.L., A.A.A.; Son onay ve sorumluluk- E.B., E.E.V.L., A.A.A.

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

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

## REFERENCES

1. World Health Organization. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. (cited 2020 August 27), Available from: URL: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>.

2. Li L, Zhang W, Hu Y, Tong X, Zheng S, Yang J, et al. Effect of Convalescent Plasma Therapy on Time to Clinical Improvement in Patients With Severe and Life-threatening COVID-19: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2020;324(5):460-70. doi: 10.1001/jama.2020.10044. Erratum in: *JAMA* 2020;324(5):519. [CrossRef]
3. Kaufmann SHE. Emil von Behring: translational medicine at the dawn of immunology. *Nat Rev Immunol* 2017;17(6):341-3. [CrossRef]
4. Sanz ML. Legends of Allergy/Immunology: Albert K. Oehling. *Allergy* 2019;74(2):382-4. [CrossRef]
5. Gmelig-Meyling FH, Meyaard L, Mebius RE. 50 years of Dutch immunology--founders, institutions, highlights. *Immunol Lett*. 2014;162(2 Pt B):85-94. doi: 10.1016/j.imlet.2014.10.014. Epub 2014 Oct 16. Erratum in: *Immunol Lett*. 2015 May;165(1):62. [CrossRef]
6. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1972. (cited 2020 August 27), Available from: URL: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1972/summary/>.
7. Bloch EM, Shoham S, Casadevall A, Sachais BS, Shaz B, Winters JL, et al. Deployment of convalescent plasma for the prevention and treatment of COVID-19. *J Clin Invest* 2020;130(6):2757-65. [CrossRef]
8. Cheng Y, Wong R, Soo YO, Wong WS, Lee CK, Ng MH, et al. Use of convalescent plasma therapy in SARS patients in Hong Kong. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005;24(1):44-6. [CrossRef]
9. McIntosh, K. Middle East respiratory syndrome coronavirus: Treatment and prevention. In: UpToDate, Post TW (Ed), UpToDate, Waltham, MA. (cited 2020 September 12)
10. van Griensven J, Edwards T, de Lamballerie X, Semple MG, Gallian P, Baize S, et al. Evaluation of Convalescent Plasma for Ebola Virus Disease in Guinea. *N Engl J Med* 2016;374(1):33-42. [CrossRef]
11. Centers for Disease Control and Prevention. Review of human-to-human transmission of Ebola virus. (cited 2020 September 12), Available from: URL: <http://www.cdc.gov/vhf/ebola/transmission/human-transmission.html>.
12. World Health Organization. Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003 (based on data as of the 31 December 2003). (cited 2020 September 12), Available from: URL: [http://www.who.int/csr/sars/country/table2004\\_04\\_21/en/index.html](http://www.who.int/csr/sars/country/table2004_04_21/en/index.html).
13. World Health Organization. WHO-ISARIC joint MERS-CoV Outbreak Readiness Workshop: Clinical management and potential use of convalescent plasma. (cited 2020 September 12), Available from: URL: [http://www.who.int/csr/disease/coronavirus\\_infections/MERS\\_outbreak\\_readiness\\_workshop.pdf](http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/MERS_outbreak_readiness_workshop.pdf).
14. Arabi YM, Hajeer AH, Luke T, Raviprakash K, Balkhy H, Johani S, et al. Feasibility of Using Convalescent Plasma Immunotherapy for MERS-CoV Infection, Saudi Arabia. *Emerg Infect Dis* 2016;22(9):1554-61. [CrossRef]
15. Bray M, Chertow DS. Epidemiology and pathogenesis of Ebola virus disease. In: UpToDate, Post TW (Ed), UpToDate, Waltham, MA. (cited 2020 September 12) [CrossRef]
16. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. (cited 2020 September 12), Available from: URL: <https://covid19.who.int>.
17. US Food and Drug Administration. Emergency use authorization for convalescent plasma. (cited 2020 September 12), Available from: URL: <https://www.fda.gov/media/141477/download>.
18. US Food and Drug Administration. Recommendations for Investigational COVID-19 Convalescent Plasma. (cited 2020 September 12), Available from: URL: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/investigational-new-drug-ind-or-device-exemption-ide-process-cber/recommendations-investigational-covid-19-convalescent-plasma>.

# HEMATOPOETİK KÖK HÜCRE İZOLASYONUNDA GÜNCEL YÖNTEMLER

## CURRENT METHODS IN ISOLATION OF HEMATOPOIETIC STEM CELL

Nilgün OKŞAK<sup>1</sup> , Dürdane Serap KURUCA<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Harran Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Şanlıurfa, Türkiye

<sup>2</sup>İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Fiziyojji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

**ORCID IDs of the authors:** N.O. 0000-0002-6058-9414; D.S.K. 0000-0001-7878-9994

**Cite this article as:** Oksak N, Kuruca DS. Current methods in isolation of hematopoietic stem cell. J Ist Faculty Med 2021;84(3):415-24.  
doi: 10.26650/IUITFD.2020.0058

### ÖZET

Hematopoetik kök hücreler (HKH) başta kemik iliği (Kİ) olmak üzere çeşitli hematopoetik organlarda, kordon kanında (KK), aferez materyalinde ve periferik kanda çok az sayıda bulunmaktadır (1-100 hücre/ml). Bu hücrelerin saflaştırılarak diyabet, kanser, kalp, nörolojik hastalıklar, kas ve eklem sorunları olan hastalara nakledilmesi fonksiyonu bozulan doku ve organların rejenerasyonunu sağlayacaktır. Kansere hastalarında otolog kök hücrelerin transplantasyonunda en önemli sorun malign hücre kontaminasyonudur. Allojenik transplantasyonda ise hücreler farklı kişilerden alındığı için, alıcıda meydana gelen immün reaksiyonlar ve doku reddi bu alanın en önemli sorunudur. Dolayısıyla transplant materyalinin tümör hücrelerinden ve immün hücrelerden temizlenmesi nakledildiği dokuda uzun süreli ve sağlıklı rejenerasyonu sağlayacaktır. Klinik kullanım için bu hücrelerin saflaştırılmasında uzun yıllar çeşitli teknikler geliştirilmesine rağmen halen uygun ve etkili bir yöntem bulunmamaktadır. Son yıllarda geliştirilen mikroakışkan sistemler (mikroçipler) kolay, ucuz ve yüksek verimli olması nedeni ile araştırılmaktadır. Çeşitli mikrokapiller, mikrosütunlar, mikroporlarla dizayn edilen bu sistemlerde hücrelerin boyut, mekanik esneklik, deformabilite, hücre adezyonu ve elektrik yükleri gibi özelliklerine dayalı saflaştırma yapılmaktadır. Başlangıçta çok az sayıda bulunan dolaşımdaki tümör hücrelerini (DTH) yakalamak amacıyla geliştirilen bu sistemler şimdi çeşitli hücrelerin, mikroveziküllerin ve eksozomların saflaştırılması ve tanısı için kullanılmaktadır. Bu derleme, geleneksel ve gelişmekte olan hematopoetik kök hücre izolasyon yöntemleri ile bu yöntemlerin avantajları ve dezavantajlarını açıklamayı amaçlamaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Kök hücre izolasyonu, mikroakışkan sistemler

### ABSTRACT

Hematopoietic stem cells are the rare cells in various hematopoietic organs which are found in small numbers (1-100 cells/ml). When these cells are transferred to patients suffering from diabetes, cancer, heart diseases, muscle and joint problems, they will help the patients' bodies with the regeneration of impaired tissues. While the most important problem in the transplantation of autologous stem cells is malignant cell contamination in cancer patients, in allogeneic transplantation, it is immune reactions and tissue rejections. Therefore, clearing of the transplant material from tumour cells and immune cells may support the long-term healthy regeneration of the tissue to which they are transplanted. Although various techniques have been developed for the purification of these cells in terms of clinical use over many years, there is still no sufficiently effective method. In recent years, researchers have shown an increased interest in microfluidic systems because they are easy to use, cheap and highly efficient. In these types of systems designed with various microcapillaries, micropillars and micropores; purification is carried out according to the properties of cells such as size, deformability, cell adhesion and electrical charges. This review aims to explain traditional and emerging hematopoietic stem cell isolation methods and their advantages and disadvantages.

**Keywords:** Stem cell isolation, microfluidic system

**Corresponding author/İletişim kurulacak yazar:** nilgunoksak@harran.edu.tr

**Submitted/Başvuru:** 12.05.2020 • **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 05.06.2020 •

**Last Revision Received/Son Revizyon:** 26.07.2020 • **Accepted/Kabul:** 07.09.2020 • **Published Online/Online Yayın:** 09.03.2021



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



## GİRİŞ

Hücrelerin ve biyomoleküllerin davranışları ve özellikleri, doku ve organların fonksiyonları hakkında bize önemli bilgiler sunar. Hücreler ve biyomoleküller üzerindeki detaylı analizler biyolojik çalışmalarda ve klinik tanıda büyük öneme sahiptir (1). Bu analiz basamaklarından biri de hücre izolasyonudur. Hücre izolasyonu, birçok biyolojik ve biyomedikal araştırmalarda, klinik tedavi ve tanıda yaygın olarak kullanılmaktadır. Klinik kullanım açısından terapötik hücre izolasyonu, hastaya zenginleştirilmiş hücre popülasyonlarının verilmesini sağlar. Lökositlerin aferezle ayrıştırılması veya hematopoetik kök hücreler (HKH) immünomagnetik ayırma ile zenginleştirilmesi buna örnektir (2). HKH nakli, kemik iliği (Kİ) hasar görmüş hastalarda kemik iliği fonksiyonunun yeniden yapılandırılması amacıyla intravenöz ya da oral yüksek doz kemoterapi veya radyoterapiyi takiben yapılan uygulamadır. İlk kez 1939'da aplastik anemi tedavisinde uygulanmıştır. 1950'de hematolojik kanserlerin tedavisinde kullanılmaya başlanmış ancak iyi bir sonuç elde edilememiştir. 1968'de insan lökosit antijenlerinin keşfedilmesiyle allojenik-kök hücre nakli ilk kez Minnesota Üniversitesinde başarıyla gerçekleştirilmiştir (3).

Kök hücre uygulamalarındaki ilerlemeler; daha verimli, basitleştirilmiş, kullanıma hazır ve son derece işlevsel kök hücreler elde etmek için birçok doku tipine geniş çapta uygulanabilen kök hücre izolasyon yöntemlerine duyulan ihtiyacı arttırmıştır (4). Bu yöntemler doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanlarında olduğu gibi biyokimya, elektrik mühendisliği, fizik ve malzeme bilimi gibi birçok alanda da kullanılmaktadır (2). Ticari olarak geçerli ve yaygın olarak kullanılmış birçok kök hücre izolasyon teknikleri olmasına rağmen, etkinlikleri ve özgüllükleri hala yetersizdir (4). Aynı zamanda pahalı ve zaman alma, gelişmiş ekipmanlara ve uzman personele ihtiyaç duyma gibi dezavantajları da vardır (5). Bu derleme, geleneksel ve gelişmekte olan hematopoetik kök hücre izolasyon yöntemleri ile bu yöntemlerin avantajları ve dezavantajlarını açıklamayı amaçlamaktadır.

## HEMATOPOETİK KÖK HÜCRELERİN KLİNİK UYGULAMADAKİ YERİ

Kök hücreler, özelleşmiş hücrelere farklılaşabilen ve insan vücudundaki birçok farklı doku veya organın kendini onarmasını sağlayan benzersiz hücrelerdir (6). Doku, kan ve Kİ'nde bulunan kök hücrelerin rejeneratif potansiyeli kesin olarak belirlenmiştir. Kök hücre çalışmaları, son yıllarda biyolojinin temel sorunlarını incelemek ve hastalıkların tedavisinde yeni seçenekler sunmak üzere en çok araştırmanın yapıldığı bir alandır (4). Kök hücre nakli, lösemi ve lenfoma gibi bazı malign kan hastalıkları, Kİ-yetmezlikleri ile doğumsal kan hastalıklarının tedavisinde sıklıkla başvurulan hayat kurtarıcı yöntemlerden biridir (7). Bu hastalıklara ek olarak diyabette; deri kaybı, otoimmün, nörolojik, eklem ve kas hastalıklarında, kardiyovasküler hastalıklarda, bazı kanser türlerinde de geniş uygulama

alanı bulmaktadır (8-10). Ayrıca iskemi ve reperfüzyon hasarının tedavisinde kök hücrelerin kullanılması ile aşırı inflamasyonun baskılandığı ve hücre hasarının onarıldığı gösterilmiştir (11).

Hematopoez, HKH'den tüm kan hücre tiplerinin oluştuğu hiyerarşik farklılaşma sürecidir. HKH'ler kendini yenileme ve çok yönlü farklılaşma yeteneğine sahip hücrelerdir (12). Kök hücre tedavisinde, klinik kullanımda daha çok bu hücreler tercih edilmektedir. HKH'ler mobilize periferik kan (MPK), kordon kanı (KK) ve Kİ'den elde edilmektedir (13). HKH, kemik iliğinde 1:10.000-15.000 iken dolaşan kanda bu oran 1:100.000'dir (14). Heterojen bir süspansiyondan HKH popülasyonlarının izole edilmesi, klinik uygulama ve temel araştırmaların olmazsa olmaz ön koşuludur (4). Uzun yıllardan beri kök hücrelere, izolasyon yöntemleri uygulanmıştır. Kök hücre izolasyon yöntemleri hücrelerin fiziko-kimyasal, biyo-fiziksel ve immün-afinite özellikleri ile tanımlanan prensiplere göre gruplandırılabilir (Tablo 1).

**Tablo 1:** Kök hücre izolasyon yöntemleri (15)\*

Yöntem	Hücresel özellikler
1. Fiziko-kimyasal bazlı izolasyon Santrifügasyon Membran filtrasyonu	Boyut, yoğunluk ve yapışma özelliklerine göre
2. İmmün-afinite bazlı izolasyon FACS MACS Afinite kromatografisi Sulu iki fazlı afinite izolasyonu	Yüzey belirteçlerinin ekspresyon düzeyine göre
3. Biyo-fiziksel bazlı izolasyon(etiketsiz) FFF DEP	Elektriksel, ataletsel/ataletsel olmayan gibi özellikler
4. Mikroakışkan yöntem ile izolasyon	Çeşitli özelliklere göre (fiziksel, afinite, biyolojik vs.)

FACS: Floresansla Aktifleştirilmiş Hücre Ayırma, MACS: Manyetik Boncuklarla Aktifleştirilmiş Hücre Ayırma, FFF: Alan Akışlı Fraksiyon, DEP: Dielektroforez. \*Kaynak 15'ten düzenlenmiştir.

## KÖK HÜCRE İZOLASYON YÖNTEMLERİ

### 1. Fiziko-kimyasal bazlı izolasyon yöntemleri

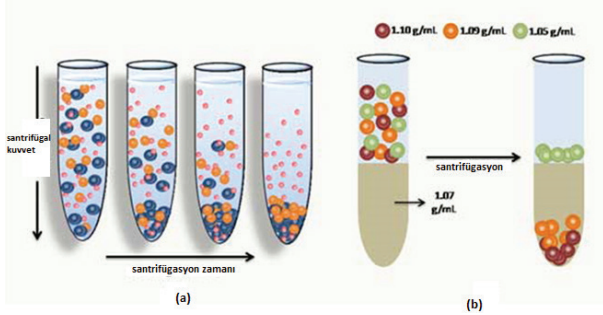
#### Sedimentasyon tekniği ile hücre fraksiyonlama

Santrifüj ile sedimentasyon, çeşitli tipteki hücrelerin ve hücre parçacıkların izolasyonunda sıkça kullanılmıştır. Bu metod ile heterojen bir hücre karışımı, hücre boyut ve/veya yoğunluğu ile ilişkili çökelmeye dayanan birkaç alt

popülasyona bölünebilir (Şekil 1). Özellikle, polimorfonükleer (PMN) ve mononükleer hücrelerin (MNH) eşzamanlı zenginleştirilmesi için yaygın olarak uygulanmıştır (5). Santrifüjlü bir alanda bir kürenin sedimentasyon (çökeltme) hızı aşağıdaki denklemle bulunur:

$$v = \left( \frac{d^2 (\rho_p - \rho_l)}{18\eta} \right) \times g,$$

Burada  $v$ ,  $d$ ,  $\rho_p$ ,  $\rho_l$ ,  $\eta$  ve  $g$  sırasıyla, sedimentasyon hızı, partikül çapı (hidrodinamik eşdeğer küre), partikül yoğun-



**Şekil 1:** a) Diferansiyel peletleme; hücreler, temel olarak boyut farklılıklarına göre ayrılır ve hücre ortamı homojen b) Yoğunluk gradyanlı (ör. 1.07 g/ml yoğunluklu Fikol ile) santrifügasyon; hücreler temel olarak yoğunluk ya da boyut farklılıklarına göre ayrılır ve hücre ortamı heterojendir. Kaynak 5'ten düzenlenmiştir.

luğu, sıvı yoğunluğu, ortamın viskozitesi ve merkezkaç kuvvetini ifade etmektedir.

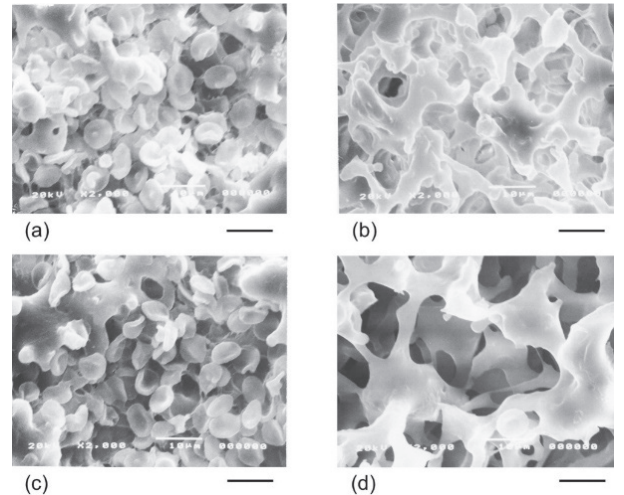
Genel olarak, santrifüj ile sedimentasyon diferansiyel peletleme, yoğunluk gradyanlı santrifügasyon (YGS) ve zıt-aışıklı santrifüjlü yıkama olmak üzere üç ana teknikten oluşur (5, 16). Diferansiyel peletlemede, hücreler temelde boyutlarına göre ayrılırsa da yoğunluk farklılıkları da bu ayrışmada bir rol oynayabilir. Hücreleri içeren ortam, yoğunluk açısından homojendir. Hücre peletleme, hemen hemen tüm hücre toplama ve yoğunlaştırma işlemlerinde ilk adım olarak kullanılmıştır. Bu teknikte peletlenmiş hücreler ve süspansiyon hücreler olarak iki fraksiyon elde edilir. İlk olarak kök hücrelerin izolasyonu için kullanılan ve daha verimli bir hücre çökeltme yöntemi olan YGS ise, hız-zonal ve izopiknik (eşit yoğunluk) olmak üzere iki alt kategoride incelenebilir. Hız-zonal santrifügasyonda ayrıştırma medyumun yoğunluğu, sedimente olacak hücre/materyalin minimum yoğunluğundan daha düşüktür (5). Santrifügal kuvvet etkisi ile partiküller yukarıda belirtilen özelliklerine bağlı olarak farklı yoğunluktaki solüsyon içerisinde belirli bölgelerde toplanırlar. İzopiknik santrifügasyonda kullanılacak medyumun yoğunluğu ayrıştırılacak hücre/materyalin yoğunluğundan fazladır. Hücre canlılığı, saflığı ve verimi için ayrıştırma medyumunun doğru seçimi, sağlam hücre popülasyonlarının izolasyonunda önemli bir rol oynar. Uy-

gun bir medyumun iki önemli özelliği osmolaritesi ve viskozitesidir. Hayvan hücrelerinin hücre duvarı olmadığı için, canlılık ve yoğunlukları osmolarite dalgalanmalarından oldukça etkilenir. Fikol, sakaroz, sığır serum albümini (BSA), perkol ve iyodin bileşenleri gibi farklı ayrıştırma medyum türleri bugüne kadar sayısız araştırmada kullanılmıştır. Fikol, en yaygın şekilde kullanılan YGS medyumlarından biridir; oldukça hidrofilitiktir ve normal fizyolojik osmolaliteyi aşmadan maksimum 1.2 g/mL yoğunluğa sahip bir yoğunluğu kapsayan %50'ye kadar konsantrasyonları hazırlamak için kullanılabilir (5). Periferik kan MNH'lerin rutin olarak ayrılmasında, Ficoll-Paque™ (yoğunluk: 1.077 g/mL) yaygın olarak kullanılmaktadır (4, 5).

Zıt-aışıklı santrifüjlü yıkama, hücreleri boyut ve yoğunluğuna göre ayırır. Bu yöntem kaldırma kuvveti prensibine dayanır ve işlemler kapalı sistemde gerçekleşir. 1970'lerden beri özellikle beyaz kan ve kök hücrelerin toplanmasında ve plazmaferezde kullanılmaktadır. Konik santrifüj haznesindeki hücre, dışa doğru santrifügal kuvvete ve içe doğru akışkan kuvvete maruz bırakılır (16). Hücreler santrifügal bir kuvvete maruz bırakılırken, seçilen bir ortamda sürekli olarak merkezci bir yönde akar. Yıkama bölmesinde, her hücre, sedimentasyon hızının sıvının akış hızı ile tam olarak dengelendiği bir bölgeye göç etme eğilimindedir. Haznenin geometrisi (konik) bir uçtan diğer uca farklı akış hızları gradyanı ürettiğinden, süspansiyonda çok çeşitli sedimentasyon hızına sahip hücreler tutulabilir. Yıkama sıvısının akış hızını adım adım artırarak veya rotor hızını azaltarak, homojen boyuttaki hücrelerin ardışık popülasyonları hazneden elde edilebilir (17).

### Membran filtrasyonu

Hücre izolasyonu; sadece hücrenin boyutuna ve membran por boyutuna göre gerçekleşmez, aynı zamanda ayrıştırma membranına hücre yapışmasının diferansiyel yo-



**Şekil 2:** PU membranların SEM görüntüleri. (a,b) kan permeasyondan sonra ortalama gözenek çapı: 5.2 µm; (c,d) ortalama gözenek çapı: 12 µm. Kaynak 18'den düzenlenmiştir.

ğunluğuna da bağlı olabilir. Hızlı, basit bir yöntemdir ve filtrasyon işlemi sırasında sterilite kolayca korunabilir (15).

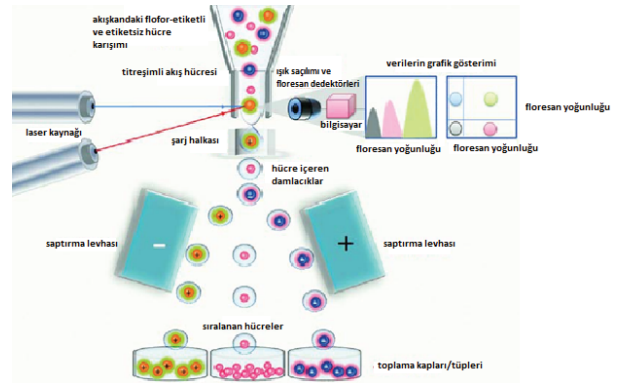
Şekil 2'de taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülenen HKK (CD34(+)) hücreler izolasyonunda kullanılan PU (poliüretan) membranlar gösterilmektedir. Yukarıdaki şekilde PU membranlarından kan hücrelerinin geçirilmesinde, HKK'nin (CD34(+)) hücreler süzülme (permeasyon) hızının en düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu durum CD34(+) hücrelerinin kırmızı kan hücrelerinden (eritrosit, trombositler, T ve B hücreleri) daha yapışkan özelliğe sahip olduğunu düşündürmüştür. Kordon kanından veya kemik iliğinden ilkel HKK ve progenitor hücrelerin izolasyonunda membran filtrasyonunun MACS veya FACS yöntemlerinden daha etkili olduğu söylenilmektedir (18). Membran filtrasyonları, kan transfüzyonu esnasında AIDS ve hepatit C gibi viral enfeksiyonları önleyen lökositleri ayrıştırmak için de kullanılır (19). Bu teknikle kan hücrelerinin dışında, Fatanat ve arkadaşları sıçan beyin dokusundan nadir oligodendrosit progenitor hücreleri başarıyla izole etmişlerdir (20). Burada 5 µm çapında membran porlar kullanılarak %99'dan fazla verim elde edilmiştir.

İyi bir performans için membran filtrelerin dikkatli tasarlanması önemlidir. Hücre izolasyonu verimini, doğruluğunu ve hassasiyetini en üst düzeye çıkarmak için, membranların doğru ve düzgün gözenek/por geometrisine sahip olması ve termal ve mekanik olarak kararlı olması gerekir. Gözenek/por çapının doğru seçimi, hedef hücreleri ayırmak için çok önemli tasarım parametresidir. Temel olarak basit bir yöntem olmasına rağmen, gözenek/porların tıkanması ya da hücrelerin parçalanması gibi dezavantajları da mevcuttur (21).

## 2. İmmüno-afinite bazlı izolasyon yöntemi

### Floresansla Aktifleştirilmiş Hücre Ayırma (FACS)

FACS, bir akış sitometrisi yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen etkili bir hücre ayırma yöntemidir. Akış sitometride hücreler boyut, şekil, DNA ve RNA içeriği, sitoplazmik granüller açısından tanımlanır. Bu amaçla, hedeflenen hücre önce floresan madde (flofor) ile işaretli bir antikor kullanılarak işaretlenir; ardından hücre süspansiyonu, akış sitometriden geçirilir. FACS da flofor konjuge antikorun varlığına ve yoğunluğuna göre hücreleri sıralar (21). FACS ile hücre izolasyonunda, flofor ile konjuge antikorlar hücre yüzeyi antijenlerine bağlanır ve lazer ışınıyla uyarıldıklarından (ekstra enerji yüklenmiş olduğundan) floresan ışığı yayarlar (2). Heterojen süspansiyondaki etiketlenen hücreler merkezi kanaldan hava basıncı ile sıvı içinden tek sıra halinde lazer ışını boyunca kanaldan geçirilir. Paralel yayılan ışın hücre büyüklüğü (forward scatter channel, FSC çizgisi), dikey açı ile yayılan ışın hücrelerin granüler içerikleri ve iç yapısı (side scatter channel, SSC çizgisi) hakkında bilgi verir (Şekil 3). Bu fiziksel parametreler; tek başına granüler PMN hücreler, MNH'ler ve kırmızı kan hücreleri (RBC) belirgin bir şekilde tanımlayabilir (22).



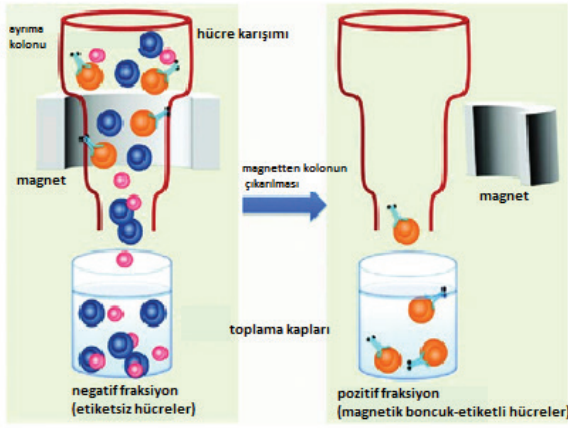
**Şekil 3:** Etiketlenmiş (yükü) ve etiketlenmemiş hücreler içeren sıvının lazer ışınlarından geçirilmesi ile hücre sıralama, Kaynak 5'ten düzenlenmiştir.

FACS, kök hücre biyolojisinde ve immünolojide geniş uygulama alanına sahiptir. İlk olarak lenfositlerin karakterizasyonu ve sıralanması için kullanılmıştır (HIV izlenmesi için CD4(+) T hücresi) (23). FACS; kök hücre, nadir hücre (<= %0,1), MNH ve PMN hücre, lenfosit, trombosit, dolaşımdaki fetal hücre, sperm hücre gibi birçok hücrenin saflaştırılmasında tercih edilen bir yöntemdir (24-27).

### Manyetik Boncuklarla Aktifleştirilmiş Hücre Ayırma (MACS)

Manyetik boncuklarla aktifleştirilmiş hücre saflaştırılması, genellikle hücreleri izole etmek için manyetik boncuk ile konjuge antikorların kullanıldığı bir yöntemdir. Basit bir izolasyon ile 10-45 dakikada  $2 \times 10^{10}$  hücre saflaştırılabilir ve hedef hücre 100 kat zenginleştirilebilir (5). Hücreleri etiketlemek ve ayırmak için, birçok tipte manyetik mikro boncuklar ve nano boncuklar geliştirilmiştir. MACS yönteminde, hücreler manyetik boncuklarla etiketlendikten sonra bir mıknatıs ile, işaretli hücreler tüp çeperinde tutularak istenmeyen hücreler atılır (2). MACS'ta hücrelerin zenginleştirilmesi, pozitif veya negatif işaretleme yoluyla gerçekleştirilir. Pozitif işaretleme, hedef hücreler doğrudan manyetik boncukla konjuge antikor ile etiketlenir ve daha sonra bu hücreler toplanır; negatifte ise, manyetik boncukla etiketlenmiş hücreler atılır ve etiketlenmeyen hücreler toplanır (16). Şekil 4'de manyetik boncuklarla aktifleştirilmiş, pozitif ve negatif işaretleme ile hücre ayırma yöntemi gösterilmektedir.

