

# Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi

## Medical Journal of Süleyman Demirel University Faculty of Medicine

### SDÜ Tıp Fak Derg / Med J SDU

Yılda dört sayı (Mart, Haziran, Eylül, Aralık) yayınlanan 'peer review' yöntemiyle çalışan hakemli dergidir.  
Bu dergi DOAJ, EBSCO, Index Copernicus, Tr-Dizin tarafından indekslenmektedir.  
This journal is indexed by DOAJ, EBSCO, Index Copernicus, Tr-Dizin.

#### Sahibi / Owner

Süleyman Demirel Üniversitesi Adına  
On Behalf of Suleyman Demirel University  
Prof. Dr. Alim KOŞAR  
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanı  
Suleyman Demirel University Dean of Faculty of Medicine

#### Editör / Editor

Prof. Dr. Alim KOŞAR (Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, TÜRKİYE)

#### Yardımcı Editörler / Associate Editors

Prof. Dr. Rasih YAZKAN (Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, TÜRKİYE)  
Doç. Dr. Kanat GÜLLE (Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, TÜRKİYE)  
Doç. Dr. Sabriye ERCAN (Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, TÜRKİYE)  
Doç. Dr. Emine Elif ÖZKAN (Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, TÜRKİYE)  
Dr. Öğr. Üyesi Giray KOLCU (Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, TÜRKİYE)  
Dr. Öğr. Üyesi Mukadder İnci BAŞER KOLCU (Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, TÜRKİYE)  
Dr. Öğr. Üyesi Fuat İNCE (Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, TÜRKİYE)  
Dr. Öğr. Üyesi Vehbi Atahan TOĞAY (Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, TÜRKİYE)

#### Bölüm Editörleri / Editorial Board

Prof. Dr. Evrim ERDEMOĞLU (Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, TÜRKİYE)  
Prof. Dr. Pakize KIRDEMİR (Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, TÜRKİYE)  
Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU (Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, TÜRKİYE)  
Prof. Dr. Mekin SEZİK (Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, TÜRKİYE)  
Prof. Dr. Taylan OKSAY (Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, TÜRKİYE)  
Prof. Dr. İbrahim Metin ÇİRİŞ (Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, TÜRKİYE)  
Prof. Dr. Hasan YASAN (Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, TÜRKİYE)  
Prof. Dr. Levent DUMAN (Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, TÜRKİYE)  
Prof. Dr. Nilgün GÜRBÜZ (Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, TÜRKİYE)  
Doç. Dr. Hakan KORKMAZ (Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, TÜRKİYE)  
Doç. Dr. Selma KORKMAZ (Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, TÜRKİYE)  
Doç. Dr. Mehtap SAVRAN (Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, TÜRKİYE)  
Doç. Dr. Zafer SABUNCUOĞLU (Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, TÜRKİYE)  
Doç. Dr. Yonca SÖNMEZ (Akdeniz Üniversitesi, Antalya, TÜRKİYE)  
Doç. Dr. A. Meriç ÜNAL (Özel Meddem Hastanesi, Isparta, TÜRKİYE)  
Dr. Öğr. Üyesi Tuba BAYKAL (Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, TÜRKİYE)

#### Yazım ve Dil Editörü / Language Editor

Dr. Öğr. Üyesi Giray KOLCU (Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, TÜRKİYE)

#### İstatistik Editörü / Statistics Editor

Dr Öğr. Üyesi Adnan KARABRAHİMOĞLU (Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, TÜRKİYE)

#### Grafik Tasarım / Graphic Design

Öğr. Gör. Serdağ DAĞLI (Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, TÜRKİYE)

#### Sekretarya / Editorial Office

Dr. Öğr. Üyesi Vehbi Atahan TOĞAY (Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta, TÜRKİYE)

#### Başvuru Adresi / Application Address

SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi Sekreterliği

#### Baskı / Press

SDÜ Basımevi / ISPARTA

SDÜ Tıp Fakültesi Dekanlığı / 32260 ISPARTA  
Tel: 0 246 2113714 - 2113230 - Faks: 0 246 2371165  
sdu.tip.dergi@sdu.edu.tr - http://dergipark.gov.tr/sdutdf





## **Uluslararası Danışma Kurulu / International Scientific Advisory Board** (Alfabetik sıra ile / In alphabetical order)

---

Prof. Dr. Arjan KORTHOLT (University of Groningen, Groningen, HOLLANDA)

Prof. Dr. Dariusz PATKOWSKI (Uniwersytecki Szpital Kliniczny, Wrocław, POLONYA)

Dr. Edin KABIL (University of Sarajevo, Sarajevo, BOSNA HERSEK)

Prof. Dr. Emin ERGEN (Haliç Üniversitesi, İstanbul, TÜRKİYE)

Prof. Dr. Figen SEVGİCAN PEDERSEN (Estetika Tannklinikk, Bergen, NORVEÇ)

Prof. Dr. Füsün OZER (University of Pennsylvania, Philadelphia, ABD)

Doç. Dr. Işıl ARAS (Jacksonville University, Jacksonville, ABD)

Dr. Lavorgna LUCA (Giorgio Leo Servidio, Rome, İTALYA)

Dr. Sherief ELZAHAR (Future University, Cairo, MISİR)

---



# Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi Yazım Kuralları

## Hakkında

SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi (SDÜ Tıp Fak Derg) Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi'nin yayın organıdır. Dergi; yılda dört sayı olarak Mart, Haziran, Eylül ve Aralık aylarında yayınlanır. Bağımsız, tarafsız ve çift-kör değerlendirme ilkelerine sahip uluslararası, bilimsel, açık erişimli (Open Access), çevrimiçi/basılı bir dergidir.

SDÜ Tıp Fakültesi Dergisinde; sağlık bilimleri alanındaki özgün klinik ve deneysel araştırmalar, derlemeler, vaka takdimleri, editöre mektuplar, dergimizde yayınlanan yazılarla ilgili görüşler ve tecrübeleri içeren yazılar yayınlanabilir. Derginin dili Türkçe ve İngilizcedir.

**SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi uluslararası (DOAJ, EBSCO, Index Copernicus) ve ulusal (TR Dizin) hakemli dergi statüsündedir.**

SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi'ne gönderilen ve dergide yayınlanan makalelerden hiçbir ücret talep edilmemektedir. Dergide yayınlanan makaleler için yazarlara veya üçüncü kişilere telif ücreti ödenmemektedir. Yazarların kimlik bilgileri ve e-posta adresleri hiçbir şekilde başka amaçlar için kullanılmamaktadır.

Derginin yayın ve editöryal süreçleri Uluslararası Tıp Dergileri Editörler Kurulu (ICMJE) yönergesine göre yürütülmektedir. Dergi, bilimsel süreli yayınların şeffaflık ve mükemmellik ilkelerine uyar ([doaj.org/bestpractice](http://doaj.org/bestpractice)).

Bir yazının yayın için kabul edilmesinde en önemli kriterler özgünlük, yüksek bilimsel kalite ve alıntı potansiyelinin varlığıdır. Dergide yayınlanmak üzere gönderilen yazılar, daha önce başka bir yerde yayınlanmamış ve yayınlanmak üzere gönderilmemiş olmalıdır. Bir kongrede tebliğ edilmiş ve özeti yayınlanmış çalışmalar organizasyonun adı, yeri ve tarihi belirtilmek şartı ile kabul edilebilir.

## Etik İlkeler

Deneysel, klinik ve ilaç çalışmaları ile bazı vaka raporlarının araştırma protokollerinin Etik Kurullar tarafından uluslararası sözleşmelere uygun olarak onaylanması (Ekim 2013'te güncellenen Dünya Tıp Birliği Deklarasyonu "İnsan Denekleri ile İlgili Tıbbi Araştırmalar için Etik İlkeler"ine göre, [www.wma.net](http://www.wma.net)) gereklidir. İlgili etik kurul raporu veya bu rapora eşdeğer olan resmi bir yazı dergipark sistemine yüklenmelidir.

**• Üzerinde deneysel çalışma yapılan gönüllü kişilere ve hastalara uygulanan prosedürler ve sonuçları anlatıldıktan sonra onaylarının alındığını ifade eden bir açıklama (bilgilendirilmiş onam) yazının içinde bulunmalıdır.**

**• Bilgilendirilmiş onam ve etik kurul onayı (etik kurulun adı, etik kurul toplantı tarihi ve onay numarası ile ilgili bilgiler) makalenin Gereç ve Yöntem bölümünde ve makalenin en sonunda kaynaklardan önce ayrı alt başlıklar ile belirtilmelidir.**

**• Hastaların gizliliğini korumak, yazarların sorumluluğundadır. Hasta kimliğini ortaya çıkarabilecek fotoğraflar için, hasta ve/veya yasal temsilcileri tarafından imzalanan onayların alınması ve yazılı onay alındığının metin içerisinde belirtilmesi gereklidir.**

**• Hayvanlar üzerinde yapılan araştırmalarda acı ve rahatsızlık verilmemesi için yapılan uygulamalar ve alınan tedbirler açık olarak belirtilmelidir. İlgili etik kurullardan alınan onaylar makalenin Gereç ve Yöntem bölümünde ve makalenin en sonunda kaynaklardan önce ayrı alt başlıklar ile belirtilmelidir.**

Dergimize gönderilen tüm yazılar intihal tespit etme programı (iThenticate) ile değerlendirilmektedir. **Benzerlik oranının %25 ve altı olması gerekmektedir.**

Derginin Yayın Kurulu, tüm itirazları Yayın Etik Komitesi (COPE) kuralları çerçevesinde ele alır. Bu gibi durumlarda, yazarlar temyiz

ve şikayetleri ile ilgili olarak yayın kuruluyla doğrudan iletişime geçmelidir. Gerekliğinde, dahili olarak çözülemeyen sorunları çözmek için bir ombudsman atanabilir. Baş Editör, tüm temyiz ve şikayetler için karar verme sürecindeki nihai otoritedir.

Yazarlar, SDÜ Tıp Fakültesi Dergisine bir makale gönderirken makalelerinin telif hakkını dergiye vermeyi kabul etmiş sayılır. Eğer yazarın çalışmasının basılması reddedilirse, yazının telif hakkı yazarlara geri verilmiş sayılır.

SDÜ Tıp Fakültesi Dergisine gönderilen her makale, adı geçen yazarların tümünün imzaladığı yayın hakları devir formu (erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/download/journal-file/22117>) ile birlikte dergi şablonuna (erişim adresi: <https://dergipark.org.tr/tr/download/journal-file/24521>) uygun olarak gönderilmelidir. Gönderilmesi gereken zorunlu belgelere <https://dergipark.org.tr/tr/pub/sduftd> adresinden ulaşılabilir.

Şekiller, tablolar veya hem basılı hem de elektronik formatlardaki diğer materyaller de dahil olmak üzere başka kaynaklardan alınan içeriği kullanan yazarların telif hakkı sahibinden izin almaları gerekir. Bu husustaki hukuki, mali ve cezai sorumluluk yazarlara aittir. SDÜ Tıp Fakültesi Dergisinde yayınlanan yazılarda belirtilen ifadeler veya görüşler yazarlara aittir. Editörler, editörler kurulu ve yayıncı, bu yazılar için herhangi bir sorumluluk kabul etmemektedir. Yayınlanan içerikle ilgili nihai sorumluluk yazarlara aittir. Ön kontrol aşamasında düzeltme istenen makaleler için 15 gün, değerlendirme sonrası düzeltme istenen makaleler için 30 gün süre verilir, bu sürelerin aşılması halinde makale reddedilir.

## Makalenin Yayına Hazırlığı

Makaleler yalnızca çevrimiçi olarak <https://dergipark.org.tr/tr/pub/sduftd> adresinden gönderilebilir. Başka bir yolla gönderilen yazılar değerlendirilmez. Dergiye gönderilen yazılar, öncelikle yazının dergi kurallarına uygun olarak hazırlanmasını ve sunulmasını sağlayacakları teknik değerlendirme sürecinden geçer. Derginin kurallarına uymayan yazılar, teknik düzeltme talepleri ile gönderen yazara iade edilir. Editör, ana metni değiştirmeden düzeltme yapılabilir. Editör, istenilen şartlara uymayan makaleleri reddetme hakkını saklı tutar.

## Yazarların aşağıdaki belgeleri göndermeleri gerekir:

- Yayın Hakkı Devir Formu
- Başlık Sayfası (Tüm kısımlar eksiksiz ve detaylı olarak doldurulmalıdır)
- Ana belge (Şablona göre hazırlanmalıdır, bölümlendirilmiş türkçe ve ingilizce öz ile türkçe ve ingilizce başlıkları da içermelidir)
- Şekiller (JPEG formatında, en az 300 DPI, en fazla 6 adet)
- Tablolar (Microsoft word dosyası formatında, en fazla 6 tablo)
- Etik Kurul Kararları (Gerekliyse)
- Yazar Katkı Formu (CRediT sistemine göre, Bknz: Şablon)

## Ana Belgenin Yayına Hazırlığı

Yazılar bilgisayar ile çift aralıklı olarak 12 punto büyüklüğünde ve Times New Roman karakteri ile yazılmalıdır. Her sayfanın bütün kenarlarında 2.5 cm boşluk bırakılmalıdır. **Özgün makaleler bölümlendirilmiş bir Öz (abstract) içermelidir (Amaç, Gereç ve Yöntem, Bulgular, Sonuç, Anahtar Kelimeler).** Olgular sunumları ve derlemeler için bölümlendirilmiş öz gerekmez. Öz bölümü 300 kelime ile sınırlandırılmalıdır. Özde kaynaklar, tablolar ve atıflar kullanılmaz. Özün bittiği satırın altında sayısı 3-5 arasında olmak üzere anahtar kelimeler verilmelidir. Türkiye dışındaki ülkelerden yazı gönderen ve Türkçe bilmeyen yazarlar için Başlık, Öz, Anahtar Kelimeler ve yazıyla ilgili diğer bazı temel bölümlerin Türkçe olarak gönderilmesi zorunlu değildir. Makalede kullanılan tüm kısaltmalar, ilk kullanımda tanımlanmalıdır. Kısaltma, tanımı ardından parantez içinde verilmelidir. Ana metinde bir ilaç, ürün, donanım veya yazılım programından bahsedildiğinde, ürünün adı, ürünün üreticisi, üretim şehri ve üreten şirketin ülkesi de dahil olmak üzere ürün bilgileri parantez içinde verilmelidir.

Tüm kaynaklara, tablolara ve şekillere ana metinde atıfta bulunulmalı ve kaynaklar, ana metinde geçen sıraya göre numaralandırılmalıdır. Kullanılan semboller, sembollerin standart kullanımlarına uygun olmalıdır.

Özgün araştırma yazıları **en fazla 4000 kelime** olmalı ve aşağıdaki başlıkları içermelidir;

- Başlık (hem Türkçe hem İngilizce)
- Öz (hem Türkçe hem İngilizce)
- Anahtar Kelimeler (hem Türkçe hem İngilizce)
- Giriş
- Gereç ve yöntemler
- Bulgular
- Tartışma
- Sonuçlar
- Beyanlar (Çıkar çatışması vb. Bknz: Şablon)
- Kaynaklar
- Şekil ve tablo açıklamaları (gerekirse)

Olgu sunumları **en fazla 2000 kelime** olmalı ve aşağıdaki başlıkları içermelidir;

- Başlık (hem Türkçe hem İngilizce)
- Öz (hem Türkçe hem İngilizce)
- Anahtar Kelimeler (hem Türkçe hem İngilizce)
- Giriş
- Olgu sunumu
- Tartışma ve Sonuç
- Beyanlar (Çıkar çatışması vb. Bknz: Şablon)
- Kaynaklar
- Şekil ve tablo açıklamaları (gerekirse)

Derleme yazıları **en fazla 5000 kelime** olmalı ve aşağıdaki başlıkları içermelidir;

- Başlık (hem Türkçe hem İngilizce)
- Öz (hem Türkçe hem İngilizce)
- Anahtar Kelimeler (hem Türkçe hem İngilizce)
- Ana metin
- Sonuç
- Beyanlar (Çıkar çatışması vb. Bknz: Şablon)
- Kaynaklar
- Şekil ve tablo açıklamaları (gerekirse)

Editöre Mektuplar **en fazla 1000 kelime** olmalı ve aşağıdaki başlıkları içermelidir;

- Başlık (hem Türkçe hem İngilizce)
- Öz (hem Türkçe hem İngilizce)
- Anahtar kelimeler (hem Türkçe hem İngilizce)
- Editöre Mektup
- Beyanlar (Çıkar çatışması vb. Bknz: Şablon)
- Kaynaklar
- Şekil ve tablo açıklamaları (gerekirse)

#### Şekillerin ve Tabloların Yayına Hazırlığı

- Şekiller, grafikler ve fotoğraflar, makale yükleme sistemi aracılığıyla ayrı dosyalar (JPEG formatında) halinde sunulmalıdır.
- Dosyalar bir Word belgesine veya ana belgeye gömülmemelidir.
- Şeklin alt birimleri olduğunda; alt birimler tek bir görüntü oluşturmak için birleştirilmemelidir. Her alt birim, başvuru sistemi aracılığıyla ayrı ayrı sunulmalıdır.
- Şekil alt birimlerini belirtmek için görüntüler Arabik rakamlarla (1,2,3...) numaralandırılmalıdır.
- Gönderilen her bir şeklin en düşük çözünürlüğü 300 DPI olmalıdır.
- Şekiller, basılı hali rahatça okunacak şekilde yüksek çözünürlükte olmalı ve en fazla 6 adet ile sınırlandırılmalıdır.

- Şekillerin açıklamaları ana belgenin sonunda listelenmelidir.
- Bilgi veya resimler hastaların tanımlanmasına izin vermemelidir. Kullanılan herhangi bir fotoğraf için hastadan ve/veya yasal temsilcisinden yazılı bilgilendirilmiş onam alınmalıdır.

- Tablolar Microsoft Word dosyası formatındaayrı dosyalar halinde sunulmalıdır. Tablo sayısı en fazla 6 adet olmalıdır. Tüm tablolar, ana metinde kullanıldığı sırayla art arda numaralandırılmalıdır. Tablo açıklamaları ana belgenin sonunda listelenmelidir.

#### Kaynaklar

**Tüm referanslar Vancouver tarzında ana metinde atıfta bulunuldukları sırayla numaralandırılmalıdır.** Metin içinde ikiden fazla ardışık kaynak kullanılıyorsa yalnızca ilk ve son kaynak numaraları belirtilmelidir (örn; 2-6). Dergi isimleri Index Medicus'taki dergi kısaltmalarına uygun olarak kısaltılmalıdır. Altı veya daha az yazar olduğunda, tüm yazarların ismi yazılmalıdır. Yedi veya daha fazla yazar varsa, ilk 6 yazarın isminin arkasından 've ark. (et al.)' yazılmalıdır. Farklı yayın türleri için kaynak yazım stilleri aşağıdaki örneklerde sunulmuştur:

*Dergi için;*

Neville K, Bromberg A, Bromberg S, Hanna BA, Rom WN. The third epidemic multidrug resistant tuberculosis. Chest 1994;1(4):45-8.

*Kitap için;*

Sweetman SC. Martindale the Complete Drug Reference. 34th ed. London: Pharmaceutical Press; 2005.

*Kitap bölümü için;*

Collins P. Embryology and development, Neonatal anatomy and growth. In: Williams PL, Bannister LH, Berry MM, Collins P, Dyson M, Dussek JE, Ferguson MWJ. Gray's Anatomy (38th Ed) London, Churchill Livingstone, 1995; 91-342.

*Web sitesi için;*

Gaudin S. How moon landing changed technology history [Internet]. Computerworld UK. 2009 [cited 15 June 2014]. Available from: <http://www.computerworlduk.com/in-depth/it-business/2387/how-moon-landing-changed-technology-history/>

*Bildiriler için;*

Proceedings of the Symposium on Robotics, Mechatronics and Animatronics in the Creative and Entertainment Industries and Arts. SSAISB 2005 Convention. University of Hertfordshire, Hatfield, UK; 2005.

*Tez için;*

Ercan S. Venöz yetmezlikli hastalarda kalf kası egzersizlerinin venöz fonksiyona ve kas gücüne etkisi. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Spor Hekimliği Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi. Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi. 2016.

#### Geri Çekme veya Reddetme

*Yazıyı Geri Çekme:* Gönderilen yazının değerlendirme sürecinde gecikme olması vb. gibi gerekçelerle yazıyı geri çekmek ve başka bir yerde yayınlamak isteyen yazarlar yazılı bir başvuru ile yazılarını dergiden geri çekebilirler.

*Yazı Reddi:* Yayınlanması kabul edilmeyen yazılar, gerekçesi ile geri gönderilir.

#### Kabul Sonrası

Makalenin kabul edilmesi durumunda, kabul mektubu dergipark sistemi üzerinden sorumlu yazara gönderilir. Makalenin baskıdan önceki son hali yazarın son kontrolüne sunulur. Dergi sahibi ve yayın kurulu, kabul edilen makalenin derginin hangi sayısında basılacağına karar vermeye yetkilidir. Yazarlar, yazılarının basılmasından önce makalelerini kişisel veya kurumsal web sitelerinde, uygun alıntı ve kütüphane kurallarına bağlı kalarak yayınlamamalıdır.

# Medical Journal of Süleyman Demirel University Authors Guidelines

## About Med J SDU

Medical Journal of Süleyman Demirel University (Med J SDU) is a journal published by Süleyman Demirel University and is published quarterly in March, June, September and December. Med J SDU is an international, scientific, open access, online/printed journal in accordance with independent, unbiased, and double-blinded peer-review principles.

Med J SDU publishes the researches in the fields of health sciences including original clinical and experimental studies, reviews on current topics, case reports, editorial comments and letters to the editor. The journal's publication language is Turkish and English.

**Med J SDU is indexing in both international (DOAJ, EBSCO, Index Copernicus) and national (TRDizin) indexes.**

There is no charges for publishing or publishing process. No copyright price are payable to the authors or other third parties for the articles published in the journal. Med J SDU has adopted the policy of providing open access with the publication. Authors' credentials and e-mail addresses are in no way used for other purposes.

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 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. 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.

## Ethical Principles

An approval of research protocols by the Ethics Committee in accordance with international agreements (World Medical Association Declaration of Helsinki "Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects," amended in October 2013, [www.wma.net](http://www.wma.net)) is required for experimental, clinical, and drug studies and for some case reports. Ethics committee approvals or an equivalent official documents must be uploaded into the [dergipark](https://dergipark.org.tr) system.

- For manuscripts concerning experimental researches on humans, a "Written Informed Consent to Participate and Publish" statement should included in the text.
- Written Informed Consent to Participate Publish statement and Ethics Committee approval details (name of the committee, date and number) should included in the Materials and Methods section and in the end of the article (before references) with separate sub-headings.
- It is the authors responsibility to carefully protect the patients anonymity. For photographs that may reveal the identity of the patients, releases signed by the patient or their legal representative should be enclosed.
- For studies carried out on animals, the measures taken to prevent pain and suffering of the animals should be stated clearly. **Ethics Committee approval details (name of the committee, date and number) should included in the Materials and Methods section and in the end of the article (before references) with separate sub-headings.**

All submissions are screened by a **similarity detection software (iThenticate) and the similarity limitation is 25%**. The Editorial Board of the journal handles all appeal and complaint cases within

the scope of Committee on Publication Ethics (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.

When submitting a manuscript to Med J SDU, authors accept to assign the copyright of their manuscript to the journal. If rejected for publication, the copyright of the manuscript is considered to be assign back to the authors. Each submission must be submitted in accordance with the journal template (available for download at: <https://dergipark.org.tr/tr/download/journal-file/24521>), together with a Copyright Transfer Form (available for download at: <https://dergipark.org.tr/tr/download/journal-file/22117>). Mandatory documents to be sent can be found at <https://dergipark.org.tr/tr/pub/sdutfd>.

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 Med J SDU 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. Revisions should submit within 15 days in pre-review stage and in 30 days in review stage. Otherwise manuscripts will be rejected.

## Manuscript Preparation

Manuscripts can only be submitted through the journal's online manuscript submission and evaluation system, available at <https://dergipark.org.tr/tr/pub/sdutfd>. 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. The editor reserves the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned requirements. Corrections may be done without changing the main text. The editor reserves the right to reject the articles that do not meet the required conditions.

## Authors are required to submit the following:

- Copyright Transfer Form,
- Title Page (including Title of Manuscript, Running title, authors' name, title and institution, corresponding author's contact information, ORCID addresses, name of the organization supporting the research and ethical approvals)
- Main document (It should be prepared according to the template and should include a sectioned abstract.)
- Figures (Jpeg format, at least 300 DPI, up to 6 figures)
- Tables (Microsoft Word format, up to 6 table)
- Ethical Approvals (If applicable)
- Author Contributions (according to CRediT, please see Template)

## Preparation of the Main Document

The articles should be written with double-spaced in 12 pt, Times New Roman character and at least 2.5 cm from all edges of each page. The main text should not contain any information about the authors' names and affiliations. **Original articles should have a structured abstract (Objective, Material and Methods, Results, Conclusion, Keywords).** For case reports and reviews, the structured abstract is not used. Limit the abstract to 300 words. References, tables and citations should not be used in an abstract. Authors must include relevant keywords (3-5) on the line following the end of the abstract. For the Non-Turkish authors, submission of Turkish

title, Turkish abstracts and Turkish keywords are not required. 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, should be provided in parentheses.

All references, tables, and figures should be referred to within the main text, and they should be numbered consecutively. The symbols used must be in nomenclature standards.

Original Research Articles should be **maximum of 4000 words** and include subheadings below;

- Title
- Abstract
- Keywords
- Introduction
- Material and Methods
- Results
- Discussion
- Conclusions
- Statements (Please See: Template)
- References
- Figure and Table Legends (if necessary)

Case Reports should be **maximum of 2000 words** and include subheadings below;

- Title
- Abstract
- Keywords
- Introduction
- Case Presentation
- Discussion and Conclusion
- Statements (Please See: Template)
- References
- Figure and Table Legends (if necessary)

Reviews should be **maximum of 5000 words** and include subheadings below;

- Title
- Abstract
- Keywords
- Main text
- Conclusion
- Statements (Please See: Template)
- References
- Figure and Table Legends (if necessary)

Letters to Editor should be **maximum of 1000 words** and include subheadings below;

- Title
- Abstract
- Keywords
- Letter to Editor
- Statements (Please See: Template)
- References
- Figure and Table Legends (if necessary)

#### Preparation of the Figures and Tables

- Figures, graphics, and photographs should be submitted as separate files (in JPEG format) through the submission system.
- The files should not be embedded in a Word document or the main document.
- When there are figure subunits, the subunits should not be merged to form a single image. Each subunit should be submitted separately through the submission system.
- Images should be numbered by Arabic numbers to indicate figure subunits.

- The minimum resolution of each submitted figure should be 300 DPI.
- Figures should be in high resolution so that the printed version can be read easily and should be limited to a maximum of 6 figures.
- Figure legends should be listed at the end of the main document.
- Information or illustrations must not permit identification of patients, and written informed consent for publication must be sought for any photograph.
- Tables should be submitted as separate Microsoft Word files and are limited with six pieces. All tables should be numbered consecutively. Table legends should be listed at the end of the main document.

#### References

All references should be numbered consecutively in Vancouver style. If more than two consecutive resources are used, only the first and last source numbers should be specified (for example; 2-6). Journal titles should be abbreviated in accordance with the journal abbreviations in Index Medicus. When there are 6 or fewer authors, all authors should be listed. If there are 7 or more authors, the first 6 authors should be listed followed by "et al." The reference styles for different types of publications are presented in the following examples:

##### *For journals;*

Neville K, Bromberg A, Bromberg S, Hanna BA, Rom WN. The third epidemic multidrug resistant tuberculosis. *Chest* 1994;1(4):45-8. 555For books; Sweetman SC. Martindale the Complete Drug Reference. 34th ed. London: Pharmaceutical Press; 2005.

##### *For book section;*

Collins P. Embryology and development, Neonatal anatomy and growth. In: Williams PL, Bannister LH, Berry MM, Collins P, Dyson M, Dussek JE, Ferguson MWJ. *Gray's Anatomy (38th Ed)* London, Churchill Livingstone, 1995; 91-342.

##### *For website;*

Gaudin S. How moon landing changed technology history [Internet]. Computerworld UK. 2009 [cited 15 June 2014]. Available from: <http://www.computerworlduk.com/in-depth/it-business/2387/how-moon-landing-changed-technology-history/>

##### *For conference proceeding;*

Proceedings of the Symposium on Robotics, Mechatronics and Animatronics in the Creative and Entertainment Industries and Arts. SSAISB 2005 Convention. University of Hertfordshire, Hatfield, UK; 2005.

##### *For Thesis;*

Ercan S. Venöz yetmezlikli hastalarda kalf kası egzersizlerinin venöz fonksiyona ve kas gücüne etkisi. Suleyman Demirel University Faculty of Medicine Sports Medicine Department Thesis. Isparta: Suleyman Demirel University. 2016.

#### Retraction or Reject

*Manuscript Retraction:* For any reason authors may withdraw their manuscript from the journal with a written declaration.

*Manuscript Reject:* The manuscripts which are not accepted to be published are rejected with explanations.

#### After Acceptance

If the manuscript is accepted, the acceptance letter and the last version of manuscript are sent to corresponding author through submission system. The journal owner and the editorial board are authorized to decide in which volume of the accepted article will be printed. Authors may publish their articles on their personal or corporate websites with the appropriate cite and library rules after publication.



## İçindekiler

### Araştırma Makaleleri

<b>K2 Vitamininin Osteosarkoma Hücrelerinde Antiproliferatif Etkileri: Farklı Sitotoksiste Analizlerinin Karşılaştırılması</b> Büşranur ÖZALPER, Tuba ÖZDEMİR SANCI, Habibe Meltem ÖZGÜNER	1
<b>Akrilamide Maruz Kalan Sıçanların Kalp Dokusu Üzerinde Selenyumun Koruyucu Rolü</b> Nasıf Fatih KARAKUYU, Halil AŞCI2, Mehtap SAVRAN, Kanat GÜLLE	8
<b>SRY Geninin Parkinson Hastalığındaki Potansiyel Rolünün in Siliko Analizi</b> Muhammet AY	19
<b>İnsülin Kullanan Diyabetli Hastalarda Hipoglisemi Korkusu ve Öz-Yeterlilik Algısı İle İlişkili Faktörlerin Belirlenmesi</b> Bilge BAL ÖZKAPTAN, İnci DEMİRCİ	25
<b>40 Yaş Altı ve 55 Yaş Üstü Meme Kanseri Kadınların Klinikopatolojik ve Radyolojik Bulgularının Sağ Kalım Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması</b> Buket ALTUN ÖZDEMİR, Servet KOCAÖZ, Bülent ÇOMÇALI, Mustafa Ömer YAZICIOĞLU Fırat CANLIKARAKAYA, Cengiz CEYLAN, Birol KORUKLUOĞLU	37
<b>Buğday Çiminin İnsan Lenfosit Hücreleri Üzerine Etkisi</b> Okan SANCER, Zehra SAFİ ÖZ, Pınar ASLAN KOŞAR	47
<b>Türk Popülasyonunda Kalıcı Atriyal Fibrilasyon Artan Depresyon ve Anksiyete Bozukluğu ile İlişkilidir</b> Bayram Ali UYSAL, Şenol TAYYAR	57
<b>Pandemi Döneminde Ameliyathane Çalışanlarında Tükenmişliğin Değerlendirilmesi</b> Devrim Tanıl KURT, Müge ÇAKIRCA	63
<b>Sağlıklı Çocuklarda Karaciğer Elastikiyetinin pSWE ve 2D-SWE Teknikleri ile Değerlendirilmesi</b> Hüseyin AYDIN, Fatma İSSİ IRLAYICI	69
<b>Tiroid Tümörlerinde İmmünohistokimyasal Olarak Neovasküler PSMA ve CD34 Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi</b> Mehmet KIRAN, İbrahim Metin ÇİRİŞ	79
<b>Keten Tohumunun Aşırı Kullanımı Böbrek Dokusu İçin Tehdit Oluşturabilir: Deneysel Bir Çalışma</b> İlkay ARMAĞAN, Şükriye YEŞİLOT	89
<b>Primer Hiperparatiroidi Cerrahisi Geçiren Hastalarda Preoperatif ve Peroperatif Parametrelerin Karşılaştırılması, Preoperatif Parametrelerin Postoperatif Seyri Üzerine Etkisi</b> İsmail HASIRCI, Çetin KOTAN	97
<b>Negatif Appendektomiye Önlemede Alvarado Skoru ve Bilgisayarlı Tomografi</b> Hüseyin Fahri MARTLI, Yasir KEÇELİOĞLU	107
<b>Ankaferd Blood Stopper'ın Kadmiyuma Bağlı Gelişen Akut Böbrek Hasarına Etkisi</b> İlter İLHAN, Halil İbrahim BÜYÜKBAYRAM	111
<b>Önemi Belirsiz Atipili Hastalardaki Postoperatif Histopatolojik Malignite Varlığı</b> Salim İlksen BAŞÇEKEN, Deniz TİKİCİ	119
<b>Borderline Müsinöz Over Tümörlerinde Ki67'Nin Prognostik Değeri</b> İrfan ÖCAL, Sinem DEMİR	123

### Olgu Sunumları

<b>Parotis Bezinin High Grade Onkositik Mukoepidermoid Karsinomu, MAML2 Translokasyonu, Nadir Bir Olgu</b> Ramazan Oğuz YÜCEER, Mehmet KIRAN, İbrahim Metin ÇİRİŞ, Yusuf Çağdaş KUMBUL, Kayhan BAŞAK	131
---	-----

### Derlemeler

<b>Popüler Bir Tamamlayıcı Tıp Tedavisi: Proloterapi</b> Aydın ÖRSÇELİK, İlker SOLMAZ	135
--	-----



## Contents

### Clinical Investigations

<b>Antiproliferative Effects of Vitamin K2 in Osteosarcoma Cells: Comparison of Different Cytotoxicity Analyzes</b> Büşranur ÖZALPER, Tuba ÖZDEMİR SANCI, Habibe Meltem ÖZGÜNER	1
<b>Protective Role of Selenium on the Heart of Rats Exposed Acrylamide</b> Nasif Fatih KARAKUYU, Halil AŞCI2, Mehtap SAVRAN, Kanat GÜLLE	8
<b>In Silico Analysis of the Potential Role of SRY Gene In Parkinson's Disease</b> Muhammet AY	19
<b>Determination of Factors Associated with Fear of Hypoglycemia and Perception of Self-Efficacy in Diabetes Patients Using Insulin</b> Bilge BAL ÖZKAPTAN, İnci DEMİRCİ	25
<b>Comparison of the Effects of Clinicopathological and Radiological Findings on Survival in Women Younger Than 40 Years and Older Than 55 Years of Age with Breast Cancer</b> Buket ALTUN ÖZDEMİR, Servet KOCAÖZ, Bülent ÇOMÇALI, Mustafa Ömer YAZICIOĞLU Firat CANLIKARAKAYA, Cengiz CEYLAN, Birol KORUKLUOĞLU	37
<b>Effect of Wheatgrass on Human Lymphocyte Cells</b> Okan SANCER, Zehra SAFİ ÖZ, Pınar ASLAN KOŞAR	47
<b>Permanent Atrial Fibrillation is Related with an Increase in Depression and Anxiety Disorder in Turkish Population</b> Bayram Ali UYSAL, Şenol TAYYAR	57
<b>Evaluation of Burnout in Operating Room Workers During the Pandemic Period</b> Devrim Tanıl KURT, Müge ÇAKIRCA	63
<b>Evaluation of Liver Elasticity Using pSWE and 2D-SWE Techniques in Healthy Children</b> Hüseyin AYDIN, Fatma İSSİ IRLAYICI	69
<b>Evaluation of Immunohistochemical Neovascular PSMA and CD34 Expressions in Thyroid Tumors</b> Mehmet KIRAN, İbrahim Metin ÇİRİŞ	79
<b>Excessive Use of Flaxseed May Pose a Threat to Kidney Tissue: An Experimental Study</b> İlkay ARMAĞAN, Şükriye YEŞİLOT	89
<b>Effects of Preoperative Findings on Postoperative Results in Patients Undergoing Surgery for Primary Hyperparathyroidism</b> İsmail HASIRCI, Çetin KOTAN	97
<b>Alvarado Score and Computed Tomography for Prevent from Negative Appendectomy</b> Hüseyin Fahri MARTLI, Yasir KEÇELİOĞLU	107
<b>Protective Role of Ankaferd Blood Stopper on Cadmium-Induced Acute Nephrotoxicity</b> İlter İLHAN, Halil İbrahim BÜYÜKBAYRAM	111
<b>Presence of Postoperative Histopathological Malignancy in Patients with Atypia of Undetermined Significance</b> Salim İlksen BAŞÇEKEN, Deniz TİKİCİ	119
<b>Prognostic Value of Ki67 in Borderline Mucinous Ovarian Tumors</b> İrfan ÖCAL, Sinem DEMİR	123
<b>Case Reports</b>	
<b>High-Grade Oncocytic Mucoepidermoid Carcinoma of Parotid Gland, MAML2 Translocation, A Rare Case</b> Ramazan Oğuz YÜCEER, Mehmet KIRAN, İbrahim Metin ÇİRİŞ, Yusuf Çağdaş KUMBUL, Kayhan BAŞAK	131
<b>Reviews</b>	
<b>A Popular Complementary Medicine Treatment: Prolotherapy</b> Aydan ÖRSÇELİK, İlker SOLMAZ	135



## ANTIPROLIFERATIVE EFFECTS OF VİTAMİN K2 IN OSTEOSARCOMA CELLS: COMPARISON OF DIFFERENT CYTOTOXICITY ANALYZES

K2 VİTAMİNİNİN OSTEOSARKOMA HÜCRELERİNDE ANTİPROLİFERATİF ETKİLERİ: FARKLI SİTOTOKSİSİTE ANALİZLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Büşranur ÖZALPER<sup>1</sup>, Tuba ÖZDEMİR SANCI<sup>2</sup>, Habibe Meltem ÖZGÜNER<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Midwifery, Faculty of Health Sciences, Muş Alparslan University, Muş, TÜRKİYE

<sup>2</sup> Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Ankara Yıldırım Beyazıt University, Ankara, TÜRKİYE

**Cite this article as:** Özalper B, Özdemir Sancı T, Özgüner HM. Antiproliferative Effects of Vitamin K2 in Osteosarcoma Cells: Comparison of Different Cytotoxicity Analyzes. Med J SDU 2023; 30(1): 1-8.

### Öz

#### Amaç

Bu çalışmanın amacı, K2 vitamininin antiproliferatif etkilerini saptamak için yaygın olarak kullanılan dört sitotoksosite analizinin (XTT, nötral kırmızı alım, kristal viyole ve propidyum iyodür boyama) doğruluk potansiyelini karşılaştırmaktır.