MACS uygulamasının başarılı örnekleri arasında hastalarda, kemik iliği transplantasyonu yerine insan KK'dan veya MPK'dan izole edilen nadir progenitor hücrelerin kullanılmasıdır (28). MACS ile sitotoksik T hücreler elimine edilerek, kemik iliği naklinde greft-versus host hastalığı (GVHH) gelişme riski azaltılır. Kritik ekstremitte iskemisinin tedavisi için planlanan Faz I klinik çalışmada, MACS ile saflaştırılmış otolog CD34 (+) hücreler ile olumlu sonuçlar elde edilmiştir (29). Ayrıca KK veya Kİ'den, MACS ile entegre, yoğunluk gradyanlı santrifüjasyon kullanılarak CD34 (+) hematopo-

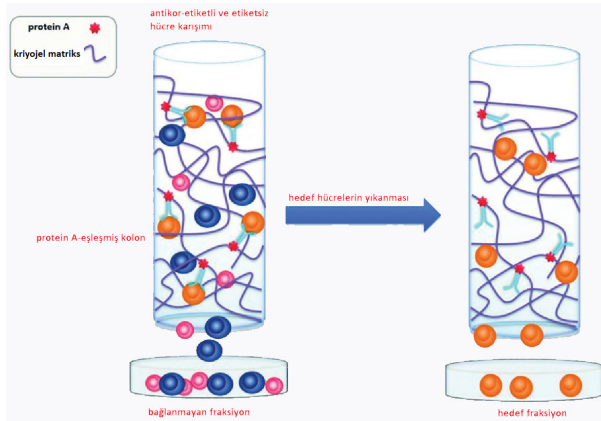


**Şekil 4:** Manyetik boncuklarla aktifleştirilmiş hücre ayırmanın görünümü, Kaynak 5'ten düzenlenmiştir.

etik kök hücreler veya progenitör hücreler hemato-onkolojik hastalıkların tedavisi için izole edilmiştir (30).

#### Afinite kromatografisi

Hedef biyomolekül ile spesifik ve geri dönüşümlü olarak kompleks oluşturabilen ligandın, çözünmeyen bir destek materyali (matris) üzerine immobilize edilmesine dayalı güçlü bir ayırma yöntemidir. Hedef olmayan biyomolekül afinite matris kolonundan ayrılır (5). Daha sonra hedef



**Şekil 5:** Hücre afinite kromatografisi. Antikor-etiketli ve etiketlenmemiş hücrelerin, protein A eşleşmiş kolona yüklenmesi, Kaynak 5'ten düzenlenmiştir.

biyomolekül pH'sı değiştirilerek veya bir tuz çözeltisi eklenerek iyonik gücünü değiştirerek kolondan ayrılır (31) (Şekil 5).

Bu yöntem protein, enzim, karbonhidrat, vitamin gibi pek çok molekülün ayrılmasında, antijen ve antikor saflaştırılmasında ve hücre izolasyonunda kullanılmaktadır (5, 32). Hücre izolasyonu için en yaygın olarak kullanılan spesifik ligand, protein A'dır (PrA). Hücrelerin kolondan geçişi sı-

rasında, daha önce hedef hücrelere eklenmiş olan spesifik IgG, Fc bölgesinden PrA'ya bağlanır. PrA kolonu hücre izolasyon etkinliğini artırır ve her hücre tipi için spesifik bir kolonun hazırlanma ihtiyacını ortadan kaldırır (5). Ligandın uygun seçilmesi ve kolon matrisinin hidrofilik, büyük gözenekli, sert (rigid), kimyasallara karşı stabilite gibi özelliklere sahip olması izolasyonda başarıyı artırmaktadır (33). Literatürde afinite kromatografi yöntemiyle CD34 (+) hücrelerin izole edildiği bildirilmektedir (5).

#### Sulu iki fazlı sistemler

Sulu iki fazlı sistemler (SİFS), biyolojik ürünlerin ve hücrelerin saflaştırılmasında yaygın olarak kullanılan bir sıvı-sıvı fraksiyonlama yöntemidir. SİFS, polimer-polimer veya polimer-tuz şeklinde sınıflandırılır. Çoğunlukla polimer olarak polietilen glikol (PEG) ve dekstran; tuz olarak fosfatlar, sülfatlar ve sitratlar kullanılmaktadır. Sulu çok fazlı sistemler, suda çözünen polimerin çeşitli kombinasyonlarının karıştırılması takiben "faz" ayrışmasıyla oluşur. Sistemin fazları yoğunluklarına göre üst üste dizilirler ve birbirine komşu her iki fazın arasında yoğunluk-adımı olarak hareket edebilen bir interfaz bulunur. Bu interfaz, nesnelere yakalayabilecek bir bariyer görevi görür (15).

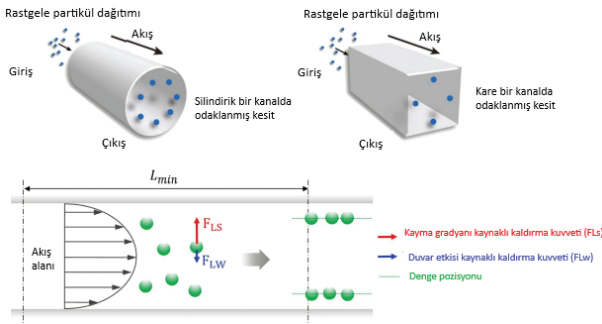
Moleküllerin ya da hücrelerin afinite iki fazdan birinde hidrofobik, boyut ve net yüzey yükü gibi özelliklere göre tanımlanır. Ayrıca özgün SİFS stratejileri ile antikor-bağlı polimerler kullanılarak hücreler izole edilir. Bu yöntem ile ilk defa CD34 antijeni ekspresyon eden akut miyeloid lösemi hücreleri elde edilmiştir. (15). İmmüno-afinite sulu iki fazlı sistem ile insan kordon kanından CD34 (+) hücreler %95 geri kazanım ile saflaştırılmıştır (34). Bu ayrıştırma yöntemi ile HKH saflaştırmasının kolaylaşacağı umut edilmektedir.

#### 3. Biyo-fiziksel bazlı etiketsiz izolasyon yöntemleri

##### Alan Akışlı Fraksiyon (FFF)

Kök hücrelerin etiketlenmesini gerektirmeyen verimli bir hücre ayırma yöntemidir. FFF'de hücreler, farklı zaman aralıklarında kollektörlere boyut ve morfolojiye göre hareket eden ataletsel veya ataletsel olmayan kuvvetlere maruz bırakılır (4).

Doğrusal kanallarda molekül/parçacıklara sürüklenme ve kaldırma kuvvetleri olmak üzere iki kuvvet etki etmektedir. Sürüklenme kuvveti, parçacığa akış yönünde etki ederek parçacığın hızlanmasını; kaldırma kuvveti ise, akışa dik bir ekseninde parçacığa etki ederek parçacığın ayrışmasını sağlayan kuvvetlerdir. Doğrusal kanallarda bir parçacığa direkt etki eden kuvvetler; 1-kayma gradyanı kaynaklı kaldırma kuvveti, 2-duvar etkisi kaynaklı kaldırma kuvvetleri olarak tanımlanır. Eğrisel kanallarda ise parçacığa direkt etki etmeyen kuvvetler bulunmaktadır (35). Ataletsel kuvvet ile düz kanallarda kayma gradyanı kaynaklı kaldırma kuvveti ve duvar etkisi kaynaklı kaldırma kuvvetlerinin denge pozisyonu, hücrelerin boyutsal olarak farklı noktalara odaklanmasını ve dolayısıyla ayrıştırmanın etkin bir şekilde yapılmasını



**Şekil 6:** Düz bir kanalda atalet göçü, Kaynak 36'dan düzenlenmiştir.

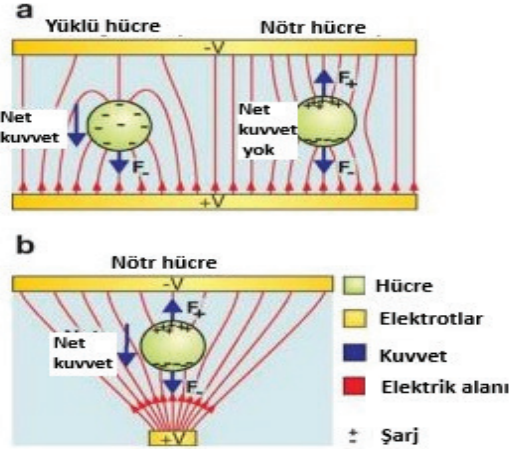
sağlar (Şekil 6) (36). FFF odaklı ayrıştırmada söz konusu olan alandaki akış yerçekimsel, santrifügal, elektriksel veya manyetiksel kuvvetlerin etkisiyle olabilir (36).

Bu yöntemdeki ayrışma, hücrelerin kütle, yük, boyut, yoğunluk, şekil ve rijidite gibi biyofiziksel özelliklerine göre gerçekleşir. FFF, boş bir kılcal kanal içinde, hareketli fazın laminer akışının ve akışa dik olarak uygulanan bir alanın kombine hareketi ile elde edilir. En basit varyantı, yerçekimi alanını kullanan yerçekimsel FFF'dir (15). Yerçekimsel FFF yöntemiyle, fetal membrandan ve amniyonik membrandan elde edilen epitelyal hücrelerden insan mezenterik kök hücrelerin, aferez ürünü kandan insan hematopoetik kök hücrelerin izole edildiği bildirilmiştir (37, 38).

### Dielektroforez (DEP)

DEP, değişken (non-uniform) bir elektrik alanına yerleştirildiğinde dielektrik partikül/hücre üzerinde bir kuvvetin indüklenmesi prensibine dayalı yöntemdir. Hücreler yüksüzdür, ancak değişken alanda polarize edilir. Polarize hücreler, DEP kuvveti olarak adlandırılan translasyonel kuvvete maruz kalırlar. Bu kuvvet, hücreyi maksimum alan kuvveti bölgesine doğru çeken (pozitif DEP) ya da bu bölgeden iten (negatif DEP) kuvvettir. Hücreler tarafından elde edilen polarizasyon, hücresel iletkenliğe ve geçirgenliğe, sıvının doğal polarizasyonuna ve ayrıca uygulanan elektrik alanının büyüklüğüne ve frekansına bağlıdır. Elektrik alan gradyanını ve hücreler üzerinde indüklenen kuvveti arttırmak için, hücre karışımına sıklıkla serbest elektrolitli sıvı çözeltiler eklenir (21). DEP ile ayrıştırılan ilk kök hücreler periferik kan veya Kİ'nden elde edilen CD34 (+) HKK'dir (39). Etiketsiz olmanın yanı sıra DEP, izolasyon sırasında hücreleri doğrudan konsantre etmek için de kullanılabilir. Bununla birlikte, hücre büyüklüğü ve dielektroforetik potansiyel farkı, kök hücreleri kök olmayan hücrelerden ayırmak için genellikle yeterli değildir ve DEP ile saflaştırılmış kök hücreler genellikle istenmeyen hücreler tarafından kontamine olur (4). Şekil 7'de elektroforez ve DEP ile yönlendirilen hücreler gösterilmektedir.

Pozitif veya negatif DEP kuvveti; kullanılan elektrotların şekillerinden (silindirik, halka, üçgen vs.), elektrotlar arasındaki mesafeden ve elektrotların diziliminden (eğik



**Şekil 7:** (a) Elektroforez: yüklü ve nötr hücre (b) DEP: düzgün olmayan bir elektrik alanında nötr bir hücre, Kaynak 40'tan düzenlenmiştir.

veya düzlemsel) etkilendir. Elektrotlar altın, karbon veya silikondan yapılabilir. Yeterli DEP kuvvetleri üretmek için yüksek elektriksel alanlara ihtiyaç vardır, ancak bu durum hücreler üzerinde membran stresi yaratabilir ve hücre ölümlüne yol açabilir (21).

### Mikroakışkan sistemler ile izolasyon yöntemi

Geleneksel hücre izolasyon yöntemleri; yüksek sağlamlık, doğruluk ve verim özelliklerinden dolayı endüstriyel ve laboratuvar ortamlarında birçok yarar sağlamaktadır. Bununla birlikte, büyük ölçekli örnek hacimlerine olan ihtiyaç, yüksek reaktif tüketimi, örneklerin çapraz kontaminasyonu ve pahalı ekipman maliyeti gibi bazı dezavantajlar kullanımı engellemektedir. Bu sınırlamaların üstesinden gelebilmek için mikroakışkan sistemler (Çip-Üstü-Laboratuvar, ÇÜL) geliştirilmektedir. (21). Tablo 2'de bazı geleneksel kök hücre izolasyon yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları verilmektedir.

Mikroakışkanlara dayanan mikromanipülasyon teknikleri ile tanı ve tedavi için çeşitli hücreler izole edilebilir. Geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında, mikroakışkan cihazlar, yüksek verim ve hassasiyet gibi özelliklere sahiptir (5). Bu sistemler basit, hızlı ve yüksek oranda saflaştırılmış hücreler elde etmek için tasarlanan yöntemler olarak ortaya çıkmıştır. Numune enjeksiyonu, akış ve toplama işlemlerinin tamamı tek bir çip üzerinde gerçekleşmektedir. Hücre saflaştırılmasında mikroakışkan sistemler son on yılda oldukça etkin bir araştırma alanı olmuştur. Bu sistemler, konsantre numunelerde nadir hücrelerin izolasyonunda yüksek verim elde edilmesi, düşük kimyasal tüketimi, ucuz olma, entegrasyon kolaylığı, tekrarlanabilme ve daha yüksek kök hücre geri kazanımı özellikleri nedeni ile kullanılmaktadır (4). Çeşitli mikrokapiller, mikrosütunlar, mikroporlarla dizayn edilen bu sistemlerde hücrelerin boyut, mekanik esneklik, de-

**Tablo 2:** Geleneksel hücre izolasyon yöntemlerinin avantajları ve dezavantajları (5)

Yöntem	Avantajları	Dezavantajları
<b>Santrifüjlü sedimentasyon</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>· Basit, hızlı, ucuz bir yöntemdir.</li><li>· Birden fazla hücre tipi aynı anda izole edilebilir.</li><li>· Spesifik bir işaretleyiciye ihtiyaç yoktur.</li><li>· Steril koşullar altında hücre ayrımı gerçekleştirilir.</li><li>· İşlem tekrarı ile yüksek saflık sağlayabilir.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>· Saflaştırılmış hücre oranı düşüktür.</li><li>· Yüksek hıza bağlı olarak hücrelere zarar verebilir.</li><li>· Prosedür uzun bir süre devam ederse tüm hücreler peletlenebilir.</li></ul>
<b>Floresansla aktifleştirilmiş hücre ayırma</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>· Hızlı, yüksek saflıkta, yüksek verimle, yüzey veya hücre içi proteinlere dayalı izolasyon yapabilir.</li><li>· Birden fazla hücre tipi aynı anda izole edilebilir.</li><li>· Farklı belirteç ekspresyon seviyelerine sahip hücreler, izole edilebilir.</li><li>· Çoklu parametre analizinde gerekli olan örnek ve reaktif miktarı azalmıştır.</li><li>· MACS ile karşılaştırıldığında daha verimli bir izolasyon tekniği olarak görülebilir.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>· Pahalıdır.</li><li>· Uzman personele ihtiyaç vardır.</li><li>· Homojen bir süspansiyon hazırlamak kritik bir önkoşuldur.</li><li>· Nadir hücrelerin izolasyonu gerekiyorsa, ön zenginleştirme yöntemleri gerekebilir.</li><li>· Aseptik koşul oluşturmak zordur, antibiyotik kullanımı gerekir.</li><li>· Cihaz kullanımından önce her seferde dekontaminasyon işlemi gereklidir.</li><li>· Hidrodinamik basınç stresi hücre canlılığını etkileyebilir.</li></ul>
<b>Manyetik boncuklarla aktifleştirilmiş hücre ayırma</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>· Basit, hızlı, nisbeten ucuz bir yöntemdir.</li><li>· Yüksek saflıkta ve verimde izolasyon sağlanır.</li><li>· Nadir hücre popülasyonunun izolasyonunda etkindir.</li><li>· Sterilite ve geri kazanma kapasitesi yüksektir.</li><li>· Canlılık ve fenotip büyük ölçüde etkilenmez.</li><li>· Biyolojide kullanılan tekniklere uyumludur.</li><li>· Pozitif seçimde yüksek oranda saf hücreler elde edilebilir (saflık: %95-99; verim: %60-99).</li><li>· Gen ekspresyon profilinin belirlenmesinde ve sinyal iletim deneylerinde faydalıdır.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>· FACS ile karşılaştırıldığında daha düşük saflık ve verim elde edilir.</li><li>· Hücreler tek seferde sadece bir işaretleyici ile etiketlenebilir.</li><li>· Yüzey belirteçleri sınırlıdır, istenen hücre yüzeyi antijenleri için spesifik antikor bulunamayabilir.</li><li>· Antikoron hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanması, hücre içi sinyalleşmeyi istenmeyen şekilde etkileyebilir.</li><li>· Manyetik boncuk yoğunluğunun çok yüksek olduğu durumlarda, hücre büyümesine ve bağlanması engel olabilir.</li></ul>
<b>Hücre afinite kromatografisi</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>· Basit, ucuz ve yüksek saflıkta izolasyon sağlar.</li><li>· Sadece küçük bir sütuna ihtiyaç duyan, en ucuz ve en basit hücre ayırma tekniklerinden biridir.</li><li>· Kolayca optimize edilebilir.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>· Hücrelerin kolon materyaline bağlanması ve spesifik olmayan etkileşimler akışı azaltabilir.</li><li>· Sonraki yıkama (elüzyon) işlemleri, hücrelere zarar verebilir.</li></ul>

formabilite, adezyon ve elektrik yükleri gibi özelliklerine dayalı saflaştırma yapılmaktadır (21).

Mikrofiltrasyon, ataletsel yöntem, DEP, akustoforez, FACS, MACS, membran filtrasyonu, sulu iki fazlı sistem veya bunların kombinasyonları ile yapılan izolasyonla farklı hücre ve partiküller ayrılabilir (5, 21, 36). Başlangıçta çok az sayıda bulunan DTH'leri yakalamak amacıyla geliştirilen bu sistemler şimdi çeşitli hücrelerin, mikroveziküllerin ve eksozomların saflaştırılması ve tanısı için kullanılmaktadır (41). Bu stratejiler ayrıca saf HKK'leri ayırıp geri kazanabilmektedir (42)

Mikroakışkan sistemlerden izole edilen hücreler genellikle etiketsizdir ve canlıdır. Bununla birlikte, mikroa-

kışkanlar tamamen dezavantajlardan yoksun değildir. Örneğin, mikroakışkan sistemlerde küçük ölçekli numunelerle çalışmak klinik kullanıma uygun olmayabilir ve biyolojik protokolleri ve sistemlerin ölçeklendirilmesini değiştirmek zor olabilir. Ek olarak, mikrobileşenlerin tasarımı, mikrokanallardaki sıvıların performansını modelleyebilen yazılımların geliştirilmesini gerektirir. Diğer yandan, farklı hücrelerin analizi, hücrelerin kesin olarak tanımlanması ve verilerin yorumlanması için karmaşık ve pahalı optik sistemlerin tasarlanmasını gerektirir (5). Tablo 3'de bazı geleneksel yöntemler ile geliştirilen mikroakışkan sistemler ve izole edilmiş hücre türleri verilmiştir.

**Tablo 3:** Geleneksel izolasyon yöntemleri ile geliştirilen mikroakışkan cihazlar (21)

Yöntem	µFACS	µMACS	µDEP	µAtaletsel ayrıştırma (boyut)	µSantrifüj ve PFF (boyut ve yoğunluk)	µAkustoforez (yoğunluk ve sıkıştırılabilirlik)
<b>Özellik</b>	Floresan bağlı antikor	Kalıcı mıknatıs Elektromıknatıs Kendinden montajlı mıknatıs	Polarizasyon (dielektroforetik kuvvet)	Ataletsel kuvvet Dean kuvvet	Santrifügasyon PFF	Ses dalgası (akustik kuvvet)
<b>Hücre</b>	Makrofaj E. Coli Fibroblast	Lökositler DTH Kök hücreler Sitokin salgılayan hücreler MCF-7 hücre hattı HIV/AIDS ile ilgili epitoplara E. Coli CD4(+) lenfositler	DTH RBC Trombosit Lökosit Patojenler PC3 hücre hattı Sperm hücresi MG-63 hücre hattı NIH-3T3 hücre hattı	RBC DTH Sıtmayla enfekte hücreler Virüs Aerosoller HPET Plazma CHO HeLa hücre	DTH Lökosit Tam kan hücre Plazma ekstraksiyonu	Apoptotik hücre Prostat kanseri hücre İnsan trombosit Lökosit

µ: Mikroakışkan sistem/cihaz, MCF-7: Meme kanseri hücre hattı, PC3: Prostat kanseri hücre hattı, MG-63: Fare osteosarkom hücre hattı, NIH-3T3: Fare fibroblast hücre hattı, RBC: Kırmızı kan hücre, DTH: Dolaşımdaki tümör hücre, HPET: İnsan Prostat Epitelial tümör hücre, CHO: Çin Hamsteri Yumurtalığı hücre hattı, PFF: Sıkıştırılmış akış fraksiyonlama

Tabloda belirtilen µFACS sistemlerinin düşük verime sahip olduğu; akustik kuvvet ve dielektroforetik kuvvet gibi diğer kuvvetler tarafından çalıştırılan mikro-sistemlerin 10-100 kat daha fazla verime sahip olduğu bildirilmiştir.

## SONUÇ

HKH kaynaklarından elde edilen kök hücrelerin hematopoetik rejenerasyonu sağlayabilmesi için kg başına belli bir sayıda olması (en az  $3,5 \times 10^8$  MNH/kg ya da  $2-6 \times 10^6$  CD34 (+) hücre/kg) ve ağırlıklı olarak pluripotent potansiyelli kök hücreler olması gerekir (43). KK ve Kİ'nden HKH edilmesinde ve kullanımında hala bazı sorunlar vardır. KK'nda bulunan kök hücre sayısı yetişkinlerde sayısal olarak yetersizdir. Bu nedenle KK nerdeyse sadece çocuklarda kullanılabilir (44). Kİ anestezi altında genellikle arka iliak kanattan toplanmaktadır. Birçok hasta için Kİ aspirasyonu rahatsızlık vermenin yanı sıra endişe uyandırıcı invazif bir uygulamadır (45). Ayrıca kanser hastalarında otolog Kİ kullanımında, her ne kadar Kİ remisyonunda toplansa da, tümör kontaminasyonu riski yüksektir. Otolog kök hücre nakline aday hastaların önemli bir kısmında kemik iliğinin malign hücrelerle tutulmuş olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle son yıllarda otolog kemik iliği transplantasyonunun (KİT) yerini bugün periferik kök hücre transplantasyonu (PKHT) almıştır. Her ne kadar otolog PKHT'de tümör kontaminasyonu otolog KİT'den daha azsa olsa da aferez ürünlerinin önemli ölçüde tümör hücreleri içerdiği gösterilmiştir. Evre IV meme kanserli olgularda bu oran %20, evre II yüksek riskli olgularda %11 olarak bulunmuştur (46). Bu kontaminasyon Hodgkin ve non-Hodgkin lenfomalı hastalarda %30 ve %5, nöroblas-

tomlu olgularda ise %15'dir (47, 48). Tümör kontaminasyonunu azaltmak ve CD34 (+) HKH'leri izole etmek amacıyla piyasada çeşitli cihazlar bulunmaktadır. CD34 (+) hücreler immünoadsorbsiyon, immünomanyetik ve akım sitometri yöntemleri ile değişik performanslarda izole edilebilmektedir. Akım sitometri tekniği yüksek oranda tümör hücre depleksiyonu yapmasına karşın, büyük hacimli işlemler için pratik olmadığından (sterilizasyon açısından) çok sınırlı kullanılmaktadır (49). Ayrıca CD34 antijeninin birçok malign tümörde bulunması nedeniyle bu antijene göre yapılan seleksiyonun tümör kontaminasyonunu elimine etmediğini göstermektedir.

Periferik kök hücre transplantasyonunda karşılaşılan bir diğer problem, nadir ama çoğu zaman ölümlü sonuçlanabilen bir komplikasyon olan Greft-versus host hastalığının oluşma riskinin olmasıdır. GVHH'yi engellemek için transfüze edilen bileşendeki immünojenik yönden aktif hücrelerin (T lenfositleri) çoğalmasını önlemek gerekir ve bunun için gama ışınlama (irradiyasyon) yapılır. Irradiyasyon işlemi de plazma potasyum düzeyini banka kanını iki katına çıkararak hiperpotaseminin ve kardiyovasküler rahatsızlıkların oluşmasına neden olabilmektedir (50). Kök hücre araştırmaları ve tedavilerindeki bu engeller nedeniyle kolay uygulanabilir, düşük maliyetli, hızlı ve yüksek verimlilikle rejeneratif potansiyeli yüksek kök hücre elde edilmesini sağlayacak, kök hücre izolasyon yöntemlerine olan ihtiyacın artmasına yol açmıştır. Günümüzde mikroakışkan sistemlerin (ÇÜL) bu ihtiyacı karşılayacağı ve yukarıda bahsedilen kısıtlamaların üstesinden gelebileceği tahmin edilmektedir.

**Açıklama:** Derlemedeki resimler alıntı yapılan kaynaklarından Türkçeye çevirilerek hazırlanmıştır.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Çalışma Konsepti/Tasarım- N.O., D.S.K.; Veri Analizi/Yorumlama- N.O., D.S.K.; Yazı Taslağı- N.O., D.S.K.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- N.O., D.S.K.; Son Onay ve Sorumluluk- N.O., D.S.K.

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

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

**Acknowledgement:** The images in this review were reproduced from the cited references with Turkish translation.

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

**Author Contributions:** Conception/Design of Study- N.O., D.S.K.; Data Analysis/Interpretation- N.O., D.S.K.; Drafting Manuscript- N.O., D.S.K.; Critical Revision of Manuscript- N.O., D.S.K.; Final Approval and Accountability- N.O., D.S.K.

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

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

## KAYNAKLAR/REFERENCES

- Gou Y, Jia Y, Wang P, Sun C. Progress of inertial microfluidics in principle and application. *Sensors (Basel)* 2018;18(6):1762. [CrossRef]
- Tomlinson MJ, Tomlinson S, Yang XB, Kirkham K. Cell separation: Terminology and practical considerations. *Journal of Tissue Engineering* 2012; 3(1):1-14.
- Metin S, Dere H. Hematopoetik kök hücre nakli ve güncel beslenme yaklaşımları. *Türkiye Klinikleri J Pediatr* 2017;26(1):22-31. [CrossRef]
- Zhu B, Murthy SK. Stem cell separation technologies. *Curr Opin Chem Eng.* 2014;2(1):3-7. [CrossRef]
- Rahmanian N, Bozorgmehr M, Torabi M, Akbari A, Zarnani AH. Cell separation: Potentials and pitfalls. *Prep Biochem Biotechnol* 2017;47(1):38-51. [CrossRef]
- Kenry, Leed WC, Loh KP, Li CT. When stem cells meet graphene: Opportunities and challenges in regenerative medicine. *Biomaterials* 2018;155:236-50. [CrossRef]
- Erdem-Kuruca S, Celik DD, Demirel G, Ozerkan D. Characterization and isolation of very small embryonic-like (VSEL) stem cells obtained from human peripheral blood. *Stem Cell Rev Rep* 2019;15(5):730-42. [CrossRef]
- Chhabra P, Brayman KL. Stem cell therapy to cure type 1 diabetes: from hype to hope. *Stem Cells Transl Med* 2013;2(5):328-36. [CrossRef]
- Mazini L, Rochette L, Amine M, Malka, G. Regenerative capacity of adipose derived stem cells (adscs), comparison with mesenchymal stem cells (mscs). *Int J Mol Sci* 2019;20(10):2523. [CrossRef]
- Zhang CL, Huang T, Wu BL, He WX, Liu D. Stem cells in cancer therapy: opportunities and challenges. *Oncotarget* 2017;8(43):75756-66. [CrossRef]
- Almendros I, Carreras A, Montserrat JM, Gozal D, Navajas D, Farre R. Potential role of adult stem cells in obstructive sleep apnea. *Front Neurol* 2012;3:112. [CrossRef]
- Yo M, Sakaue-Sawano A, Noda S, Miyawaki A, Miyoshi H. Fucci-guided purification of hematopoietic stem cells with high repopulating activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;30;457(1):7-11. [CrossRef]
- Ng AP, Alexander WS. Haematopoietic stem cells: past, present and future. *Cell Death Discovery* 2017;3:17002. [CrossRef]
- Sargin D. Kök hücre ve kök hücre tedavisi. XXX. Ulusal Hematoloji Kongresi Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu; 10-14 Ekim 2003; İstanbul, 2003. p. 49-61.
- Diogo MM, Silva CL, Cabral JMS. Chapter 7: Separation technologies for stem cell bioprocessing. In: Mohamed Al-Rubeai, Mariam Naciri, editors. *Stem Cells and Cell Therapy*. Dordrecht: Springer; 2014. p. 157-181. [CrossRef]
- Hoeve MA, De Sousa, PA, Willoughby NA. Chapter: 5. Challenges of scale-up of cell separation and purification techniques: 5.3.3.1. Centrifugal Counterflow Elutriation (CCE). In: Connon Che J, editor. *Bioprocessing for Cell-Based Therapies*. UK: John Wiley & Sons; 2017. p. 138-140.
- Bachère E, Chagot D, Henri Grizel H. Cell Separation by centrifugal elutriation. *American Fisheries Society Special Publication* 1988;18:281-5.
- Higuchi A, Lizuka A, Gomei Y, Miyazaki T, Sakurai M, Matsuoka Y, et al. Separation of CD34+ cells from human peripheral blood through polyurethane foaming membranes. *J Biomed Mater Res A* 2006;78(3):491-9. [CrossRef]
- Muller-Steinhardt M, Hennig H, Kirchner H, Schlenke P. Prestorage WBC filtration of RBC units with soft-shell filters: Filtration performance and impact on RBCs during storage for 42 days. *Transfusion* 2002;42(2):153-8. [CrossRef]
- Fatanat T, Li K, Veres T, Tabrizian M. Separation of rare oligodendrocyte progenitor cells from brain using a high-throughput multilayer thermoplastic-based micro fluidic device. *Biomaterials* 2013;34(22):5588-93. [CrossRef]
- Yousuff CM, Wei-Ho ET, Ismail Hussain K, Hamid NHB. Microfluidic platform for cell isolation and manipulation based on cell properties. *Micromachines* 2017; 8 (15): 1-26. [CrossRef]
- Actor JK, Elsevier's Integrated Review Immunology and Microbiology. Second Edition. Elsevier Inc.; 2012. p. 71-9. [CrossRef]
- Prince H, Arens L, Kleinman S. CD4 and CD8 Subsets Defined by Dual-color Cytofluorometry which Distinguish Symptomatic from Asymptomatic Blood Donors Seropositive for Human Immunodeficiency Virus. *Diagn. Clin. Immunol* 1986;5(4):188-93.
- Johnson KW, Dooner M, Quesenberry PJ. Fluorescence activated cell sorting: A window on the stem cell. *Curr Pharm Biotechnol* 2007;8(3):133-9. [CrossRef]
- Will B, Steidl U. Multi-parameter fluorescence-activated cell sorting and analysis of stem and progenitor cells in myeloid malignancies. *Best Pract Res Clin Haematol* 2010;23(3):391-401. [CrossRef]
- Curtis MG, Walker B, Denny TN. Flow cytometric methods for prenatal and neonatal diagnosis. *J Immuno Methods* 2011;363(2):198-209. [CrossRef]