#### Gereç ve Yöntem

Osteosarkoma hücre hattı olan Saos-2 hücreleri, 48 ve 72 saat boyunca K2 vitaminine (10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM, 100 µM ve 200 µM) maruz bırakıldı. Tetrazolyum tuzu testi (XTT), nötral kırmızı alım testi (NR), kristal viyole testi ve propidyum iyodür (PI) boyama yapılarak hücrelerin canlılık oranlarına göre K2 vitamini sitotoksitesi belirlendi ve farklı dozların IC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı. Analiz sonuçları tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey testiyle değerlendirildi.

#### Bulgular

K2 vitamininin osteosarkoma hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri olduğu sırasıyla XTT, NR, kristal viyole testi ve PI yöntemleri kullanılarak belirlendi ve IC<sub>50</sub> de-

ğerleri 48 saatlik maruziyet için sırasıyla 61,93; 40,21; 62,11; 70,57 µM ve 72 saatlik maruziyet için sırasıyla 75,44; 68,22; 41,66; 88,01 µM olarak saptandı.

#### Sonuç

İstatistiksel analizler çalışmada uygulanan testlerden elde edilen sonuçların farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca propidyum iyodür boyama sonucundaki canlılık oranlarının diğer testlerle elde edilen sonuçlara kıyasla çarpıcı bir şekilde daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Sitotoksosite analizlerinde sonuçların yanlış yorumlanmasını önlemek için farklı zamanlarda ve farklı konsantrasyonlarda inkübasyonlar gerektiği ve ayrıca tetrazolyum tuzu temelli testlerin metabolik olmayan diğer testlerle desteklenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Hücre canlılık testleri, İn vitro sitotoksosite, K vitamini, Osteosarkoma

#### Abstract

#### Objective

The aim of this study was to compare four commonly used cytotoxicity assays (XTT, neutral red uptake, crys-

**Sorumlu yazar ve iletişim adresi /Corresponding author and contact address:** B.Ö. / b.ozalper@alparslan.edu.tr

**Müracaat tarihi/Application Date:** 06.04.2022 • **Kabul tarihi/Accepted Date:** 22.02.2023

**ORCID IDs of the authors:** B.Ö: 0000-0002-1599-3637; T.Ö.S: 0000-0002-9468-4719;

H.M.Ö: 0000-0003-0364-5907

tal violet assay, and propidium iodide staining) which analyzed the antiproliferative effects of vitamin K2.

### Material and Method

Saos-2 cells, an osteosarcoma cell line, were exposed to vitamin K2 at different concentrations (10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 40  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M and 200  $\mu$ M) for 48 and 72 hours. Tetrazolium salt test (XTT), neutral red uptake (NR) assay, crystal violet assay, and propidium iodide (PI) staining were performed to determine cytotoxic potential of vitamin K2 in terms of the cell viability and IC<sub>50</sub> values. The results were evaluated with one-way analysis of variance (ANOVA) and the Tukey test.

### Results

Cytotoxic effects of vitamin K2 on osteosarcoma cells were analyzed with XTT, neutral red, crystal violet assay, and propidium iodide, respectively. IC<sub>50</sub> values

were determined exposure to 61.93; 40.21; 62.11; 70.57  $\mu$ M vitamin K2 for 48 and 75.44; 68.22; 41.66; 88.01  $\mu$ M vitamin K2 for 72 hours.

### Conclusion

Statistical analysis revealed that there is a significant statistical difference between four tests used in this study. In addition, it was determined that the viability rates in propidium iodide staining were higher than other tests for cytotoxicity analyses. It has been concluded that incubations at different concentrations were required to prevent misinterpretation of results in cytotoxicity analyses, and tetrazolium salt-based tests should be supplemented with other non-metabolic tests.

**Keywords:** Cell viability tests, In vitro cytotoxicity, Osteosarcoma, Vitamin K.

## Introduction

Osteosarcoma (OS) is the most malignant and common type of primary bone tumor. It is generally seen in children, adolescents, and young adults (1). With the advancement of chemotherapy, the long-term treatment rate after surgery for nonmetastatic osteosarcoma increased from 25% to 60%, and the average 5-years survival is around 70% (2).

Many studies in recent years have investigated the anti-tumor effects of vitamin K (VK). These studies have shown that vitamin K inhibits growth and induces apoptosis in cancer cells, including leukemia, hepatocellular carcinoma, lung, breast, bladder, and prostate cancers (3-8). Vitamin K is an essential fat-soluble vitamin that is effective in the synthesis of active forms of coagulation proteins and is of vital importance in ensuring normal coagulation (9). The vitamin K family consists of three groups; phyloquinone (K1), menaquinone (K2) and menadione (K3) (10). Menaquinones have both pro-osteoblastic and anti-osteoclastogenic properties. It also has the effect of improving bone quality rather than preserving bone mineral density (11). In this study, we aimed to investigate the cytotoxic effects of VK2 on osteosarcoma (Saos-2) cells by different cytotoxicity assays.

Cytotoxicity studies are conducted to assess cell death caused by a substance by measuring cell number if the substance has a cytotoxic potential (12). Cell-based

cytotoxicity studies have emerged as an alternative to animal experiments and have become frequently preferred in toxicology laboratories due to their ease of application and compatibility with data obtained from in vivo studies. Cytotoxicity varies depending on the dose and exposure time of the substance under investigation (13). Dye exclusion, colorimetric assays, fluorometric assays, and luminometric assays are commonly used methods for the determination of cytotoxicity (14).

XTT (2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) one of the enzymatic test methods widely used in cytotoxicity evaluations, was first described by Scudiero et al. (15). This assay is based on the ability of the tetrazolium salt XTT to be reduced to orange-colored formazan compounds by metabolically active cells. The orange-colored formazan is soluble in water, and its density can be measured with a spectrophotometer. There is a linear relationship between the density of formazan and the number of viable cells (14).

The neutral red uptake assay is a method frequently used in cytotoxicity tests that allow quantitative estimation of the number of viable cells in cultures (16). Neutral red, a weakly cationic dye, penetrates cell membranes by non-ionic passive diffusion (active transport) and accumulates in lysosomes (17), where it binds to the anionic and/or phosphate groups of the lysosomal matrix by electrostatic hydrophobic bonds (18,19). The dye is then extracted from living

cells using an acidified ethanol solution, and the absorbance of the solubilized dye is measured using a spectrophotometer (20).

Another method of detecting the continued adhesion of cells is staining living cells with a crystal/cresyl violet dye that binds to proteins and DNA. Cells that undergo cell death lose their adhesion and subsequently disappear from the cell population, reducing the amount of crystal violet staining in a culture. This protocol describes a rapid and reliable screening method suitable for examining the effect of chemotherapeutics or other compounds on cell survival and growth inhibition (21).

One of the most common methods of assessing cell viability is the measurement of cell membrane integrity. Dyes such as trypan blue and propidium iodide cannot freely pass through the membrane of living cells (13). PI is a nucleic acid-specific dye that emits red fluorescence that can only stain dead cells, that is, cells with impaired membrane integrity (22). For this reason, it is widely used in the evaluation of cell death and apoptosis or the determination of DNA content in cell cycle analysis.

Based on these findings, our aim in this study is to compare the effects of four different cytotoxicity methods on the same cell line.

## Material and Method

### Preparation of Cells

The Saos-2 cells received from the nitrogen tank were thawed in a 37°C water bath and centrifuged at 1800 rpm for 10 minutes. The supernatant was removed and the pelleted cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium High glucose (Lonza, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Biochrom, Germany), 1% penicillin-streptomycin (Biochrom, Germany), and 1% antifungal at 37°C in a humidified atmosphere supplemented with 5% CO<sub>2</sub>. Cells that became 80-90% confluent were passaged at the desired density (5x10<sup>3</sup>) into 96-well plates with fresh medium for analysis. The densities, viability, and proliferation rate was monitored daily under an inverted microscope.

### Preparation of Vitamin K2

Vitamin K2 (V9378, Sigma-Aldrich, USA) used in the study was supplied in powder form. VK2 was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) (OriGen, USA). Stock solutions prepared at a concentration of 10 mM were sterilized by 0.2 µm filters, divided into disposable aliquots and stored at -20°C. 10 µM,

20 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM, 100 µM and 200 µM vitamin K2 concentrations were prepared by diluting 500 µM intermediate stock solution with the cell culture medium. Control groups (cultured in medium) and DMSO control groups (cultured in 0.1-2% DMSO containing medium) were also included in the study. However, since no statistically significant change in cell viability was observed in the DMSO control groups, the data are not shown.

### Preparation of Osteosarcoma Cells for the Tests

Osteosarcoma cells seeded in 96-well cell culture plates (5x10<sup>3</sup>) were incubated for 24 hours in 5% CO<sub>2</sub> by adding 100 µl of medium per well. After the cells adhered, the medium was removed. Fresh mediums containing vitamin K2 at concentrations of 10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM, 100 µM and 200 µM were added and incubated at 37°C for 48 and 72 hours. Cell viability percentages were calculated based on the control group. The tests were repeated three times at different times.

### XTT

After osteosarcoma cells were prepared 50 µl of XTT reaction solution (Biotium, 30007) was added to each well. After being wrapped in aluminum foil to avoid light and incubated for 2 hours at 37°C in an environment containing 5% CO<sub>2</sub> and 95% humidity, measurements were made on the Elisa reader (Thermo Scientific, Varioskan Flash Multiplate Reader) at 475 nm and 630 nm (background) wavelengths. The values obtained by subtracting the background absorbance from the signal absorbance to obtain normalized absorbance values were used in cell viability calculations.

### Neutral Red Uptake Assay

The osteosarcoma cells were prepared as described above. According to the protocol of the test, at the end of the period, an amount of 0.33% neutral red solution (Sigma-Aldrich, N-2889) was added to 10% of the volume of the culture medium and allowed to incubate for 2-4 hours. At the end of the incubation period, the culture medium was carefully aspirated and the cells were quickly washed with PBS. 100 µl of neutral red dissolving solution (50% ethanol, 1% acetic acid, 49% dH<sub>2</sub>O) was added to each well to dissolve the red precipitates. The plates were mixed on a microplate shaker at medium speed for 15 minutes to completely dissolve the red precipitates. The absorbance of the wells was measured at 540 nm and 690 nm (background) wavelengths and the values obtained by subtracting the absorbance value measured at 690 nm from the absorbance value measured at 540 nm were used in cell viability calculations.

### Crystal Violet Assay

Osteosarcoma cells were prepared in 96 well plate and at the end of the incubation period, the medium was removed and washed with PBS. After adding 50  $\mu$ l of 0.5% crystal violet solution (Sigma-Aldrich, USA) per well, it was kept at room temperature for 20 minutes and then washed 4 times with distilled water. The plates were then left to dry at room temperature for at least two hours with the lid open. 200  $\mu$ l of methanol was added to the per well and the lid was closed. After waiting at room temperature for 20 minutes, the measurement was made on the Elisa reader at 590 nm (21).

### Propidium Iodide Staining

Unlike other methods, cells were seeded in 6-well ( $3 \times 10^5$ ) cell culture plates. Cells were trypsinized after culture period. Then cells were harvested from the culture plates and centrifuged at 1800 rpm for 10 minutes. The medium was added, and cells were washed to eliminate the trypsin effect. The supernatant was discarded, 100  $\mu$ l medium was added to the tube, and cells were resuspended and analyzed by flow cytometry after adding 1  $\mu$ l of PI (Biolegend, CA) (23).

### Calculation of IC<sub>50</sub> Value

Viability absorbance values obtained as a result of cytotoxicity tests of osteosarcoma cells in which vitamin K2 was applied were normalized with the control value (without VK2). Absorbance values were graphed using Graphpad Prism 8.0 program and IC<sub>50</sub> (Half-maximal inhibitory concentration) values were calculated.

### Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the IBM SPSS 25.0 package program. It was observed that the data were normally distributed after the conformity of the groups to the normal distribution was made according to the Shapiro-Wilk test. Comparisons between groups were evaluated with One-Way analysis of variance (ANOVA). The differences between the

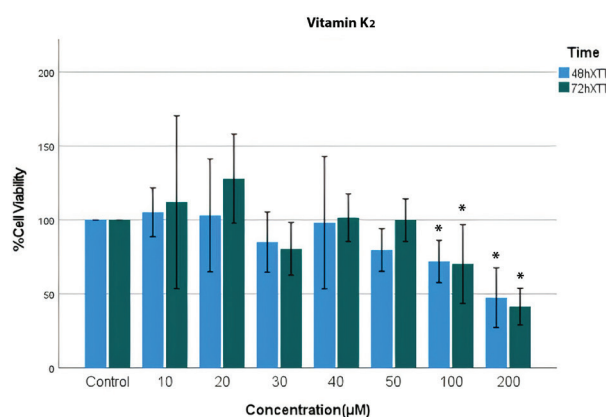
means and the control group were evaluated with the Tukey test. Comparison data were given as mean  $\pm$  standard deviation. The statistical significance level was accepted as  $p < 0.05$ .

## Results

Saos-2 cells were exposed to different concentrations of vitamin K2 for 48 and 72 hours and cytotoxicity tests were made by XTT, NR assay, crystal violet assay and PI staining. The IC<sub>50</sub> values calculated for each incubation time (48 and 72 hours) are shown separately in Table 1.

In order to calculate the viability ratios of cells in each method; the absorbance value in each concentration for each sample divided to the absorbance value of the untreated control and then multiplied by 100.

The cytotoxic effects of vitamin K2 on Saos-2 cells were determined by the XTT method for 48 and 72-hours, and the results are shown in Figure 1. According to the pairwise comparisons between the groups, cell viability decreased significantly between the control group and the 100  $\mu$ M; 200  $\mu$ M groups ( $p < 0.05$ ).



**Figure 1:**

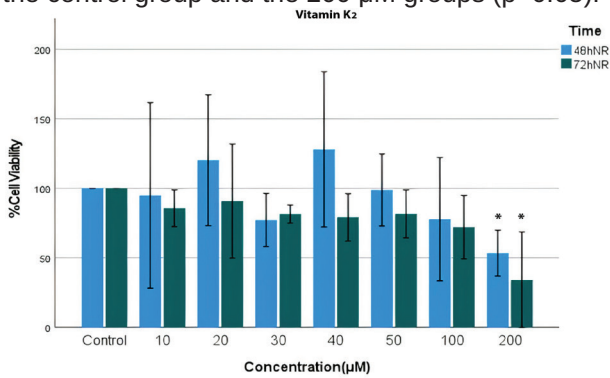
Cytotoxic effects of vitamin K2 on Saos-2 cells. Cell viability was evaluated compare to control using XTT method.  $p < 0.05$  was accepted as statistically significant.

**Table 1** IC<sub>50</sub> values of the applied methods.

IC <sub>50</sub> values (µM)	48 h	72 h
XTT	61.93	75.44
NR assay	40.21	68.22
Cresyl violet	62.11	41.66
PI	70.57	88.01



The cytotoxicity results after exposure of VK2 for 48 and 72 hours for NR assay were shown in Figure 2. According to the pairwise comparisons between the groups, cell viability decreased significantly between the control group and the 200  $\mu\text{M}$  groups ( $p < 0.05$ ).

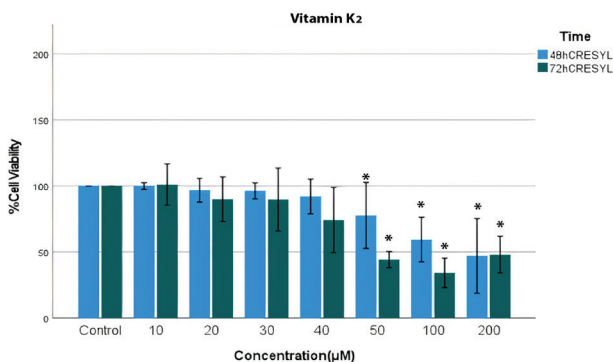


**Figure 2:** Cytotoxic effects of vitamin K2 on Saos-2 cells. Cell viability was evaluated compare to control using NR method.  $p < 0.05$  was accepted as statistically significant.

The cytotoxicity results, after exposure of VK2 for 48 and 72 hours for crystal violet test method, were shown in Figure 3. According to the pairwise comparisons between the groups, cell viability decreased significantly between the control group and the 50  $\mu\text{M}$ ; 100  $\mu\text{M}$  and 200  $\mu\text{M}$  groups ( $p < 0.05$ ).

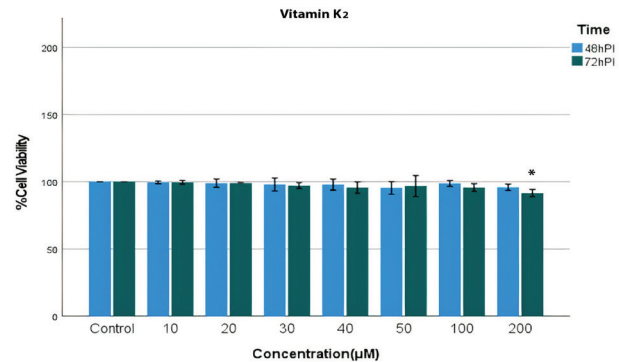
The cytotoxicity results, after exposure of VK2 for 48 and 72 hours PI method, are shown in Figure 4. According to the pairwise comparisons between the control group and the 200  $\mu\text{M}$  groups for 72 h ( $p < 0.05$ ).

When we analyzed four cytotoxicity tests to determine the antiproliferative effects of vitamin K2; XTT, NR, and

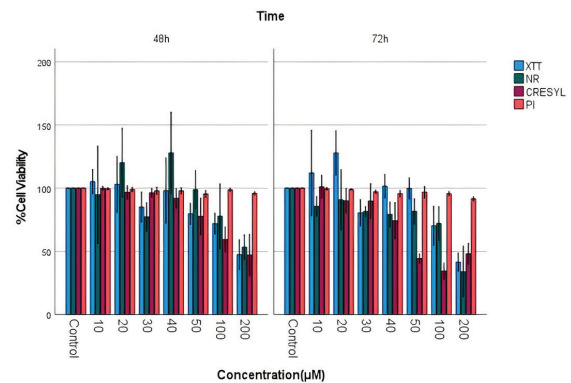


**Figure 3:** Cytotoxic effects of vitamin K2 on Saos-2 cells. Cell viability was evaluated compare to control using crystal violet assay method.  $p < 0.05$  was accepted as statistically significant.

crystal violet results show a dose-dependent decrease in cell viability compared to control for both 48 and 72 hours, but PI results show high cell viability (Figure 5).



**Figure 4:** Cytotoxic effects of vitamin K2 on Saos-2 cells. Cell viability was evaluated compare to control using PI method.  $p < 0.05$  was accepted as statistically significant.



**Figure 5:** Effect of vitamin K2 at 10-200  $\mu\text{M}$  concentrations on Saos-2 cells for 48 and 72 hours using four different cytotoxicity assays.

## Discussion

Cytotoxicity tests provide basic information about the behavior of a substance that is likely to be a drug or whose toxic effect is unknown and form a source for future animal or clinical trials. For this reason, the accuracy and reliability of the data obtained from the studies are very important. The accuracy of the data depends not only on the method but also on many variables such as the knowledge and experience of the researcher, the type of cell used, the pH of the medium, ion concentration (calcium, potassium, sodium), environmental factors (temperature, humidity), and the duration of the cell cycles (12). Numerous methods have been developed to measure parameters related to cell death, and each method has its advantages and disadvantages.