27. Garner DL, Evans KM, Seidel GE. Sex-sorting sperm using flow cytometry/cell sorting. *Methods Mol Biol* 2013;927:279-95. [CrossRef]
28. Mahmoud TMS. Selection of non-apoptotic, DNA intact spermatozoa. Groningen: University of Groningen. 2009.
29. Rodrigues GMC, Fernandes TG, Rodrigues CAV, Diogo MM, Cabral JMS. Chapter 9- enrichment and separation technologies for stem cell-based therapies; 9.2.1 Adult stem cells. In: Cabral JMS, Cláudia Lobato da Silva, Chase LG, Diogo MM, editors. *Stem Cell Manufacturing*. Elsevier; 2016. p. 199-213. [CrossRef]
30. Fernandes TG, Diogo MM, Cabral JMS. Stem cell separation. *Stem Cell Bioprocessing For Cellular Therapy, Diagnostics and Drug Development*. Woodhead Publishing Series in Biomedicine; 2013. p. 115-41. [CrossRef]
31. Firer MA. Efficient elution of functional proteins in affinity chromatography. *J Biochem Biophys Methods* 2001;49(1-3):433-42. [CrossRef]
32. Hage DS, Cazes, J, editors. *Handbook of Affinity Chromatography*. 2nd Edition. Boca Raton: CRC Pres; 2005. p. 856. [CrossRef]
33. Hage DS, Clarke W. Affinity chromatography: In: Cazes J, editör. *Encyclopedia of Chromatography*. New York: Marcel Dekker; 2004. p. 40-3.
34. Sousa AF, Andrade PZ, Pirzagska RM, Galhoz TM, Azevedo AM, Silva CL, et al. A novel method for human hematopoietic stem/progenitor cell isolation from umbilical cord blood based on immunoaffinity aqueous two-phase partitioning. *Biotechnol Lett* 2011;33(12):2373-7. [CrossRef]
35. Yılmaz M. Design and fabrication of low cost passive microfluidic systems for particle separation. Istanbul: Istanbul Technical University, 2012.
36. Kim GY, Han JI, Park JK. Inertial microfluidics-based cell sorting. *BioChip Journal* 2018;12(4):257-67. [CrossRef]
37. Roda B, Lanzoni G, Alviano F, Zattoni A, Costa R, Di Carlo A, et al. A novel stem cell tag-less sorting method. *Stem Cell Rev* 2009;5(4):420-7. [CrossRef]
38. Roda B, Reschiglian P, Alviano F, Lanzoni G, Bagnara GP, Ricci F, et al. Gravitational field-flow fractionation of human hemopoietic stem cells. *J Chromatogr A* 2009;1216(52):9081-7. [CrossRef]
39. Talary MS, Mills KI, Hoy T, Burnett AK, Pethig R. Dielectrophoretic separation and enrichment of CD34+ cell subpopulation from bone marrow and peripheral blood stem cells. *Medical and Biological Engineering and Computing* 1995; 33 (2), p. 235-7. [CrossRef]
40. Voldman, J. Electrical forces for microscale cell manipulation. *Annu Rev Biomed Eng* 2006;8:425-54. [CrossRef]
41. Gwak H, Kim J, Kashefi-Kheyraadi L, Kwak B, Kyung-A Hyun, Hyo-Il Jung. Progress in circulating tumor cell research using microfluidic devices. *micromachines* 2018;9(7):353. [CrossRef]
42. Lecault V, Vaninsberghe M, Sekulovic S, Knapp DJ, Wohrer S, Bowden W, et al. High-throughput analysis of single hematopoietic stem cell proliferation in microfluidic cell culture arrays. *Nat Methods* 2011;8(7):581-6. [CrossRef]
43. Perutelli P, Catellani S, Scarso L, Cornaglia-Ferraris P, Dini G. Processing of human cord blood by three different procedures for red blood cell depletion and mononuclear cell recovery. *Vox Sanguinis* 1999;76(4):237-40. [CrossRef]
44. Rocha V, Gluckman E. Eurocord and European Blood and Marrow Transplant Grup. Clinical use of umbilical cord blood hematopoietic stem cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12(1S):34-41. [CrossRef]
45. Trewthitt KG. Bone marrow aspiration and biopsy: Collection and interpretation. *Oncol Nurs Forum* 2001;28(9):1409-17.
46. Franklin WA, Shpall EJ, Archer P, Johnston CS, Garza-Williams S, Hami L, et al. Immunocytochemical detection of breast cancer cells in marrow and peripheral blood of patients undergoing high dose chemotherapy with autologous stem cell support, *Breast Cancer Res Treat* 1996;41(1):1-13. [CrossRef]
47. Sharp JG, Kessinger MA, Vaughan WP, Mann SL, Crouse DA, Dicke KA, et al. Detection and clinical significance of minimal tumor cell contamination of peripheral stem cell harvests. *Int Cell Cloning* 1992;10(1):92-4. [CrossRef]
48. Moss TJ. Sensitive detection of metastatic tumor cells in bone marrow. *Prog Clin Biol Res*. 1994;389:567-77.
49. Nieto Y, Shpall EJ. CD34+ blood stem cell transplantation. In: Reiffers J, Goldman J, Armitage JO (eds). *Blood Stem Cell Transplantation*. London: Martin Dunitz Ltd.; 1998. p. 187-201.
50. Ertuğrul-Örücü N, Yenicesu İ. Bölüm-II: Transfüzyon Merkezi. Ulusal Kan ve Kan Bileşenleri Hazırlama, Kullanım ve Kalite Güvencesi Rehberi, Türkiye 2008 Ulusal IPA (Katılım Öncesi Mali Yardım) Programı: 2016. URL: [https://www.kanver.org/Upload/Dosya/ulusal\\_kan\\_rehberi](https://www.kanver.org/Upload/Dosya/ulusal_kan_rehberi). Erişim Tarihi: 07.06.2019.

# METASTATİK KOLON KANSERİ TEDAVİSİNDEKİ YENİLİKLER

## WHAT'S NEW IN METASTATIC COLON CANCER TREATMENT?

Senem KARABULUT<sup>1</sup> , Mehmet KARABULUT<sup>2</sup> , Didem TAŞTEKİN<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye,

<sup>2</sup>Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Genel Cerrahi Kliniği, İstanbul, Türkiye

**ORCID IDs of the authors:** S.K.0000-0003-4740-9973; M.K. 0000-0002-1889-5637; D.T.0000-0002-9522-9849

**Cite this article as:** Karabulut S, Karabulut M, Tastekin D. What's new in metastatic colon cancer treatment? J Ist Faculty Med 2021;84(3):425-9. doi: 10.26650/IUITFD.2020.0086

### ÖZET

Bu derlemede metastatik kolon kanseri (mKRK)'ndeki medikal alandaki güncel yenilikler değerlendirildi. Metastatik kolon kanseri tedavi kararında tümör yerleşimi önemlidir ve KRAS, NRAS, BRAF mutasyon analizi prognoz/prediktivite açısından yapılmaktadır. İmmünoterapi %5-6 ve dMMR/MSI olan hasta grubunda tedavi seçeneğidir. NeoRAS kavramı, kanıt düzeyi yüksek bilgiler artıkça yakın gelecekte daha fazla gündemde olacaktır. Günümüzdeki birçok tümör tedavisinde olduğu gibi mKRK tedavisinde de moleküler değerlendirmeler prognoz ve prediktif açıdan son derece önemli hale gelmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Metastatik kolon kanseri, tedavi, yenilikler

### ABSTRACT

In this review, we present the current innovations in the field of metastatic colon cancer (mCRC). Tumor placement is important in the mCRC treatment decision, and KRAS, NRAS, BRAF mutation analysis is performed in terms of prognosis/predictivity. Immunotherapy is the treatment option in patients with 5-6% and dMMR/MSI. The concept of NeoRAS will become more on the agenda in the near future as high-level evidence becomes available. Molecular evaluations have become extremely important in terms of prognosis and predictions in the treatment of mCRC, as in many tumors today.

**Keywords:** Metastatic colon cancer, treatment, innovations

### GİRİŞ

Kolorektal kanser dünyada en sık gözlenen 4. kanser türüdür. Hastalığın insidansı ve mortalitesi yıllar içinde azalmaktadır. Bu iyileşmenin nedeni tarama ve etkin tedavi yöntemleriyle açıklanmaktadır. Ancak hastalığın nedeni henüz geniş verilerle desteklenmeyen 50 yaş altı ve 20-34 yaş grubunda arttığı gözlemlenmektedir. Bu grup hastalarda hastalığın farklı genetik ve klinikopatolojik yapıya sahip olduğu tespit edilmiştir ve bu da beraberinde bu hasta grubuna özel tedavilerin gerekliliğini doğurmuştur (1). Son yıllarda metastatik kolon kanseri (mKRK) tedavisinde yeni tedavi protokolleri oluşturulmaktadır ve bu değerlendirme yazısında medikal alandaki yenilikler ele alınacaktır.

### Kolon tümörünün lokalizasyonu ve hedef tedavi seçimi

Günümüz pratiğinde kolon tümörlerini yerleşim yerlerine göre sağ kolon ve sol kolon tümörleri olarak ayırmaktayız.

Sağ kolon tümörü çekum-transvers kolonun 2/3 kısmı, sol kolon tümörleri 1/3 transvers kolon-rektum bölgesi olarak kabul edilmektedir. Bu ayırımın temel nedeni aynı organda farklı histolojik, klinik, çevresel ve moleküler yapıya sahip iki bölüm olmalarından kaynaklanmaktadır. Ayrıca bu iki ayrı bölgesel yapının 5-FU varyasyonları, FOLFOX/XELOX, IFL ve FOLFOXIRI gibi farklı kemoterapi protokolleri ile yapılan çalışmalarda kemoterapi ajanlarından bağımsız olarak sağ kolon tümörlerinin sol kolon tümörlerine göre prognozunun daha kötü olduğu bilinmektedir (2).

RAS wild tip mKRK kanserde ilk seri tedavide anti-EGFR'li tedavi veya anti-VEGF'li tedavi mi verilmeli sorusunun cevabını araştıran PEAK, FIRE-3 ve CALBG/SWOG 80405 çalışmalarının retrospektif verilerinde hastaların tümör yerleşiminin önemli olduğu, sol kolon tümörlerinde istatistiksel anlamlı olarak anti-EGFR etkinliği bulunurken, sağ kolon tümör yerleşiminin istatistiki anlamlılığa ulaşmamakla beraber

**İletişim kurulacak yazar/Corresponding author:** drsenemkarabulut@gmail.com

**Başvuru/Submitted:** 13.07.2020 • **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 25.08.2020 •

**Son Revizyon/Last Revision Received:** 10.09.2020 • **Kabul/Accepted:** 21.11.2020 • **Online Yayın/Published Online:** 02.07.2021



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

anti-VEGF etkinliğinin olduğu tespit edilmiştir. CRYSTAL ve PRIME çalışmaları retrospektif olarak değerlendirildiğinde bu sonucu desteklemiş ve tüm çalışmaların analiz edildiği iki metanalizde bu farkı gözler önüne sermiştir (3, 4). CALBG/SWOG 80405 çalışması sonuçlarında MSI, BRAF mutasyonun sık görüldüğü ve sağ kolon tümörlü hasta grubunda sık görülen konsensüs moleküler sınıflandırma (CMS)1 alt grubunun 15 ay gibi en kötü sağ kalımla seyrederken, MSS, WNT/MYC sinyal yolağı aktif, sol kolon tümörlü hastalarda sık görülen CMS2 alt grubunun sağ kalımın 40 ay gibi en iyi sağ kalımlara sahip olduğu belirlenmiştir.

Moleküler alt tiplere göre kemoterapi ve biyolojik ajan kombinasyonu değerlendirmesinde hastaların tümünün irinotekan aldığı FIRE-3 çalışması ve %75'nin oksaliplatin aldığı CALBG/SWOG 80405 çalışmasındaki verilerde anti-EGFR veya anti-VEGF biyolojik ajanı eklemenin sonuçları değerlendirildiğinde; CMS2 moleküler alt grubunda kemoterapi farklılığı biyolojik ajanların sağ kalım katkısı üzerine etki oluşturmazken, CMS1 alt grubunda oksaliplatin kullanımının anti-VEGF etkinliğinde anlamlı bir fark yarattığı ve oksaliplatin kullanımının sağ kalımı artırdığı tespit edilmiştir (5). Ayrıca bu çalışmanın analizi sonrası MSI-H grup hastaların anti-VEGF tedaviden anti-EGFR tedaviye göre daha fazla fayda gördüğü anlaşılmıştır (6).

Günümüz pratiğinde artık mKRK'nın yerleşiminin, prognostik ve prediktif etkisinin olduğu bilinmektedir. mKRK'nın sola yerleşimi durumunda birinci seri tedavide biyolojik ajan seçiminde ESMO kılavuzu, ikili kemoterapi ajanlarıyla anti-EGFR'yi önerirken; NCCN kılavuzu, kemoterapiye anti-EGFR veya anti-VEGF eklenmesiyle ilgili bir ayrım yapmamaktadır. Her iki hedef tedaviyi kemoterapiye eklemeyi eşit oranda önermektedir. Metastatik sağ kolon tümörlerinin birinci seri tedavisinde ESMO üçlü kemoterapi rejimine anti-VEGF tedavi eklemeyi veya ikili kemoterapi rejimlerine anti-EGFR tedavisi eklemeyi önerirken; NCCN tedavide anti-EGFR'nin etkinliği olmadığını bildirmektedir. mKRK'nın refrakter hastalık tedavisinde kemoterapiye anti-EGFR eklemekle ilgili gerek setuksimab gerekse panitumab'ın çalışmalarında sağ kolon tümörlerinde anlamlı bir sağ kalım yararı sağlanmamıştır (7). İkinci seri tedavide kemoterapiye anti-EGFR eklemekle anti-VEGF eklemenin katkısını araştıran PRODIGE-18 çalışmasında tedavi açısından gruplar arasında etkinlik farkı göstermemiştir (8).

Anti-VEGF eklenen ikili veya üçlü kemoterapi rejimlerinin etkinliğinin araştırıldığı TRIBE çalışmasında, üçlü kemoterapi ile başlayıp tekrar progresyon durumunda intensif tedavi devamı ve anti-VEGF veya ikili kemoterapi rejimleri ve anti-VEGF tedavi rejimlerini karşılaştıran TRIBE2 çalışmasında ve üçlü kemoterapiye anti-EGFR eklenmesini etkinliğini araştıran VOLFI (Faz II) çalışmasında toksisite-lerin oldukça yüksek olduğu görülmüş ve üçlü kemoterapi için hasta seçiminin önemli olduğu bildirilmiştir (9-11).

TRIBE çalışmasının alt grup analizlerinde fit, rezeksiyona zorlanabilecek hastalarda, BRAF mutant ve sağ kolon tümörlerinde üçlü kemoterapiye anti-VEGF tedavisinin eklenilebileceği belirtilmiştir. TRIBE2 çalışması, fit, sağ kolon veya RAS/BRAF mutant hasta grubunda ufak da olsa bir katkı sağladığını gösterdi (10). VOLFI çalışması faz II bir çalışma olmasına karşın üçlü kemoterapiye anti-EGFR ilavesini araştıran bir çalışma olması açısından önemlidir ve bu çalışmayla özellikle sol kolon ve rezeksiyona zorlanacak hastalarla bu tedavinin en etkin olduğu bildirildi (11). İkili kemoterapi veya üçlü kemoterapi rejimi ile beraberlerinde anti-EGFR kullanmanın etkinlik farkı oluşturup oluşturmadığını TRIPLETE çalışması sonuçlarıncı öğreneceğiz (12).

İdame tedavisi, anti-VEGF tedavisinin etkinlik için 5-FU tedavisi ile beraber kullanılması gerektiğinden ve anti-EGFR'lerin cilt toksisitesi oluşturması nedeniyle toleransı güç bir tedavidir. Sitotoksik kemoterapi ± hedef tedavi ile idame tedavi kararı verilirken daha çok devam eden-iyi tedavi cevabı olan, R0 rezeke olabilmüş, tedavi iyi tolere eden veya hastalığa bağlı semptomu, yaşamı tehdit eden hastalığı olan hastalara tercih etmek daha akıllıca bir yaklaşım olabilir. Setuksimab tek başına idame için çalışması olan bir anti-EGFR iken diğer bir anti-EGFR ajan olan panitumumab VALENTINO çalışmasıyla 5-FU ve panitumumab kullanımına karşı inferior bulunmuştur (13).

### RAS dışı hedefler ve tedavi stratejileri

Günlük pratiğimizde mKRK kanser hastalarında moleküler belirteçler olarak KRAS, NRAS, BRAF V600E mutasyon varlığı, HER2/neu overekspresyon/amplifikasyonu ve dMMR/MSI bakmak artık standart yaklaşım olmuştur.

BRAF mutasyon varlığının prognostik etkinliğinin olduğu bilinmekteydi ancak, ikinci seri tedavi yaklaşımında prediktif etkinliği olduğu faz III bir çalışma olan BEACON çalışmasının uzun dönem sonuçlarıyla görülmüştür. Çalışmada BRAF inhibitörü (enkorafenib), MEK inhibitörü (binimetinib) ve anti-EGFR (setuksimab) tedavi (üçlü) ya da BRAF inh. ve anti-EGFR tedavi (ikili) veya standart tedavi kolu karşılaştırılmış, ASCO 2020'de veriler sonrası bu prognozu kötü hasta grubu için ikinci seri tedavi için ikili tedavi yaklaşımı standart tedavi olmuştur (14). HER2/neu overekspresyonu/amplifikasyonu, tüm mKRK kanserlerde %2, RAS/BRAF wild hasta grubunda %5 oranındadır ve prognostik değeri belirsizdir. Prediktif olarak anti-EGFR tedavisinin etkinliği üzerine olumsuz etkisi bilinmektedir. Küçük hasta gruplarıyla yapılmasına ve faz II olmalarına karşın bu grup hastalar için tedavi açısından yol gösterici olan iki çalışma sonucu mevcuttur.

HERACLES çalışması ile KRAS kodon 12/13 wild hastalara trastuzumab ve lapatinib'in kullanılması değerlendirilmiş; özellikle HER2/neu kopya sayısı >9,45 olan hastalarda oldukça etkin olduğu bildirilmiştir (15). Diğer bir faz II çalışma MyPathway çalışmasıdır. Çalışmada çoklu tedavi almış, KRAS wild veya mutant (%25) hastalarda trastuzumab ve

pertuzumabın kullanılması (dual HER-2/neu blokajı) değerlendirilmiştir ve objektif cevap oranı %32 bulunmuştur. Bu sonuç, çoklu tedavi almış bu hasta grubu için yüz güldürücüdür (16). Sonuçlar değerlendirildiğinde; tedavi etkinliği RAS mutant/MSI alt grublarına benzer, BRAF mutant gruba göre iyidir ve toksisitenin yönetilebilir olduğu sonucu çıkarılmaktadır. Bilinen diğer bir bilgi, primer tümör ve metastazı arasında HER-2/neu diskordansının yok kabul edilecek kadar düşük olduğudur. Kemoterapiye hedef tedavi eklemenin önemi günlük pratikte bu nadir görülen grupta araştırılması gereken bir diğer husustur (15, 16). ASCO 2020'de faz II çalışma sonucunda anti-HER2 monoklonal antikoru ve sitotoksik topoizomera-2 inhibitörü konjugatı olan trastuzumab derukstekan (T-DXd)'in etkinlik ve güvenlik verilerine ulaşılmıştır. İki ve daha fazla tedavi almış (aralarında anti-HER2/neu tedavide almış hasta oranı %44), RAS/BRAF wild ve refrakter HER2/neu pozitif mKRK hasta grubunda T-DXd'nin aynı serideki tedavi seçenekleri olan regorafenib ve TAS-102'ye göre daha etkin ve kost efektif olduğu gösterilmiştir (17).

NTRK ve Non-TRK gen füzyon pozitifliğinin %1'den az görülmesine ve prognoz verileri net olmamasına rağmen hedef tedavi alternatifi sunması açısından prediktif değeri vardır. NTRK ve Non-TRK gen füzyon pozitifliği daha sık MSI-H/RAS/BRAF wild, sağ kolon yerleşimli, yaşlı hastalarda tespit edilmiştir (18, 19). Yüzde 1 altı hasta popülasyonunda görülen ve prognostik değeri bilinmeyen bir diğer biyobelirteç de DNA polimerase epsilondur ve MSI dışı hipermutasyonlu bölgelerin tespit edilmesi durumunda immun checkpoint inhibitörü tedavisi verilebilmesi açısından değerlidir (20). NCCN 2020 Next-Generation-Sequencing (NGS)'i standart olarak önermemektedir. Özellikle mevcut tedaviler altında progrese, genç, nadir patolojilerde, atipik prezentasyonda, çoklu tedaviler sonrasında tedavi alabilecek veya klinik çalışmaya girebilecek hastalarda (örneğin NTRK pozitifliği düşünülen gibi) hastalarda istenmesini önerilmektedir.

### Üçüncü basamak ve sonrası yaklaşımlar

Bu basamakta mKRK'li hastalarda tedavi ajanları olarak regorafenib, TAS-102, cetuximab ve panitimumab, TAS-102'ye anti-VEGF (bevasizumab) beraber kullanımı önerilen tedavi seçenekleri arasındadır (21-24, 26). Regorafenib veya TAS-102 tedavi önceliği ile ilgili sıralama herhangi bir netliğe kavuşmuş değildir. Ancak her iki ajanın ayrı ayrı RAS wild/mutant hastalarda yapılmış olan faz III çalışmalarında TAS-102 tedavisi alan hastaların ilaca ara verme ve ilacı kesme oranları regorafenib tedavisi alanlara göre oldukça düşüktür (21, 22). TAS 102 ve regorafenib tümör büyüme hızı üzerinden değerlendirildiği bir çalışmada yavaş büyüyen tümörde TAS 102 daha etkinken hızlı büyüyen tümörde böyle bir tedavi farkı gösterilememiştir. Çalışmada ilk kez kliniğin prediktivite açısından kullanılabileceği ayırıcı olduğu bildirilmiş oldu (25). Diğer bir çalışmada refrakter mKRK hastala-

rında TAS-102'ye bevasizumab eklemenin daha etkin ve güvenli olduğu ortaya konmuştur. Bu çalışmayla kombinasyon tedavileri refrakter mKRK hastaları için kullanılabilir seçenekler olabileceklerini göstermişlerdir (26).

Rechallenge bugün için önerilen bir tedavi modalitesidir. Ancak yeni bir kavram olarak NeoRAS kavramı ile dikkati çeken nokta, hastaların üçüncü seri tedavide tekrar anti-EGFR tedavisinden fayda görenlerinin likid biyopside RAS-wild olanlar olduğudur. Çalışmalarla gün geçtikçe destek bulan NeoRAS yaklaşımı, her tedavi değişimi öncesi likid biyopsi ile RAS durumunu değerlendirilerek sonraki tedavideki biyolojik ajanın devamı ya da değiştirilmesi yönünde karar verilmesidir (27). RAS mutant hasta grubunun tedavi başlangıcından 8 hafta sonra RAS wild olabileceği ve hastaya tedavi serisi kazandırmak adına likid biyopsi ile RAS bakılması yaklaşımı bu konuda yapılmış faz II kanıt düzeyli çalışmalarla değerlendirilmiştir ve önerilmektedir (28). NeoRAS kavramı yeni oluşan bir klinik antidedir ve devam eden faz III çalışmaları mevcut olumlu sonuçları desteklerse, en önemlisi maliyet sorunu çözülebilirse günlük pratikte kullanıma girecektir.

### İmmünoterapi

Kanser hücrelerinde mismatch repair protein (MLH-1, MSH2, MSH6 ve PMS2) yetersizliği, çok sayıda somatik mutasyonlara ve tümör ilişkili neoantijenlere neden olarak immun cevabı tetikleyerek immünoterapinin etkin olmasına zemin hazırlamaktadır. mKRK'da MSI-H yüksekliği %3,5-6,5 oranında görülmektedir. Çoklu seri tedavi almış dMMR/MSI-H olan mKRK hastalarında Keynote-164 ile tek başına pembrolizumab kullanımı ve multi-kohort CheckMate-142 çalışması ise nivolumab'a düşük doz ipilimumab eklenmesi hem birinci seri tedavi ajanı olarak hem de sonrasında kullanımını değerlendiren ikinci faz II çalışmadır. Bu iki çalışma sonuçlarıyla NCCN v. 4. 2020'de mKRK dMMR/MSI-H hastalarda ikinci seri ve sonrası pembrolizumab, nivolumab ± ipilimumab kullanımı standart hale gelmiştir. İlk hat tedavide ise, aynı grup hastalarda intensif tedavi alamayanlar için pembrolizumab veya nivolumab kanıt düzeyi daha düşük olmak üzere nivolumab ve ipilimumab önerilmektedir.

ASCO 2020'de 3. yıl Keynote-164 ve 2. yıl birinci seri kullanımına ilişkin CheckMate-142 verileri paylaşıldı ve uzun dönem sonuçlarında da etkinliğin devam ettiği ve güvenli olduğu bildirildi (29,30). Keynote 177, MSI-H olan mKRK birinci seri tedavide pembrolizumaba karşı standart tedavinin değerlendirildiği faz III çalışma olarak ASCO 2020 sunuldu. Çalışmada pembrolizumab'ın RAS durumundan bağımsız olarak PFS'de 2 kata varan yükseklik, sürdürülebilir cevap oranı yüksekliği sağladığı gözlemlendi ve klavuzlarda birinci sıra tedavide yerini aldı (31). İlk seri tedavide bu hasta grubunda kemoterapiye immünoterapi eklemenin sonuçları beklenmektedir.

Diğer immunoterapi prediktif belirteçleri arasında öne çıkanlar tümör mutasyon yükü ve ARID1A mutasyon varlığıdır. Tümör mutasyon yükü >9 mutasyon/megabase üstünde olan MSS olan refrakter mKRK hastalarda pembrolizumab'ın etkinliği gösterildi. ARID1A mutasyonu (%7), MSS mKRK hastalarında frame-shift mutasyon artışı ile neoantijenite sağlamakta, IFN-γ ekspresyon artışına, inflamatuvar hc artışına, checkpoint artışına neden olmaktadır. İmmunoterapi için prediktiftir (32).

Günümüz pratiğinde mKRK tedavi kararında tümör yerleşimi önemlidir ve prognoz/prediktivite açısından biyobelirteçler belirlenmiştir ve her geçen gün sayısı daha da artmaktadır. İmmunoterapi tedavisi için dMMR/MSI bakılması günlük pratikte rutin önerilmektedir ve az da olsa hasta grubunda tedavide yerini almıştır. İmmunoterapiler ile ilk hat ve sonraki tedavilerde tümörü durdurmada süreklilik sağlayan bir yanıtın sağlandığı gözlemlenmektedir. Ayrıca ileriki yıllarda yeni immunoterapi prediktif belirteçleri ile tedavi edilebilen hasta sayısının artırılması, tedavi süresinin belirlenmesi ve progresyon sonrası aynı tedavinin devamı gibi sorulara yanıt bulunması beklenmektedir. NeoRAS kavramı, kanıt düzeyi yüksek bilgiler artıkça yakın gelecekte daha fazla gündemde olacaktır. Günümüzdeki birçok tümör tedavisinde olduğu gibi mKRK tedavisinde de moleküler değerlendirmeler prognoz ve prediktif açıdan son derece önemli hale gelmiştir.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Çalışma Konsepti/Tasarım- D.T., M.K.; Yazı Taslağı- M.K.; Son Onay ve Sorumluluk- S.K., D.T., M.K.

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

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

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

**Author Contributions:** Conception/Design of Study- D.T., M.K.; Drafting Manuscript- M.K.; Final Approval and Accountability- S.K., D.T., M.K.