However, researchers think that none of these methods is sufficient alone and it is appropriate to prefer combinations of different methods, taking into account the variability of the methods (24). Cell death is a highly heterogeneous process; since the signaling pathways leading to cell death can differ even in relatively similar experimental environments, it is at the discretion of each researcher to decide which biochemical parameters are the most appropriate to monitor the mechanical characterization of cell death in the experimental setup (24, 25).

Although many studies have been conducted in recent years on the anticancer effects of vitamin K, which is known to have important roles in blood coagulation and bone metabolism, studies on its effects on osteosarcoma cells are very rare (26). In our study, the effect of vitamin K2 on the survival of osteosarcoma cells was investigated with different *in vitro* cytotoxicity analyses to fill this gap, and  $IC_{50}$  values were found at different doses.

According to our results, we determined the lowest  $IC_{50}$  value in osteosarcoma cells with the NR test at 40.21 for 48 hours, and the highest  $IC_{50}$  value in the PI method at 88.01 for 72 hours. In a similar study by Zenmyo et al., it was shown that MG-63 osteosarcoma cells were applied 5  $\mu$ M vitamin K2 for 48 hours to inhibit cell proliferation, but the  $IC_{50}$  value was not specified (27). In another study by Otsuka et al. on hepatocellular carcinoma cells, cells were exposed to VK2 for 5 days, and decreased growth of cells was reported, with an  $IC_{50}$  value (45  $\mu$ M) close to our result (28). When the apoptosis induction of VK2 in lung cancer cell lines was examined, it was reported that it suppressed growth in a dose-dependent manner and the  $IC_{50}$  value was calculated as 7.5-75  $\mu$ M (29). Yokoyama et al. reported that VK2 suppressed growth in small cell lung cancer, and the  $IC_{50}$  value was found to be 16-64  $\mu$ M (30). It has been reported that VK2 inhibits the proliferation of hepatocellular carcinoma cells by caspase 8 activation and induction of apoptosis involving p53, and the  $IC_{50}$  value is 9.73  $\mu$ M in 24 hours (31). On the other hand, it has been reported that cells are minimally affected after VK2 (100  $\mu$ M) is administered at high concentrations to non-cancer cells. All these results show that vitamin K2 has a low cytotoxic effect in non-cancer cells, while it has anticancer activity in different cancer cells (5). Since studies examining the effects of vitamin K2 on osteosarcoma cells are rare, it is thought that the difference between the  $IC_{50}$  values found when we look for its cytotoxic effects in different cancers is due to the different fetal bovine serum and proliferation conditions, which are effective on cell development. In

addition, since the sensitivity, variability, and contents of the tests used in cytotoxicity analyzes are different from each other, they may affect the data. Therefore, the same cell lines may give different responses in different environments.

Fotakis and Timbrell compared four different cytotoxicity assays (LDH, a protein, NR, and MTT assays) by exposing hepatocellular carcinoma cells to cadmium chloride, observing different sensitivity for each assay. They stated that NR and MTT assays are most sensitive in detecting cytotoxic events (32). In another study, three different cytotoxicity assays (NR, resazurin test and TB staining) were performed to determine  $VOSO_4$  cytotoxicity in the CHO-K1 cell line. While NR and resazurin tests performed after 24 hours of exposure showed similar sensitivity; the NR test after 48 hours showed higher sensitivity than the resazurin test in detecting vanadyl-induced toxicity. The TB test, performed after 24 and 48 hours of exposure was found to be less sensitive than other tests (20). When the analyzes we used in our study were evaluated, it was determined that PI staining was less sensitive than other tests. Therefore, the present results highlight the role of lysosomes, mitochondria, DNA and proteins in the mechanism of VK2-induced toxicity in Saos-2 cells. When the studies are evaluated in terms of the sensitivity of the tests taken into account, it is observed that different results are obtained. It has been reported by studies that the accuracy of the data does not depend only on the method but on many variables such as the knowledge and experience of the researcher, the type of cell used, the pH of the medium, the ion concentration (calcium, potassium, sodium), environmental factors (temperature, humidity), and the duration of the cell cycles (12).

In conclusion, it should be noted that incubations of various concentrations at different times are necessary to avoid over-or under-estimate the toxicity of a substance and to distinguish between effects on particular organelles or overall cytotoxicity. It is recommended to use more than one test to increase the reliability of the results obtained and to determine cell viability *in vitro* studies.

#### Acknowledgment

The Saos-2 cell line was a kind gift of Assoc. Prof. Dr. Mustafa Güngörmüş Ankara Yıldırım Beyazıt University Faculty of Dentistry. This study was carried out using the facilities of Ankara Yıldırım Beyazıt University, Central Research Laboratory Application and Research Center (MERLAB).

### Conflict of Interest Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

### Ethical Approval

This article does not contain any studies with human or animal subjects.

### Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### Availability of Data and Materials

Data available on request from the authors.

### Authors Contributions

BÖ: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Investigation; Methodology; Validation; Visualization; Funding acquisition; Project administration; Writing-original draft.

TÖS: Conceptualization; Funding acquisition; Resources; Validation; Writing-review & editing.

HMÖ: Formal analysis; Validation; Writing-review & editing.

### References

- Ando K, Heymann MF, Stresing V, Mori K, Rédini F, Heymann D. Current therapeutic strategies and novel approaches in osteosarcoma. *Cancers*. 2013;5(2):591-616.
- Roberts RD, Lizardo MM, Reed DR, Hingorani P, Glover J, Allen-Rhoades W, Fan T, et al. Provocative questions in osteosarcoma basic and translational biology: A report from the Children's Oncology Group. *Cancer*. 2019;125(20): 3514-3525.
- Hoyt M, Reger M, Marley A, Fan H, Liu Z, Zhang J. Vitamin K intake and prostate cancer risk in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer (PLCO) Screening Trial. *Am J Clin Nutr*. 2019;109(2):392-401.
- Xia J, Ozaki I, Matsushashi S, Kuwashiro T, Takahashi H, Anzai K, Mizuta T. Mechanisms of PKC-mediated enhancement of HIF-1 $\alpha$  activity and its inhibition by Vitamin K2 in hepatocellular carcinoma cells. *Int J Mol Sci*. 2019;20(5):1022.
- Duan F, Yu Y, Guan R, Xu Z, Liang H, Hong L. Vitamin K2 induces mitochondria-related apoptosis in human bladder cancer cells via ROS and JNK/p38 MAPK signal pathways. *PLoS One*. 2016;11(8):1-20.
- Jiang Y, Yang J, Yang C, Meng F, Zhou Y, Yu B, Khan M, Yang H. Vitamin K4 induces tumor cytotoxicity in human prostate carcinoma PC-3 cells via the mitochondria-related apoptotic pathway. *Pharmazie*. 2013;68:442-448.
- Baran I, Ganea C, Scordino A, Musumeci F, Barresi V, Tudisco S, Privitera S, Grasso R, Condorelli DF, Ursu I, Baran V, Katona E, Mocanu MM et al. Effects of menadione, hydrogen peroxide, and quercetin on apoptosis and delayed luminescence of human leukemia Jurkat T-cells. *Cell Biochem Biophys*. 2010;58(3):169-179.
- Akiyoshi T, Matzno S, Sakai M, Okamura N, Matsuyama K. The potential of vitamin K3 as an anticancer agent against breast cancer that acts via the mitochondria-related apoptotic pathway. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2009;65(1):143-150.
- Demirtaş F, Evim MS, Baytan B, Güneş AM. Vitamin K ve Homeostaz. *Güncel Pediatri*. 2010;8: 113-8.
- Chatron N, Hamed A, Benoit E, Lattard V. Structural Insights into Phylloquinone (Vitamin K1), Menaquinone (MK4, MK7), and Menadione (Vitamin K3) Binding to VKORC1. *Nutrients*. 2019;11(1):67.
- Owen R, Bahmaee H, Claeysens F, Reilly GC. Comparison of the anabolic effects of reported osteogenic compounds on human mesenchymal progenitor-derived osteoblasts. *Bioengineering*. 2020;7(12):1-19.
- Tokur O, Aksoy A. In vitro sitotoksitate testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2017;6(1):112-118.
- Riss TL, Moravec RA. Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay and drug development Technologies*. 2004;2(1):51-62.
- Aslantürk ÖS. In vitro cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages. *Genotoxicity-A predictable risk to our actual World*. 2018;2:64-80.
- Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nogziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research*. 1988;48:4827-4833.
- Repetto G, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Prot*. 2008;3(7):1125-1131.
- Babich H, Borenfreund E. Applications of the neutral red cytotoxicity assay to in vitro toxicology. *Altern Lab Anim*. 1990;18:129-144.
- Winckler J. Vital staining of lysosomes and other cell organelles of the rat with neutral Red. *Prog Histochem Cytochem*. 1974;6(3):1-91.
- Nemes Z, Dietz R, Luth JB. The pharmacological relevance of vital staining with neutral red. *Experientia*. 1979;35:1475-1476.
- Zwolak I. Comparison of three different cell viability assays for evaluation of vanadyl sulphate cytotoxicity in a Chinese hamster ovary K1 cell line. *Toxicology and industrial health*. 2016;32(6):1013-1025.
- Feoktistova M, Geserick P, Leverkus M. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2016;(4), pdb-prot087379.
- Atale N, Gupta S, Yadav UCS, Rani V. Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques. *Journal of microscopy*. 2014;255(1),7-19.
- Crowley LC, Scott AP, Marfell BJ, Boughaba JA, Chojnowski G, Waterhouse NJ. Measuring cell death by propidium iodide uptake and flow cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2016;(7), pdb-prot087163.
- Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, Alnemri ES, Andrews DW, Baehrecke EH, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death & Differentiation*. 2009;16(8):1093-1107.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*. 2009;16:3-11.
- Di W, Khan M, Gao Y, Cui J, Wang D, Qu M, Feng L, Maryam A, Gao H. Vitamin K4 inhibits the proliferation and induces apoptosis of U2OS osteosarcoma cells via mitochondrial dysfunction. *Mol Med Rep*. 2017;15(1),277-284.
- Zenmyo M, Komiya S, Hamada T, Hiraoka K, et al. Transcriptional activation of p21 by vitamin D(3) or vitamin K(2) leads to differentiation of p53-deficient MG-63 osteosarcoma cells. *Hum Pathol*. 2001;32(4),410-6.
- Otsuka M, Kato N, Shao RX, Hoshida Y, Ijichi H, Koike Y, et al. Vitamin K2 inhibits the growth and invasiveness of hepatocellular carcinoma cells via protein kinase A activation. *Hepatology*. 2004;40(1), 243-251.

29. Yoshida T, Miyazawa K, Kasuga I, Yokoyama T, Minemura K, Ustumi K, et al. Apoptosis induction of vitamin K2 in lung carcinoma cell lines: the possibility of vitamin K2 therapy for lung cancer. *International journal of oncology*. 2003;23(3),627-632.
30. Yokoyama T, Miyazawa K, Yoshida T, Ohyashiki K. Combination of vitamin K2 plus imatinib mesylate enhances induction of apoptosis in small cell lung cancer cell lines. *International journal of oncology*. 2005;26(1),33-40.
31. Li L, Qi Z, Qian J, Bi F, Lv J, Xu L, et al. Induction of apoptosis in hepatocellular carcinoma Smmc-7721 cells by vitamin K2 is associated with p53 and independent of the intrinsic apoptotic pathway. *Molecular and cellular biochemistry*. 2010;342(1),125-131.
32. Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett*. 2006;160:171–177.



## PROTECTIVE ROLE OF SELENIUM ON THE HEART OF RATS EXPOSED ACRYLAMIDE

### AKRİLAMİDE MARUZ KALAN SIÇANLARIN KALP DOKUSU ÜZERİNDE SELENYUMUN KORUYUCU ROLÜ

Nasıf Fatih KARAKUYU<sup>1</sup>, Halil AŞCI<sup>2</sup>, Mehtap SAVRAN<sup>2</sup>, Kanat GÜLLE<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Süleyman Demirel Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Ana Bilim Dalı, Isparta, TÜRKİYE

<sup>2</sup> Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı, Isparta, TÜRKİYE

<sup>3</sup> Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Ana Bilim Dalı, Isparta, TÜRKİYE

**Cite this article as:** Karakuyu NF, Aşçı H, Savran M, Güllü K. Protective Role of Selenium on The Heart of Rats Exposed Acrylamide. Med J SDU 2023; 30(1): 9-17.

#### Öz

##### Amaç

Akrilamid (ACR), farklı endüstriyel alanlarda yaygın olarak kullanılan zararlı organik reaktif bir bileşiktir. Selenyum (SEL), hem hayvanlarda hem de insan organizmalarında meydana gelen bazı kimyasal ve enzimatik reaksiyonlarda yer alan ve eksikliği durumunda kardiyovasküler sistem gibi birçok sistemde bazı rahatsızlıklara neden olabilen bir eser elementtir. Bu çalışmanın amacı, sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan ACR toksisitesinde SEL'in kalp dokusu üzerinde koruyucu bir etkisinin olup olmadığını araştırmaktır.

##### Gereç ve Yöntem

Toplam 28 sıçan rastgele ve eşit olarak dört gruba ayrıldı: Kontrol, SEL, ACR, SEL + ACR. Çalışma sonunda kan örneklerinden kreatin kinaz MB (CKMB), laktat dehidrojenaz (LDH) ve iskemi modifiye albümin (IMA) gibi kardiyak belirteçler ile kalp dokusundan toplam oksidan durumu (TOS), toplam antioksidan durumu (TAS) ve oksidatif stres indeksi (OSI) gibi oksidatif stres belirteçlerinin analizleri yapıldı. Ayrıca kalp kesitlerinde immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak indüklenbilir nitrik oksit sentaz (iNOS) aktiviteleri belirlendi.

#### Bulgular

ACR + SEL grubunda, ACR grubuna göre TOS, OSI, CKMB, LDH, IMA düzeylerinde anlamlı düşüş ve TAS düzeyinde önemli artış gözlemlendi. Kalp dokusu kesitlerinin histopatolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmesinde; ACR grubunda kalp kası liflerinde düzensizlik, kas lifleri arasında bağ dokusu artışı ve kas liflerinde düzensiz eozinofili tespit edildi. SEL uygulanan gruplarda ACR grubuna göre histopatolojik bulgularda azalma gözlemlendi. iNOS immünreaktivite; ACR grubunda orta düzeyde ekspresyon gözlenirken, ACR + SEL grubunda daha zayıf bir ekspresyon gözlemlendi.

#### Sonuç

ACR'nin sıçanların kalp dokusunda çeşitli metabolik yollarla hasara yol açtığını ve bu hasarın SEL verilen gruplarda tersine döndürüldüğünü belirledik.

**Anahtar Kelimeler:** Akrilamid, Antioksidan, Selenyum, Sıçan

#### Abstract

##### Objective

Acrylamide (ACR) is a harmful organic reactive compound widely used in different industrial fields. Sele-

**Sorumlu yazar ve iletişim adresi /Corresponding author and contact address:** N.F.K. / fatihkarakuyu03@gmail.com

**Müracaat tarihi/Application Date:** 08.08.2022 • **Kabul tarihi/Accepted Date:** 28.12.2022

**ORCID IDs of the authors:** N.F.K: 0000-0002-2249-4668; H.A: 0000-0002-1545-035X;

M.S: 0000-0002-7933-0453; K.G: 0000-0002-6337-8962

niyum (SEL) is a trace element that takes part in some chemical and enzymatic reactions in both animals and human organisms and can cause some disorders in many systems such as the cardiovascular system in case of deficiency. The aim of this study is to investigate whether SEL has a protective effect on cardiac tissue in experimentally induced ACR toxicity in rats.

### Material and Method

A total of 28 rats were randomly and equally divided into four groups: Control, SEL, ACR, SEL + ACR. At the end of the study, cardiac markers such as creatine kinase MB (CKMB), lactate dehydrogenase (LDH) and ischemia-modified albumin (IMA) from blood samples were measured. Oxidative stress markers such as total oxidant status (TOS), total antioxidant status (TAS) and oxidative stress index (OSI) in heart tissue were analyzed. In addition, inducible nitric oxide synthase iNOS activities were determined in heart sections using immunohistochemical methods.

### Results

The ACR + SEL group showed a significant decrease in TOS, OSI, CKMB, LDH, IMA levels and significant increase in TAS level compared to the ACR group. In histopathological and immunohistochemical evaluation of the heart sections; Disorganization in cardiac muscle fibers, increased connective tissue between muscle fibers and irregular eosinophilia in muscle fibers were detected in ACR group. A decrease in histopathological findings was observed in the SEL treated groups compared to the ACR group. iNOS immunoreactivities; moderate marking was observed in the ACR group sections, while poor marking was observed in the ACR + SEL group.

### Conclusion

We determined that ACR caused damage to the heart tissue of rats through various metabolic pathways and that these damages were reversed in the groups given the SEL.

**Keywords:** Acrylamide, Antioxidant, Rat, Selenium

## Introduction

Industrialization, with the development of technology, causes the pollution of natural resources and can cause health problems on various living things, especially human beings. Acrylamide (ACR) is an organic reactive compound that is widely used in different industrial areas and forms polyacrylamide by polymerization. Edible foods are main sources of ACR. Especially it found in heated foods because of the reaction between reduced sugars and amino acids. High concentrations have been observed in products such as bread, coffee, and potatoes (1). In addition, the ACR has been classified as "Group 2A carcinogenic" by the International Agency for Research on Cancer (IARC) and it has been reported that the major tobacco derivatives are caused by fumes and environmental pollutants in water sources (2). Studies on ACR have become widespread in recent years due to its toxic effects on animals and humans (1).

There are very few in vivo studies conducted in experimental animals on heart tissue sensitive to exposure of environmental pollutants such as ACR (3). ACR is metabolized by the CYP2E1 enzyme within the cytochrome P450 enzyme family in the liver, conjugated with glutathione or glydamide (4). Glutathione (GSH) has an important role in preventing toxicity caused by ACR in various systems (5).

Oxidative stress and inflammation are among the basic mechanisms of this toxicity. Reactive oxygen species (ROS) formed by these two mechanisms and the increase in the production of cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) are responsible (4, 6).

Selenium (SEL) is a trace element involved in some chemical and enzymatic reactions as glutathione peroxidase (GSH-Px) synthesis that occur in both animals and human organisms, and in case of deficiency, it can cause some disorders in many systems such as cardiovascular system (7, 8). In addition, in some studies, it has been shown that SEL has a protective effect in cases of toxicity caused by some substances that are toxic to the organism, called xenobiotics, including heavy metals (7).

When damage occurs in the body for any reason, the antioxidant enzyme system is activated. This system causes the use of antioxidant enzymes. For this reason, there is a decrease in the levels of these enzymes in the blood and tissues. Failure to replace this activity with exogenous antioxidant supplementation results in insufficient antioxidant activity, and the oxidant-antioxidant levels in balance shift towards oxidant. For example, increased oxidative stress as a result of the decrease in GSH-Px enzyme activity, of which SEL is a cofactor, damages the cell membrane due to lipid peroxide accumulation and makes the cell vulnerable

(9). Antioxidant activity of selenium has been proven in many studies (10, 11).

In addition to the antioxidant effect of SEL, there are studies showing that it has an anti-inflammatory effect by reducing the level of some inflammation markers such as interleukin-6, TNF- $\alpha$  and C-reactive protein in the treatment of many chronic inflammatory disease (12). Orally administered SEL shows its anti-inflammatory effect by preventing the adhesion of monocyte to the endothelium (13). As known, monocyte adhering to endothelial cells infiltrates into tissue spaces and transforms into macrophages, which play a major role in inflammation (14). For these reasons mentioned above, it is known that SEL has cardioprotective effects against the cardiotoxic effects of some xenobiotic substances (15).