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

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

## KAYNAKLAR/REFERENCES

- Weinberg BA, Marshall JL, E Salem M. The Growing Challenge of Young Adults With Colorectal Cancer. *Oncology (Williston Park)* 2017;31(5):381-9.
- Cremolini C, Antoniotti C, Lonardi S, Bergamo F, Cortesi E, Tomasello G, et al. Primary Tumor Sidedness and Benefit From FOLFOXIRI Plus Bevacizumab as Initial Therapy for Metastatic Colorectal Cancer. Retrospective Analysis of the TRIBE Trial by GONO. *Ann Oncol* 2018;29(7):1528-34. [\[CrossRef\]](#)
- D Arnold, B Lueza, J-Y Douillard, M Peeters, H-J Lenz, A Venook, et al. Prognostic and Predictive Value of Primary Tumour Side in Patients With RAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer Treated With Chemotherapy and EGFR Directed Antibodies in Six Randomized Trials. *Ann Oncol* 2017;28(8):1713-29. [\[CrossRef\]](#)
- Holchet JW, Ricard I, Stintzing S, Modest DP, Heinemann V, et al. The Relevance of Primary Tumour Location in Patients With Metastatic Colorectal Cancer: A Meta-Analysis of First-Line Clinical Trials. *Eur J Cancer* 2017;70:87-98. [\[CrossRef\]](#)
- Lenz HJ, Ou FS, Venook AP, Hochster HS, Niedzwiecki D, Goldberg RM, et al. Impact of Consensus Molecular Subtype on Survival in Patients With Metastatic Colorectal Cancer: Results From CALGB/SWOG 80405 (Alliance). *J Clin Oncol* 2019;37(22):1876-85. [\[CrossRef\]](#)
- Innocenti F, Fang-Shu Ou FS, Qu X, Zemla TJ, Niedzwiecki D, Tam R, et al. Mutational Analysis of Patients With Colorectal Cancer in CALGB/SWOG 80405 Identifies New Roles of Microsatellite Instability and Tumor Mutational Burden for Patient Outcome. *J Clin Oncol* 2019;37(14):1217-27. [\[CrossRef\]](#)
- Boeckx N, Koukakis R, Op de Beeck K, Rolfo C, Van Camp G, Siena S, et al. Effect of Primary Tumor Location on Second- Or Later-line Treatment Outcomes in Patients With RAS Wild-type Metastatic Colorectal Cancer and All Treatment Lines in Patients With RAS Mutations in Four Randomized Panitumumab Studies. *Clin Colorectal Cancer* 2018;17(3):170-8. [\[CrossRef\]](#)
- Bennouna J, Hiret S, Bertaut A, Bouché O, Deplanque G, Borel C, et al. Continuation of Bevacizumab vs Cetuximab Plus Chemotherapy After First Progression in KRAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer: The UNICANCER PRODIGE18 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol* 2019;5(1):83-90. [\[CrossRef\]](#)
- Cremolini C, Loupakis F, Antoniotti C, Lupi C, Sensi E, Lonardi S, et al. FOLFOXIRI Plus Bevacizumab Versus FOLFIRI Plus Bevacizumab as First-Line Treatment of Patients With Metastatic Colorectal Cancer: Updated Overall Survival and Molecular Subgroup Analyses of the Open-Label, Phase 3 TRIBE Study. *Lancet Oncol* 2015;16(13):1306-15. [\[CrossRef\]](#)
- Avallone A, Giuliani F. TRIBE2 results and toxicity. *Lancet Oncol.* 2020;21(6):e299. [\[CrossRef\]](#)
- Fornaro L, Lonardi S, Masi G, Loupakis F, Bergamo F, Salvatore L, et al. FOLFOXIRI in Combination With Panitumumab as First-Line Treatment in Quadruple Wild-Type (KRAS, NRAS, HRAS, BRAF) Metastatic Colorectal Cancer Patients: A Phase II Trial by the Gruppo Oncologico Nord Ovest (GONO). *Ann Oncol* 2013;24(8):2062-7. [\[CrossRef\]](#)
- Borelli B, Moretto R, Lonardi S, Bonetti A, Antoniotti C, Pietrantonio, F et al. TRIPLETE: A Randomised Phase III Study of Modified FOLFOXIRI Plus Panitumumab Versus mFOLFOX6 Plus Panitumumab as Initial Therapy for Patients With Unresectable RAS and BRAF Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer. *ESMO Open* 2018;3(4):e000403. [\[CrossRef\]](#)
- Pietrantonio F, Morano F, Corallo S, Miceli R, Lonardi S, Raimondi A, et al. Maintenance Therapy With Panitumumab Alone vs Panitumumab Plus Fluorouracil-Leucovorin in Patients With RAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer: A Phase 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol* 2019;5(9):1268-75. [\[CrossRef\]](#)

14. Kopetz S, Grothey A, Van Cutsem E, Yaeger R, Wasan HS et al. Encorafenib plus cetuximab with or without binimetinib for BRAF V600E metastatic colorectal cancer: Updated survival results from a randomized, three-arm, phase III study versus choice of either irinotecan or FOLFIRI plus cetuximab (BEACON CRC). *J Clin Oncol* 2020;38(15\_suppl): 4001-4001. [\[CrossRef\]](#)
15. Sartore-Bianchi A, Trusolino L, Martino C, Bencardino K, Lonardi S, Bergamo F, et al. Dual-targeted therapy with trastuzumab and lapatinib in treatment-refractory, KRAS codon 12/13 wild-type, HER2-positive metastatic colorectal cancer (HERACLES): a proof-of-concept, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2016;17(6):738-46. [\[CrossRef\]](#)
16. Meric-Bernstam F, Hurwitz H, Raghav KPS, McWilliams RR, Fakih M, VanderWalde A, et al. Pertuzumab Plus Trastuzumab for HER2-amplified Metastatic Colorectal Cancer (MyPathway): An Updated Report From a Multicentre, Open-Label, Phase 2a, Multiple Basket Study. *Lancet Oncol* 2019;20(4):518-30. [\[CrossRef\]](#)
17. Siena S, Di Bartolomeo M, Raghav KPS, Masuishi T, Loupakis F, et al. A phase II, multicenter, open-label study of trastuzumab deruxtecan (T-DXd; DS-8201) in patients (pts) with HER2-expressing metastatic colorectal cancer (mCRC): DESTINY-CRC01. *J Clin Oncol* 2020;38(15\_suppl):4000-4000. [\[CrossRef\]](#)
18. Okamura R, Boichard A, Kato S, Sicklick JK, Bazhenova L, Kurzrock R. Analysis of NTRK Alterations in Pan-Cancer Adult and Pediatric Malignancies: Implications for NTRK-Targeted Therapeutics. *JCO Precis Oncol* 2018;2018:10.1200/PO.18.00183. [\[CrossRef\]](#)
19. Federman N, McDermott R. Larotrectinib, a highly selective tropomyosin receptor kinase (TRK) inhibitor for the treatment of TRK fusion cancer. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2019;12(10):931-9. [\[CrossRef\]](#)
20. Müller MF, Ibrahim AE, Arends MJ. Molecular Pathological Classification of Colorectal Cancer. *Virchows Arch* 2016;469(2):125-34. [\[CrossRef\]](#)
21. Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A, Siena S, et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): a, n international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2013;381(9863):303-12. [\[CrossRef\]](#)
22. Mayer RJ, Van Cutsem E, Falcone A, Yoshino T, Garcia-Carbonero R, Mizunuma N, et al. Randomized Trial of TAS-102 for Refractory Metastatic Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 2015;372:1909-19. [\[CrossRef\]](#)
23. Karapeti CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, et al. K-ras Mutations and Benefit From Cetuximab in Advanced Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 2008;359(17):1757-65. [\[CrossRef\]](#)
24. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Cutsem EV, Siena S, Freeman DJ, et al. Wild-type KRAS Is Required for Panitumumab Efficacy in Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *JCO* 2008;26(10):1626-34. [\[CrossRef\]](#)
25. Masuishi T, Taniguchi H, Kawakami T, Kawamoto Y, Kadowaki S, Onozawa Y, et al. Impact of Tumour Growth Rate During Preceding Treatment on Tumour Response to Regorafenib or trifluridine/tipiracil in Refractory Metastatic Colorectal Cancer. *Esmo open* 2019;4(6):e000584. [\[CrossRef\]](#)
26. Pfeiffer P, Yilmaz M, Möller S, Zitnjak D, Krogh M, Petersen LN, et al. TAS-102 With or Without Bevacizumab in Patients With Chemorefractory Metastatic Colorectal Cancer: An Investigator-Initiated, Open-Label, Randomised, Phase 2 Trial. *Lancet Oncol* 2020;21(3):412-20. [\[CrossRef\]](#)
27. Klein-Scory S, Maslova M, Pohl M, Eilert-Micus C, Schroers R, Schmiegel W, et al. Significance of Liquid Biopsy for Monitoring and Therapy Decision of Colorectal Cancer. *Transl Oncol* 2018;11(2):213-20. [\[CrossRef\]](#)
28. Satake H, Sunakawa Y, Miyamoto Y, Nakamura M, Nakayama H, Shiozawa M, et al. A Phase II Trial of 1st-line modified-FOLFOXIRI Plus Bevacizumab Treatment for Metastatic Colorectal Cancer Harboring RAS Mutation: JACCRO CC-11. *Oncotarget* 2018;9(27):18811-20. [\[CrossRef\]](#)
29. Diaz La, Dung TL, Won Kim T, et al. Pembrolizumab monotherapy for patients with advanced MSI-H colorectal cancer: Longer-term follow up phase II. Keynote-164 study. *2020;38(15\_suppl):4032-4032. [CrossRef]*
30. Lenz HJ, Lonardi S, Zagonel V, et al. Nivolumab (NIVO) + low dose ipilimumab (IPI) as after first-line (1L) therapy in microsatellite instability-high/mismatch repair deficient (MSI-H/dMMR) metastatic colorectal cancer (mCRC): Two years clinical update. *J Clin Oncol* 2020;38(15\_suppl):4040-4040. [\[CrossRef\]](#)
31. Thierry Andre, Kai-Keen Shiu, Won Kim T, Jensen BV, Jensen LH, Cornelis J. A et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for microsatellite instability-high/mismatch repair deficient metastatic colorectal cancer: The phase 3 KEYNOTE-177 Study. *J Clin Oncol* 2020;38(18\_suppl): LBA4-LBA4. [\[CrossRef\]](#)
32. Jiang T, Chen X, Chunxia Su, Ren S, Zhou C. Pan-cancer analysis of ARID1A Alterations as Biomarkers for Immunotherapy Outcomes. *J Cancer*. 2020;11(4):776-780. [\[CrossRef\]](#)

# AYNA NÖRON SİSTEMİ VE FONKSİYONLARINA KLİNİK YAKLAŞIM

## A CLINICAL APPROACH TO THE MIRROR NEURON SYSTEM AND ITS FUNCTIONS

Emre HARI<sup>1,2,3</sup> , Canberk CENGİZ<sup>1,4</sup> , Ferhat KILIÇ<sup>1,5</sup> , Ertan YURDAKOŞ<sup>6</sup> 

<sup>1</sup>İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Sinirbilim Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup>İstanbul Üniversitesi, Hulusi Behçet Yaşam Bilimleri Araştırma Laboratuvarı, Nörogörüntüleme Birimi, İstanbul, Türkiye

<sup>3</sup>İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İleri Nörolojik Bilimler Doktora Programı, İstanbul, Türkiye

<sup>4</sup>İstinye Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Elektronörofizyoloji Bölümü, İstanbul, Türkiye

<sup>5</sup>İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Adli Tıp Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

<sup>6</sup>Altınbaş Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

**ORCID IDs of the authors:** E.H.0000-0002-8329-5507; C.C. 0000-0001-7444-7874; F.K. 0000-0003-4488-3485; E.Y. 0000-0003-4722-3888

**Cite this article as:** Hari E, Cengiz C, Kilic F, Yurdakos E. A clinical approach to the mirror neuron system and its functions. J Ist Faculty Med 2021;84(3):430-8. doi: 10.26650/IUITFD.2021.814218

### ÖZET

Ayna nöronlar, 1990'lı yılların başında Parma Üniversitesi'nde Rizzolatti ve ekibi tarafından ilk kez makak maymunlarında keşfedilmiştir. İnsanlarda ayna nöronların araştırıldığı çalışmalarda, makaklarda olduğu gibi invazif yöntemlerin kullanılması mümkün olmadığı için nörogörüntüleme ve elektrofizyolojik teknikler gibi non-invazif yöntemler kullanılmıştır. Bu nöron topluluğu, keşfinden bu yana eylemlerin tanınması, yorumlanması, taklit edilmesi, empati, öğrenme ve hafıza gibi birçok karmaşık işlevler ile ilişkilendirilmiştir. Bu durum, ayna nöron sisteminin biliş ve eylem arasında bir köprü oluşturduğunu düşündürmektedir. Ayna nöronların bilişteki olası rolü, bu sistemin nörolojik ve psikiyatrik hastalıklara bir şekilde etki ettiğini göstermektedir. Bu çerçevede bu derlemede, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, amiotrofik lateral skleroz, otizm spektrum bozuklukları ve psikotik bozukluklardaki ayna nöron sistemi patolojisi ile konjenital ayna hareket bozukluğunun ayna nöron sistemi ile olası ilişkisine dair çalışmalara yer verilmiştir. Ayna nöronların keşfinden sonra beyin organizasyonu hakkındaki yeni görüşler ışığında nörolojik ve psikiyatrik hastalıkların yeniden yorumlanması, klinik belirtilerinin daha iyi anlaşılması ve rehabilitasyonu için yeni yollar açmaya yardımcı olabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Ayna nöronlar, ayna nöron sistemi, ayna nöron fonksiyonları, nörodegeneratif hastalıklar, psikotik bozukluklar, otizm spektrum bozukluğu

### ABSTRACT

Mirror neurons were discovered in macaque monkeys in the early 1990s by Rizzolatti and his colleagues at the University of Parma. In studies investigating mirror neurons in humans, non-invasive methods of neuroimaging and electrophysiology have been used because the invasive methods used on macaque monkeys are not available. Several complex functions, including identification, evaluation, and imitation of action, empathy, learning, and memory, have been attributed to this neuron group since its discovery. Thus, the mirror neuron system is thought to be the bridge between cognition and action. This possible role in cognition shows the contribution of this system in some neurological and psychiatric diseases. With this perspective, studies on the pathology of the mirror neuron system in Parkinson's and Alzheimer's diseases, amyotrophic lateral sclerosis, and autism-spectrum and psychotic disorders are mentioned in this review, together with research on the possible involvement of the mirror neuron system in congenital mirror movement disorder. A re-evaluation of neurological and psychiatric diseases in light of new opinions on the organization of the brain following the discovery of mirror neurons may be helpful in understanding clinical features and establishing new methods of treatment and rehabilitation.

**Keywords:** Mirror neurons, mirror neuron system, mirror neuron functions, neurodegenerative diseases, psychotic disorders, autism spectrum disorder

**İletişim kurulacak yazar/Corresponding author:** ertan.yurdakos@kemerburgaz.edu.tr

**Başvuru/Submitted:** 21.10.2020 • **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 03.01.2021 •

**Son Revizyon/Last Revision Received:** 21.01.2021 • **Kabul/Accepted:** 24.01.2021 • **Online Yayın/Published Online:** 12.07.2021



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

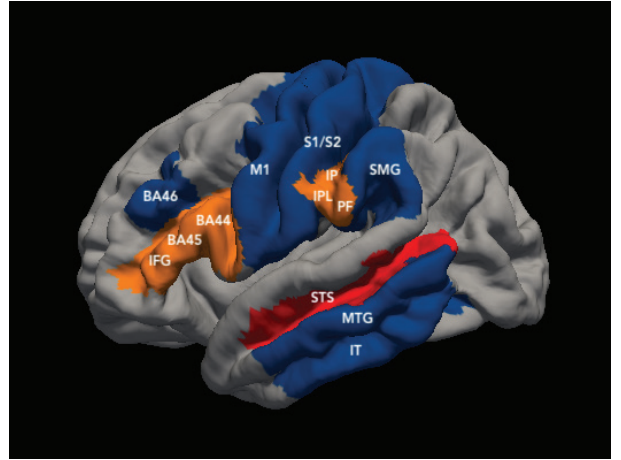
## GİRİŞ

Ayna nöronlar, yaklaşık 30 yıl önce Rizolatti ve ekibi tarafından makak beyinde F5 alanı ve inferior parietal lobülde (IPL) yeni bir sınıf nöron topluluğunun varlığının gösterilmesiyle keşfedildi (1). Bu nöron topluluğunun makak tarafından sadece bir nesneyi kavramak veya kapmak gibi bir eylem gerçekleştirildiğinde değil, aynı zamanda aynı eylemin bir insan veya başka bir makak tarafından gerçekleştirildiğini izlerken de aktive olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar bu yeni tür nöronları "Ayna Nöronlar" olarak adlandırmıştır. İnsanlarda ayna nöronların varlığı makaklarda olduğu gibi invazif yöntemlerle araştırılmayacağı için nörogörüntüleme (Fonksiyonel Manyetik Rezonans Görüntüleme – fMRG) ve elektrofizyolojik teknikler (Elektroensefalografi – EEG, Transkraniyal Manyetik Stimülasyon – TMS ve Manyetoensefalografi – MEG) gibi non-invazif metotlar kullanılmaktadır. İnsanda ayna nöron aktivitesi, premotor kortekste (inferior frontal girusun dorsal alanları) ve IPL'de tespit edilmiştir ve bu alanların makaklardaki F5 alanının homoloğu olduğu bilinmektedir (2). Bu bölgelere ek olarak primer motor korteks ve hipokampusta da ayna nöron aktivitesi gösterilmiştir (3). Ayrıca, superior temporal sulkusta (STS) yer alan nöronların ise ayna nöron özelliği taşımadığı ve ayna nöronlara temel görsel kortikal girdiyi sağladığı bildirilmiştir (4). Yakın zamandaki bir derlemede, inferior frontal girus (IFG), Brodmann 44–45 ve IPL bölgeleri klasik ayna nöron ağına ait alanlar olarak kabul edilmiştir. Bu alanlara ek olarak, Brodmann 46, primer motor korteks, primer somatosensoryel korteks, supramarjinal girus, orta temporal girus ve inferotemporal korteks ayna nöron özelliklerine sahip hücreler içeren alanlar olarak bildirilmiştir (5).

### Ayna nöronlar: Nörogörüntüleme çalışmaları

Nörogörüntüleme çalışmaları sayesinde kavrama hareketlerinin gözlemi ve yürütülmesi sırasında IFG, presentral girusun alt alanları, inferior parietal lobülün temporal, oksipital ve parietal görsel alanlarını içeren parietofrontal ağına aktive olduğu gösterilmiştir (6). Ayrıca bu bölgelere ek olarak ayna nöron aktivasyonuna yönelik spesifik olarak premotor korteks de tanımlanmıştır (7). Molenberghs ve ark. tarafından yapılan ve 125 çalışmanın fMRG verilerinin dahil edildiği kapsamlı bir meta-analiz çalışmasında da insan ayna nöron alanlarının klasik olarak IFG, ventral premotor korteks ve IPL'de bulunduğu ortaya konulmuştur (8). İnsanlardaki ayna nöronların serebral korteks üzerindeki yerleşimi Şekil 1'de gösterilmiştir.

Inferior frontal girustaki ve Broca alanındaki aktivasyonun distal el, ağız ve ayak hareketlerini gözlemlerken, premotor kortekste aktivasyonun ise proksimal kas hareketleri sırasında ortaya çıktığı bildirilmiştir (9). Katılımcıların iletişim kurmaya yönelik ve nesne kavramaya yönelik el hareketlerini gözlemlendiği ve taklit ettiği bir fMRG çalışmasında ise, her iki el hareketinin gözlemlenmesi ve yürü-



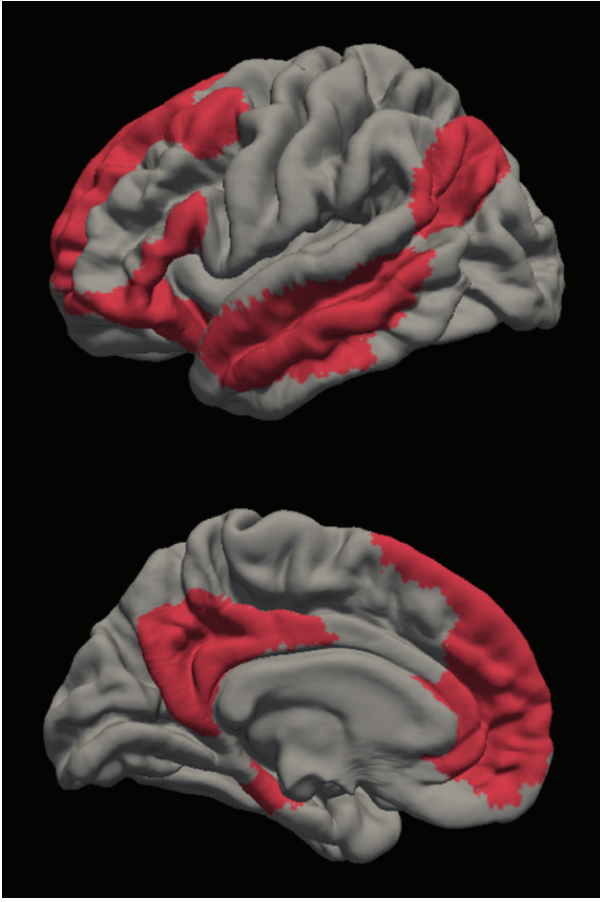
Şekil 1: Ayna nöronların serebral korteks üzerindeki yerleşimi

Klasik ayna nöron sistemine ait alanlar turuncu renkte temsil edilmektedir. Superior temporal sulcus (STS) kırmızı renk ile gösterilmiştir. Turkuaz alanlar ise, ayna nöron özelliklerine sahip nöronların bulunduğu veya fonksiyonel olarak ayna nöronlar ile sıkı sikiya bağlı olan diğer serebral alanları temsil etmektedir. Brodmann 44 (BA44); Brodmann 45 (BA45); Brodmann 46 (BA46); inferior parietal lobül (IPL); inferior frontal girus (IFG); inferotemporal korteks (IT); primer motor korteks (M1); orta temporal girus (MTG); primer somatosensoryel korteks (S1); sekonder somatosensoryel korteks (S2); supramarjinal girus (SMG)

tülmesi sırasında ayna nöron sisteminin benzer düzeyde aktive olduğu bildirilmiştir (10). Maymunlardakinin aksine, insanlardaki ayna nöronlar anlamsız hareketler gözlemlenirken bile aktive olmaktadır. Anlamlı eylemlerin gözlemlenmesi, ayna nöron sisteminin (Mirror Neuron System, MNS) frontal ve temporal alanlarının aktivasyonuna neden olurken, anlamsız eylemlerin gözlenmesi sadece frontal alanların aktive olmasına neden olmaktadır (9). İnsandaki ayna nöron sisteminin anlamsız eylemlere olan bu hassasiyetinin, insanların başkalarının eylemlerini taklit etme kapasitesini belirlemede önemli bir rol oynayabileceği ileri sürülmüştür.

Yeo ve ark. tarafından oldukça büyük bir örneklem grubu kullanılarak beyindeki entrensek bağlantısallık ağlarının (Intrinsic Connectivity Network, ICN) atlası oluşturulmuştur (11). Bu atlasta olağan durum ağının (Default Mode Network, DMN) serebral korteks üzerindeki dağılımına baktığımızda ayna nöron sistemi ile ilişkilendirilen birçok yapının DMN'nin içerisinde yer aldığı görülmektedir. DMN, medial prefrontal korteks, anterior singulat korteks, posterior singulat korteks ve prekuneus dahil olmak üzere kortikal orta hat yapılarını içeren, bireyin spesifik olarak bir görev yapmadığında bağlantısallığını arttıran, üzerinde en çok çalışılmış entrensek bağlantısallık ağlarından birisidir. Ayrıca DMN, sosyal biliş ile de ilişkilendirilmiştir (12). Yeo ve ark. tarafından oluşturulan entrensek bağlantısallık ağları atlasındaki DMN'nin kortikal yerleşimi Şekil 2'de gösterilmektedir (11).





**Şekil 2:** Olağan durum ağının serebral korteks üzerindeki yerleşimi

Kırmızı renk ile işaretlenen alanlar Yeo atlasında olağan durum ağının kortikal parsellerini temsil etmektedir.

DMN'nin temel bileşenlerinden olan prekuneusun, MNS'de yer alan IPL ile olan karşılıklı bağlantıları da bu iki sistem arasındaki yakın ilişkileri desteklemektedir (13, 14). Bu nedenle, bu iki ağ arasındaki ilişkinin inceleneceği gelecek çalışmalar, insan beyin süreçleri ile sosyal yetenekler arasındaki bağlantıyı anlamaya yardımcı olabilir.

### **Ayna nöronlar: Elektrofizyolojik çalışmalar**

Ayna nöronların keşfinden yıllar önce Gastaut'un çalışmalarında primer motor kortekse tekabül eden rolandik bölgedeki C3, Cz ve C4 elektrotlarından alınan EEG kayıtlarında hem aktif hareket esnasında hem de başka bireylerin hareketlerini gözlerken ve bu hareketleri yaptığını hayal ederken "mu" adı verilen alfa frekans bandındaki ritmin desenkronize olduğu gösterildi (15). Ayna nöronların keşfinden günümüze kadar yapılan çeşitli EEG ve MEG çalışmalarında klasik olarak mu ritmi supresyonunun ayna nöron aktivitesini yansıttığı bildirildi (15). Güncel bir EEG çalışmasında bebek ve yetişkinlerin geçişli hareketlerinin takibi geçişsiz hareketlerin takibi ile karşılaştırıldığında mu ritminin daha fazla baskılandığı gösterildi. Mu ritminin

araştırıldığı bir MEG çalışmasında, kaynağının sensorimotor bölgeler olduğunu gösterilmiştir (12).

Mu desenkronizasyonunun yanı sıra beta ve teta ritimleri ile ayna nöronların ilişkisi üzerine de çalışmalar mevcuttur. Beta ritmi supresyonu primer motor korteks faaliyetleri ve motor işlemlerle ilişkilendirilmiştir. Ayrıca somatosensoryel alanlardaki teta ritminin de hareket ile ilişkili olduğu ve ayna nöron faaliyetlerini yansıtabileceği öne sürülmektedir (12).

Diğer yandan mu ritmi desenkronizasyonunun MNS'nin rol oynadığı hareketlerin izlenmesi, öğrenilmesi ve taklit edilmesi işlevleri ile ilişkili olmadığını, bireylerin dikkat seviyeleriyle ilişkili olduğunu öne süren çalışmalar da mevcuttur. Perry ve Bentin yaptıkları bir çalışmada mu ritmi supresyonuna benzer bir etkinin oksipital kanallardaki EEG sinyalinde de görülmesini, bu supresyonun ayna nöron faaliyetleriyle değil, görevler arası dikkat farklılıklarıyla ilişkili olması şeklinde yorumlamışlardır (16). Aleksandrov ve Tugin ise insan hareketlerinin gözlemi ve değişik motor faaliyetler esnasındaki mu ritmi supresyonlarını karşılaştırmış ve anlamlı bir fark saptamamışlardır. Bu durumu mu ritmi supresyonunun ayna nöron aktivitesinin yeterli bir göstergesi olamayacağı şeklinde yorumlamışlardır (17).

Ayna nöron sisteminin parçalarından Broca alanı ve IFG'de tekrarlayıcı TMS ile geçici lezyon oluşturulan bir çalışmada, deneklerin çeşitli eylemleri tekrar ve taklit etme becerisinde azalma gösterilmiştir. Ayrıca motor uyarılmış potansiyeller (Motor Evoked Potentials, MEP) tekniğinde TMS ile indükleme esnasında amplitütlerde sıklıkla görülen azalmanın ayna nöron sisteminde oluşan geçici işlev kaybından kaynaklandığı düşünülmektedir (18). Cengiz ve ark. tarafından yapılan bir TMS-MEP çalışmasında MNS aktivitesinin kortikomotor uyarılabilirliğe olan etkisi incelenmiştir. Hareket gözlemi ve hareket gözlemi ile eşzamanlı aynı hareketin katılımcı tarafından hayal edilmesi (motor imgeleme) esnasında TMS uyarımının gözlemin farklı anlarında (hareketin başlangıcı, motor çıktının başlangıcı veya hareketin gösterildiği videonun sonu) uygulanması sonucu ortaya çıkan MEP yanıtları karşılaştırılmıştır. Hareket gözlemi+motor imgeleme durumunda sadece hareket gözlemi durumuna kıyasla daha fazla MEP yanıtı elde edilmiştir. İki grup içindeki değerlendirmelerde ise motor çıktının başlangıcında daha fazla olmak üzere hareketin başlangıcı ve hatta videonun sonunda uygulanan TMS uyarımı sonrasında elde edilen MEP yanıtları, hareket gözlemi veya motor imgeleme olmadan elde edilen bazal TMS-MEP yanıtlarından daha kuvvetli bulunmuştur. Bu durum MNS'nin farklı koşullarda gösterdiği aktivite farklılığıyla açıklanmıştır (19). Başka bir çalışmada ise katılımcıların Brodmann 1 ve 2 alanlarına tekrarlayıcı TMS (Repetitive TMS, rTMS) yöntemlerinden sürekli teta patlaması uyarımı (Continuous Theta Burst Stimulation, cTBS) uygulanmıştır ve eşzamanlı olarak fMRG çekimi yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda, primer

somatosensoryel korteksin hareket gözlemi esnasında MNS'ye girdi sağladığı düşünülmüştür (20).

## AYNA NÖRONLARIN FONKSİYONLARI

Ayna nöronların insanda eylemlerin tanınması, amacının yorumlanması, motor hareketlerin taklit edilmesi, empati, dil, öğrenme ve hafıza gibi karmaşık işlevlerde rol oynadığını öne süren pek çok çalışma yapılmıştır. Bu durum, aslında ayna nöron sisteminin biliş ve eylem arasında bir çeşit köprü görevi gördüğünü düşündürmektedir. Ayna nöronların fonksiyonlarını özellikle son yıllardaki yaklaşımları da göz önünde bulundurarak birkaç başlık altında değerlendirebiliriz.

### Hareket anlama

Literatürde eski ve yeni pek çok çalışma ayna nöronların; öğrenme, iletişim, empati, taklit gibi sosyal işlevlerde ve diğer bireylerin hareketlerinin fiziksel komponentleri, arandaki hedef, niyet ve emosyonel süreçlerin anlaşılmasında rol oynadığını öne sürmektedir. Bu işlevlerin hepsi "hareket anlama" adı verilen genel bir başlık altında ele alınmakta ve çalışmaların büyük bir kısmında bu ana işlevde rol oynadığı bildirilmektedir (21). Güncel yaklaşımlar hareket anlamayı farklı psikolojik süreçlere dayanan üç ayrı alt işleve ayırmaktadır: *i) Hareket tanımlama (Action identification)*: Bir harekete veya hareket dizisine vücudun hangi parçalarının hangi şekilde ve hangi oranlarda katıldığını değerlendirilmesi ve anlaşılması, *ii) Hedef tanımlama (Goal identification)*: Daha önceki deneyimlerin genellenmesinden de faydalanarak hareketlerin o anki hedefinin ve sonucunun değerlendirilmesi ve anlaşılması, *iii) Niyet tanımlama (Intention identification)*: Yine daha önceki deneyimlerden faydalanarak hareketlerin arkasındaki kognitif süreçlerin ve uzun soluklu sonuçlarının değerlendirilmesi ve anlaşılması. Güncel ve geçmiş pek çok çalışma ayna nöronların hareket tanımlamada aktif rol oynadığını göstermekte ve yaygın bir şekilde kabul görmektedir (3, 21).

Hedef ve niyet tanımlama işlevinde de aktif rol oynadığını öne süren çalışmalar mevcuttur. Örneğin, Gallese ve ark. tarafından yapılan çalışmada deneklerin nesnelere kavrama hareketi ve amaçsız hareketler yapılırken gözlemlenmesi sırasında TMS ile sol motor korteks uyarılmıştır. El kaslarında gözlenen elektrofizyolojik aktivite amaçsız hareketler esnasında da mevcut olsa bile kavrama hareketi esnasında daha belirgin olduğu gözlenmiştir (21). Hedef ve niyet anlama işlevi ile ayna nöronların ilişkisini değerlendiren çalışmalara bir diğer örnek ise Lacoboni ve ark. tarafından yayınlanan çalışmadır (22). Bu çalışmada, bağlam içinde yer alan eylemlere, bağlam içinde yer almayan eylemlerden farklı bir şekilde, IFG'nin dorsal kısmında ve el hareketlerinin temsil edildiği ventral premotor korteksin inferior kısmında görülen aktivasyon artışının eşlik ettiği bildirilmiştir. Bu durum araştırmacılar tarafından ayna nöron sisteminin bir parçası olan premotor korteksin alt alanlarının diğer bireylerin niyetlerinin anlaşılmasında rol oynadığı şeklinde yorumlanmıştır (22).

Makak maymunlarında yapılan bir çalışmada maymunlar bir parça yiyecek kavradığında ve bu eylemi diğer bireylerde gözlemlediklerinde IPL'de aktivasyon artışı tespit edilirken aynı yiyecek parçası kaba yerleştirildiğinde ise aktivasyon tespit edilmemiştir. Bu durum araştırmacılar tarafından bu aktivasyonun hareketin hedefini tanımlamaya ilişkili olduğu ve IPL ayna nöronlarının bu işlevde rol oynadığı şeklinde yorumlanmıştır (23). Buna karşılık, güncel bazı çalışmalar özellikle literatürdeki nispeten eski çalışmaların hareket anlama işlevini bir bütün olarak değerlendiren bir yaklaşıma sahip olmasından ve deney tasarımlarındaki kısıtlılıklardan hareketle ayna nöronların bu iki alt işlevde gerçekten rol oynadığına dair henüz yeterli kanıt bulunmadığını öne sürmektedir. Güncel bir çalışmada, TMS uygulanarak IFG bölgelerine geçici lezyon oluşturulan deneklerden kutu kaldıran bir kişiyi izlemeleri, kutunun ağırlığını tahmin etmeleri ve sonrasında kendilerinin de bu eylemi taklit etmeleri istenmiştir. Bu denekler kutunun ağırlığını gerçeğe yakın bir şekilde tahmin etmiş ancak eylemi taklit etmekte güçlük çekmiştir. Bu durum ise MNS'nin hareket tanımlamada aktif olduğu ancak hedef tanımlamada görevli olmadığı yönünde değerlendirilmiştir (24).

### Öğrenme ve hafıza

Çeşitli davranışsal araştırmalar, insan hafızasının bir bilgisayar hafızası gibi statik bir depo olmadığını, eşlik eden sensorimotor deneyimlerle sürekli değişime uğradığını ve dinamik bir yapı olduğunu göstermiştir. Bu durum ise ayna nöronların hafıza işlevinde rolü olabileceğini düşündürmüştür. Nitekim 2000'li yıllarda motor hafıza, taklit öğrenme ve yeni motor becerilerin kazanılmasıyla ayna nöron sisteminin ilişkili olduğunu öne süren çeşitli çalışmalar yapılmıştır (5). MEG kullanılan bir çalışmada bireylere belli hareketlerin resmedildiği görseller verilmiş ve taklit etmeleri istenmiştir. Kortikal aktivasyon oksipital korteksten başlayıp sırasıyla superior temporal bölgede, ayna nöron sisteminin parçası olan inferior parietal bölgede ve inferior frontal lobda özellikle Broca alanında görülmüş ve en sonunda 50-140 milisaniyelik bir süre sonunda her iki yarım kürenin primer motor korteksinde gözlenmiştir. Taklit esnasında ise Broca alanını içeren IFG'de aktivasyon artışı gözlenmiştir. Bu durum da ayna nöronların eylem taklidinde rol oynadığını düşündürmektedir (25). Bunun ötesinde, Mukamel ve ark. yaptıkları çalışmada hafıza işlevinin yürütülmesinde en büyük görevi sahip alanlardan biri olan hipokampusta ayna nöron benzeri, hem hareketler gözlemlenirken hem de uygulanırken aktive olan nöronlar olduğunu öne sürmüştür (3).

Motor taklit üzerine yapılan çalışmada ayna nöronlar, gözlemlenen ve taklit edilen hareketlerin vücuttaki lokasyonuna göre el, ağız ve ses-vokal ayna nöronları gibi alt kategorilere ayrılmıştır (26). Örneğin makak maymunlarında F5 alanının superior bölümleri daha çok el, lateralinde ise daha çok ağız ve ses-vokal ayna nöronları gözlenmiştir (27). Ancak bu alt kategoriler konum olarak birbirinden

tamamen bağımsız olsa da ayrı sistemler değildir ve ortak komponentleri mevcuttur. Örneğin, el ve ağız motor uyumu bebeklerde beslenme davranışlarının gelişimi açısından oldukça önemlidir. Bu çerçevede, maymunlarda yapılan bir çalışmada, hem el ve ağız hareketleri hem de yiyeceklerin ağza getirilmesi gibi eylemler gösterildiğinden F5c'nin lateralinde aktivasyon saptanmıştır (28).

### **Dil ve iletişim fonksiyonları**

Ayna nöronların, makak maymunlarında ilk tanımlandığı ventral premotor kortekste F5 alanının insandaki homologu konuşmanın motor komponentleri ile ilgili Broca alanının bir kısmını oluşturan Brodmann'ın 44. alanıdır (1). Primatlar üzerine yapılan güncel çalışmalar, bu alanın premotor ve primer motor korteksle birlikte görsel ve işitsel uyarılara karşı istemli sesli yanıt verilmesinde rol oynadığını göstermektedir (29). Broca alanı ile sol inferior parietal sulkus (IPS) ve sol IFG'den oluşan sol fronto-parieto-temporal ağız özellikle dil edinimi, gelişimi ve iletişim işlevlerinde rol oynayan ayna nöronları içerdiği düşünülmektedir (5). Ayna nöron sisteminin hem hareketlerin izlenmesi, taklit edilmesi ve öğrenilmesindeki rolü, hem de dil ve iletişimdeki rolünden hareketle, bu sistemin insanda dilin hareket ve işaret temelli bir şekilde başlayıp sesli bir hale evrilmesini sağladığı öne sürülmektedir (30). Bununla birlikte ayna nöronlar yalnızca primatlarda değil ötücü kuşlarda da gösterilmiştir. Yüksek vokal merkez (High Vocal Center) adı verilen bir premotor alanda görülen ses-vokal ayna nöronlarının; kuşların birbirlerinin ötme ve şakıma paternlerini tanıma ve bu paternlerden birbirlerinin kimliklerini ayırt etme, bu paternleri taklit etme ve iletişimde kullanmayı öğrenmelerinde işlevi olduğunun gösterilmesi, ayna nöronların insanlarda da dil ve iletişim işlevlerinin elde edilmesi ve sürdürülmesinde görev yaptığı yönündeki yaklaşımlarla örtüşmektedir (26). Bebekler kendi yüzlerini görmeseler bile annelerinin veya onunla yakından ilgilenen diğer kişilerin yüz ifadeleri ve emosyonel durumlarını sıklıkla görürler ve hatta kendi davranışları hakkında bunlardan geri bildirim alır ve bu ifadeleri taklit ederler. Bu durum davranış örüntülerinin ve duygulanımın gelişimi açısından oldukça önemlidir (28). Ayna nöron sistemi, emosyonel yüz ifadelerinin edinilmesi, anlaşılması ve oluşturulmasını sağlayarak emosyonel iletişime de katkıda bulunmaktadır. Bu işlevlerin yürütülmesi sırasında özellikle amigdala ve limbik yapılarda aktivasyon artışı olduğu fMRG çalışmaları ile gösterilmiştir (28).

### **KLİNİK VE ARAŞTIRMA ETKİLERİ**

Ayna nöronların bilişteki olası rolü, bu sistemin nörolojik ve psikiyatrik hastalıklara hipotetik bir şekilde etki ettiğini göstermektedir. Bu çerçevede bu derlemede, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, amyotrofik lateral skleroz (ALS), otizm spektrum bozuklukları ve psikotik bozukluklardaki ayna nöron patolojisine dair çalışmalar incelenmiştir.

### **Parkinson hastalığı**

Son yıllarda, kognitif ve motor nörodejeneratif bozukluklar arasındaki klasik ayrımın bulanık olduğu ve her nörodejeneratif hastalıkta hem kognitif hem de motor semptomların bir tür süreklilik içinde temsil edildiği giderek daha belirgin hale gelmiştir; Başlangıçta bir hareket bozukluğu olarak sınıflandırılan Parkinson hastalığında motor olmayan semptomların (Kognitif ve davranışsal semptomlar) günümüzde hastalığın seyri ile ilgili olduğu kabul edilmektedir. Parkin mutasyon taşıyıcıları ve sağlıklı kişilerin dahil edildiği bir fMRG çalışmasında, katılımcılara çekim esnasında ilk olarak nötr yüz ifadeleri sonra affektif yüz ifadeleri gösterilmiştir, sonrasında ise katılımcılara bir yüz ifadesi tanıma görevi uygulanmıştır. Parkin mutasyonu taşıyan grup affektif yüz ifadelerini gözlemlerken sağlıklı kontrollere göre ventrolateral premotor kortekste önemli ölçüde daha yüksek aktivasyon göstermiştir (31). Ayrıca, parkin mutasyon taşıyıcıları, ventrolateral premotor korteksteki aktivite artışıyla ters orantılı bir şekilde yüz ifadelerini tanımada sağlıklılara göre daha düşük performans göstermişlerdir. Bu telafi edici mekanizmanın başarısız olmasının, klinik olarak belirgin Parkinson hastalığında gözlenen yüz ifadesi ve yüz duygu tanımanın bozulmasına yol açabileceği ileri sürülmüştür. Buna karşılık, ayna nöronların aktivasyonunun, bu telafi mekanizmalarını en azından hastalığın ilk aşamalarında desteklemesi ve böylece Parkinson hastalarının daha etkili sosyal etkileşim becerisine sahip olmalarının mümkün olduğu düşünülmüştür. Başka bir fMRG çalışmasında, 13 Parkinson hastası ve sağlıklı kontrole çekim sırasında bir duygu tanıma görevi uygulanmıştır (32). Deneklere emosyonel, emosyonel olmayan ve nötr yüz ifadeleri içeren video klipler gösterilmiş ve bu yüz ifadelerini gerçekleştirmeleri istenmiştir. Hastalar duygu tanıma görevinde sadece yorumlaması en zor ifadelerde kontrol grubundan biraz daha başarısız olmuşlardır. Hasta grubunda, kontrol grubuna kıyasla emosyonel ifadelerin gözlemlenmesi ve gerçekleştirilmesi sırasında, IFG ve IPL'de daha düşük aktivasyon gözlenmiştir. Ayrıca, IPL'nin aktivasyonu hasta grubunun duygu tanıma yeteneği ile pozitif yönde korelasyon göstermiştir (32).

### **Alzheimer hastalığı**

Demansın en yaygın sebebi olarak bilinen Alzheimer hastalığı (AH) ve hastalığın preklirik evresi olarak kabul edilen hafif kognitif bozukluğun çoğu zaman sadece kognitif bozukluklar ile seyrettiği düşünülmüştür. Bununla birlikte, son yıllarda motor fonksiyonlardaki eksiklikler ile hastalık sürekliliği arasında giderek artan bir bağlantı olduğu ortaya çıkmıştır (33). Alzheimer demans spektrumunda, MNS'nin araştırıldığı bir fMRG çalışmasında 5 hafif kognitif bozukluk (HKB), 7 Alzheimer hastası ve 80 kognitif olarak normal birey incelenmiştir (34). Katılımcılar deney koşulu olarak bir el hareketini (kağıt parçasını yırtmak) ve kontrol koşulu olarak ise fiksasyon noktası içeren bir video izlemişlerdir. Deney koşulunda kontrol grubuna, hafif kognitif bozukluk ve Alzheimer hastalarına göre bilateral

inferior frontal lobül ve IPL'de anlamlı düzeyde yüksek aktivasyon tespit edilmiştir. Bu bulgular ışığında, çalışmada MNS'deki bir disfonksiyonun Alzheimer hastalığındaki kognitif bozulmada rol oynayabileceği ileri sürülmüştür. Diğer bir çalışmada ise 72 HKB ve 40 kognitif olarak normal katılımcının dahil edildiği EEG ve MRG kaydı yapılan çalışmada alfa3/alfa2 frekans güç oranı ile kortikal kalınlık ilişkisi araştırılmıştır. EEG'deki alfa3/alfa2 frekans güç oranındaki artışın IPL atrofisiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (35). Yine başka bir fMRG çalışmasında, HKB ve AH gruplarında ayna nöron sisteminin kognitif performans ile olan ilişkisi araştırılmıştır (36). Çalışmada AH grubunda MNS'de belirgin bozulma görülürken, HKB'li hastalarda ayna nöron sisteminin anterior bölümlerinin korunduğu ve Broca alanında bir aktivasyon artışı tespit edilmiştir. Ayrıca özellikle frontal alanlar ile ilgili görevlerde kognitif performansların korunmuş olması, MNS'nin posterior bileşenindeki aktivasyon düşüşünün frontal yapılar tarafından kompanse edilmesi şeklinde açıklanmıştır. Son olarak, başka bir fMRG çalışmasında Alzheimer hastalarında yüz ifadesi tanıma görevi sırasındaki nöral aktiviteler incelenmiştir (37). Hastalarda sol hemisferde ayna nöron sistemiyle ilişkili olduğu bilinen, ventral premotor korteks, anterior insula ve frontal operculum yapılarında kontrolle göre daha düşük aktivasyon tespit edilmiştir.

#### **Amyotrofik lateral skleroz**

ALS, serebral korteks, beyin sapı ve omurilikte bulunan motor nöronların seçici bir dejenerasyon örüntüsü ile ortaya çıkan ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır. ALS hastalarında motor davranıştan sorumlu beyin bölgelerindeki bu dejenerasyonun fonksiyonel sonuçlarının incelenmesi altta yatan temel mekanizmaları anlamada önemli bir adım olarak görülmektedir. fMRG yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalar, çeşitli görevlere yanıt olarak ALS hastalarındaki anormal beyin aktivasyonunu doğrulamıştır. Li ve ark. tarafından 30 ALS hastası ve 30 sağlıklı kontrol grubu dahil edilerek bir fMRG çalışması yapılmıştır. Çalışmada, katılımcılar üç frekansta veya üç zorluk derecesinde tekrarlayan fleksiyon-ekstansiyon hareketi yapan parmakların videosunu izledikleri sırada fMRG kayıtları gerçekleştirilmiştir. Hem ALS hastalarında hem de sağlıklı kontrol grubunda ayna nöron sistemine ait eylem gözlem alanlarında artmış aktivasyon tespit edilmiştir. ALS hastalarında ise, dorsolateral premotor korteks, IFG, inferior ve superior parietal girus ve suplementer motor alanda kontrollere kıyasla aktivasyon artışı tespit edilmiştir (38). Çalışmanın sonucunda, hastalarda tespit edilen MNS ile ilişkili alanlardaki artmış aktivasyon örüntüsünün parmak hareketinin frekansı ve zorluk derecesiyle bağlantılı olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular, ALS hastalarındaki işlev kaybını telafi etmek için MNS'nin de yer aldığı motor işleme ağında kompensatuar bir sürecin gerçekleştiğini göstermektedir (38). Başka bir fMRG çalışmasında ise, katılımcıların bir oyuncunun elindeki topu ritmik olarak sıkarken veya sıkarken gözlemlenmeleri sırasında inferior

frontal operkulum, frontal ve parietal alanlarda kontrolle kıyasla artmış aktivasyon tespit edilmiştir (39). Yine aynı çalışmada, ALS hastalarının diğer insanların eylemlerini fark etme becerileri araştırılmıştır. Çalışmada, katılımcılar elleriyle bir hareketi ifade eden bir aktörün kısa bir videosunu izlemişlerdir ve pasif olarak gözlemlenmeleri ya da ekranda görüntülenen cümleler içerisinden doğru olanı seçmeleri (aktif tanıma) istenmiştir. Pasif gözleme kıyasla aktif tanıma sırasında kontrol grubunda MNS'deki eylem gözlemi ile ilişkili frontal ve parietal alanlara ek olarak medyal temporal girusta yüksek aktivasyon gösterirken ALS grubunda sadece oksipital alanlarda artmış aktivasyon tespit edilmiştir. Sonrasında ALS hastaları tanıma görevindeki performanslarına göre ikiye ayrılmış ve sadece en iyi performans gösterenlerde bilateral SFG'de aktivasyon artışı tespit edilmiştir. Ayrıca katılımcıların fMRG görevindeki performansları ile gözlerden zihin okuma testi performanslarının tutarlı olarak örtüştüğü de bildirilmiştir. Sonuç olarak, çalışmadaki bulgular bazı ALS hastalarında MNS'deki disfonksiyonun sosyal bilgi de etkileyebileceğini düşündürmüştür (39).

#### **Otizm spektrum bozuklukları**

Bebeklik ve erken çocukluk döneminde ortaya çıkan, sosyal iletişim ve bazı davranış bozukluklarıyla karakterize nörogelişimsel bir rahatsızlıktır. Bu bozuklukta, taklit, duyguların paylaşımı, görev veya amaçları anlama, iletişim ve sosyal etkileşim sorunları da dahil olmak üzere kültürel uygulamalara ve sosyal öğrenme deneyimlerine katılım gibi oldukça önemli süreçler bozulmaktadır. Sosyal kognitif fonksiyonlarda rol alan MNS, Otizm Spektrum Bozuklukları (OSB) rahatsızlıkları ile ilişkilendirilmiştir. Bu mekanizma, başkalarının davranışları hakkındaki fikirlerimizin esas olarak kendi kişisel deneyimlerimize dayandığı ve buna paralel olarak başkalarının sosyal davranışları üzerindeki gözlemlerimiz ve çıkarımlarımıza da dayandığı çıkarımsal akıl yürütme (Explicit theory of other minds) fikrine temel oluşturur. Bu sebeple otizm ile MNS disfonksiyonu arasında bir ilişki ve yapısal anormallik olup olmadığına yönelik çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bir MEG çalışmasında, 8 Asperger sendromlu (AS) birey ile 10 kişilik sağlıklı kontrol grubu dudak hareketlerinin olduğu resimleri taklit etme görevi sırasında değerlendirilmiş ve Asperger sendromlu bireylerde inferior frontal lobda MNS'nin gecikmiş aktivasyon gösterdiği saptanmıştır. Gözlenen anormal premotor ve motor süreçlerin, AS'li hastalarda taklit ve sosyal bozuklukları kısmen açıklayabileceği vurgulanmıştır (40).

EEG'deki mu ritmi senkronizasyonunun ayna nöron sisteminin aktivitesini yansıttığı düşünülmekte ve eylem yürütme ile algı arasındaki bağlantının önemli bir sinirsel ilişkisini temsil etmektedir. OSB'de EEG ile yapılan çalışmalarda, mu ritmi supresyonu otizmde de MNS'de bir bozulma meydana geldiğini desteklemektedir (41). Otizmlili bireylerde TMS'de azalmış kortikospinal fasilitasyon bildirilmişse de OSB olan 32 kişi ile yapılan TMS çalışmasında

belirli görevler verilmiş (el hareketleri; kendisinin aktif olduğu veya karşılıklı gözlem) ve MEP kayıtları incelenmiştir. Sonuç olarak 32 kişilik nörogelişimsel bozukluk göstermeyen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında IMR (Interpersonal motor resonance) indekslerinde herhangi bir anlamlı farklılık ortaya çıkmamıştır (42). Başka bir çalışmada, hareket eden bir elin ve zıplayan bir topun videolarını izlerken ve kendi ellerini hareket ettirirken de OSB'li yüksek işlevli bireyler ile yaş ve cinsiyet açısından uyumlu kontrol deneklerinde mu ritmi supresyonu saptanmıştır. Kontrol grubu hem kendi el hareketlerinde hem de gözlemlenen el hareketlerinde önemli mu ritmi supresyonu gösterirken, OSB grubu sadece kendi kendine gerçekleştirdiği el hareketlerinde önemli mu ritmi supresyonu göstermiş ancak gözlemlenen el hareketlerinde mu ritmi supresyon göstermediği saptanmıştır (43). OSB'li yüksek işlevli çocuklarda ve yaş ve cinsiyet uyumlu kontrol grubunda mu ritmi supresyonu üzerine yapılan bir diğer çalışmada, OSB'li çocuklar; bir yabancıya sağ elini açıp kapattığını, ebeveyninin veya kardeşinin aynı el hareketini ve kendilerinin aynı el hareketini yaparken ki çekilmiş videosunu ve zıplayan iki topun dikey olarak birbirlerine doğru ve birbirinden uzaklaştığı videoları izlerken mu ritimleri incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda, OSB'li çocukların ve normal olarak gelişmekte olan çocukların, yabancılarla kıyasla tanıdık bireyler (ebeveynleri vb.) tarafından gerçekleştirilen eylemlerde daha fazla mu ritmi supresyonu gösterdiği ortaya konmuştur. Bu veriler, gözlem sırasında otistik çocuklarda mu ritmi supresyonu olmadığını göstermiş ve MNS'de olası bir işlev bozukluğuna işaret etmektedir (44). Sonraki yıllarda yapılan bir meta-analiz çalışmasında ise otizmi bireyler ile nörogelişimsel herhangi bir bozukluk göstermeyen popülasyon arasında anlamlı bir farklılık olmadığı da ileri sürülmüştür (45).

### **Psikotik bozukluklar**

Ayna nöron sistemi disfonksiyonunun görüldüğü bir diğer hastalık grubu olarak psikotik bozukluklar sayılabilir. Emosyonel-sosyal işlev bozukluğu ile karakterize şizofrenide özellikle negatif semptomlar (affektif küntleşme, anhedoni, yüz ifadelerinin anlaşılması ve oluşturulmasındaki bozulmalar) ile MNS işleyişindeki bozuklukların ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bir çalışmada, aktif şizofreni spektrumu ve psikotik bozuklukları olan katılımcılar, rezidüel fazda olan katılımcılarla ve sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında, sol hemisferde sensorimotor korteksin önemli ölçüde daha fazla mu ritmi supresyonu gösterdiği belirtilmiştir. Rezidüel fazda olan ve sağlıklı bireylerin benzer düzeylerde mu ritmi supresyonu gösterdiği yine aynı çalışmada belirtilmiştir. Bu çerçevede, daha fazla sol taraflı mu ritmi supresyonunun, psikotik semptomlarla pozitif olarak ilişkili olması, hastalığın aktif fazı sırasındaki şizofreni hastalarında anormal MNS aktivitesinin olabileceğini düşündürmüştür (46).

Empati, duyguları tanıma, duygusal perspektif alma ve duygusal yanıt verme gibi çeşitli bileşenlerden oluşmak-

tadır. Bir fMRG çalışmasında, 15 şizofreni hastası ile 15 kişilik sağlıklı kontrol grubunda empatinin bu üç bileşeni ile ilgili verilen görevler (yüz ifadesinden duygu tanımlama, bir sahnede maskeli bir yüzün duygusal ifadesini tahmin etme, gerçek yaşam durumlarını tanımlayan 70 kısa yazılı cümle ve bu durumları deneyimleseler nasıl hissedeceklerini hayal etmeleri) sonucunda şizofreni hastalarının üç alanda da kontrol grubundan daha kötü performans göstererek amigdalayla da içeren bir fronto-temporo-parietal ağda hipoaktivasyon sergiledikleri tespit edilmiştir (47). Emosyonel yüz ifadelerinin empati ile ilişkili olarak işlenmesi, MNS ile ilgili beyin alanlarını içerir. Psikotik hastalarda ayna nöron aktivitesi üzerine nörogörüntüleme çalışmalarının sistematik olarak gözden geçirildiği bir çalışmada; hastaların büyük bir bölümünde MNS aktivitesinin azaldığı ve özellikle premotor, motor korteks, IFG, IPL ve posterior STS bölgelerinin hastalarda disfonksiyon gösteren MNS parçaları olduğu saptanmıştır (12).

### **Konjenital ayna hareket bozukluğu**

Konjenital ayna hareket bozukluğu, istemli tek taraflı hareketin vücudun kontralateral tarafında bastırılmayan patolojik homolog aynalama hareketiyle karakterizedir (48). Bu ayna hareketler ile birlikte ek nörolojik belirtilerin başlaması genellikle beklenmez. Bu hastalar, iki el koordinasyonu gerektiren görevlerde zorluk, tek el gerektiren hareketleri yapamama ve bu aktivitelerin devamlılığında üst ekstremitelerde ağrı şikayetleri ile birlikte günlük yaşam aktivitelerinde zorluk yaşamaktadırlar (49). Ayna hareketleri açıklamak için literatürde önerilen mekanizma, istemli tek taraflı hareket sırasında her iki hemisferin anormal aktivasyonu şeklindedir (48). Bu anormal aktivasyon, istemli hareket esnasında kontralateral M1'deki motor hareketi kontrol eden nöral devrelerle olan işlev bozukluğu ile açıklanmaktadır. Ayrıca ayna hareket bozukluğu olan hastalarda fMRG metodu kullanılarak tek taraflı motor görevlerde bilateral kortikal aktivasyon da tespit edilmiştir (50). Ayna hareket bozukluğunun, ALS ve Parkinson hastalıklarında görülmesi ve MNS'nin temel yapılarından M1 disfonksiyonu ile karakterize olması sebebiyle kesin olmamakla birlikte MNS ile ilişkili olduğu düşünülebilir (48). Ancak literatürde konjenital ayna hareket bozukluğu ile MNS ilişkisinin araştırıldığı çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çerçevede, konjenital ayna hareket bozukluğunda MNS'nin araştırılması hem hastalığın kliniği hem de MNS'nin anlaşılması için önemli bir yere sahip olabilir.

### **SONUÇ**

Nörodejeneratif hastalıklarda ayna nöronların durumu ve rolü hakkındaki veriler oldukça zayıftır. Parkinson hastalığı ile ilgili mevcut çalışmaların varsayımsal bir sonucu, ayna nöron sisteminde hiperaktivasyon meydana geldiği yönündedir. Bu aktivasyon değişimi hastalığın erken aşamalarında motor ve kognitif performansları destekleyebilirken daha sonraki aşamalarda ayna nöronların

daha ciddi şekilde bozulması hastaların bir kısmında telafi edici mekanizmaları da bozabilir. Alzheimer demans spektrumunda da veriler oldukça azdır. Son çalışmalar, ayna nöron sisteminin posterior bölgelerinden, anterior bölgelerine doğru ilerleyici hipoaktivite meydana geldiği ve bu hipoaktivitenin telafi edici mekanizmaları devreye soktuğu ileri sürülmektedir. Bununla birlikte, bu hipotezi doğrulamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır, çünkü önceki davranışsal araştırmalar kısmen ters yöne işaret etmiştir. ALS'nin ise kavrama, konuşma, yürüme ve empatide spesifik eksikliklerle karakterize olduğu kabul edilirse, MNS'deki bir bozukluk bu klinik tabloya katkıda bulunabilir. Ancak gerçekçi bir şekilde, insandaki ayna nöronlar ve bunların diğer beyin sistemleri ile fonksiyonel ilişkileri hakkındaki mevcut bilgiler, bunu değerlendirilmesi zor bir hipotez haline getirmektedir. Ayna nöron sistemi otizm spektrum bozukluğuna sahip bireylerde taklit değerlendirme paradigmaları incelenmiş ve her ne kadar OSB'li bireylerde disfonksiyonel aktivasyon tespit edilmiş olsa da farklı yaş gruplarında farklı sonuçlar alınmıştır. Küçük çalışma grupları ve bireylerin doğuştan gelen farklılıkları ile çalışmaların bütününde tam olarak belirlenmiş standart metodolojik ilkeler bulunmaması da sonuçlarda değişkenlik yaratmış olabilir. Ayrıca MNS ve DMN arasındaki ilişkinin, kendilik algısı ile ilgili bazı beyin bölgelerini paylaşıyor görünmelerinden dolayı aralarındaki ilişkinin aydınlatılması ve OSB'nin DMN ilişkili bir hastalık olup olmadığının ileri çalışmalarla gösterilmesi gerekmektedir. Psikotik bozukluklarda özellikle şizofreni hastalarında bazı negatif ve pozitif semptomlarda rol oynadığı düşünülen MNS, psikotik semptomların yorumlanmasında ve terapötik stratejilerin geliştirilmesinde yeni perspektiflerin oluşturulmasına katkı sağlayabilir. Konjenital ayna hareket bozukluğu ise M1'deki disfonksiyon ve MNS'nin etkilediği hastalıklarda görülmesi sebebiyle MNS için ilgi çekici bir araştırma alanı olabilir. MNS'nin kognitif işlevlerle olan ilişkileri hakkındaki yeni görüşler, çeşitli hastalıkların klinik belirtilerinin daha iyi anlaşılması ve bu sayede de rehabilitasyonları için yeni yollar açılmasını sağlayabilir.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Çalışma Konsepti/Tasarım- E.H., C.C., F.K., E.Y.; Yazı Taslağı- E.H., C.C., F.K., E.Y.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi-E.Y.; Son Onay ve Sorumluluk- E.H., C.C., F.K., E.Y.

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

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

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

**Author Contributions:** Conception/Design of Study- E.H., C.C., F.K., E.Y.; Drafting Manuscript- E.H., C.C., F.K., E.Y.; Critical Revision of Manuscript-E.Y.; Final Approval and Accountability- E.H., C.C., F.K., E.Y.