There are 3 forms of nitric oxide synthase which are inducible nitric oxide synthase (iNOS), endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and neuronal nitric oxide synthase (nNOS). iNOS contributes to the pathophysiology of inflammatory diseases and septic shock, and increased levels of iNOS in inflammation have been shown to cause endothelial dysfunction (16-21).

In this study, we aimed to investigate whether SEL has a protective effect on cardiac tissue in the ACR toxicity created experimentally in rats.

## Material and Method

### Animals and Ethical Approval

All experiments were performed under the guidelines for animal research from the National Institutes of Health and were approved by the Committee on Animal Research of Suleyman Demirel University (Approval No: 21/10/2020 08-06).

Twenty-eight male Wistar Albino rats, weighing 250–350 g, were placed in a room-controlled temperature (21°C -22 °C) and humidity (60%  $\pm$  5%) conditions, in which a 12:12 h light/dark cycle was maintained. All rats were fed a standard commercial chow diet (Korkuteli Yem, Antalya, TURKEY).

### Experimental Design

The rats were distributed into the following four groups each containing seven rats: control, SEL, ACR and ACR+SEL groups.

1-Control group, from the 0th day until the 27th day, 1 mL saline per day were administered orally.

2- In the SEL group, 0.5 mL 0.1 mg/kg SEL (Sodium selenate, NS412130207, Alfa Aesar, USA) was dissolved in 0.5 mL saline once a day from the 0th day until the 27th day and administered orally (5).

3- In the ACR group, from the 0th day until the 27th day, 0.5 mL 20 mg/kg/day ACR (329747349 Sigma-Aldrich,) was dissolved in 0.5 mL saline and administered orally (22, 23).

4- In the ACR+SEL, from day 0th to day 27th, 0.5 mL 20 mg/kg/day ACR and 0.5 mL 0.1 mg /kg/day SEL was given orally.

24 h after the last application of ACR, all rats were anesthetized by an intraperitoneal injection of 90 mg/kg ketamine (Alfamin, Alfasan IBV) and 10 mg/kg xylazine (Alfazin, Alfasan IBV). After abdominal incision, blood samples were taken from vena cava inferior to analyses biochemical markers of cardiac damage. Then cardiac tissues were removed and half of the cardiac specimens were placed into liquid nitrogen and stored at -20 °C until the analysis of assayed for biochemical parameters. The remaining tissues were collected during necropsy and fixed in 10% buffered formalin for histopathological and immunohistochemical analyses.

Measurement of cardiac damage parameters in blood An auto analyzer (Beckman Coulter AU680, Pasadena, California, USA) was used to determine the creatine kinase MB (CKMB), lactate dehydrogenase (LDH) and ischemia-modified albumin (IMA) levels in the blood samples.

### Measurement of Oxidative Stress Parameters in the Heart Tissue

The heart tissues were homogenized in a motor-driven tissue homogenizer (IKA UltraTurrax T25 Basic; Labortechnik, Staufen, Germany) and a sonicator (UW 2070 Bandelin Electronic, Germany) with phosphate buffer (pH 7.4). Unbroken cells, cell debris, and nuclei were sedimented by centrifugation at 10.000 g for 10 min. Protein levels in the homogenate and supernatant were determined according to the Bradford method (24). Total oxidant status (TOS) (RL0024, Relassay, Turkey) and Total antioxidant status (TAS) (RL0017, Relassay, Turkey) levels were determined using an automated colorimetric kit. The color intensity was related to the total amount of oxidant molecules, and the change in absorbance at 660 nm was related to the total antioxidant level of the sample, which was measured spectrophotometrically, as shown in the sample. The results are expressed as hydrogen peroxide equivalent per gram liter

(mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> equiv./L, mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> equiv./mg protein) for TOS levels and mmol Troloxequiv./mg protein for TAS levels. TAS and TOS levels were measured spectrophotometrically by the automated chemistry analyzer Beckman Coulter AU5800 (Japan) (25, 26).

### Histopathological Analyses

Heart tissues obtained from animals were taken into 10% neutral formaldehyde solution and fixed. After the fixation was completed, the tissue samples were taken to the washing process. Washed samples, respectively; it was passed through alcohol batches, dehydrated, made transparent with xylol and embedded in paraffin. 4-5µm sections were taken from the obtained paraffin blocks (RM2125RTS, Leica, Germany). Samples belonging to all groups were stained with Hematoxylin-Eosin (H-E) for histopathological evaluation. Histopathological findings were evaluated under four headings; disorganization of muscle fibers, increased connective tissue between muscle fibers, irregular eosinophilia and mononuclear cell infiltration. Histopathological scoring was performed in terms of findings by examining different areas from each section with 40x objective. Structural changes in the hearth tissue sections of the experimental and control groups were evaluated according to the scoring made by Nezcic et al (27) (Table 1). The images of the sections were obtained with imaging-supported binocular light microscope (ECLIPSE Ni-U, Nikon, Tokyo, Japan).

### Immunohistochemical Analyses

In heart sections, iNOS activities were determined using immunohistochemical methods. Sections 4-5 µm thick were first deparaffinized and dehydrated. Then the sections were incubated with 3% hydrogen peroxide, Ultra-V Block (ThermoFisher), primary antibodies (Bioss), secondary antibody (ThermoFisher), streptavidin peroxidase (ThermoFisher), respectively. Core staining was done with hematoxylin, labeling with DAB solution (Vectorlab). Sections immunoreactivities,

semi-quantitative scoring method were evaluated according to their degree of staining and sections were evaluated by imaging-assisted light microscope (ECLIPSE Images were acquired with Ni-U, Nikon, Tokyo, Japan) as shown in Table 1.

### Statistical Analyses

Variables were presented as mean ± standard deviations. One way ANOVA (post hoc LSD) tests were used to compare biochemical, histopathological and immunohistochemical scores between the groups. Statistical calculations were made using the SPSS 18.0 program pack (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). p<0.05 was set as the value for significance.

## Results

### Results of Cardiac Damage Parameters in Blood

CKMB, LDH and IMA levels increased significantly in the ACR group compared to the control group (p≤0.001, p≤0.001 and p=0.001, respectively) and compared to the SEL group (p≤0.001, p≤0.001 and p=0.020, respectively). CKMB and LDH levels increased significantly in the ACR + SEL group compared to the control group (p=0.016 and p=0.015, respectively). The ACR + SEL group showed a significant decrease in all parameter levels compared to the ACR group (p≤0.001, p=0.001 and p=0.025) (Table 2).

### Results of Oxidative Stress Parameters in the Heart Tissue

TAS levels decreased significantly in the ACR group compared to the control group (p=0.023) and a significant increase was observed in TAS levels in the SEL and ACR+SEL group compared to the ACR group (p=0.016 and p=0.033; respectively).

TOS and OSI levels increased significantly in the ACR group compared to the control group (p≤0.001 for both) and SEL group (p ≤ 0.001 for both). When

**Table 1**

Scoring table of histopathological and immunohistochemical evaluations

Symbol	Mean	Histopathological scores	Immunohistochemical scores
(-) score	negative score	no finding	no marking
(+) score	1 positive score	low level of finding	low marking
(++) score	2 positive scores	moderate finding	moderate marking
(+++ ) score	3 positive scores	severe finding	strong labeling



**Table 2** Biochemical changes in blood of the experiment groups.

Groups	CKMB (U/L)		LDH (U/L)		IMA (ABSU)	
	Mean±SD	P value	Mean±SD	P value	Mean±SD	P value
Control	225.43 ± 27.50		480.83 ± 119.64		0.15 ± 0.03	
SEL	257.32 ± 62.92		600.39 ± 205.33		0.22 ± 0.02	
ACR	460.02 ± 52.81 <sup>a,b</sup>	a≤0.001 b≤0.001	961.52 ± 63.38 <sup>a,b</sup>	a≤0.000 b≤0.001	0.35 ± 0.14 <sup>a,b</sup>	a=0.001 b=0.020
ACR+SEL	303.91 ± 57.02 <sup>a,c</sup>	a=0.016 c≤0.001	675.50 ± 61.56 <sup>a,c</sup>	a=0.015 c=0.001	0.22 ± 0.07 <sup>c</sup>	c=0.025

Values are presented as means ± SD. The relationships between groups and results of biochemical markers are assessed by One-way ANOVA test (post hoc LSD test). CKMB: Creatine Kinase MB, LDH: Lactate Dehydrogenase, IMA: Ischemia-Modified Albumin, ACR: Acrylamide, SEL: Selenium, a: Compared with the control group, b: Compared with the SEL group, c: compared with the ACR group

**Table 3** TAS, TOS, OSI values in groups of heart tissue.

Groups	TAS (mmol Trolox Equivalents/L)		TOS (μmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Equivalents/L)		OSI	
	Mean±SD	P value	Mean±SD	P value	Mean±SD	P value
Control	0.82±0.13		6.30±1.42		0.75±0.19	
SEL	0.84±0.29		6.34±1.56		0.80±0.45	
ACR	0.57±0.11	a=0.023 b=0.016	10.17±1.76	a≤0.001 b≤0.001	1.77±0.35	a≤0.001 b≤0.001
ACR+SEL	0.79±0.15	c=0.033	7.89±1.25	c=0.022	1.07±0.25	c=0.003

Values are presented as means ± SD. The relationships between groups and results of oxidative stress markers are assessed by One-way ANOVA test (post hoc LSD test). TAS: Total Antioxidant Status TOS: Total Oxidant Status, OSI: Oxidative stress index, ACR: Acrylamide, SEL: Selenium. a: Compared with the control group, b: Compared with the SEL group, c: compared with the ACR group.

the ACR+SEL group was compared with the ACR group, it was observed that there was a significant decrease in TOS and OSI levels (p=0.022 and p=0.003, respectively) (Table 3).

### Histopathological Results

No histopathological findings were found in the sections belonging to the control group and SEL groups (Figure 1A, 1B). Disorganization in cardiac muscle fibers, increased connective tissue between muscle fibers and irregular eosinophilia in muscle fibers were detected in sections belonging to the ACR

group (Figure 1C). A decrease in histopathological findings was observed in the ACR+SEL group compared to the ACR group (Figure 1D). The findings are summarized in Table 4.

### Immunohistochemical Results

iNOS immunoreactivities were not observed in heart tissue of control and SEL group (Figure 2A, 2B). Moderate marking was observed in the ACR group sections, while poor marking was observed in the ACR + SEL group (Figure 2C, 2D).

Table 4 Histopathological Findings

Parameters / Group	Control	SEL	ACR	ACR+SEL
Disorganization of muscle fibers	-	-	+++	+
Increased connective tissue between muscle fibers	-	-	+++	+
Irregular eosinophilia in fibers	-	-	+++	+
Mononuclear cell infiltration	-	-	-	-

ACR: Acrylamide, SEL: Selenium.

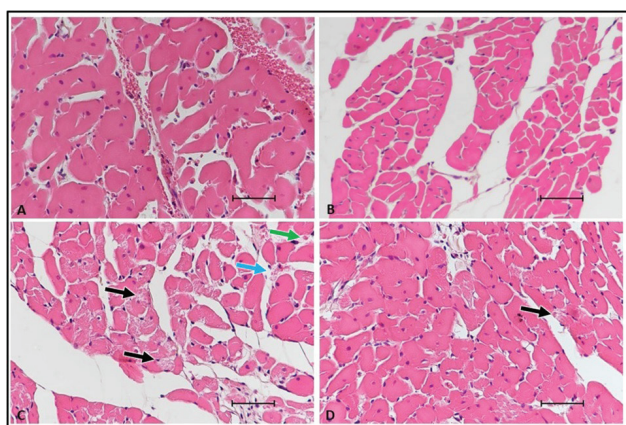


Figure 1:

Heart tissue histopathology between the groups. (A) Normal heart tissue structure in the control group, (B) SEL group normal heart tissue histology, (C) ACR group disorganization in muscle fibers (black arrow), increase in connective tissue between muscle fibers (blue arrow) and irregular eosinophilia in heart tissue (green arrow), (D) Low level histopathological findings in the ACR+SEL group. ACR: Acrylamide, SEL: Selenium, HE, Bar 50 µm, 40x

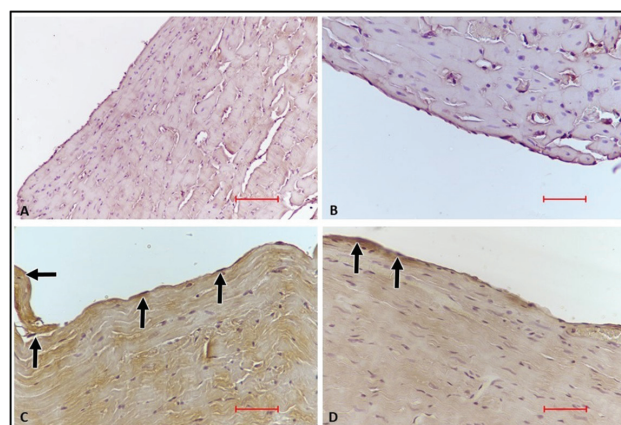


Figure 2:

iNOS immunoreaction of the hearts. (A) No immunoreaction in the control group, (B) SEL group no immunoreactivity, (C) Moderate immunoreactivity in the ACR group (black arrow), (D) Low level of immunoreactivity in the SEL+ACR group. ACR: Acrylamide, SEL: Selenium, iNOS: Inducible Nitric Oxide Synthase, Scale Bar 50 µm, 40x.

## Discussion

ACR is a water-soluble unsaturated amide used in the production of polyacrylamides (28). Orally taken into the body, ACR passes through many organs through the circulatory system and causes toxic effects by reacting with DNA and various enzymes (29, 30). ACR is not a toxic substance by itself, it is oxidized by the CYP2E1 enzyme to activate a genotoxic metabolite, glydamide (31, 32). It has been shown in many studies that ACR, which has become widespread in use with the development of industrialization in recent years, is common in fast-food style foods, has carcinogenesis relationship and genotoxic effects (33, 34).

SEL is an important antioxidant enzyme and has an active role in the immune system (35). It performs

this antioxidant function with the GSH-Px enzyme system, by eliminating harmful radicals released as a result of oxidative stress (36, 37). There are many animal studies showing that SEL, which is frequently encountered in foods, especially in grains, meat and seafood, plays an active role in preventing and reducing cancer cases caused by radiation and various chemical carcinogens (38). In the light of this information, we investigated the toxic effects of ACR on heart tissue and whether SEL, known as an antioxidant element, has a protective effect on these tissues.

First of all, we found that CKMB, LDH and IMA levels, which are markers of cardiac damage for the damaged heart tissue, increased significantly in the ACR group compared to the other groups. In the study conducted

by Kushwah et al., it was observed that similar results were found with our study and that ACR increased the levels of cardiac damage markers by causing damage to the heart tissue (39). As a result of these studies, the existence of cardiotoxic effects of ACR on heart tissue can be considered, and our study may be a guide to investigate the cardiotoxic effect of ACR on other living things, especially humans. In addition, when we compared the treatment group with the ACR group, we observed a significant decrease in CKMB, LDH and IMA levels in ACR + SEL group. Güneş et al. investigated the cardioprotective effects of SEL against cyclophosphamide-induced cardiotoxic effects in rats, they found that the activities of these enzyme markers decreased significantly in the SEL treated group (15). In recent studies, the anti-inflammatory activity of selenium with similar markers is in parallel with our study (40,41). Considering these similar results in this study, SEL may have an anti-inflammatory effect against the damage caused by various agents and the inflammation caused by this damage.

In this study, ACR not only led to an increase in biochemical marker levels, but also histopathological, it caused some changes such as disorganization in cardiac muscle fibers, increased connective tissue between muscle fibers and irregular eosinophilia in muscle fibers. Again, in the study of Kushwah et al., increased inflammatory cell infiltration, loss of myocardial tissue and interstitial spaces trying to fill its place, nuclear loss and vacuolization in the heart tissues of rats in the ACR group were shown (39). Considering the histopathological changes caused by ACR on the cardiac tissue in other studies in the literature, especially the cause of myocardial dysfunction shows that similar histopathological findings have emerged through different mechanisms in our study (42, 43). In addition, similar to the result in the study of Soudani et al., a decrease in histopathological findings was observed in the treatment group compared to the ACR group (44).

Oxidative stress occurs due to impaired defense mechanisms in the body and uncontrolled increase in ROS amounts. TAS is a parameter that shows the function of antioxidants in preventing the formation of free radicals in the body. However, TOS is a parameter that shows the severity of oxidative stress in the body and the total peroxide amount of macromolecules at the tissue and cell level (45).

OSI is also defined as a general indicator of oxidative stress showing the ratio of TOS levels to TAS levels (46). In this study, the reason for the decrease of

TAS levels may be due to the depletion of antioxidant enzymes as a result of the usage or less production. Similar to this study, Taşkın et al. investigated the protective effect of SEL on Adriamycin-induced damage in rats, and it was shown that the groups given SEL caused an increase in mitochondrial and cytosolic TAS levels compared to other groups with toxic agents causing oxidative stress (47). TOS and OSI levels also increased significantly in the ACR group as a result of the comparison with other groups. In a study conducted by Dönmez et al. on ACR-induced liver toxicity, it was found that TOS and OSI values reached the highest levels in the ACR group (48). In another study by Huang et al. investigating ACR-induced oxidative stress and cardiovascular toxicity in zebrafish embryos, they found that ROS levels increased significantly in the ACR group compared to the other groups (3). It has been supported that ACR causes oxidative stress in different studies (49,50). When we evaluate the results of these studies together with the results of our own study, it can be concluded that ACR has toxic effects on various tissues by increases of oxidative stress parameters and SEL reversed all these parameters.

NO, which is released in excessive amounts as a result of the overexpression of iNOS, which is required in normal physiological processes, plays a role in inflammatory processes and sepsis (51). When we examined the immunohistochemical results of our study, an increase in iNOS immunoreactivity was observed in the ACR group in cardiac tissue similar with literature. For example, in a study by Wei et al. using ACR in female mice, it was shown that iNOS immunoreactivity were significantly increased in ovaries (52). In another study examining the levels of NOS subtypes after ACR exposure in rat brain tissue, iNOS levels were found to be higher in the rat group given subacute ACR (53). However, there is no study in the literature about iNOS levels in a rat heart exposed to ACR. Studies on different tissues found that SEL reduced iNOS levels compared to the damage groups (54,55). The decrement of iNOS expressions in SEL treated groups showed that SEL has an anti-inflammatory effect against ACR induced cardiac damage.

In this study, we aimed to examine the toxic effect of ACR on the heart tissue, which has become increasingly widespread in industrial areas and foodstuffs in recent years. According to results, ACR caused damage to the heart tissue through the enhancement of inflammatory and oxidant conditions, SEL treatment reversed all these pathological findings. In the light of the data in the literature, more animal

and human studies are needed to evaluate the cardiotoxic effects of ACR with known carcinogenic and genotoxic effects on rats. In addition, sensitivity should be shown to minimize the use of ACR in the industrial field. However, further studies are needed to support that the SEL element, which has an active role in the immune system, is also protective on the cardiotoxic effects of ACR.

### Conflict of Interest Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

### Ethical Approval

Our study was approved by the Animal Research Ethics Committee of Suleyman Demirel University (21/10/2020 08-06).

### Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### Availability of Data and Materials

Authors can confirm that all relevant data are included in the article and/or its supplementary information files. Data sharing not applicable.