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

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

## KAYNAKLAR/REFERENCES

1. Di Pellegrino G, Fadiga L, Fogassi L, Gallese V, Rizzolatti G. Understanding motor events: a neurophysiological study. *Exp brain Res* 1992;91(1):176-80. [CrossRef]
2. Ferri S, Peeters R, Nelissen K, Vanduffel W, Rizzolatti G, Orban GA. A human homologue of monkey F5c. *Neuroimage* 2015;111:251-66. [CrossRef]
3. Mukamel R, Ekstrom AD, Kaplan J, Iacoboni M, Fried I. Single-neuron responses in humans during execution and observation of actions. *Curr Biol* 2010;20(8):750-6. [CrossRef]
4. Nelissen K, Borra E, Gerbella M, Rozzi S, Luppino G, Vanduffel W, et al. Action observation circuits in the macaque monkey cortex. *J Neurosci* 2011;31(10):3743-56. [CrossRef]
5. Farina E, Borgnis F, Pozzo T. Mirror neurons and their relationship with neurodegenerative disorders. *J Neurosci Res* 2020;98(6):1070-94. [CrossRef]
6. Grèzes J, Armony JL, Rowe J, Passingham RE. Activations related to "mirror" and "canonical" neurones in the human brain: an fMRI study. *Neuroimage* 2003;18(4):928-37. [CrossRef]
7. Vogt S, Buccino G, Wohlschläger AM, Canessa N, Shah NJ, Zilles K, et al. Prefrontal involvement in imitation learning of hand actions: effects of practice and expertise. *Neuroimage* 2007;37(4):1371-83. [CrossRef]
8. Molenberghs P, Cunnington R, Mattingley JB. Brain regions with mirror properties: a meta-analysis of 125 human fMRI studies. *Neurosci Biobehav Rev* 2012;36(1):341-9. [CrossRef]
9. Mehta B, Bhandari B. The Mirror Neuron System: Basic Concepts. *Int Physiol* 2016;4(2):77-80. [CrossRef]
10. Montgomery KJ, Isenberg N, Haxby J V. Communicative hand gestures and object-directed hand movements activated the mirror neuron system. *Soc Cogn Affect Neurosci* 2007;2(2):114-22. [CrossRef]
11. Yeo BTT, Krienen FM, Sepulcre J, Sabuncu MR, Lashkari D, Hollinshead M, et al. The organization of the human cerebral cortex estimated by intrinsic functional connectivity. *J Neurophysiol* 2011;106(3):1125-65. [CrossRef]
12. Jeon H, Lee S-H. From neurons to social beings: Short review of the mirror neuron system research and its socio-psychological and psychiatric implications. *Clin Psychopharmacol Neurosci* 2018;16(1):18-31. [CrossRef]
13. Northoff G, Bermpohl F. Cortical midline structures and the self. *Trends Cogn Sci* 2004;8(3):102-7. [CrossRef]
14. Raichle ME, MacLeod AM, Snyder AZ, Powers WJ, Gusnard DA, Shulman GL. A default mode of brain function. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98(2):676-82. [CrossRef]
15. Gastaut HJ, Bert J. EEG changes during cinematographic presentation (Moving picture activation of the EEG). *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1954;6:433-44. [CrossRef]
16. Perry A, Bentin S. Does focusing on hand-grasping intentions modulate electroencephalogram  $\mu$  and  $\alpha$  suppressions? *Neuroreport* 2010;21(16):1050-4. [CrossRef]
17. Aleksandrov AA, Tugin SM. Changes in the mu rhythm in different types of motor activity and on observation of movements. *Neurosci Behav Physiol* 2012;42(3):302-7. [CrossRef]

18. Heiser M, Iacoboni M, Maeda F, Marcus J, Mazziotta JC. The essential role of Broca's area in imitation. *Eur J Neurosci* 2003;17(5):1123-8. [\[CrossRef\]](#)
19. Cengiz B, Vuralı D, Zinnuroğlu M, Bayer G, Golmohammadzadeh H, Günendi Z, et al. Analysis of mirror neuron system activation during action observation alone and action observation with motor imagery tasks. *Exp Brain Res* 2018;236(2):497-503. [\[CrossRef\]](#)
20. Valchev N, Gazzola V, Avenanti A, Keysers C. Primary somatosensory contribution to action observation brain activity-combining fMRI and cTBS. *Soc Cogn Affect Neurosci* 2016;11(8):1205-17. [\[CrossRef\]](#)
21. Gallese V, Fadiga L, Fogassi L, Rizzolatti G. Action recognition in the premotor cortex. *Brain* 1996;119(2):593-609. [\[CrossRef\]](#)
22. Iacoboni M, Molnar-Szakacs I, Gallese V, Buccino G, Mazziotta JC, Rizzolatti G. Grasping the intentions of others with one's own mirror neuron system. *PLoS Biol* 2005;3(3):e79. [\[CrossRef\]](#)
23. Fogassi L, Ferrari PF, Gesierich B, Rozzi S, Chersi F, Rizzolatti G. Parietal lobe: from action organization to intention understanding. *Science* 2005;308(5722):662-7. [\[CrossRef\]](#)
24. Thompson EL, Bird G, Catmur C. Conceptualizing and testing action understanding. *Neurosci Biobehav Rev* 2019;105:106-14. [\[CrossRef\]](#)
25. Nishitani N, Hari R. Viewing lip forms: cortical dynamics. *Neuron* 2002;36(6):1211-20. [\[CrossRef\]](#)
26. Tramacere A, Pievani T, Ferrari PF. Mirror neurons in the tree of life: mosaic evolution, plasticity and exaptation of sensorimotor matching responses. *Biol Rev* 2017;92(3):1819-41. [\[CrossRef\]](#)
27. Rizzolatti G, Craighero L. The mirror-neuron system. *Annu Rev Neurosci* 2004;27:169-92. [\[CrossRef\]](#)
28. Ferrari PF, Gerbella M, Coudé G, Rozzi S. Two different mirror neuron networks: the sensorimotor (hand) and limbic (face) pathways. *Neuroscience* 2017;358:300-15. [\[CrossRef\]](#)
29. Hage SR. Auditory and audio-vocal responses of single neurons in the monkey ventral premotor cortex. *Hear Res* 2018;366:82-9. [\[CrossRef\]](#)
30. Arbib MA. From monkey-like action recognition to human language: An evolutionary framework for neurolinguistics. *Behav Brain Sci* 2005;28(2):105-24. [\[CrossRef\]](#)
31. Anders S, Sack B, Pohl A, Münte T, Pramstaller P, Klein C, et al. Compensatory premotor activity during affective face processing in subclinical carriers of a single mutant Parkin allele. *Brain* 2012;135(4):1128-40. [\[CrossRef\]](#)
32. Pohl A, Anders S, Chen H, Patel HJ, Heller J, Reetz K, et al. Impaired emotional mirroring in Parkinson's disease—a study on brain activation during processing of facial expressions. *Front Neurol* 2017;8:682. [\[CrossRef\]](#)
33. Bisio A, Casteran M, Ballay Y, Manckoundia P, Mourey F, Pozzo T. Motor resonance mechanisms are preserved in Alzheimer's disease patients. *Neuroscience* 2012;222:58-68. [\[CrossRef\]](#)
34. Rattanachayoto P, Tritanon O, Laothamatas J, Sungkarat W. Comparison of a mirror neuron system among elders with mild cognitive impairment, Alzheimer's disease, and no disease. Thailand: N. p., 2012.
35. Moretti D V. Involvement of mirror neuron system in prodromal Alzheimer's disease. *BBA Clin* 2016;5:46-53. [\[CrossRef\]](#)
36. Farina E, Baglio F, Pomati S, d'Amico A, Campini IC, Di Tella S, et al. The mirror neurons network in aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer disease: A functional MRI study. *Front Aging Neurosci* 2017;9:371. [\[CrossRef\]](#)
37. Lee TMC, Sun D, Leung M-K, Chu L-W, Keysers C. Neural activities during affective processing in people with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2013;34(3):706-15. [\[CrossRef\]](#)
38. Li H, Chen Y, Li Y, Yin B, Tang W, Yu X, et al. Altered cortical activation during action observation in amyotrophic lateral sclerosis patients: a parametric functional MRI study. *Eur Radiol* 2015;25(9):2584-92. [\[CrossRef\]](#)
39. Jelsone-Swain L, Persad C, Burkard D, Welsh RC. Action processing and mirror neuron function in patients with amyotrophic lateral sclerosis: an fMRI study. *PLoS One* 2015;10(4):e0119862. [\[CrossRef\]](#)
40. Nishitani N, Avikainen S, Hari R. Abnormal imitation-related cortical activation sequences in Asperger's syndrome. *Ann Neurol* 2004;55(4):558-62. [\[CrossRef\]](#)
41. Oberman LM, McCleery JP, Hubbard EM, Bernier R, Wiersma JR, Raymaekers R, et al. Developmental changes in mu suppression to observed and executed actions in autism spectrum disorders. *Soc Cogn Affect Neurosci* 2013;8(3):300-4. [\[CrossRef\]](#)
42. Enticott P, Kennedy H, Rinehart NJ, Bradshaw J, Tonge B, Daskalakis ZJ, et al. Interpersonal motor resonance in autism spectrum disorder: evidence against a global "mirror system" deficit. *Front Hum Neurosci* 2013;7:218. [\[CrossRef\]](#)
43. Oberman LM, Hubbard EM, McCleery JP, Altschuler EL, Ramachandran VS, Pineda JA. EEG evidence for mirror neuron dysfunction in autism spectrum disorders. *Cogn Brain Res* 2005;24(2):190-8. [\[CrossRef\]](#)
44. Oberman LM, Ramachandran VS, Pineda JA. Modulation of mu suppression in children with autism spectrum disorders in response to familiar or unfamiliar stimuli: the mirror neuron hypothesis. *Neuropsychologia* 2008;46(5):1558-65. [\[CrossRef\]](#)
45. Todorova GK, Hatton REM, Pollick FE. Biological motion perception in autism spectrum disorder: a meta-analysis. *Mol Autism* 2019;10(1):49. [\[CrossRef\]](#)
46. McCormick LM, Brumm MC, Beadle JN, Paradiso S, Yamada T, Andreasen N. Mirror neuron function, psychosis, and empathy in schizophrenia. *Psychiatry Res Neuroimaging* 2012;201(3):233-9. [\[CrossRef\]](#)
47. Derntl B, Finkelmeyer A, Voss B, Eickhoff SB, Kellermann T, Schneider F, et al. Neural correlates of the core facets of empathy in schizophrenia. *Schizophr Res* 2012;136(1-3):70-81. [\[CrossRef\]](#)
48. Cox BC, Cincotta M, Espay AJ. Mirror movements in movement disorders: a review. *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)*. 2012;2: tre-02-59-398-1. [\[CrossRef\]](#)
49. Spencer-Smith M, Knight JL, Lacaze E, Consortium I, Depienne C, Lockhart PJ, et al. Callosal agenesis and congenital mirror movements: outcomes associated with DCC mutations. *Dev Med Child Neurol* 2020;62(6):758-62. [\[CrossRef\]](#)
50. Demirayak P, Onat OE, Gevrekci AÖ, Gülsüner S, Uysal H, Bilgen R, et al. Abnormal subcortical activity in congenital mirror movement disorder with RAD51 mutation. *Diagnostic Interv Radiol* 2018;24(6):392. [\[CrossRef\]](#)

## TWO CASE REPORTS OF COVID-19 PATIENTS WITH CONCURRENT INTRACRANIAL HEMORRHAGE

### İKİ OLGU SUNUMU: İNTRAKRANİYAL KANAMANIN EŞLİK ETTİĞİ COVID-19 VAKALARI

Pınar VARGÜN<sup>1</sup> , Musa KAYA<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Zonguldak Atatürk State Hospital, Department of Emergency Medicine, Zonguldak, Turkey

**ORCID IDs of the authors:** P.V. 0000-0003-0055-7741; M.K. 0000-0003-4962-2575

**Cite this article as:** Vargun P, Kaya M. Two case reports of covid-19 patients with concurrent intracranial hemorrhage. J Ist Faculty Med 2021;84(3):439-42. doi: 10.26650/IUITFD.2020.0097

#### ABSTRACT

COVID-19, of which unprecedented complications are constantly emerging, still continues to be the leading problem all over the world. As previously reported, neurological manifestations are some of the complications seen in novel coronavirus disease. Neurological complications are known to vary widely, including intracerebral hemorrhage. In this study, we intended to report two COVID-19 cases with concurrent intracerebral hemorrhage. In these case reports, we aimed to highlight the importance of being aware of neurological manifestations in COVID-19 patients.

**Keywords:** COVID-19, neurological complications, intracranial hemorrhage

#### ÖZET

Sürekli olarak yeni komplikasyonlarla gündeme gelen COVID-19, tüm dünyada hala önde gelen sorun olmaya devam ediyor. Daha önce bildirildiği gibi, nörolojik belirtiler, yeni coronavirüs hastalığında görülen komplikasyonlardan bazılarıdır. Nörolojik komplikasyonların, intrakraniyal kanamalar da dahil olmak üzere geniş ölçüde çeşitlilik gösterdiği bilinmektedir. Bu çalışmada, eş zamanlı olarak intrakraniyal kanaması da olan iki COVID-19 vakasını paylaşmak istedik. Bu vaka sunumları ile COVID-19 hastalarında nörolojik belirtilerin farkında olmanın önemini vurgulamayı amaçladık.

**Anahtar Kelimeler:** COVID-19, nörolojik komplikasyonlar, intrakraniyal kanama

#### INTRODUCTION

The Coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic, caused by the novel severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) which was initially identified in China in December 2019 and expeditiously spread across the world, continues to be a public health problem. The disease can be severe and even mortal in older people and in those with underlying chronic disease. Mortality rate is 2-3% worldwide with an apparent variation between countries. Supportive and empirical treatments are recommended at present and specific treatment and/or vaccine are not yet available. (1)

Although the most common symptoms are known to be related with the respiratory system, it has been revealed that some COVID-19 cases can present with extrapulmonary manifestations. Moreover, some COVID-19 patients

were been found to have only neurological manifestations such as headache, hyposmia, anosmia, dizziness, limb weakness, speech disturbance and unconsciousness in the course of the preliminary diagnosis. Cerebral infarction and intracerebral hemorrhage have been reported in some patients diagnosed with COVID-19 (2). Furthermore, some of the intracerebral hemorrhage cases have been reported to be massive accompanied by intraventricular and subarachnoid hemorrhage (3). Despite the fact that neurological complications have been reported to be various, such as encephalitis, neuralgia, ataxia, olfactory/taste disorder, Guillain-Barre syndrome, Miller Fisher syndrome, intracerebral hemorrhage, polyneuritis cranialis, ischemic stroke and dystonic posture, due to its poor prognosis intracerebral hemorrhage seems to be a leading mortal problem among the neurologic complications in COVID-19 cases (4).

**Corresponding author/İletişim kurulacak yazar:** pinarakanli@gmail.com

**Submitted/Başvuru:** 07.08.2020 • **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 07.09.2020 •

**Last Revision Received/Son Revizyon:** 24.12.2020 • **Accepted/Kabul:** 15.01.2021 • **Published Online/Online Yayın:** 17.03.2021



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



## CASE PRESENTATION

**Case 1:** A 56-year-old male patient with no co-existing disease was admitted to the Emergency Department of Zonguldak Atatürk State Hospital following a weakness of the left side of the body and cough. It was found out that the patient didn't apply to another hospital for these complaints and had no a history of using anticoagulant or antiaggregant medications. At the time of the admission, vital signs were as follows: Glasgow coma score (GCS):14, blood pressure (BP):180/90 mmHg, respiratory rate (RR): 16/min, oxygen saturation (SpO<sub>2</sub>): 98% heart rate (HR): 101/min and body temperature (BT):37.2. On neurological exam, his mental status was normal. There was no speech disturbance, neglect or visual field cut but a 3/5 left-sided hemiparesis was present. Eye movements and pupils were normal. He had a slight left nasolabial fold flattening. After the patient underwent a brain computed tomography (CT) scan, an intracranial hemorrhage (26x13 mm) at the level of the pons was noticed (Figure 1). A chest CT scan was taken simultaneously and bilateral peripherally located ground glass opacity was detected in the lungs of the patient (Figure 1).

The patient was hospitalized in the intensive care unit (ICU). Clarithromycin, meropenem, hydroxychloroquine and favipiravir were administered after admission to the ICU. However, since the acute phase markers were inclined to increase, clarithromycin was stopped and teicoplanin was started. Despite being elevated at admission, his blood pressured remained within normal range during his follow-up. The result of *RT-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) test of the patient was detected to be positive. D-dimer was determined to be elevated with a level of 9,475 µg/mL (reference range 0-500 µg/mL) following mea-

surement in the ICU. A mild thrombocytopenia was present (126,000 per microliter). International normalized ratio (INR), prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) were found to be in the normal range (1, 11 and 24 respectively). The level of ferritin (1271 µg/L) was above the normal range (30-400 µg/L). Unlike ferritin and D-dimer results, C-reactive protein value (4 mg/L, at admission) and fibrinogen (287 mg/dl, at admission) remained in the normal range during the follow-up. During his stay in the ICU, the patient had epileptic seizures. Endotracheal intubation was required after the deterioration of the patient's neurological condition with low GCS in the 28<sup>th</sup> day of the admission. The patient died of multiple organ failure at the end of the 41<sup>st</sup> day.

**Case 2:** A 54-year-old male patient with a medical history of diabetes mellitus was brought to the Emergency Department of Zonguldak Atatürk State Hospital because of complaints such as nausea, vomiting, fever and severe headache. He didn't apply to another hospital earlier. It was elicited that he didn't use any blood thinners in his lifetime. At the time of the admission, vital signs were as follows: GCS:15, BP:130/80 mmHg, RR:18/min, SpO<sub>2</sub>: 100%, HR: 88/min and BT: 37.8. On neurological exam, his mental status was normal. There was not any speech disturbance, limb weakness, neglect or visual field cut. Cranial nerve examination was normal. Cerebellar examination revealed that the patient had right-sided dysdiadochokinesia. Right intracerebellar hematoma with a size of 40 x 29 mm was detected on brain CT scan (Figure 2). The chest CT scan taken simultaneously showed bilateral, peripheral and basal predominant ground glass (Figure 2).

The patient was admitted to the ICU. He was started on antibiotics and hydroxychloroquine. The patient tested posi-



**Figure 1:** Brain CT scan image of the 1<sup>st</sup> case



**Figure 2:** Chest CT scan image of the 1<sup>st</sup> case



Figure 3: Brain CT scan image of the 2<sup>nd</sup> case

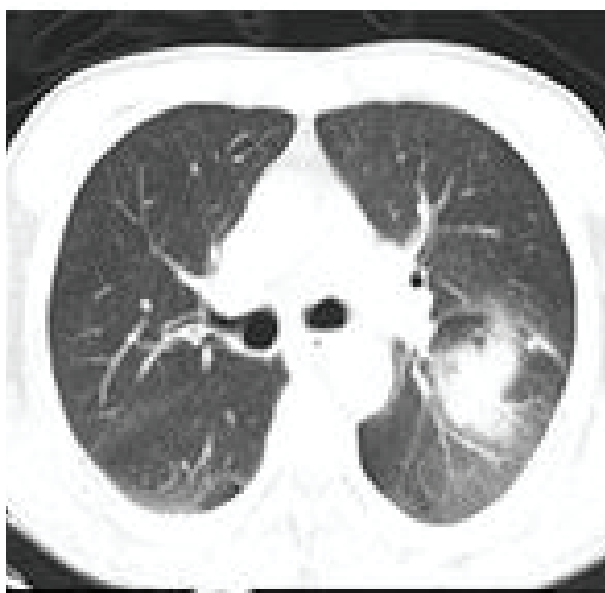


Figure 4: Chest CT scan image of the 2<sup>nd</sup> case

tive for Covid-19. D-dimer level was found to be elevated with a value of 1,249 µg/mL in the beginning and began to decrease starting from the 2<sup>nd</sup> day in the ICU. The platelet count was found to be slightly low (134,000 per microliter). INR, PT and aPTT were found to be in the normal range (0.9, 11 and 26 respectively). Ferritin (44 ng/ml) and C-reactive protein (0 mg/L) levels were within normal ranges. The patient was discharged with full recovery after firstly being transferred to a regular hospital room from the ICU.

Written informed consent was obtained from both patients.

## DISCUSSION

As a global public health problem, COVID-19 infection, which continues to be the major issue all over the world, almost every day initiates discussions regarding the unknown aspects of the condition. There have been discussions about the involvement of the central nervous system in this disease considering previously reported various neurological complications in COVID-19 patients (4,5). A broad-spectrum of neurological complications such as ischemic stroke, intracerebral hemorrhage, Guillain-Barre Syndrome, encephalitis, epilepsy and acute transverse myelitis have been reported in COVID-19 patients (6). Moreover, It has been suggested that neurological manifestations may even precede typical symptoms such as fever, cough and dyspnea in certain cases (6). In this study, we aimed to underline the fact that mortal neurological complications are most likely to be encountered in COVID-19 infection as we have detected intracerebral hemorrhage in two male patients aged 54 and 56 with COVID-19 (7). Several assumptions have been made about the potential mechanisms and facilitating factors in occurrence of such complications in this novel coronavirus disease. Although the typical targets of the coronaviruses are known to be the respiratory system, the fact that attachment of SARS-CoV-2 to the cells occurs through angiotensin converting enzyme-2 (ACE-2) and certain cells in the central nervous system have these receptors, suggest ACE-2 mechanism to have a role in neurological involvement in Covid-19 infection (8). In addition to COVID-19 cases with concurrent intracerebral hemorrhage, complications such as ischemic stroke (9) and cerebral venous thrombosis (10) have also been reported. Apart from ACE-2 receptor mechanism, it has also been postulated that neurological complications in novel coronavirus disease are possible to be originated from direct damage of infectious agents, an inflammatory process caused by these agents or other unexplained means. Moreover, these possible mechanisms may play a role in both ischemic and hemorrhagic strokes (11). Some findings regarding endothelial cell damage and vasculitis shown in some autopsy studies have been considered to explain the occurrence of ischemic stroke and intracranial hemorrhage in COVID-19 infection (12). In addition, coagulopathy proven with elevated D-dimer levels and thrombocytopenia has been shown in COVID-19 patients. It has been concluded that coagulopathy may be one of the reasons of neurological complications in novel coronavirus infection (13).

The main risk factors for intracranial hemorrhage are known to be hypertension, hypercholesterolemia, diabetes mellitus, smoking, alcohol and illegal drugs. Older people are more at risk than young people (14). In a case report, a 79-year-old man with no history of risk factors, such as anticoagulant therapy, was found to have a mas-

sive intracerebral hemorrhage detected synchronously with COVID-19 (3). Benger et al. reported a case series with 5 patients with ICH and COVID-19. All the patients were relatively young. However, three of them were on anticoagulant therapy prior to COVID-19 and the other 2 patient received low dose anticoagulant treatment as a prophylaxis for thrombotic manifestations of COVID-19 (15). COVID-19 cases with or without risk factors have been reported to suffer from neurological complications such as intracerebral hemorrhage (16). Thus, it still remains unclear whether there is a causative link between intracerebral hemorrhage and novel coronavirus diseases. In our study, the 56-year-old patient did not have any co-existing disease and the other patient had only diabetes mellitus. Neither patient had a history of smoking or alcohol consumption. Both had coagulopathy evidence with elevated D-dimer and thrombocytopenia in accordance with prior studies. Considering one of our patients had no risk factors, the other patient had only one and both of them were at a relatively young age, the culprit in emergence of intracerebral hemorrhage may be conceived to be associated with COVID-19 infection itself instead of being coincidental. But it would be too hypothetical to conclude this without further evidence.

## CONCLUSION

In this case report of two COVID-19 patients with intracerebral hemorrhage, we aimed to emphasize that crucially important neurological complications may occur in novel coronavirus infection. Even though based on some evidence, neurological complications are thought to be directly associated with novel coronavirus disease rather than being accidental, it is still theoretical with such limited data. Nevertheless, it must be taken into consideration when inquiring about neurological manifestations in patients with COVID-19.

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

**Informed Consent:** Written consent was obtained from the participants.

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

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

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

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Bilgilendirilmiş Onam:** Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

**Yazar Katkıları:** Çalışma Konsepti/Tasarım- P.V., M.K.; Veri Analizi/Yorumlama- P.V., M.K.; Yazı Taslağı- P.V., M.K.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- P.V., M.K.; Son Onay ve Sorumluluk- P.V., M.K.

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


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

## REFERENCES

1. Uğraş Dikmen U, Kına M, Özkan S, İlhan M. COVID-19 Epidemiyolojisi: Pandemiden Ne Öğrendik. *J Biotechnoloji and Strategic Health Research* 2020;4:28-36. [CrossRef]
2. Wang HY, Li XL, Yan ZR, Sun XP, Hun J, Zhang BW. Potential neurological symptoms of COVID-19. *Ther Adv Neurol Disord* 2020;13:1-2. [CrossRef]
3. Sharifi-Razavi A, Karimi N, Rouhani N. COVID-19 and intracerebral haemorrhage: causative or coincidental? *New Microbes New Infect* 2020;35:100669. [CrossRef]
4. Tsai ST, Lu MK, San S, Tsai CH. The Neurologic Manifestations of Coronavirus Disease 2019 Pandemic: A Systemic Review. *Front Neurol* 2020;11:498. [CrossRef]
5. Mao L, Jin H, Wang M, Hu Y, Chen S, He Q, et al. Neurologic Manifestations of Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. *JAMA Neurology* 2020;77(6):683-90. [CrossRef]
6. Ahmadi I, Rathore FA. Neurological manifestations and complications of COVID-19: A literature review. *J Clin Neurosci* 2020;77:8-12. [CrossRef]
7. Li J, Long X, Zhu C, Lin Z, Li J, Xiong N, et al. A case of COVID-19 pneumonia with cerebral hemorrhage. *Thromb Res* 2020;193:22-4. [CrossRef]
8. Baig AM, Khaleeq A, Ali U, Syeda H. Evidence of the COVID-19 virus targeting the CNS: tissue distribution, host virus interaction, and proposed neurotropic mechanisms. *ACS Chem Neurosci* 2020;11(7):995-8. [CrossRef]
9. Tan YK, Goh C, Leow AST, Tambyah PA, Ang A, Yap ES, et al. COVID-19 and ischemic stroke: a systematic review and meta-summary of the literature. *J Thromb Thrombolysis* 2020;50(3):587-95. [CrossRef]
10. Hemasian H, Ansari B. First case of Covid-19 presented with cerebral venous thrombosis: A rare and dreaded case. *Rev Neurol (Paris)* 2020;176(6):521-3. [CrossRef]
11. Bhatia R, Srivastava MVP. COVID-19 and Stroke: Incidental, Triggered or Causative. *Ann Indian Acad Neurology* 2020;23(3):318-24.
12. Moriguchi T, Harii N, Goto J, Harada D, Sugawara H, Takamino J, et al. A first case of Meningitis/Encephalitis associated with SARS-Coronavirus-2. *Int J Infect Dis* 2020;94:55-8. [CrossRef]
13. Levi M, Thachil J, Iba T, Levy JH. Coagulation abnormalities and thrombosis in patients with COVID-19. *Lancet Haematol* 2020;7(6):438-40. [CrossRef]
14. Morotti A, Goldstein JN. Diagnosis and Management of Acute Intracerebral Hemorrhage. *Emerg Med Clin North Am* 2016;34(4):883-99. [CrossRef]
15. Benger M, Williams O, Siddiqui J, Sztrihai L. Intracerebral haemorrhage and COVID-19: Clinical characteristics from a case series. *Brain Behav Immun* 2020;88:940-44. [CrossRef]
16. Cheruiyot I, Sehmi P, Ominde B, Bundi P, Mislani M, Ngure B, et al. Intracranial hemorrhage in coronavirus disease 2019 (COVID-19) patients. *Neurol Sci* 2020;3:1-9. [CrossRef]

## MULTIPLE FRACTURES IN A SINGLE UPPER EXTREMITY: HUMERAL SHAFT, OLECRANON, DISTAL RADIUS AND FOURTH METACARPAL BONE FRACTURES IN AN ELDERLY PATIENT AFTER A FALL: A CASE REPORT

BASİT DÜŞME SONRASI YAŞLI HASTADA AYNI TARAF EKSTREMİTEDE MULTİPL KIRIK;  
HUMERUS ŞAFT, OLEKRANON, DİSTAL RADIUS VE DÖRDÜNCÜ METAKARPAL KEMİK  
KIRIĞI-OLGU SUNUMU

Serkan BAYRAM<sup>1</sup> , Lezgin MERT<sup>1</sup> , Mehmet EKİNCİ<sup>1</sup> , Turgut AKGÜL<sup>1</sup> , İrfan ÖZTÜRK<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Department of Orthopedics and Traumatology, Istanbul, Turkey

**ORCID IDs of the authors:** S.B. 0000-0001-7651-1200; L.M. 0000-0003-3602-6694; M.E. 0000-0001-7337-3615; T.A. 0000-0002-0704-3797; İ.Ö. 0000-0002-3504-3479

**Cite this article as:** Bayram S, Mert L, Ekinci M, Akgul T, Ozturk I. Multiple fractures in a single upper extremity: humeral shaft, olecranon, distal radius and fourth metacarpal bone fractures in an elderly patient after a fall: a case report. J Ist Faculty Med 2021;84(3):443-7. doi: 10.26650/IUITFD.2020.0088

### ABSTRACT

Floating limb is a complicated injury and is associated with limb deformation and increased morbidity and mortality. We report a rare case of a floating upper limb in a 77-year old woman with ipsilateral humeral shaft, olecranon, distal radial and metacarpal bone fractures after a simple fall. The patient underwent surgery for humerus shaft, olecranon, and distal radius and was treated surgically with the 4<sup>th</sup> metacarpal conservative method. At the final follow-up 3 years after surgery, the patient had no complaints, all fracture had healed completely and elbow-wrist range of motion was complete. We discuss the surgical procedures that we used for the fractures, the mechanism of injury and the functional and radiological results. Multiple bone fractures in the same limb are rare and typically associated with high-trauma. We reported a unique case of an elderly patient with osteoporosis having multiple fractures in the same extremity that occurred as a result of low-energy trauma.