### Authors Contributions

NFK: Conceptualization; Data curation; Funding acquisition; Formal analysis; Investigation; Methodology; Validation; Visualization; Writing-original draft.

HA: Conceptualization; Formal analysis; Investigation; Methodology; Project administration; Supervision; Writing-review & editing.

MS: Conceptualization; Formal analysis; Investigation; Methodology; Project administration; Validation; Writing-review & editing.

KG: Formal analysis; Investigation; Methodology; Validation; Writing-review & editing.

### Editorial

Although MS and KG are editorial board members of the journal, they have not taken part in any stage of the publication processes of this article.

### References

- Semla M, Goc Z, Martiniaková M, Omelka R, Formicki G. Acrylamide: a common food toxin related to physiological functions and health. *Physiological research*. 2017;66(2):205-17.
- Smith CJ, Perfetti TA, Rumble MA, Rodgman A, Doolittle DJ. "IARC group 2A Carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke. *Food Chem Toxicol*. 2000;38(4):371-83.
- Huang M, Jiao J, Wang J, Xia Z, Zhang Y. Characterization of acrylamide-induced oxidative stress and cardiovascular toxicity in zebrafish embryos. *Journal of hazardous materials*. 2018;347:451-60.
- Marković J, Stošić M, Kojić D, Matavulj M. Effects of acrylamide on oxidant/antioxidant parameters and CYP2E1 expression in rat pancreatic endocrine cells. *Acta histochemica*. 2018;120(2):73-83.
- Ali MA, Aly EM, Elawady AI. Effectiveness of selenium on acrylamide toxicity to retina. *International journal of ophthalmology*. 2014;7(4):614-20.
- Pan X, Wu X, Yan D, Peng C, Rao C, Yan H. Acrylamide-induced oxidative stress and inflammatory response are alleviated by N-acetylcysteine in PC12 cells: Involvement of the crosstalk between Nrf2 and NF-κB pathways regulated by MAPKs. *Toxicology letters*. 2018;288:55-64.
- Agarwal R, Behari JR. Effect of selenium pretreatment in chronic mercury intoxication in rats. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. 2007;79(3):306-10.
- Broome CS, McArdle F, Kyle JA, Andrews F, Lowe NM, Hart CA, et al. An increase in selenium intake improves immune function and poliovirus handling in adults with marginal selenium status. *The American journal of clinical nutrition*. 2004;80(1):154-62.
- Gouazé V, Mirault ME, Carpentier S, Salvayre R, Levade T, Andrieu-Abadie N. Glutathione peroxidase-1 overexpression prevents ceramide production and partially inhibits apoptosis in doxorubicin-treated human breast carcinoma cells. *Molecular pharmacology*. 2001;60(3):488-96.
- Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomed Pharmacother*. 2003;57(3-4):134-144.
- Gunes S, Sahinturk V, Uslu S, Ayhanci A, Kacar S, Uyar R. Protective Effects of Selenium on Cyclophosphamide-Induced Oxidative Stress and Kidney Injury. *Biol Trace Elem Res*. 2018;185(1):116-123.
- Duntas LH. Selenium and inflammation: underlying anti-inflammatory mechanisms. *Horm Metab Res*. 2009;41(6):443-7.
- Ahrens I, Ellwanger C, Smith BK, Bassler N, Chen YC, Neudorfer I, et al. Selenium supplementation induces metalloproteinase-dependent L-selectin shedding from monocytes. *J Leukoc Biol*. 2008;83(6):1388-95.
- Cao YZ, Weaver JA, Reddy CC, Sordillo LM. Selenium deficiency alters the formation of eicosanoids and signal transduction in rat lymphocytes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2002;70(1-2):131-43.
- Gunes S, Sahinturk V, Karasati P, Sahin IK, Ayhanci A. Cardioprotective Effect of Selenium Against Cyclophosphamide-Induced Cardiotoxicity in Rats. *Biological trace element research*. 2017;177(1):107-14.
- Dayal S, Blokhin IO, Erger RA, Jensen M, Arning E, Stevens JW, et al. Protective vascular and cardiac effects of inducible nitric oxide synthase in mice with hyperhomocysteinemia. *PLoS One*. 2014;9(9):e107734.
- Shah AM. Inducible nitric oxide synthase and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*. 2000;45(1):148-55.
- Viaro F, Nobre F, Evora PR. Expression of nitric oxide synthases in the pathophysiology of cardiovascular diseases. *Arq Bras Cardiol*. 2000;74(4):380-93.
- Lee J, Bae EH, Ma SK, Kim SW. Altered Nitric Oxide System in Cardiovascular and Renal Diseases. *Chonnam Med J*. 2016;52(2):81-90.
- Lind M, Hayes A, Caprnda M, Petrovic D, Rodrigo L, Kruzliak P, et al. Inducible nitric oxide synthase: Good or bad? *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2017;93:370-5.
- Varadharaj S, Porter K, Pleister A, Wannemacher J, Sow A, Jarjoura D, et al. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling: a novel pathway in OSA induced vascular endothelial dysfunction.

- tion. *Respir Physiol Neurobiol.* 2015;207:40-7.
22. Ghorbel I, Chaâbane M, Boudawara O, Kamoun NG, Boudawara T, Zeghal N. Dietary unsaponifiable fraction of extra virgin olive oil supplementation attenuates lung injury and DNA damage of rats co-exposed to aluminum and acrylamide. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2016;23(19):19397-408.
  23. Ghorbel I, Khemakhem M, Boudawara O, Marrekchi R, Jamoussi K, Ben Amar R, et al. Effects of dietary extra virgin olive oil and its fractions on antioxidant status and DNA damage in the heart of rats co-exposed to aluminum and acrylamide. *Food Funct.* 2015;6(9):3098-108.
  24. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
  25. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem.* 2004;37(4):277-85.
  26. Karakus E, Halici Z, Albayrak A, Polat B, Bayir Y, Kiki I, et al. Agomelatine: an antidepressant with new potent hepatoprotective effects on paracetamol-induced liver damage in rats. *Hum Exp Toxicol.* 2013;32(8):846-57.
  27. Nežić L, Škrbić R, Amidžić L, Gajanin R, Kuča K, Jačević V. Simvastatin Protects Cardiomyocytes Against Endotoxin-induced Apoptosis and Up-regulates Survivin/NF-κB/p65 Expression. *Sci Rep.* 2018;8(1):14652.
  28. United States Environmental Protection Agency. National primary drinking water regulations [Internet]. EPA USA. 2009 [cited 8 August 2022]. Available from: [https://www.epa.gov/sites/default/files/2016-06/documents/npwdr\\_complete\\_table.pdf](https://www.epa.gov/sites/default/files/2016-06/documents/npwdr_complete_table.pdf)
  29. Baum M, Loepky RN, Thielen S, Eisenbrand G. Genotoxicity of glycidamide in comparison to 3-N-nitroso-oxazolidin-2-one. *J Agric Food Chem.* 2008;56(15):5989-93.
  30. Rayburn JR, Friedman M. L-cysteine, N-acetyl-L-cysteine, and glutathione protect *Xenopus laevis* embryos against acrylamide-induced malformations and mortality in the frog embryo teratogenesis assay. *J Agric Food Chem.* 2010;58(20):11172-8.
  31. Doerge DR, Gamboa da Costa G, McDaniel LP, Churchwell MI, Twaddle NC, Beland FA. DNA adducts derived from administration of acrylamide and glycidamide to mice and rats. *Mutat Res.* 2005;580(1-2):131-141.
  32. Ghanayem BI, McDaniel LP, Churchwell MI, Twaddle NC, Snyder R, Fennell TR, et al. Role of CYP2E1 in the epoxidation of acrylamide to glycidamide and formation of DNA and hemoglobin adducts. *Toxicol Sci.* 2005;88(2):311-318.
  33. Klaunig JE. Acrylamide carcinogenicity. *J Agric Food Chem.* 2008;56(15):5984-5988.
  34. Mei N, McDaniel LP, Dobrovolsky VN, Guo X, Shaddock JG, Mittelstaedt RA, et al. The genotoxicity of acrylamide and glycidamide in big blue rats. *Toxicol Sci.* 2010;115(2):412-421.
  35. Arthur JR, McKenzie RC, Beckett GJ. Selenium in the Immune System. *J Nutr.* 2003;133(5):1457S-9S.
  36. Maggini S, Wintergerst ES, Beveridge S, Hornig DH. Selected vitamins and trace elements support immune function by strengthening epithelial barriers and cellular and humoral immune responses. *Br J Nutr.* 2007;98 Suppl 1:S29-S35.
  37. Zeng H. Selenium as an essential micronutrient: roles in cell cycle and apoptosis. *Molecules.* 2009;14(3):1263-1278.
  38. Tinggi U. Selenium: its role as antioxidant in human health. *Environ Health Prev Med.* 2008;13(2):102-108.
  39. Kushwah A, Boreddy Shivanandappa T, Singh T. Quercetin Attenuates Oxidative Stress, Inflammation and Cardiac Dysfunction in Acrylamide-Induced Cardiotoxicity. *Acta Pol Pharm - Drug Res.* 2020;77.
  40. Malyar RM, Naseri E, Li H, Ali I, Farid RA, Liu D, et al. Hepatoprotective Effects of Selenium-Enriched Probiotics Supplementation on Heat-Stressed Wistar Rat Through Anti-Inflammatory and Antioxidant Effects. *Biol Trace Elem Res.* 2021;199(9):3445-3456.
  41. İlhan I, Asci H, Tepebasi MY, İmeci OB, Sevuk MA, Temel EN, et al. Selenium exerts protective effects on inflammatory cardiovascular damage: molecular aspects via SIRT1/p53 and Cyt-c/Cas-3 pathways. *Mol Biol Rep.* 2023;50(2):1627-1637.
  42. Walters B, Hariharan V, Huang H. Dietary levels of acrylamide affect rat cardiomyocyte properties. *Food Chem Toxicol.* 2014;71:68-73.
  43. Abdel-Moneim AM, Elsayy H, Alzahrani AM, Ali A, Mahmoud O. Silymarin Ameliorates Acrylamide-Induced Hyperlipidemic Cardiomyopathy in Male Rats. *Biol Med Res Internat.* 2019;2019:4825075
  44. Soudani N, Troudi A, Bouaziz H, Ben Amara I, Boudawara T, Zeghal N. Cardioprotective effects of selenium on chromium (VI)-induced toxicity in female rats. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2011;74(3):513-520.
  45. Onopiuk B, Onopiuk P, Dąbrowska Z, Dąbrowska E, Pietruska M, Car H. Effect of Metronidazole on the Oxidoreductive Processes in the Submandibular and Parotid Glands in Experimental Research. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:7083486.
  46. Yuksel M, Ates I, Kaplan M, et al. Is Oxidative Stress Associated with Activation and Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease?. *J Med Biochem.* 2017;36(4):341-348.
  47. Taskin E, Dursun N. The protection of selenium on adriamycin-induced mitochondrial damage in rat. *Biol Trace Elem Res.* 2012;147(1-3):165-171.
  48. Donmez DB, Kacar S, Bagci R, Sahinturk V. Protective effect of carnosic acid on acrylamide-induced liver toxicity in rats: Mechanistic approach over Nrf2-Keap1 pathway [published online ahead of print, 2020 May 8]. *J Biochem Mol Toxicol.* 2020;e22524.
  49. Farag OM, Abd-Elsalam RM, Ogaly HA, Ali SE, El Badawy SA, Alsherbiny MA, et al. Metabolomic Profiling and Neuroprotective Effects of Purslane Seeds Extract Against Acrylamide Toxicity in Rat's Brain. *Neurochem Res.* 2021;46(4):819-842.
  50. Kacar S, Sahinturk V, Tomsuk O, Kutlu HM. The effects of thymoquinone and quercetin on the toxicity of acrylamide in rat glioma cells. *J Biochem Mol Toxicol.* 2022;36(4):e22992.
  51. Cinelli MA, Do HT, Miley GP, Silverman RB. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Med Res Rev.* 2020;40(1):158-189.
  52. Wei Q, Li J, Li X, Zhang L, Shi F. Reproductive toxicity in acrylamide-treated female mice. *Reprod Toxicol.* 2014;46:121-128.
  53. Kim K. Effect of subchronic acrylamide exposure on the expression of neuronal and inducible nitric oxide synthase in rat brain. *J Biochem Mol Toxicol.* 2005;19(3):162-168.
  54. Tian LP, Zhang S, Xu L, Li W, Wang Y, Chen SD, et al. Selenite benefits embryonic stem cells therapy in Parkinson's disease. *Curr Mol Med.* 2012;12(8):1005-1014.
  55. Kassab RB, Elbaz M, Oyouni AAA, Mufti AH, Theyab A, Al-Bra-kati A, et al. Anticolitic activity of prodigiosin loaded with selenium nanoparticles on acetic acid-induced colitis in rats. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2022;29(37):55790-55802.



## SRY GENİNİN PARKİNSON HASTALIĞINDAKİ POTANSİYEL ROLÜNÜN İN SİLİKO ANALİZİ

### IN SILICO ANALYSIS OF THE POTENTIAL ROLE OF SRY GENE IN PARKINSON'S DISEASE

Muhammet AY<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi, Rafet Kayış Mühendislik Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Antalya, TÜRKİYE

**Cite this article as:** Ay M. SRY Geninin Parkinson Hastalığındaki Potansiyel Rolünün İn Siliko Analizi. Med J SDU 2023; 30(1): 19-24.

#### Öz

##### Amaç

Parkinson hastalığı (PH) en sık görülen hareket hastalığıdır ve substansiya nigra bölgesindeki dopaminerjik nöronların kaybindan kaynaklanmaktadır. PH'nin ilk motor semptomları ortaya çıkmaya başladığında dopaminerjik nöronların %60'ından fazlası zaten ölmüştür. PH'nin etiyolojisi tam olarak anlaşılmamış olsa da, PH'nin genetik ve çevresel faktörler arasındaki kompleks etkileşimler sonucu oluştuğuna inanılmaktadır. Önceki çalışmalar erkeklerin PH'ye yakalanma olasılığının kadınlara göre en az 1,5 kat daha fazla olduğunu göstermiştir. Bu çalışma, bir Y kromozomu geni olan SRY'nin PH'nin patogenezinde bir rol oynayıp oynamadığını in silico yöntemlerle araştırmayı amaçlamıştır.

##### Gereç ve Yöntem

Farklı insan dokularındaki SRY mRNA ekspresyonu İnsan Protein Atlas (HPA)'yı kullanarak analiz edilmiştir. SRY ve PH ile ilişkili genler arasındaki etkileşimler STRING ve GeneMANIA veri tabanlarını kullanarak incelenmiştir. JASPAR veri tabanı, PH ile ilişkili bazı genlerin promotör bölgelerindeki muhtemel SRY bağlanma noktalarını belirlemek için kullanılmıştır. Son olarak, SRY ile etkileşim halindeki anahtar genleri belirlemek için BioGRID ve GeneMANIA veri tabanları kullanılmıştır.

##### Bulgular

İn siliko analizler PH ile ilişkili bazı genlerin promotör bölgelerinde SRY bağlanma noktası olduğunu ve SRY'nin androjen reseptör (AR) sinyalini düzenleyebileceğini ortaya çıkarmıştır.

##### Sonuç

Bu bulgular SRY'nin PH'nin patogenezinde rol oynayabileceğini ve bundan dolayı da PH'ye karşı yeni terapötik stratejiler geliştirmek için moleküler bir hedef vazifesi görebileceğini önermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Ekspresyon, İn siliko, Parkinson hastalığı, Promotör, SRY

##### Abstract

##### Objective

Parkinson's disease (PD) is the most common movement disorder and is caused by the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra. The first motor symptoms of PD begin to appear when more than 60% of dopaminergic neurons are already lost. Although the etiology of PD is not fully understood, PD is believed to result from the complex interactions between genetic and environmental factors. Previous studies demonstrated that men are at least 1.5 times more likely to develop PD than women. The current

**Sorumlu yazar ve iletişim adresi /Corresponding author and contact address:** M.A. / muhammet.ay@alanya.edu.tr

**Müracaat tarihi/Application Date:** 25.08.2022- **Kabul tarihi/Accepted Date:** 14.11.2022

**ORCID IDs of the authors:** M.A: 0000-0003-1179-593X

study aimed to investigate whether SRY, a chromosome gene, plays a role in the pathogenesis of PD using in silico methods.

### Material and Method

The mRNA expression of SRY in different human tissues was analyzed using the Human Protein Atlas (HPA). The interactions between SRY and PD-related genes were analyzed using the STRING and GeneMANIA databases. The JASPAR database was used to determine the putative binding sites of SRY in the promoter regions of some PD-related genes. Finally, the BioGRID and GeneMANIA databases were used to identify the key genes that interact with SRY.

### Results

In silico analyses revealed that there are SRY binding sites in the promoter regions of some PD-associated genes and that SRY can regulate androgen receptor (AR) signaling.

### Conclusion

These findings suggest that SRY may play a role in the pathogenesis of PD and may thus serve as a molecular target for developing new therapeutic strategies against PD.

**Keywords:** In silico, Expression, Parkinson's disease, Promoter, SRY

## Giriş

Parkinson hastalığı (PH) Alzheimer hastalığından sonra en sık görülen nörodejeneratif hastalıktır ve dünya genelinde 10 milyonu aşkın insanı etkilemektedir (1). PH'nin görülme sıklığı 60 yaş üzeri popülasyonda yaklaşık %1'dir, fakat ortalama yaşam süresinin artmasından dolayı hastalığın görülme sıklığının da ciddi oranda artması öngörülmektedir (2). Epidemiyolojik çalışmalar PH'nin erkeklerde kadınlara göre en az 1,5 kat daha fazla görüldüğünü göstermektedir (3). PH'de titreme, bradikinezi, rijidite, denge ve duruş bozuklukları gibi motor semptomların yanında, uyku bozuklukları, kabızlık, koku duyusunun kaybı, depresyon ve konuşma bozuklukları gibi motor-olmayan semptomlar da sıklıkla gözlenmektedir (4, 5). Beynin substansiya nigra bölgesindeki dopaminerjik nöronların kaybı ve striatumdaki dopamin miktarının ciddi miktarda azalması PH'nin başlıca patolojik özelliğidir (6). Hastağın etiyojisi hala belirsizliğini korusa da, genetik ve çevresel faktörler birlikte veya ayrı ayrı oksidatif stress, mitokondriyal disfonksiyon ve nöroinflamasyon gibi moleküler mekanizmaları uyararak dopaminerjik nöronların dejenerasyonuna katkıda bulunmaktadırlar (7).

PH'nin erkeklerde kadınlara oranla daha fazla görülmesinin nedenleri hala tam olarak bilinmemektedir. Muhtemel nedenler arasında, östrojenin nöronları koruyucu etkisi, erkeklerin PH'ye neden olan çevresel faktörlere daha fazla maruz kalması ve cinsiyet kromozomlarına bağlı genetik farklılıklar yer almaktadır (8). Erkeklerin hastalığa karşı daha hassas olmasından Y kromozomunda bulunan bazı genler sorumlu olabilir. Y kromozomu üzerinde bulunan SRY (cinsiyet belirleyici bölge Y proteini), transkripsiyon faktörü

olarak görev yapan bir genidir (9). SRY'nin dopaminerjik nöronlarda eksprese olduğu (10) ve bu genin ekspresyonunu inhibe etmenin PH'nin deneysel bir modelinde koruyucu etkiler sağladığı daha önce gösterilmiştir (11). Mevcut bilgiler ışığında, bu çalışma SRY'nin PH'de gözlenen cinsiyet farklılığındaki olası rolünü in silico yöntemlerle analiz etmeyi amaçlamıştır. SRY ve PH ile ilişkili genler arasındaki etkileşimlerin analizinden elde edilen sonuçlar, SRY'nin PH ile ilişkili bazı genlerin promotör bölgelerinde muhtemel bağlanma noktaları olduğunu ve SRY'nin bu genlerin ekspresyonunu düzenlemede rol oynayabileceğini ortaya çıkarmıştır.

## Gereç ve Yöntem

### Doku Spesifik SRY Gen Ekspresyonu Analizi

Normal insan dokularındaki SRY RNA ekspresyonu profili Human Protein Atlas veri tabanını kullanarak Consensus veri setinden elde edilmiştir (<https://www.proteinatlas.org/>) (12).

### SRY ile Diğer Genler Arasındaki Etkileşim Ağlarının Analizi

SRY ve PH ile ilişkilendirilmiş olan genler arasındaki etkileşimler STRING (<https://string-db.org/>) ve GeneMANIA (<https://genemania.org/>) veri tabanlarını kullanarak analiz edildi. STRING proteinler arasındaki fiziksel ve fonksiyonel etkileşimleri ortaya çıkarmada yaygın olarak kullanılan bir veri tabanıdır (13). GeneMANIA işlevsel olarak benzer genleri tespit edebilmek, genlerin fonksiyonlarını anlayabilmek ve genler arasındaki etkileşimleri göstermek amacıyla kullanılan bir veri tabanıdır (14). SRY geninin etkileşim halinde olduğu diğer genler ise GeneMANIA ve BioGRID (<https://thebiogrid.org/>) veri tabanlarını kul-



lanarak ortaya çıkarıldı. BioGRID proteinler, genler ve kimyasallar arasındaki etkileşimlerin depolandığı bir veri tabanıdır (15).

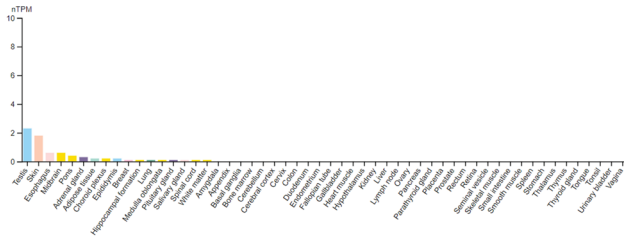
### İn Siliko Promotör Analizi

PH ile doğrudan ilişkilendirilmiş olan genlerin bazı- larının promotör dizilerine Ökaryotik Promotör Veri Tabanı (<https://epd.epfl.ch//index.php>) üzerinden ula- şılmıştır (16). JASPAR CORE veri tabanı kullanıla- rak genlerin transkripsiyon başlangıç noktasına göre -1000 ve +100 baz çifti arasındaki promotör bölge- lerinde yer alan potansiyel SRY bağlanma noktaları ortaya çıkarılmıştır. SRY bağlanma noktaları belirle- nirken varsayılan p değeri 0.001 kullanılmıştır.

## Bulgular

### İnsan Dokularında SRY Geninin RNA Ekspresyonu Profili

SRY geninin PH'deki potansiyel rolünü anlayabilmek için, ilk olarak normal insan dokularındaki SRY RNA ekspresyonu profili Human Protein Atlas veri tabanını kullanarak analiz edilmiştir. Şekil 1'de görüldüğü gibi SRY ekspresyonu dokularda büyük farklılıklar göster- mektedir. Diğer dokularla kıyaslandığında, SRY eks- presyonu en yüksek olan dokular sırasıyla testis, deri, özofagus ve orta beyin olarak gözlenmiştir.



**Şekil 1:**

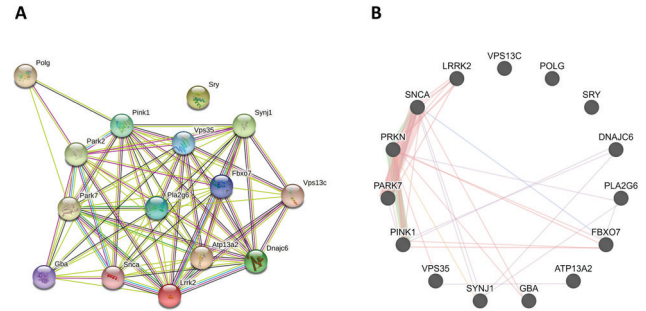
### İnsan dokularında SRY ekspresyonu profili. SRY geninin insan dokularındaki RNA ekspresyonu profili

Consensus veri seti kullanılarak Human Protein Atlas veri tabanından elde edilmiştir (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000184895-SRY/tissue>). Dokulardaki SRY eks- presyonu seviyeleri nTPM (milyon başına normalize edilmiş protein kodlayan transkript) olarak gösterilmiştir.

### SRY ve PH ile İlişkili Genler Arasındaki Etkileşimlerin İncelenmesi

SRY geninin farklı dokulardaki ekspresyonu ana- liz edildikten sonra, PH ile doğrudan ilişkilendirilmiş olan genlerle herhangi bir etkileşiminin olup olmadığı STRING ve GeneMANIA veri tabanlarını kullanarak incelenmiştir. Bu zamana kadar 20'den fazla gende meydana gelen mutasyonlar PH ile ilişkilendirilmesi-

ne rağmen, bu genlerden bazılarının PH ile ilişkisi ko- nusunda çelişkili raporlar bulunmaktadır ve patojenik rolleri belirsizliğini korumaktadır (17). STRING ve Ge- neMANIA veri tabanlarında yapılan analizlere PH ile ilişkisi doğrulanmış olan genler dahil edilmiştir. Her iki veri tabanında da yapılan analizler sonucunda SRY ve PH ile ilişkili genler arasında şu ana kadar saptan- mış herhangi bir fiziksel veya fonksiyonel etkileşimin olmadığı ortaya çıkarılmıştır (Şekil 2A ve 2B).



**Şekil 2:**

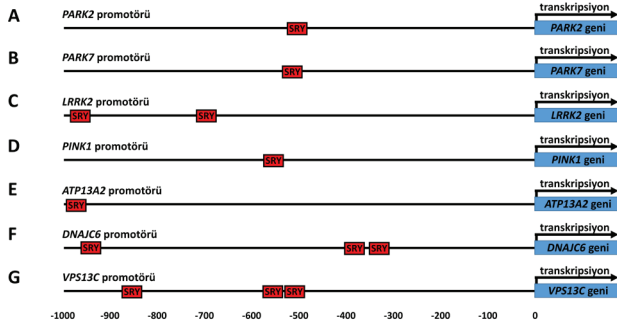
### SRY ve PH ile ilişkilendirilmiş genler arasındaki etkileşim ağları.

A, protein-protein etkileşim ağı STRING veri tabanını kul- lanılarak analiz edilmiştir. STRING analizi yapılırken çok- lu protein sekmesi seçildikten sonra input bölümüne SRY ve PH ile ilişkili 15 genin isimleri girilmiştir ve organizma olarak Mus musculus seçilmiştir. B, gen-gen etkileşim ağı GeneMANIA veri tabanını kullanarak analiz edilmiştir. Ge- neMANIA analizinde input bölümüne SRY ve PH ile ilişkili 15 genin isimleri girilmiştir ve ayarlar kısmındaki maksimum oluşacak genler bölümüne sıfır girilmiştir.

### PH ile İlişkili Genlerin Promotör Bölgelerindeki Potansiyel SRY Bağlanma Noktalarının Analizi

SRY hem aktivatör hem de represör olarak davra- nabilen bir transkripsiyon faktörüdür. Her ne kadar STRING ve GeneMANIA analizleri sonucunda SRY ve PH ile ilişkili genler arasında şu ana kadar saptan- mış bir ilişki bulunamamış olsa da, burada SRY geninin PH ile ilişkili genlerin ekspresyonunda bir düzenleyici rolünün olup olmadığı araştırılmak isten- miştir. Bunun için, PH ile ilişkisi doğrulanmış genle- rin promotör bölgelerinde SRY bağlanma noktasının olup olmadığı incelenmiştir. Genlerin promotör dizi- leri Ökaryotik Promotör Veri Tabanı'ndan indirilmiş ve JASPAR CORE veri tabanını kullanarak genlerin promotör bölgelerindeki muhtemel SRY bağlanma noktaları araştırılmıştır. Yapılan analizler sonucunda, SNCA (alfa-sinüklein), VPS35 (vakuolar protein sıra- lama ortologu 35) ve SYNJ1 (sinaptojanin 1) genleri- nin promotör bölgelerinde SRY bağlanma noktasının olmadığı ortaya çıkarılmıştır. Diğer taraftan PARK2 (parkin), PARK7 (DJ-1), LRRK2 (lösin bakımından

zengin tekrar kinaz 2), PINK1 (PTEN ile indüklenen kinaz 1), ATP13A2 (ATPaz katyon taşıyan 13A2), DNAJC6 (DnaJ ısı şoku proteinleri ailesi üyesi C6) ve VPS13C (vakuolar protein sıralama 13 homologu C) genlerinin promotör bölgelerinde en az bir tane muhtemel SRY bağlanma noktasının olduğu gözlenmiştir (Şekil 3). Yapılan bu analizler, SRY'nin PH ile doğrudan ilişkilendirilmiş bazı genlerin ekspresyonunda aktivatör veya represör olarak bir düzenleyici rolünün olabileceğini göstermektedir.



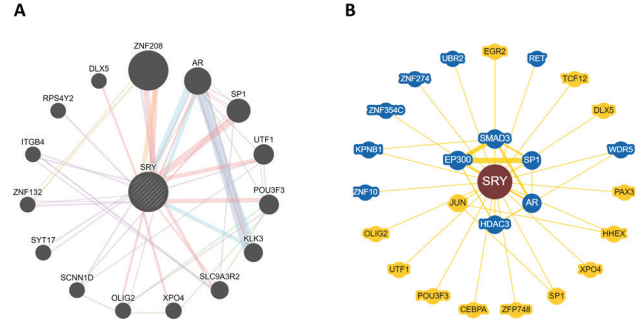
Şekil 3:

#### PH ile ilişkilendirilmiş bazı genlerin promotör bölgelerindeki potansiyel SRY bağlanma noktaları.

PH ile doğrudan ilişkilendirilmiş olan bazı genlerin promotör dizilerine Ökaryotik Promotör Veri Tabanı (<https://epd.epfl.ch/index.php>) üzerinden ulaşılmıştır. JASPAR veri tabanını kullanarak PARK2 (A), PARK7 (B), LRRK2 (C), PINK1 (D), ATP13A2 (E), DNAJC6 (F) ve VPS13C (G) genlerinin promotör bölgelerindeki SRY bağlanma noktaları varsayılan p değeri olan 0.001 kullanılarak ortaya çıkarılmıştır.

#### SRY ile Etkileşim Halinde Olabilecek Diğer Genlerin Analizi

Burada, SRY geninin etkileşim halinde olduğu başlıca genlerin GeneMANIA ve BioGRID veri tabanlarını kullanarak belirlenmesi ve SRY'nin etkileşim halinde olduğu bu genlerin PH'nin patogenezinde dolaylı bir rolünün olup olmadığının incelenmesi amaçlanmıştır. GeneMANIA veri tabanında yapılan analizler, SRY'nin en çok etkileşim halinde olduğu genlerin ZNF208 (çinko parmak protein 208) ve AR (androjen reseptörü) olduğunu ortaya çıkarmıştır (Şekil 4A). BioGRID ile yapılan analizler sonucunda da AR'nin SRY ile en çok etkileşim halinde olan genlerden birisi olduğu gözlenmiştir (Şekil 4B). SRY'nin AR'nin transkripsiyonel aktivitesini negatif olarak düzenlediği daha önce gösterilmiştir (18). Androjenin PH'de koruyucu etkisinin olup olmadığı tam olarak anlaşılamasa da, AR sinyalinin beyinde BDNF ekspresyonunu ve nörogenezi artırabilme özelliğinin bulunması AR sinyal aktivasyonunun terapötik potansiyeli olabileceğine işaret etmektedir (19). Bu yüzden, SRY AR ekspresyonunu düşürerek PH'nin patogenezinde dolaylı olarak rol oynayabilir.



Şekil 4:

#### SRY ve diğer genler arasındaki etkileşim ağları.

SRY geninin etkileşim ağları GeneMANIA (A) ve BioGRID (B) veri tabanlarını kullanarak analiz edilmiştir. GeneMANIA analizinde input bölümüne sadece SRY geninin ismi girilmiştir ve ayarlar kısmındaki maksimum oluşacak genler bölümüne 15 girilmiştir. BioGRID analizinde input bölümüne SRY geninin ismi girilmiştir ve organizma olarak da Homo sapiens seçilerek SRY'nin diğer genlerle olan etkileşim ağı ortaya çıkarılmıştır.

#### Tartışma

PH, dünya genelinde milyonlarca insanı etkileyen kronik ve ilerleyici bir hastalıktır. Halen PH'nin kesin bir tedavisi ve dopaminerjik nöronların dejenerasyon sürecini durdurabilecek etkili bir ilaç bulunmamaktadır. PH'de gözlenen motor semptomların tedavisinde altın standart olarak kullanılan L-DOPA, diskinezi, bulantı ve anksiyete gibi bazı yan etkilere sebep olabilmektedir (20). Bu yüzden hastalığın patogenezinde rol oynayan moleküler mekanizmaların ve genetik faktörlerin tam olarak anlaşılması PH için yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesi için oldukça önemlidir. Bu çalışmada, bir Y kromozomu geni olan SRY'nin PH'ye neden olan genlerle ilişkisinin in siliko yöntemlerle araştırılması ve elde edilen verilerin deneysel çalışmalara bir temel oluşturması amaçlanmıştır.

SRY gonadların testise dönüşmesini sağlayarak erkek cinsiyetinin belirlenmesinde görev alan bir transkripsiyon faktörüdür (21). SRY'nin testislerdeki ekspresyonunun yanı sıra bazı beyin bölgelerinde de eksprese olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (22, 23). SRY'nin ayrıca substansiya nigra bölgesinde bulunan ve dejenerasyonu PH'ye neden olan dopaminerjik nöronlarda da eksprese olduğu gösterilmiştir (24). Bu çalışmada, SRY'nin RNA ekspresyonu profili Human Protein Atlas veri tabanında analiz edildiğinde orta beyin bölgesinin SRY'nin en fazla eksprese olduğu dokulardan birisi olduğu gözlenmiştir (Şekil 1). SRY'nin dopaminerjik nöronlarda eksprese olması, PH'de gözlenen cinsiyet farklılığında bir rolünün olabileceğine işaret etmektedir. Normal fizyolojik koşullar-

da olmasa bile stress koşulları altında değişebilecek olan SRY ekspresyonu PH'nin gelişmesine katkıda bulunabilir.

Parkinson hastalarının %90 civarı sporadik olup, sadece %5-10'luk kısmı tek bir gen mutasyonundan kaynaklanan monogenik formdadır. Bazılarının PH'ye neden olup olmadığı kesin olmamakla birlikte 20'den fazla gen mutasyonu PH ile ilişkilendirilmiştir. SRY'nin PH'ye neden olan genlerle bir ilişkisinin olup olmadığı STRING ve GeneMANIA veri tabanlarını kullanarak analiz edildiğinde herhangi bir etkileşim saptanmamıştır (Şekil 2A ve 2B). Bu veri tabanları deneysel sonuçları ve literatür bilgilerini tarayarak genler arasındaki şu ana kadar saptanmış olan fiziksel ve fonksiyonel etkileşimleri ortaya çıkarmada kullanılmaktadır. PH ile ilişkisi doğrulanmış olan genler ve SRY arasında şu ana kadar ortaya çıkarılmış bir ilişki olmadığı gözlemlenirken, SRY'nin PH ile ilişkili genlerin promotör bölgelerinde muhtemel bağlanma noktasının olup olmadığı incelenmiştir. PH'de otozomal dominant geçiş gösteren başlıca genler SNCA, LRRK2 ve VPS35'tir. Bu genlerin promotör bölgeleri incelendiğinde SNCA ve VPS35'te muhtemel SRY bağlanma noktası bulunmazken, LRRK2 geninin promotör bölgesinde 2 tane muhtemel SRY bağlanma noktası olduğu ortaya çıkarılmıştır (Şekil 3). LRRK2 gen mutasyonları PH'ye neden olduğu bilinen en yaygın mutasyonlardan biridir ve bu gende meydana gelen mutasyonlar fonksiyon kazancıyla sonuçlanır (25). Daha önce farelerle yapılan çalışmada, 6-OHDA ve rotenon gibi PH'ye neden olduğu bilinen nörotoksinlerin dopaminerjik nöronlarda SRY ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (11). Bu doğrultuda, insanlarda da stres koşulları altında SRY ekspresyonu artabilir ve SRY de LRRK2'nin promotör bölgesine bağlanıp transkripsiyonel aktivitesini artırarak dopaminerjik nöronların dejenerasyonuna katkıda bulunabilir. Yine PH'de otozomal resesif geçiş gösteren PARK2, PARK7, PINK1 ve ATP13A2 genlerinin promotör bölgelerinde 1'er tane, DNAJC6 ve VPS13C genlerinin promotör bölgelerinde de 3'er tane muhtemel SRY bağlanma noktasının bulunduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3). PARK2, PARK7 ve PINK1 genlerinde meydana gelen mutasyonlar erken başlangıçlı PH'de en sıklıkla gözlenen ve fonksiyon kaybıyla sonuçlanan mutasyonlardır (17). PARK2, PARK7 ve PINK1 genleri mitofaji, mitokondriyal fonksiyon ve oksidatif stress yanıtlarında görev alırlar (26). Aynı zamanda represör olarak da davranabilme özelliği olan SRY, stres koşullarında bu genlerin ekspresyonunu negatif şekilde düzenleyerek hücrelerin oksidatif stresle mücadele kapasitesinin düşmesine neden olabilir. Bu sonuçlar, PH ile ilişkili bazı genlerin promotör bölgelerinde SRY bağlanma noktası olduğunu

ve SRY'nin bu genlerin ekspresyonlarını pozitif ya da negatif şekilde düzenleyerek dopaminerjik nöronların dejenerasyon sürecine katkıda bulunabileceğini göstermektedir.

SRY'nin PH'ye neden olan genlerle olabilecek ilişkileri değerlendirildikten sonra, SRY'nin en çok etkileşim halinde olduğu genler ve bu genlerin PH'de bir rolünün olup olmadığı incelenmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda SRY ile AR genleri arasında yakın ilişki tespit edilmiştir (Şekil 4). AR testosteron gibi androjenik hormonların bağlanmasıyla aktive olan bir reseptördür. Erkek PH hastalarının plazma testosteron seviyelerinin benzer yaştaki kontrol grubuna göre daha düşük olduğu daha önce gösterilmiştir (27). Başka bir çalışmada, testosteron seviyesi düşük bir PH hastasına testosteron verildiğinde motor semptomlarında iyileşme gözlemlenmiştir (28). Ek olarak, AR sinyalinin nöronlarda BDNF ekspresyonunu artırabilme özelliğine sahip olduğu da gösterilmiştir (29). BDNF PH'nin deneysel çalışmalarında dopaminerjik nörodejenerasyona karşı koruyucu etkiler gösteren ve PH için en umut verici terapötik ajanlardan birisidir (30-32). SRY bir represör olarak AR ekspresyonunu azaltabilir ve dolaylı olarak da BDNF seviyelerinin düşmesine sebep olarak dopaminerjik nöronlarda patolojik bir rol oynayabilir.