**Keywords:** Multiple bone fractures, osteoporotic bone, floating limb

### ÖZET

Yüzen ekstremitte ile sonuçlanan yaralanmalar kompleks, ciddi sakatlıklara neden olabilen ve morbidite-mortalite riski yüksek olan yaralanmalardır. Bu olguda basit bir düşme sonucu aynı tarafta humerus şaft, olekranon, radius alt uç ve dördüncü metakarpal kemik kırıkları olan, 77 yaşında bir kadın hastada nadir görülen yüzen bir üst ekstremitte olgusunu sunmayı amaçladık. Humerus şaft, olekranon ve radius alt uç kırıkları ameliyat ile metakarp kırığı konservatif metot ile tedavi edildi. Hastanın ameliyat sonrası 3. yıl takibinde, ek şikayeti olmadığı, kırıkları tamamen iyileştiği ve dirsek, el bileği hareket açıklıklarının tam olduğu saptandı. Bu olgu da kırıklar için kullandığımız cerrahi teknikleri, yaralanma mekanizmasını ve fonksiyonel ve radyolojik sonuçları sunduk. Aynı uzuvdaki çoklu kemik kırıkları nadirdir ve tipik olarak yüksek enerjili bir travma ile ilişkilidir. Bu olgumuzda literatürde çok nadir bildirilen düşük enerjili bir travma sonucu gelişen aynı taraf ekstremitte birden fazla kırığı olan osteoporozlu hastayı sunduk.

**Anahtar Kelimeler:** çoklu kemik kırığı, osteoporotik kemik, yüzen ekstremitte

**Corresponding author/İletişim kurulacak yazar:** dr.serkanbayram89@gmail.com

**Submitted/Başvuru:** 18.07.2020 • **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 01.10.2020 •

**Last Revision Received/Son Revizyon:** 20.11.2020 • **Accepted/Kabul:** 12.12.2020 • **Published Online/Online Yayın:** 31.05.2021



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

## INTRODUCTION

Humeral shaft fractures are common in elderly patients with low-energy trauma and account for 3%–5% of all fractures in adults (1). Although olecranon and distal radius fractures are most commonly observed in elderly patients, concurrent ipsilateral olecranon and distal radius fractures are extremely rare.

Concurrent ipsilateral fractures of the humeral shaft and forearm result in a so-called floating elbow. There are relatively few case reports in the literature on ipsilateral olecranon fractures associated with distal radius fractures, the so-called floating forearm injury, and these pertain to paediatric cases.

Herein, we describe the case of a 77-year-old woman who had a combination of the aforementioned injuries in the ipsilateral limb. To the best of our knowledge, this is the first case report of a combined floating elbow and floating forearm injury in the same limb in an elderly patient. Written informed consent was obtained from the patient for publication of this case report and accompanying images.

## CASE REPORT

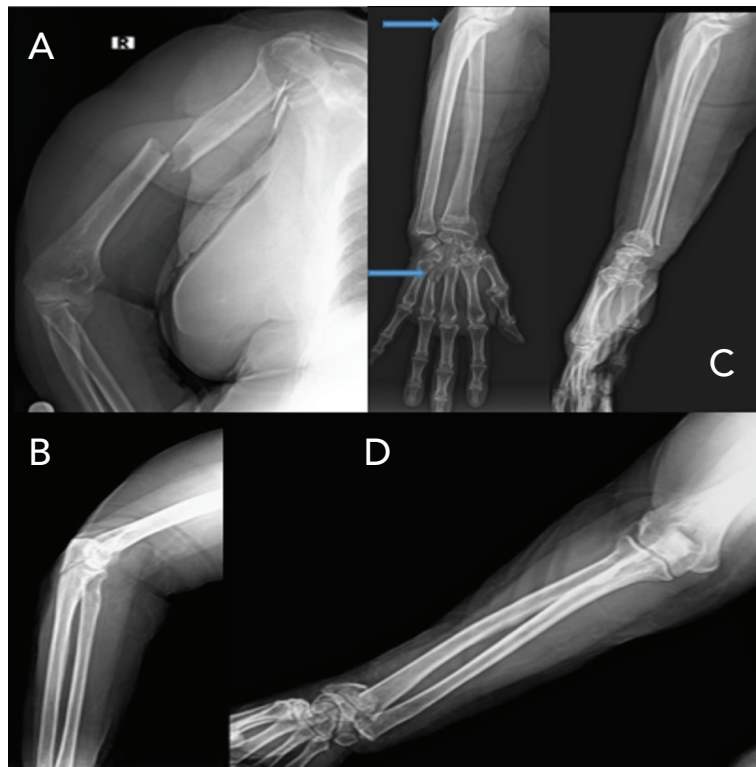
A 77-year-old woman was admitted to our emergency department following a fall from one stair step. She

complained of pain in her right upper extremity. Physical examination revealed a deformity in the arm and wrist. There was tenderness with palpation of the humeral shaft, olecranon, distal radius and fourth metacarpal bone. The neurovascular and radial nerve examinations were normal, and there was no other extremity trauma. She had hypertension and osteoporosis. The T-score detected at the lumbar vertebra was  $-2.7$ .

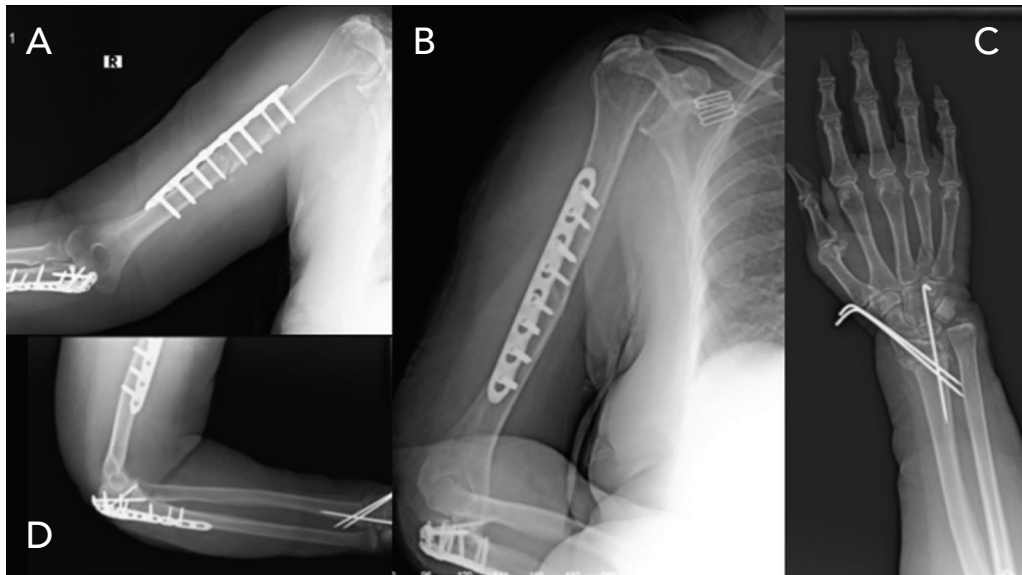
Radiological assessment included antero-posterior (AP)–lateral radiograph of the right humerus, elbow, wrist and AP and lateral and oblique radiograph of hand and confirmed the diagnosis of the right humeral shaft, olecranon, distal radius and fourth metacarpal bone fractures (Figure 1). All fractures were closed. According to the AO Fracture and Dislocation Classification, the humeral shaft fracture was AO 1-2-A2, the olecranon fracture was 2-1-B1, the distal radius fracture was 2-3-A2 and the fourth metacarpal fracture was a neck fracture. Surgical treatment was planned for the humeral shaft, olecranon and distal radius fractures, and conservative treatment was planned for the fourth metacarpal fracture. The patient's right upper extremity was splinted extending from the tip of the shoulder to the fingertips.

## SURGICAL TECHNIQUE

First, the patient underwent open reduction for the humeral shaft fracture with an anterolateral approach un-



**Figure 1:** Humeral shaft (A), olecranon (B), distal radius (D) and fourth metacarpal bone (C) fractures in the same upper limb.



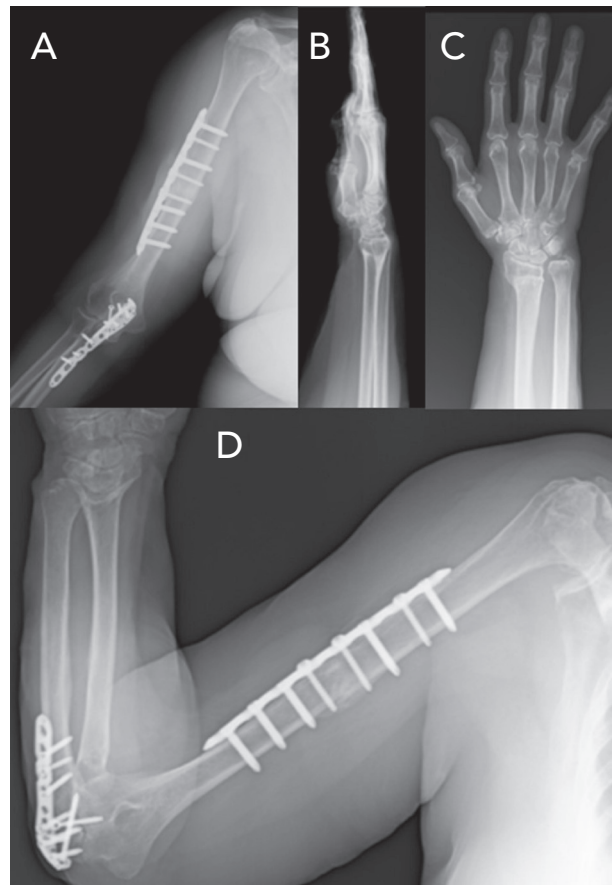
**Figure 2:** Humeral shaft and olecranon fractures were surgically treated using anatomical locking plates (A, B, D), and the distal radius fracture was treated via closed reduction using two percutaneous Kirschner wires (C)

der general anaesthesia, and an anatomical locking plate was applied. Thereafter, she underwent surgery for the olecranon fracture with a posterior approach, and an anatomical locking plate was applied. Finally, she underwent closed reduction for the distal radius fracture with percutaneous Kirschner (K) wire fixation. Reduction was stabilised using two K wires (Figure 2). An arm sling and a short forearm splint were used postoperatively for the metacarpal fracture. Elbow range of motion (ROM) exercises were initiated after one week of arm-sling usage.

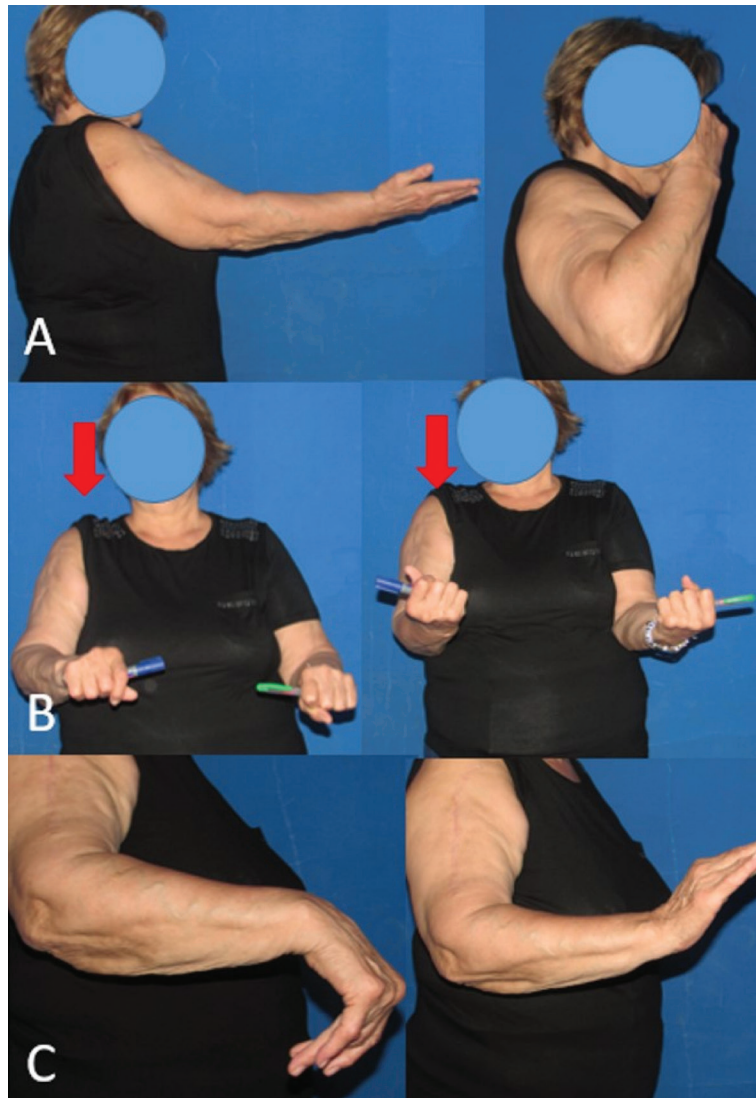
The patient postoperatively developed radial nerve palsy symptoms with difficulty in straightening her wrist and fingers. The forearm splint was removed, and the patient began to use a radial nerve splint after two weeks and take pregabalin orally 75 mg twice a day and B-12 vitamin pills once a day.

At the 6<sup>th</sup> week postoperatively, the distal radius and the fourth metacarpal bone were healed radial nerve symptoms were not completely recovered; thus, the use of the radial nerve splint and pregabalin administration were continued. At the 3-month follow-up, radial nerve palsy symptoms were completely resolved, and the splint and medications were discontinued. The patient achieved an elbow ROM of 20°–100°.

At the final follow-up three years after surgery, the patient had no complaints regarding fracture healing (Figure 3). She had an elbow ROM of 10°–130°, wrist joint ROM of 45° of dorsiflexion and 45° of *volar flexion* and full pronation and supination (Figure 4).



**Figure 3:** A, D: Humeral and olecranon, B: distal radius and C: 4<sup>th</sup> metacarpal bone fracture were successfully treated



**Figure 4:** The patient's elbow (A), forearm rotation (B) and wrist joint (C) range of motion

## DISCUSSION

'Floating elbow' is a term used to describe a combination of ipsilateral forearm and humeral fractures (2). The term 'floating forearm' describes a combination of ipsilateral proximal and distal forearm fractures (3); these injuries are extremely rare. This case, which describes a combination of an ipsilateral floating elbow and a floating forearm in an elderly patient after an injury that resulted from a fall from one stair, is very rare.

Humeral shaft, olecranon and distal radius fractures are very common injuries by themselves, but the simultaneous occurrence of these fractures after a fall from one stair step is unusual. We hypothesise that the mechanism of this injury was an outstretched arm with the forearm pronated and wrist hyperextended. This mechanism would

explain the olecranon and distal radius fractures, whereas the humeral and fourth metacarpal fractures may be explained by direct trauma from the edge of the stairs.

Multiple fractures in the concurrent limb usually require a high-energy trauma. However, in our case, these fractures resulted from a low-energy trauma most likely due to osteoporosis. Patients with multiple fractures carry a higher risk of developing neurovascular injuries, compartment syndrome and open fractures than that of patients with isolated fractures (4-6). Unfortunately, there is no consensus in the literature on the order of treatment in the upper limb in the event of multiple fractures. In our case, surgery was initiated for the most severely deformed fracture, the humeral shaft fracture. After the humeral fracture was reduced and fixed, the reduction of the olecranon and distal radius fractures was easier.

## CONCLUSION

One of the important messages here is that multiple bone fractures in the same limb are can occur after a simple fall especially in elderly patients with osteoporosis. So, elderly patients should be evaluated with complete and thorough examination and obtain the appropriate x-rays to rule out the occurrence of more injuries in the same limb or other body parts. These fractures can be treated conservatively when they occur separately, however, multiple fractures in the same limb, such as a floating limb, should be treated surgically.

---

**Informed Consent:** Written consent was obtained from the participants.

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

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

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

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

---

**Bilgilendirilmiş Onam:** Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

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

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

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

## REFERENCES

1. Tytherleigh-Strong G, Walls N, McQueen MM. The epidemiology of humeral shaft fractures. *J Bone Joint Surg Br* 1998;80(2):249-53. [\[CrossRef\]](#)
2. Harrington P, Sharif I, Fogarty EE, Dowling FE, Moore DP. Management of the floating elbow injury in children: simultaneous ipsilateral fractures of the elbow and forearm. *Arch Orthop Trauma Surg* 2000;120(3-4):205-8. [\[CrossRef\]](#)
3. Jupiter JB, Kour AK, Richards RR, Nathan J, Meinhard B. The floating radius in bipolar fracture-dislocation of the forearm. *J Orthop Trauma* 1994;8(2):99-106. [\[CrossRef\]](#)
4. Dhoju D, Sherestha D, Parajuli N, Dhakal G, Sherestha R. Ipsilateral supracondylar fracture and forearm bone injury in children: a retrospective review of thirty one cases. *Kathmandu Univ Med J* 2011;9(2):11-6. [\[CrossRef\]](#)
5. Abutalib RA, Khoshhal KI. Multiple concomitant injuries in one upper extremity: a case report. *Am J Case Rep* 2016;17:6-11. [\[CrossRef\]](#)
6. Mana'an Q, Bashir A, Zahoor A, Mokhdomi TA, Danish Q. The floating upper limb: multiple injuries involving ipsilateral, proximal, humeral, supracondylar, and distal radial limb. *Clin Orthop Surg* 2016;8(3):345-8. [\[CrossRef\]](#)



# GIANT SIZED EXTRAVESICAL BLADDER LEIOMYOMA MIMICKING UTERINE CERVICAL LEIOMYOMA: A CASE REPORT WITH 8 YEARS' POSTOPERATIVE FOLLOW-UP AND A REVIEW OF THE LITERATURE

UTERİN SERVİKAL LEİOMYOMU TAKLİT EDEN DEV EKSTRAVEZİKAL MESANE LEİOMYOMU: 8 YILLIK POSTOPERATİF TAKİBİ VE LİTERATÜRÜN GÖZDEN GEÇİRİLMESİ

Şebnem ALANYA TOSUN<sup>1</sup> , Hamdullah SOZEN<sup>2</sup> , Tzevat TEFİK<sup>3</sup> , Ahmet Cem İYİBOZKURT<sup>4</sup> , Yavuz SALİHOĞLU<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Giresun University, Faculty of Medicine, Department of Gynecology and Obstetrics, Giresun, Turkey

<sup>2</sup>Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Department of Gynecology and Obstetrics, Division of Gynecologic Oncology, İstanbul, Turkey

<sup>3</sup>Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Department of Urology, İstanbul, Turkey

<sup>4</sup>Demiroglu Bilim University, Department of Gynecology and Obstetrics, İstanbul, Turkey

**ORCID IDs of the authors:** Ş.A.T. 0000-0002-2044-1044; H.S. 0000-0002-0568-5307; T.T. 0000-0002-1398-8332; A.C.İ. 0000-0002-5047-2191; Y.S. 0000-0002-8058-5568

**Cite this article as:** Alanya Tosun S, Sozen H, Tefik T, Iyibozkurt AC, Salihoglu Y. Giant sized extravescical bladder leiomyoma mimicking uterine cervical leiomyoma: a case report with 8 years' postoperative follow-up and a review of the literature. J Ist Faculty Med 2021;84(3):448-53. doi: 10.26650/IUITFD.2021.804321

## ABSTRACT

The incidence of bladder leiomyoma is estimated at only 0.43% because most bladder tumors arise from the urothelium. Moreover, 30% of them are the extra-vesical type. The symptoms include urinary tract obstruction, bladder irritation, and dysuria, with the possibility of dyspareunia or hematuria depending on the size and location of the tumor. Bladder leiomyomas cannot be diagnosed solely by combining symptoms and imaging techniques. We present a rare case of giant sized extravescical-type bladder leiomyoma with a diameter of 15.5x14.5x14 cm, which was misdiagnosed as a uterine cervical leiomyoma. It caused unilateral ureteral distension without related symptoms. During the 8-year postoperative follow-up, the patient had two healthy full-term pregnancies and no recurrence was observed. We reviewed the literature of the most recent five years and discussed the characteristics of 22 bladder leiomyoma cases. Unlike the literature, the present case is unique due to the giant size of the bladder leiomyoma, its ureteral complications, and long follow-up period. Bladder leiomyomas are rare bladder tumors which should be borne in mind during the differential diagnosis of a pelvic mass. Surgical excision is the most useful procedure for diagnosis and treatment.

**Keywords:** Bladder leiomyoma, bladder tumor, cervical leiomyoma, cervical tumor, differential diagnosis

## ÖZET

Mesane leiomyomunun insidansı sadece %0,43 olarak tahmin edilmektedir; çünkü mesane tümörlerinin çoğu üroepitelyumdan kaynaklanmaktadır. Bunun yanı sıra, mesane leiomyomlarının sadece %30'u ekstra-vezikal tiptedir. Üriner sistem obstrüksiyonu, mesane irritasyonu, dizüri, disparoni veya hematüri gibi semptomlar kitlenin boyut ve yerine göre değişebilir. Yalnızca semptom ve görüntüleme tekniklerine dayanarak mesane leiomyomu tanısı konulamamaktadır. Preoperatif uterin servikal leiomyom ön tanısı düşünülen, 15,5x14,5x14 cm çapında tek taraflı üreteral distansiyona yol açan, nadir görülen bir ekstrevezikal tip mesane leiomyomu olgusunu sunuyoruz. Sekiz yıllık postoperatif takip boyunca, hastanın iki sağlıklı term gebeliği mevcuttu ve nüks izlenmedi. Son beş yılın literatürü gözden geçirilerek 22 mesane leiomyomunun özellikleri sunuldu. Literatürden farklı olarak, mevcut olgu mesane leiomyomunun büyüklüğü, üreteral komplikasyonları ve uzun takip süresi ile benzersizdir. Mesane leiomyomları, pelvik kitlenin ayırıcı tanısında göz önünde tutulması gereken, nadir görülen mesane tümörleridir. Tanı ve tedavi için en faydalı prosedür cerrahi eksizyondur.

**Anahtar Kelimeler:** Mesane leiomyomu, mesane tümörü, servikal leiomyom, servikal tümör, ayırıcı tanı

**Corresponding author/İletişim kurulacak yazar:** sebnem\_alanya@hotmail.com

**Submitted/Başvuru:** 04.10.2020 • **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 01.10.2020 •

**Last Revision Received/Son Revizyon:** 20.11.2020 • **Accepted/Kabul:** 12.12.2020 • **Published Online/Online Yayın:** 12.07.2021



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

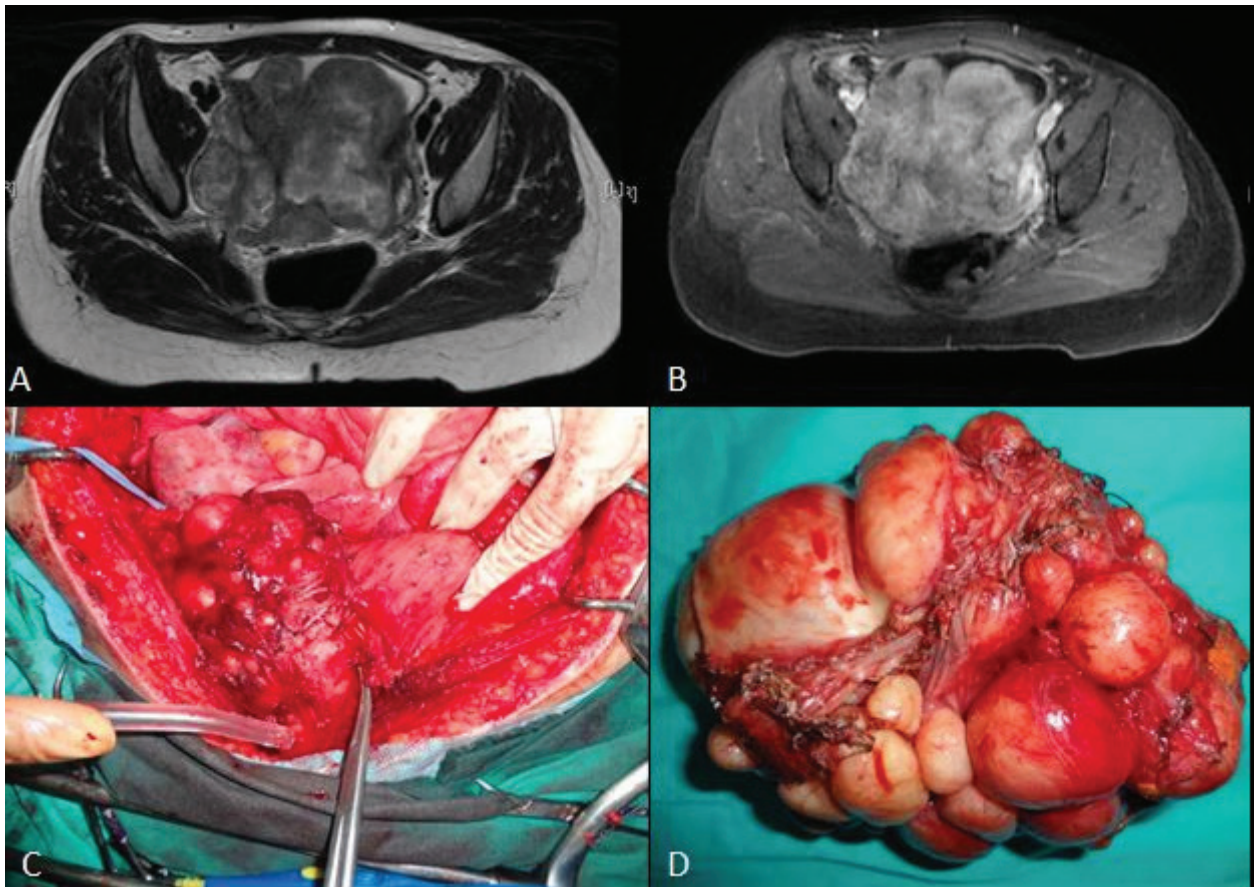
## INTRODUCTION

Bladder leiomyoma is a rarely seen mesenchymal neoplasm of the urinary bladder, and it is only estimated to occur in 0.43% of adults. Incidence of this condition is higher in female patients in their fifth decade (1). The etiology is uncertain; effects of hormones, inflammation, localized infection, and chromosomal abnormalities may play a role. The symptoms depend on the location and size of the tumor, which is categorized as endovesical, intramural or extravescical with frequencies of 63%, 7% and 30%, respectively (2). Voiding symptoms such as hematuria, dysuria and/or obstructive symptoms are generally seen in endovesical-type tumors, whereas bladder neck obstruction due to compression of the ureter may lead to upper urinary tract obstruction and hydronephrosis in extravescical-type tumors (3). Like uterine leiomyoma, radiologic differentiation of bladder leiomyoma from leiomyosarcoma is not clearly defined.

We present a rare case of a giant extra-vesical type bladder leiomyoma, leading to unilateral ureteral distension, which was misdiagnosed as a cervical leiomyoma. We also report the 8-year follow-up and review the related literature on the last five years between 2016 and 2021.

## CASE REPORT

A 23-year-old nulliparous woman was referred due to a pelvic mass with symptoms of dysuria and chronic pelvic pain. Her urologic and gynecologic histories were unremarkable. On gynecologic examination, the mass occupied the entire pelvis till 2 cm above the umbilicus, bulging the right vaginal wall and obliterating the vaginal lumen; the uterine cervix was unremarkable. Laboratory tests revealed normal tumor markers and urinalysis. Magnetic resonance imaging (MRI) showed a 15x10x10-cm mass of low signal intensity on T2-weighted images, which appeared adjacent to the right cervical wall, compressing the right ureter and the bladder (Figure 1A, 1B).



**Figure 1:** (A). Fat-suppressed T1-weighted sequence after intravenous gadolinium administration demonstrating a giant mass with heterogeneous contrast agent fixation that occupies the entire pelvis. (B). T2-weighted sequence showing a solid lesion with partially high signal areas and no clear border separation visible in the adjacent bladder. (C). The bladder leiomyoma reached the bladder mucosa and compressed the uterine cervix from the antero-lateral part. (D). The bladder leiomyoma was approximately 10x15 cm in size.

The signal intensity was similar to leiomyoma and leiomyosarcoma of the uterus on MRI. Based on the clinical and radiologic findings, the mass was estimated to be leiomyoma or leiomyosarcoma of the cervix.

Surgery was performed with a low midline incision; it was observed that the mass originated from the right side of the bladder wall and extended as far as the right parametrium (Figure 1C). Perioperatively, it was considered as 15.5x14.5x14 cm extravesical bladder leiomyoma that reached the bladder mucosa (Figure 1D). The distal part of the right ureter was passing through the mass. Pararectal, paravesical and Retzius spaces were developed. The distended right midureter was dissected and a full cut incision was performed to the bladder wall for total excision. The right distal ureter was excised and ureteroneocystostomy was performed. The bladder wall was repaired in two layers, the first consisting of mucosa using 3-0 vicryl, and the second consisting of detrusor and serosa using 2-0 vicryl sutures and a double-J catheter which was inserted through the lumen. The histopathologic investigation reported a bladder leiomyoma without cytologic atypia or necrosis. It stained positively for smooth muscle actin and vimentin, and estrogen and

progesterone receptors were positive. The postoperative period was uneventful and the patient was discharged on the 6<sup>th</sup> day after the operation without complications.

During follow-up, spontaneous pregnancy occurred two years later. During the 8-year postoperative follow-up, the patient had two healthy full-term pregnancies and delivered via an uncomplicated cesarean section. The indication for the first cesarean section was fetal macrosomia. During follow up no recurrence was observed.

## DISCUSSION

Bladder leiomyoma was first described by Virchow in 1931 and there are about 250 cases in the literature (4). As recent studies have shown promise in establishing best practices for evaluation and management, we reviewed the related studies on the last five years between 2016 and 2021. To review the features of bladder leiomyoma such as symptoms, diagnosis tools, treatment and prognosis, a literature search of PubMed and the Web of Science was conducted, which included 22 cases of bladder leiomyomas in 17 publications as shown in Table 1 (1, 3-18). The symptoms vary according to the location of the

**Table 1:** A review of case reports reported as bladder leiomyomas in histopathologic examinations between 2016 and 2021

Study	Age/sex	Symptom/history	Size	Location	Diagnosis tool	Initial diagnosis before surgery	Treatment	Follow-up
Xin et al. 2016	44/F	dyspareunia	7.3x6.1x5.8 cm	Trigone of urinary bladder	USG, CT	Soft tissue mass	Open surgical excision	8 months without recurrence
Haddad et al. 2016	37/M	Severe dysuria, urgency, frequency, fever and chills	5.5x4.3 cm	Right anterolateral wall of urinary bladder	USG, CT	Febrile urinary tract infection	TUR-B	1 year without recurrence
Mendes et al. 2017	22/F	Pelvic discomfort, dysuria, and dyspareunia	1.6x1.1x0.6 cm	Anterior bladder wall	USG, Cystoscopy and biopsy	Cystitis	TUR-B	N/A
Jamshaid et al. 2017	38/F	lower urinary tract symptoms (straining, intermittency, sense of incomplete bladder emptying and increased frequency of urination)	4.4x4.5 cm	Posterior inferior surface of the bladder near the bladder neck	CT, Cystoscopy	Polypoidal mass	TUR-B	After 6 months, urinary retention occurred. She underwent an open local excision as second operation. After 1 year follow up, no recurrence was observed.
Dodia et al. 2017	35/F	Hematuria, dysuria	3.3x4.3 cm	Right posterolateral bladder wall	USG, MRI, Cystoscopy and biopsy	N/A	Open transvesical enucleation	N/A
He et al. 2018	47/F	Dysuria	4 cm	Right posterior bladder wall	Pelvic CT	N/A	Open partial cystectomy	8 months without recurrence

**Table 1: Continued**

Sharma et al. 2018	65/M	Lower urinary tract symptoms	3.8×3.3×2.4 cm	Left posterolateral wall and left vesico-ureteral junction of the bladder	USG, Contrast-enhanced CT, FDG PET/CT	Favor of low-grade urinary bladder neoplasm	TUR-B	N/A
Yucel et al. 2018	44/M	Suprapubic pain and history of neurofibromatosis	1.8×2.2 cm	Inferior bladder wall	USG	N/A	TUR-B	After 3 months, grade 3 hydronephrosis on left side and 6×3.5 cm mesenchymal tumor from the left anterolateral wall of the bladder.
Pramod et al. 2020	42/F	Painless hematuria and irritative symptoms	7×6.5×4 cm	Posteroinferior wall of the bladder	USG, Doppler, CT, Cystoscopy	Soft tissue mass	Open transvesical excision of the bladder mass	N/A
Sodo et al. 2019	33/M	Pelvic pain, urgency, dysuria	6×5.8×4.7 cm	Upper side of the bladder located along the urachus	CT, MRI	Bladder tumor without distant metastasis	Laparoscopic partial cystectomy and urachus removal	9 months without recurrence
Mitchell et al. 2019	64 /M	Recurrence of bladder leiomyoma after TUR-B, History of testicular teratoma	6 cm	Postero-lateral wall of the bladder causing obstruction of the left ureterovesical junction. Severe hydronephrosis and hydro-ureter	CT	Metastasis of testicular teratoma	Open radical cystoprostatectomy	6 months without recurrence after radical surgery
Fridman et al. 2018	51/F	Heavy vaginal bleeding, pelvic pressure, bladder incontinence, dyspareunia	5.5 cm	Inferior of bladder & superior anterior wall of urethra	MRI	Paraurethral mass	Open paraurethral resection	N/A
Mavridis et al. 2020	28/M	Asymptomatic, History of solitary fibrous tumor of pleura	3.7 cm	Left bladder wall	CT	Metastasis of pleural tumor	Open retropubic resection	N/A
Tobias-Machado et al. 2020	25/M	Urinary frequency, urgency	3×2 cm	Postero-lateral bladder wall	USG, MRI	Bladder leiomyoma	Robot-assisted transvesical partial cystectomy & placement of right urethral stent	N/A
Li et al. 2019	50.2 (n=6) F (n=5) M (n=1)	Asymptomatic (n=3) Irritative (n=2) Hematuria (n=1)	Mean: 3.9 cm	Endo-vesical (n=3) Intramural (n=3)	USG, CT, Cystoscopy	Bladder tumor	Transurethral enucleation	Mean 14.8 months without recurrence
Zachoval et al. 2018	32/F	Asymptomatic pregnant woman	5 cm	Anterior wall of the bladder	USG, MRI	Bladder leiomyoma	Open resection	1 year without recurrence
Delara et al. 2021	33/F	Abdominal pain, urinary urgency, frequency, heavy menses	2.0×1.3×1.7 cm	The left posterior bladder wall adjacent to the left ureterovesical junction	MRI, cystourethroscopy	Bladder mass	TUR-B	N/A

TUR-B: Transurethral resection of the bladder; USG: Ultrasound; CT: Computed Tomography; MRI: Magnetic Resonance Imaging

tumor, and may even be asymptomatic (Table 1). The data analysis in Table 2 shows that computed tomography (CT) is mostly used for diagnosis and transurethral resection of the bladder (TUR-B) is the common treatment method for endovesical-type bladder leiomyomas. Additionally, the mean size is 4.16 (range, 1.8-6.7) cm (n=16), and the mean follow up period is 11.5 (range, 2-30) months (n=11) (Table 2). Here, we report a rare, giant, extravescical-type bladder leiomyoma. Our case is unique with its giant size (15.5x14.5x14 cm), its extension to the parametrium, which created confusion in diagnosis by mimicking a cervical tumor, and its ureter complications. Although recurrence had been reported in two cases previously, the present case showed no recurrence during cesarean sections.

**Table 2:** Analysis of case reports reported as bladder leiomyomas between 2016 and 2021

Mean age	42.81
Gender (n, %)	F: 14, 63.6% M:8, 36.4%
Mean size (cm)	4.04 cm (1.1 to 6.7 cm)
Diagnostic tool	CT (n=15, 68.2%), USG (n=15, 68.2%); MRI (n=6, 30%); Cystoscopy (n=11, 5%); Doppler USG (n=1, 4.6 %); PET-CT (n=1, 4.6%)
Treatment	Open abdominal resection (n=7, 31.8%); TUR-B (n=13, 59.1%); Robotic surgery (n=1, 4.6%); Laparoscopic surgery (n=1, 4.6%)
Mean follow up period (months)	11.5 months (2 to 30 months) (n=14) N/A (n=8) In three of them, recurrence was reported.

Differential diagnosis between cervical pathologies and extravescical bladder tumor is difficult, even with an examination and radiologic investigation. Also, benign conditions such as lipomas, hamartomas or nephrogenic adenoma and malignant conditions such as urothelial carcinoma, adenocarcinoma or metastatic cancer of the urinary tract should be considered. Ultrasound is the first tool for suspected bladder leiomyoma due to the characteristic image of the mass protruding into the bladder cavity, especially in endovesical-type tumors (3). A smooth, homogenous, and hypoechoic mass in the bladder wall is observed in an ultrasound. Blood flow of the mass can be evaluated using Doppler flow to assess the possibility of malignancy (6). CT is a good option to show hypoattenuating mass, to detect the location and relation of mass with surrounding structures, and to identify cystic and solid components. Contrast-enhanced CT images improve the differential diagnosis (5). MRI is superior to CT in distinguishing the mesenchymal component of leiomyomas and preservation of the muscle layer (19). On MRI, blad-

der leiomyoma is similar to uterine leiomyoma imaging features, which visualize at intermediate signal intensity on T1-weighted images and low signal on T2-weighted images. Multiphase dynamic MRI studies with gadolinium can demonstrate the enhancement pattern of the solid component. Cystoscopy can be used to take a biopsy and successfully diagnose endovesical bladder leiomyoma and other types that have intravesical protrusion (3). Ultrasound and cystoscopy are sufficient tools for diagnosing intravesical bladder leiomyoma, whereas MRI is generally used for extravescical-type tumors. Pathologic evaluation is the golden standard for diagnosis (3).

Since we could not completely exclude malignancy histopathologically, we chose laparotomic surgical excision to prevent possible spread and seeding of tumors. For endovesical-type bladder leiomyomas, transurethral resection is one of the primary options (3). Minimally invasive surgery, such as laparoscopic or robotic myomectomy, are suitable options for extravescical and intramural-type tumors (13). However, surgeons must keep in mind morcellator restrictions and patients should be informed about the risk of intraperitoneal myometrial cell spread (20). Injury of the ureter and bladder, and severe hemorrhage of pelvic organs can be seen as complications.

Histopathologic diagnosis is needed to rule out malignancy. Microscopically, bladder leiomyoma consists of smooth muscle cells with eosinophilic cytoplasm and cigar-shaped nuclei. The feature that distinguishes uterus and bladder leiomyoma from leiomyosarcoma is the absence of mitotic activity, cytologic atypia or necrosis (21). Immunohistochemically, bladder leiomyoma stains diffusely with smooth muscle actin, desmin, and vimentin, but not with cytokeratin and S100 protein (2).

## CONCLUSION

We present a unique case of giant sized extravescical bladder leiomyoma with ureteral complications, and a long follow-up period. Despite the best clinical examination and radiologic imaging, it may be difficult to distinguish extravescical bladder leiomyoma. Although bladder leiomyomas are rarely seen tumors, surgeons should keep them in mind during the differential diagnosis of a pelvic mass. Appropriate surgery should be performed for the diagnosis and treatment.

**Informed Consent:** Written consent was obtained from the participants.

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

**Author Contributions:** Data Acquisition- S.A.T., H.S., T.T., A.C.İ., Y.S.; Drafting Manuscript- S.A.T., H.S.; Critical Revision of Manuscript- T.T., A.C.İ., Y.S.; Final Approval and Accountability- S.A.T., H.S., T.T., A.C.İ., Y.S.

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

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

**Acknowledgement:** We would like to thank David F. Chapman, BSc, for editing the article.

**Bilgilendirilmiş Onam:** Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Veri Toplama- S.A.T., H.S., T.T., A.C.İ., Y.S.; Yazı Taslağı- S.A.T., H.S.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- T.T., A.C.İ., Y.S.; Son Onay ve Sorumluluk- S.A.T., H.S., T.T., A.C.İ., Y.S.

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

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

**Teşekkür:** Makalenin İngilizce düzeltmelerine yardımcı olan Sayın David Chapman'a teşekkür ederiz.

## REFERENCES

1. He L, Li S, Zheng C, Wang C. Rare symptomatic bladder leiomyoma: case report and literature review. *J Int Med Res* 2018;46(4):1678-84. [\[CrossRef\]](#)
2. Park JW, Jeong BC, Seo SI, Jeon SS, Kwon GY, Lee HM. Leiomyoma of the urinary bladder: a series of nine cases and review of the literature. *Urology* 2010;76(6):1425-9. [\[CrossRef\]](#)
3. Li A, Zhang P, Zhang M, Yang T, Yue Y, Chen G, et al. Transurethral Enucleation of Bladder Leiomyoma: A Series of Six Cases and Review of the Literature. *Urol Int* 2019;102(1):102-8. [\[CrossRef\]](#)
4. Xin J, Lai HP, Lin SK, Zhang QQ, Shao CX, Jin L, et al. Bladder leiomyoma presenting as dyspareunia: Case report and literature review. *Medicine (Baltimore)* 2016;95(28):e3971. [\[CrossRef\]](#)
5. Sharma A, Vadi SK, Sood A, Kumar S, Mete UK, Parkhi M, et al. Bladder Leiomyoma: A Rare Differential and a Potential Pitfall in the Evaluation for a Bladder Mass in (18) F-Fluorodeoxyglucose-Positron Emission Tomography/Computed Tomography. *Indian J Nucl Med* 2018;33(3):264-5.
6. Pramod SV, Safriadi F, Hernowo BS, Dwiyanana RF, Ksatriapraja RA. A large bladder leiomyoma. *Urol Case Rep* 2020;32:101211. [\[CrossRef\]](#)
7. Mitchell K, Barnard J, Luchey A. Locally Recurrent Leiomyoma of the Bladder Refractory to Visually Complete Transurethral Resection: An Indication for Cystoprostatectomy. *Case Rep Urol* 2019;2019:1086575. [\[CrossRef\]](#)
8. Fridman D, Abeshouse M, Sankin A. Paraurethral Leiomyoma as an Incidental Finding in Patient with Fibroid Uterus. *Case Rep Obstet Gynecol* 2018;2018:7042960. [\[CrossRef\]](#)
9. Yucel C, Budak S, Kisa E, Celik O, Kozacioglu Z. The Rare Togetherness of Bladder Leiomyoma and Neurofibromatosis. *Case Rep Urol* 2018;2018:2302918. [\[CrossRef\]](#)
10. Sodo M, Spirito L, La Rocca R, Bracale U, Imbimbo C. Partial cystectomy in young male for a urachal tumor masquerading a bladder leiomyoma. *Arch Ital Urol Androl* 2019;91(1):51-2. [\[CrossRef\]](#)
11. Zachoval R, Dukatova K, Svabik K. Vaginal ultrasound for imaging of a urinary bladder mass and treatment of a large leiomyoma of the urinary bladder in pregnancy. *Int Urogynecol J* 2018;29(4):601-2. [\[CrossRef\]](#)
12. Mavridis C, Georgiadis G, Lagoudaki ED, Skamagkas I, Heretis I, Koutsopoulos AV, et al. Bladder Leiomyoma with Synchronous Solitary Fibrous Tumor of the Pleura. *Case Rep Urol* 2020;2020:3717506. [\[CrossRef\]](#)
13. Tobias-Machado M, Pazeto CL, Borges RC. Robot-assisted transvesical partial cystectomy for leiomyoma of bladder trigone. *Int Braz J Urol* 2020;46(2):300.
14. Delara R, Wasson M, Khan A. Bladder Leiomyoma. *J Minim Invasive Gynecol.* 2021 Jan 4: S1553-4650(21)00002-9. [\[CrossRef\]](#)
15. Mendes JE, Ferreira AV, Coelho SA, Gil C. Bladder leiomyoma. *Urol Ann* 2017;9(3):275-7. [\[CrossRef\]](#)
16. Dodia B, Mahajan A, Amlani D, Bathe S. Leiomyoma of Urinary Bladder in Middle-Aged Female. *J Obstet Gynaecol India* 2017;67(2):147-9. [\[CrossRef\]](#)
17. Jamshaid A, Arshad Z, Zaidi SZ. Leiomyoma of the urinary bladder. *J Pac Med Assoc* 2017;67(9):1447-9.
18. Haddad RG, Murshidi MM, Abu Shahin N, Murshidi MM. Leiomyoma of Urinary Bladder Presenting with Febrile Urinary Tract Infection: A Case Report. *Int J Surg Case Rep* 2016;27:180-2. [\[CrossRef\]](#)
19. Sun S, Bonaffini PA, Nougaret S, Fournier L, Dohan A, Chong J, et al. How to differentiate uterine leiomyosarcoma from leiomyoma with imaging. *Diagn Interv Imaging* 2019;100(10):619-34. [\[CrossRef\]](#)
20. Glaser LM, Friedman J, Tsai S, Chaudhari A, Milad M. Laparoscopic myomectomy and morcellation: A review of techniques, outcomes, and practice guidelines. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2018;46:99-112. [\[CrossRef\]](#)
21. Barlotta R, Edwards DC, McGreen B, Levy J, Xia G, Brennan M, et al. Incidental Asymptomatic Leiomyoma of the Urinary Bladder. *Urology* 2018;113:6-9. [\[CrossRef\]](#)

# HIPO VE HIPERGLİSEMİNİN NADİR BİR NEDENİ; GLİKOJEN DEPO HASTALIĞI TİP 0: OLGU SUNUMU

## A RARE CAUSE OF BOTH HYPO AND HYPERGLYCEMIA; GLYCOGEN STORAGE DISEASE TYPE 0: A CASE REPORT

Meryem KARACA<sup>1</sup> , Halil ASLAN<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Beslenme ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup>Harran Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye

**ORCID IDs of the authors:** M.K. 0000-0002-0662-7344; H.A. 0000-0001-8111-121X

**Cite this article as:** Karaca M, Aslan H. a rare cause of both hypo and hyperglycemia; glycogen storage disease type 0: a case report. J Ist Faculty Med 2021;84(3):454-6. doi: 10.26650/IUITFD.2020.0040

### ÖZET

Glikojen depo hastalığı tip 0A; hepatic glikojen sentaz enzim eksikliği sonucu ortaya çıkan otozomal resesif kalıtılan nadir bir hastalıktır. Glikojen depo tip 0A hastalığı hepatomegali olmaksızın açlık ketotik hipoglisemisi, postprandiyal hiperglisemi ve laktik asidemi ile karakterizedir. Klinik pratikte hastalar asemptomatik olabileceği gibi hipoglisemik konvülsiyon, boy kısalığı, büyüme geriliği, osteopeni ve seyrek olarak hiperglisemi semptomları ile başvurabilirler. Bu yazıda daha önce hipoglisemi semptomları olan ve başvuru anında hiperglisemi semptomları bulunan postprandiyal laktik asidemi bulguları ile genetik olarak glikojen depo hastalığı tip 0A tanısı konan 6 yaşında kız hasta sunuldu.

**Anahtar Kelimeler:** Glikojen depo hastalığı tip 0A, ketotik hipoglisemi, hiperglisemi, laktik asidemi

### ABSTRACT

Glycogen-storage disease type 0A is a rare autosomal recessively inherited disease resulting from a hepatic glycogen synthase enzyme deficiency. Glycogen-storage disease type 0A is characterized by fasting ketotic hypoglycaemia, postprandial hyperglycemia and lactic acidemia without hepatomegaly. In clinical practice, patients may be asymptomatic, or may present with hypoglycemic convulsions, short stature, growth retardation, osteopenia, and rarely symptoms of hyperglycemia. In this article, we present a 6-year-old girl with previous symptoms of hypoglycaemia, and symptoms of hyperglycemia at the time of admission and genetically diagnosed as glycogen storage disease type 0A.

**Keywords:** Glycogen storage disease type 0A, ketotic hypoglycaemia, hyperglycaemia, lactic acidemia

### GİRİŞ

Glukoz vücudumuzda en çok karaciğerde olmak üzere kas ve bazı organlarda açlık döneminde kullanılmak üzere 'glikojen' şeklinde depolanır. Glikojen depo hastalıkları (GDH) glikojenin yapımı ya da yıkımındaki problemler sonucu ortaya çıkan doğumsal metabolik hastalıklardır. Glikojen depo hastalıkları en çok karaciğer, iskelet kası ve kalbi etkiler. Glikojen depo hastalığı tip 0A (GDH0A), karaciğere spesifik glikojen sentaz (GS) enzim eksikliği sonucu görülen; hepatomegali olmaksızın hipoglisemi ile seyreden GDH'dir. Glikojen depo hastalığı tip 0A 12p12.1'de lokalize GYS2 genindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkar (1).

Genellikle gece beslenmesinin kesildiği geç infantil dönemde ya da daha büyük çocukluk yaş grubunda oral alımın bozulduğu enfeksiyon dönemlerinde hipoglisemi semptomatik hale gelebilir. Kan şekeri 25-40 mg/dl'ye kadar düşebilmesine rağmen irritabilite, letarji, nöbet gibi semptomlar; serbest yağ asitlerinden oluşan ketonların beyne alternatif enerji sağlaması nedeni ile çok nadir görülür (2,3).

Açlıkta ketotik hipoglisemiye neden olurken, tokluk döneminde karbonhidratların glikojene dönüştürülemeyip glikolize katılması ile tokluk hiperglisemisi ve tokluk laktik

**Corresponding author/İletişim kurulacak yazar:** drhaslan1@gmail.com

**Submitted/Başvuru:** 10.04.2020 • **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 09.05.2020 •

**Last Revision Received/Son Revizyon:** 12.05.2020 • **Accepted/Kabul:** 20.05.2020 • **Published Online/Online Yayın:** 04.06.2021



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

asidemisi meydana gelir (4). Açlık ketonüri ve tokluk hiperglisemisi olması nedeni ile diyabetes mellitusun erken dönemi ile karıştırılabilir. Öyküsünde hipoglisemik nöbet ve hiperglisemileri olan GDH0A vakası nadir olması nedeni ile sunuldu.

## OLGU SUNUMU

Daha önce benzer şikâyeti olmayan 6 yaşındaki hastanın ilk defa 1,5 yaşında sabah uyandığında nöbet gözlenmesi üzerine bakılan kan şekeri 22 mg/dl olarak saptanmış. Daha sonraki dönemde nöbeti tekrarlamayan hastanın üç yaşından sonra kan şekeri düşüklüğü sıklaşmış ve aynı zamanda gece terleme, avuç içlerinde yanma şikâyeti olmuş ve bu şikâyetleri esnasında bakılan kan şekeri yüksek saptanmış (240 mg/dl). Altı yaşında iken kan şekeri düşüklüğü ve boy kısalığı nedeni ile başvuran hastanın anne ve babası arasında 1. derece kuzen evliliği mevcuttu. Annenin 3. gebeliğinde 3. yaşayan çocuk olarak 36. haftada 2800 gram sezaryen ile doğmuş. Postnatal dönemde ilk iki ay sadece anne sütü aldığı, sonrasında ek gıdaya geçildiği öğrenildi. Nöromotor gelişimi yaşına uygun olarak değerlendirildi.

Hastanın fizik muayenesinde vücut ağırlığı: 16,6 kg (<3p), boy:104 cm (<3p) genel görünümü iyi, bilinci açık, oryante ve koopere idi. Solunum sistemi ve kardiyovasküler sistem muayenesi normaldi, hepatosplenomegali yoktu.

Daha önceden hipoglisemi anında yapılan tetkikler;

Glukoz: 53 mg/dl, Adrenokortikotropik hormon (ACTH): 16,3 pg/ml (0-46), Kortizol: 19,3 µg/dl (4,6-22,8), İnsülin <1,05 mU/L (2,4-23,3), C-peptid: 0,263 ng/ml (0,9-7,1), idrar keton 1 pozitif, İdrar dansitesi: 1023 olarak raporlanmıştı.

Hipoglisemi anında bakılan ACTH, kortizol, insülin, c-peptid ve Hba1c değerleri normal iken metabolik hastalık ayırıcı tanısı için yapılan Tandem MS (kütle spektrometre) ile açlık karbamin ve aminoasit profili ile idrar organik asit analizinde spesifik bulgu saptanmadı. Batın ultrasonografi ve ekokardiyografi normal olarak değerlendirildi.

Hepatomegali olmaksızın ketotik hipoglisemi ve hiperglisemi ile birlikte boy kısalığı olan hastanın postprandial laktat ve glukoz yanıtı değerlendirildi (Tablo 1). Postprandial dönemde laktat düzeyi 3,5 kat artan hastada glikojen depo hastalığı tip 0A düşünüldü.

Sık öğünler ile birlikte çığ mısırs nişastası ve proteinden zengin beslenme tedavisi düzenlendi. Genetik analizinde GYS2 geninde literatürde daha önce bildirilen c.736C>T/c.1645G>A iki heterozigot mutasyon saptandı. Aile çalışmasında annede GYS2 geninde c.736C>T heterozigot mutasyonu, babada ise GYS2 geninde c.1645G>A heterozigot mutasyonunun varlığının gösterilmesi ile hastanın GDH0A tanısı kesinleştirildi. Beslenme tedavisi ile sabah hipoglisemileri düzelmekle birlikte, avuç içlerindeki yanma şikâyeti geriledi. On sekiz aylık

izleminde boy 114 cm (3-10p) olduğu ve kısalığın düzelenerek persentilinin arttığı gözlemlendi.

## TARTIŞMA

Glikojen depo hastalığı tip 0A ilk defa 1963 yılında tanımlanmıştır.

**Tablo 1:** Hastaya ait laboratuvar değerleri

	Hastanın değerleri	Referans değerler
Açlık plazma glukozu, mg/dL	49	70-105
Tokluk, mg/dL	136	70-105
Açlık laktat düzeyi, mg/dL	21	4,5-19,8
Tokluk laktat düzeyi, mg/dL	73,4	4,5-19,8
AST, U/L	45	5-34
ALT, U/L	18	0-55
Total kolesterol, mg/dL	202	112-200
Trigliserid, mg/dL	99	30-200
Albumin, g/dL	3,9	3,5-5
İdrar keton	Pozitif	
Hemoglobin, g/dL	12,1	11,5-13,5
WBC, x10 <sup>3</sup> /µL	9,9	5-14,5
Platelet, x10 <sup>3</sup> /µL	553	250-350
Alanin, µm/L	473	158-420

olan, karaciğerde GS enzim eksikliğine bağlı ortaya çıkan otozomal resesif kalıtılan bir hastalıktır (5).

Glikojen sentaz, karaciğerde glikojenin düz zincirinin devamını sağlayan α-1,4 bağlarını yapmaktan sorumludur. Glikojen depo hastalığı tip 0A'da glukozun glikojene dönüşmemesi ile tokluk hiperglisemisi ve reaksiyonun glikolitik yolağa kayması ile laktik asidemi ve hiperlipidemi görülür. Ayrıca glikojen depolarının yetersiz olması nedeniyle açlıkta ortaya çıkan hipoglisemi ve yağ asitlerinin yıkılmasından dolayı ortaya çıkan ketonemi diğer önemli bulgulardır. Diğer glikojen depo hastalıklarının aksine GDH0A'da glikojen oluşturulmadığı için hepatomegali görülmez. Hastalarda glukoneogenezin sağlam olması ve yağ asitlerinin oksidasyonu ile ortaya çıkan keton cisimleri sayesinde derin ve semptomatik hipoglisemilerin oluşmasının azaltıldığı düşünülmektedir (4).

Bununla birlikte uzamış açlıkta keton cisimlerinin ve serbest yağ asitlerinin artması çizgili kaslardan alanin salınımını



azaltarak glukoneogenez öncüllerini azaltıp hipoglisemiye daha da ağırlaşabilmektedir (6,7). Dolayısıyla hastalar uzamış açlığın önlenmesi için sık beslenmeye özellikle gece yatmadan beslenmeye meyillidirler. Literatürde böyle vakalar bildirilmiş olmasına rağmen hastamızın öyküsünde bu bulguya rastlanmamıştır (8).

Hastalık bazen bulantı, kusma, solukluk ve bazen de sabah ortaya çıkan konvülsiyonların eşlik ettiği semptomatik hipoglisemi ile kendini gösterebildiği gibi asemptomatik olarak da seyredebilir. Bazı hastalarda gelişme geriliği görülmesine karşın çoğu hasta normal nöromotor gelişim göstermektedir (9). Hastamızda da büyüme gelişme geriliği mevcut olup öyküsünde birkaç defa sabah ortaya çıkan konvülsiyonu mevcuttu.

Tedavi edilmemiş hastalarda uzun dönemde boy kısalığı ve osteopeni yaygın olarak görülen komplikasyonlardır. Ancak diğer glikojen depo hastalıklarında ortaya çıkan siroz, hepatik adenom, böbrek yetmezliği gibi uzun dönem komplikasyonlar GDH0A'da bildirilmemiştir (5). Hipoglisemi GDH0A'nın karakteristik özelliği olmasına rağmen literatürde hiperglisemi ve glukozüri ile genetik tanısı konan olgular da bildirilmiştir (3). Olgumuzda da hem hipoglisemi semptomları hem de avuç içlerinde terleme gibi hiperglisemi semptomları mevcuttu.

Hastalığın semptomları sık beslenme, proteinden zengin diyet ve gece tüketilen pişirilmemiş nişasta ile kontrol altına alınabilmektedir (10). Literatürle uyumlu olarak olgumuzda açlık hipoglisemisi ve tokluk hiperglisemisi mevcuttu. Beslenme tedavisi ile boy kısalığı dahil semptomları gerilemişti.

Sonuç olarak oldukça nadir görülen bu hastalığın tanısı şüphe ile konmaktadır. Açlık hipoglisemisi ve keton pozitifliği, tokluk laktik asidozu, postprandiyal uzamış hiperglisemi ve hepatomegalinin olmaması akla GDH0A'yı getirmeli ve genetik konsültasyon istenmelidir.

**Bilgilendirilmiş Onam:** Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

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

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

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

**Informed Consent:** Written consent was obtained from the participants.

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

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

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

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

## KAYNAKLAR/REFERENCES

1. Orho M, Bosshard NU, Buist NR, Gitzelmann R, Aynsley-Green A, Blümel P, et al. Mutations in the liver glycogen synthase gene in children with hypoglycemia due to glycogen storage disease type 0. *J Clin Invest* 1998;102(3):507-15. [CrossRef]
2. Hasselbalch SG, Knudsen GM, Jakobsen J, Hageman LP, Holm S, Paulson OB. Blood- brain barrier permeability of glucose and ketone bodies during short-term starvation in human. *Am J Physiol* 1995;268: E1161-6. [CrossRef]
3. Bachrach BE, Weinstein DA, Orho-Melander M, Burgess A, Wolfsdorf JI. Glycogen synthase deficiency (glycogen storage disease type 0) presenting with hyperglycemia and glucosuria: report of three new mutations. *J Pediatr* 2002;140:781-3. [CrossRef]
4. Weinstein DA, Correia CE, Saunders AC, Wolfsdorf JI. Hepatic glycogen synthase deficiency: an infrequently recognized cause of ketotic hypoglycemia. *Mol Genet Metab* 2006;87:284-8. [CrossRef]
5. Lewis GM, Spencer-Peet J, Stewart KM. Infantile hypoglycaemia due to inherited deficiency of glycogen synthetase in liver. *Arch Dis Child* 1963;38:40-8. [CrossRef]
6. Sherwin RS, Hendler RG, Felig P. Effect of ketone infusions on amino acid and nitrogen metabolism in man. *J Clin Invest* 1975;55(6):1382-90. [CrossRef]
7. Féry F, Plat L, Melot C, Balasse EO. Role of fat-derived substrates in the regulation of gluconeogenesis during fasting. *Am J Physiol* 1996;270(5 Pt 1):E822-30. [CrossRef]
8. Kirel B, Ulualan G, Hazer İ, Eren M. Hipogliseminin Nadir Bir Nedeni: Glikojen Depo Hastalığı Tip 0. *Turkiye Klinikleri J Pediatr*. 2019;28(1):43-6. [CrossRef]
9. Laberge AM, Mitchell GA, van de Werve G, Lambert M. Long-term follow-up of a new case of liver glycogen synthase deficiency. *Am J Med Genet* 2003;120A(1):19-22. [CrossRef]
10. Ozen H. Glycogen storage diseases. *World J Gastroenterol* 2007;13:2541-53. [CrossRef]