## Sonuç

Sonuç olarak, bu çalışmada sunulan in silico veriler SRY'nin PH ile ilişkili bazı genlerin ekspresyonlarını ve AR sinyalinin düzenleyebileceğini ve böylelikle PH'de gözlenen dopaminerjik nöronların ölümü sürecinde bir rolünün olabileceğini önermektedir. Elde edilen bu in silico verilerin deneysel çalışmalarla da doğrulanması, SRY'nin PH'de gözlenen cinsiyet farklılığında patolojik bir rolünün olup olmadığının anlaşılması ve PH için yeni terapötik stratejilerin geliştirilebilmesi açısından da önemlidir.

## Çıkar Çatışması Beyanı

Herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

## Etik Kurul Onayı

Bu makale, insan veya hayvanlar üzerinde herhangi bir çalışma içermemektedir.

## Finansman

Bu araştırma, kamu, ticari veya kar amacı gütmeyen sektörlerdeki finansman kuruluşlarından herhangi bir finansal destek almamıştır.

## Verilerin Ulaşılabilirliği

Veriler sorumlu yazardan talep edilebilir.

**Yazar Katkıları**

MA: Çalışmanın planlanması; Araştırma; Metodoloji; Görselleştirme; Makalenin Yazımı.

**Kaynaklar**

- Vitek JL, Johnson LA. Understanding Parkinson's disease and deep brain stimulation: Role of monkey models. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Dec 23;116(52):26259–65
- Aarsland D, Batzu L, Halliday GM, Geurtsen GJ, Ballard C, Ray Chaudhuri K, Weintraub D. Parkinson disease-associated cognitive impairment. *Nat Rev Dis Primers*. 2021 Jul 1;7(1):47
- Wirdefeldt K, Adami HO, Cole P, Trichopoulos D, Mandel J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur J Epidemiol*. 2011 Jun;26 Suppl 1: S1-58
- Chaudhuri KR, Schapira AH. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *Lancet Neurol*. 2009 May;8(5):464-74
- Thomas B, Beal MF. Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*. 2007 Oct 15;16 Spec No. 2: R183-94
- Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*. 2003 Sep 11;39(6):889-909
- Levy OA, Malagelada C, Greene LA. Cell death pathways in Parkinson's disease: proximal triggers, distal effectors, and final steps. *Apoptosis*. 2009 Apr;14(4):478-500
- Wooten GF, Currie LJ, Bovbjerg VE, Lee JK, Patrie J. Are men at greater risk for Parkinson's disease than women? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004 Apr;75(4):637-9
- Ferrari S, Harley VR, Pontiggia A, Goodfellow PN, Lovell-Badge R, Bianchi ME. SRY, like HMG1, recognizes sharp angles in DNA. *EMBO J*. 1992 Dec;11(12):4497-506
- Czech DP, Lee J, Sim H, Parish CL, Vilain E, Harley VR. The human testis-determining factor SRY localizes in midbrain dopamine neurons and regulates multiple components of catecholamine synthesis and metabolism. *J Neurochem*. 2012 Jul;122(2):260-71
- Lee J, Pinares-Garcia P, Loke H, Ham S, Vilain E, Harley VR. Sex-specific neuroprotection by inhibition of the Y-chromosome gene, SRY, in experimental Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Aug 13;116(33):16577-16582
- Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson Å, Kampf C, Sjöstedt E, Asplund A, Olsson I, Edlund K, Lundberg E, Navani S, Szigartyo CA, Odeberg J, Djureinovic D, Takanen JO, Hober S, Alm T, Edqvist PH, Berling H, Tegel H, Mulder J, Rockberg J, Nilsson P, Schwenk JM, Hamsten M, von Feilitzen K, Forsberg M, Persson L, Johansson F, Zwaahlen M, von Heijne G, Nielsen J, Pontén F. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015 Jan 23;347(6220):1260419
- Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Doncheva NT, Morris JH, Bork P, Jensen LJ, Mering CV. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res*. 2019 Jan 8;47(D1):D607-D613
- Warde-Farley D, Donaldson SL, Comes O, Zuberi K, Badrawi R, Chao P, Franz M, Grouios C, Kazi F, Lopes CT, Maitland A, Mostafavi S, Montojo J, Shao Q, Wright G, Bader GD, Morris Q. The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic Acids Res*. 2010 Jul;38(Web Server issue):W214-20
- Stark C, Breitkreutz BJ, Reguly T, Boucher L, Breitkreutz A, Tyers M. BioGRID: a general repository for interaction datasets. *Nucleic Acids Res*. 2006 Jan 1;34(Database issue):D535-9
- Dreos R, Ambrosini G, Périer RC, Bucher P. The Eukaryotic Promoter Database: expansion of EPDnew and new promoter analysis tools. *Nucleic Acids Res*. 2015 Jan;43(Database issue):D92-6
- Blauwendraat C, Nalls MA, Singleton AB. The genetic architecture of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2020 Feb;19(2):170-178
- Yuan X, Lu ML, Li T, Balk SP. SRY interacts with and negatively regulates androgen receptor transcriptional activity. *J Biol Chem*. 2001 Dec 7;276(49):46647-54
- Bianchi VE, Rizzi L, Bresciani E, Omeljaniuk RJ, Torsello A. Androgen Therapy in Neurodegenerative Diseases. *J Endocr Soc*. 2020 Aug 21;4(11):bvaa120
- Espay AJ, Pagan FL, Walter BL, Morgan JC, Elmer LW, Waters CH, Agarwal P, Dhall R, Ondo WG, Klos KJ, Silver DE. Optimizing extended-release carbidopa/levodopa in Parkinson disease: Consensus on conversion from standard therapy. *Neurol Clin Pract*. 2017 Feb;7(1):86-93
- Koopman P, Münsterberg A, Capel B, Vivian N, Lovell-Badge R. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature*. 1990 Nov 29;348(6300):450-2
- Lahr G, Maxson SC, Mayer A, Just W, Pilgrim C, Reisert I. Transcription of the Y chromosomal gene, Sry, in adult mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res*. 1995 Oct;33(1):179-82
- Mayer A, Lahr G, Swaab DF, Pilgrim C, Reisert I. The Y-chromosomal genes SRY and ZFY are transcribed in adult human brain. *Neurogenetics*. 1998 Aug;1(4):281-8
- Dewing P, Chiang CW, Sinchak K, Sim H, Fernagut PO, Kelly S, Chesselet MF, Micevych PE, Albrecht KH, Harley VR, Vilain E. Direct regulation of adult brain function by the male-specific factor SRY. *Curr Biol*. 2006 Feb 21;16(4):415-20
- Di Fonzo A, Rohé CF, Ferreira J, Chien HF, Vacca L, Stocchi F, Guedes L, Fabrizio E, Manfredi M, Vanacore N, Goldwurm S, Breedveld G, Sampaio C, Meco G, Barbosa E, Oostra BA, Bonifati V; Italian Parkinson Genetics Network. A frequent LRRK2 gene mutation associated with autosomal dominant Parkinson's disease. *Lancet*. 2005 Jan 29-Feb 4;365(9457):412-5
- Cookson MR. Parkinsonism due to mutations in PINK1, parkin, and DJ-1 and oxidative stress and mitochondrial pathways. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Sep 1;2(9):a009415
- Okun MS, Crucian GP, Fischer L, Walter BL, Testa CM, Vitek JL, DeLong MR, Hanfelt J, Huang X. Testosterone deficiency in a Parkinson's disease clinic: results of a survey. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004 Jan;75(1):165-6
- Mitchell E, Thomas D, Burnet R. Testosterone improves motor function in Parkinson's disease. *J Clin Neurosci*. 2006 Jan;13(1):133-6
- Louissaint A Jr, Rao S, Leventhal C, Goldman SA. Coordinated interaction of neurogenesis and angiogenesis in the adult songbird brain. *Neuron*. 2002 Jun 13;34(6):945-60
- Chang E, Wang J. Brain-derived neurotrophic factor attenuates cognitive impairment and motor deficits in a mouse model of Parkinson's disease. *Brain Behav*. 2021 Aug;11(8):e2251
- Klein RL, Lewis MH, Muzyczka N, Meyer EM. Prevention of 6-hydroxydopamine-induced rotational behavior by BDNF somatic gene transfer. *Brain Res*. 1999 Nov 20;847(2):314-20
- Tsukahara T, Takeda M, Shimohama S, Ohara O, Hashimoto N. Effects of brain-derived neurotrophic factor on 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in monkeys. *Neurosurgery*. 1995 Oct;37(4):733-9; discussion 739-41

# İNSÜLİN KULLANAN DİYABETLİ HASTALARDA HİPOGLİSEMİ KORKUSU VE ÖZ-YETERLİLİK ALGISI İLE İLİŞKİLİ FAKTÖRLERİN BELİRLENMESİ

DETERMINATION OF FACTORS ASSOCIATED WITH FEAR OF HYPOGLYCEMIA AND PERCEPTION OF SELF-EFFICACY IN DIABETES PATIENTS USING INSULIN

Bilge BAL ÖZKAPTAN<sup>1</sup>, İnci DEMİRCİ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Sinop Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Hemşirelik Bölümü, Sinop, TÜRKİYE

<sup>2</sup> Sinop Atatürk Devlet Hastanesi, Diyabet Eğitim Hemşireliği, Sinop, TÜRKİYE

**Cite this article as:** Bal Özkaptan B, Demirci İ. İnsülin Kullanan Diyabetli Hastalarda Hipoglisemi Korkusu ve Öz-Yeterlilik Algısı ile İlişkili Faktörlerin Belirlenmesi. Med J SDU 2023; 30(1): 25-36.

## Öz

### Amaç

Bu çalışmanın amacı insülin kullanan diyabetli hastalarda hipoglisemi korkusu ve öz-yeterlilik algısını ve bunlarla ilişkili faktörleri belirlemektir.

### Gereç ve Yöntem

Tanımlayıcı ve ilişki arayıcı tipteki bu araştırma Aralık 2016-Şubat 2017 tarihleri arasında bir Devlet Hastanesi'nde diyabet eğitim hemşiresi tarafından takip edilen toplam 136 hasta ile yapılmıştır. Verilerin toplanmasında literatür doğrultusunda hazırlanan "Hasta Tanıtım Formu", "Çok Boyutlu Diyabet Anketi'nin Öz-yeterlilik Algısı Alt Ölçeği" ve "Hipoglisemi Korku Ölçeği (HKÖ)" kullanılmıştır. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediğini belirlemek için Kolmogorov-Smirnov testi, basıklık ve çarpıklık değerleri hesaplanarak verilerin analizi için kullanılacak testler belirlenmiştir. Bağımsız iki grup arasındaki verilerin karşılaştırılmasında t testi, ikiden fazla grup arasındaki verilerin karşılaştırılmasında Tek Yönlü Varyans analizi kullanılmıştır. Ölçek puanları arasındaki ilişkiyi belirlemek için Pearson Korelasyon analizi yapılmıştır. Bağımsız değişkenlerin Öz-yeterlilik Algı Ölçeği ile HKÖ puanlarını anlamlı düzeyde yordama durumunu

belirlemek amacıyla Çoklu Doğrusal Regresyon analizi yapılmıştır.

### Bulgular

Araştırmaya katılan bireylerin yaş ortalaması 58,12 ± 12,45'dir. Ayrıca katılımcıların %66,9'u kadın olup %75'i elli yaş ve üzerindedir. Katılımcıların HKÖ toplam puan ortalaması 52,58 ± 11,21; Davranış alt boyutu puan ortalaması 28,12 ± 4,76 ve Kaygı alt boyutu puan ortalaması 24,46 ± 8,11'dir. Hastaların Öz-yeterlilik Algısı Ölçeği puan ortalaması 364,24 ± 18,46'dır. Hastaların DM süresi, DM tipi, DM ilaç tedavisi türü, düzenli kontrollere gitme durumu, hipoglisemi yaşama durumu ve hipoglisemi belirtilerini bilme durumu ile HKÖ ve Öz-yeterlilik Algısı Ölçeği puanları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir (p < 0,05). Öz-yeterlilik Algı Ölçeği puanı ile HKÖ toplam puanı, Davranış ve Kaygı alt boyutu puanı arasında negatif yönde ve orta düzeyde bir korelasyon (sırasıyla r = - 0,578, p < 0,001; r = - 0,588, p < 0,001 ve r = - 0,548, p < 0,001) bulunmuştur. DM süresi, DM tipi, DM ilaç tedavisi, düzenli kontrollere gitme durumu, hipoglisemi yaşama durumu ve hipoglisemi belirtilerini bilme durumunun HKÖ ve Öz-yeterlilik Algısı Ölçeği toplam puanını anlamlı düzeyde yordama durumunu belirlemek amacıyla yapılan çoklu regresyon analizi-

**Sorumlu yazar ve iletişim adresi /Corresponding author and contact address:** B.B.Ö. / bilgebal57@hotmail.com

**Müracaat tarihi/Application Date:** 29.09.2022 • **Kabul tarihi/Accepted Date:** 10.01.2023

**ORCID IDs of the authors:** B.B.Ö: 0000-0001-9388-8333; İ.D: 0000-0003-2295-0077

ne göre modelin anlamlı olduğu ve sırasıyla varyansın %42'sini ve %53'ünü açıkladığı bulunmuştur (sırasıyla  $F= 16,71$ ;  $p<0,001$ ;  $F= 19,47$ ;  $p<0,001$ ).

### Sonuç

İnsülin kullanan diyabetli hastaların hipoglisemi korkusu ve öz-yeterlilik algısı hastalığa ilişkin bazı özelliklerden etkilenmektedir. Ayrıca hastaların öz-yeterlilik algı düzeyi hipoglisemi korkusu üzerinde etkilidir. Bu bağlamda diyabetli bireylerde öz-yeterlilik algısının geliştirilmesi hipoglisemi korkularının azaltılmasında etkili olabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Diyabetes Mellitus, Hipoglisemi, Korku, Öz-yeterlilik

### Abstract

#### Objective

The aim of this study is to determine the factors associated with fear of hypoglycemia and perception of self-efficacy and related factors in diabetic patients using insulin.

#### Material and Method

This descriptive and correlational study was conducted with a total of 136 patients followed by a diabetes education nurse in a State Hospital between December 2016 and February 2017. "Patient Information Form", "Self-Efficacy Perception Sub-Scale of Multidimensional Diabetes Questionnaire" and "Hypoglycemia Fear Scale (HFS)" were used to collect data. In order to determine whether the data showed a normal distribution, Kolmogorov-Smirnov test, kurtosis and skewness values were calculated and the tests to be used for the analysis of the data were determined. The t test was used to compare the data between two independent groups, and the one-way analysis of variance was used to compare the data between more than two groups. Pearson Correlation analysis was performed to determine the relationship between scale scores. Multiple Linear Regression analysis was performed to determine whether the independent variables significantly predicted the

Self-Efficacy Perception Scale and HFS scores.

#### Results

The mean age of the individuals participating in the research is  $58.12 \pm 12.4$ . In addition, 66.9% of the participants are women and 75% of them are fifty years old and over. The total mean score of the participants on the HFS was  $52.5 \pm 11.2$ ; Behavior sub-dimension mean score was  $28.12 \pm 4.76$  and Worry sub-dimension mean score was  $24.46 \pm 8.11$ . The mean score of the Self-Efficacy Perception Scale of the patients was  $364.2 \pm 18.46$ . It was determined that there was a statistically significant difference between the patients' DM duration, DM type, DM drug treatment type, regular follow-up visits, hypoglycemia experience and knowing the symptoms of hypoglycemia, and the scores of HFS and Self-Efficacy Perception Scale ( $p < 0.05$ ). A negative and moderate correlation was found between the Self-Efficacy Perception Scale score and the total score of HFS, the Behavior sub-dimension score and the Worry sub-dimension score ( $r= - 0.578$ ,  $p<0.001$ ;  $r= - 0.588$ ,  $p<0.001$  ve  $r= - 0.548$ ,  $p<0.001$  respectively). According to the multiple regression analysis carried out to determine whether the duration of DM, type of DM, DM medication, regular follow-up visits, hypoglycemia, and knowing the symptoms of hypoglycemia significantly predicted the total score of the HFS and Self-Efficacy Scale, the model was found to be significant and the variance explained 42% and 53% of them respectively. ( $F= 16.71$ ;  $p<0.001$ ;  $F= 19.47$ ;  $p<0.001$ , respectively).

#### Conclusion

Fear of hypoglycemia and self-efficacy perception of diabetic patients using insulin are affected by some characteristics of the disease. In addition, the self-efficacy perception level of the patients is effective on the fear of hypoglycemia. In this context, improving the perception of self-efficacy in individuals with diabetes may be effective in reducing fears of hypoglycemia.

**Keywords:** Diabetes Mellitus, Fear, Hypoglycemia, Self-efficacy

### Giriş

Diyabetes Mellitus (DM) günümüzde tüm dünyada giderek artış gösteren ve önemli komplikasyonları nedeniyle mortalite ve morbiditeye neden olan kronik bir hastalıktır. Dünyada 20-79 yaşları arasındaki yak-

laşık olarak 537 milyon kişinin diyabetle yaşadığı tahmin edilmektedir ve bu dünya nüfusunun %10,5'ini temsil etmektedir (1). Tip 1, Tip 2, Gestasyonel ve diğer nedenlere bağlı diyabet gibi tipleri bulunmakla birlikte, Tip 2 DM, dünyadaki tüm diyabetlerin %90'ından fazlasını oluşturan en yaygın diyabet türüdür (1).

Hipoglisemi; kan glikoz düzeyinin 70 mg/dL'nin altına düşmesi olarak tanımlanan ve günümüzde güncel tedavi yaklaşımları ve modern teknolojik gelişmelere rağmen özellikle Tip 1 DM hastalarında daha sık olmakla birlikte tüm diyabetli bireylerde ortaya çıkan diyabetin önemli bir akut komplikasyonudur. Tip 1 diyabetli kişilerin haftada ortalama iki semptomatik hafif veya orta derecede hipoglisemi ve yılda bir veya daha fazla şiddetli hipoglisemi yaşadığı belirtilmektedir (2). Alwafi ve ark. tarafından yapılan çalışmada diyabet prevalansı Tip 1 DM için %1,3 - %38,0 ve tip 2 için %0,074 - %73,0 arasında değiştiği belirlenmiştir (3). Chantzaras ve Yfantopoulos tarafından Tip 2 DM hastalarıyla yapılan çalışmada hastaların %52,9'unun hipoglisemi yaşadığı belirlenmiştir (4). Edridge ve ark. tarafından yapılan çalışmada Tip 2 DM hastalarında hipoglisemi prevalansı hafif/orta hipoglisemi için %45,0 ve şiddetli hipoglisemi için %6,0 bulunmuştur (5). Samya ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise Tip 2 DM hastalarında hipoglisemi prevalansı %57,44 ve şiddetli hipoglisemi hastaları için %10,7 olarak belirlenmiştir (6). Aslında, hipoglisemi riski özellikle insülin tedavisi bağlamında, Tip 1 DM ve Tip 2 DM'nin optimal tedavisinin önünde önemli bir engeldir (7).

Amerikan Diyabet Birliği ve Avrupa Diyabet Çalışmaları Birliği kılavuzları, Tip 2 DM hastalarını tedavi ederken hipoglisemi riskinin dikkate alınmasını önermektedir (8). Tip 2 DM hastalarında hipogliseminin birincil nedeninin, diyabetik hastaların %90'ında ilaçlar yani sülfonilüreler ve insülin olduğu tespit edilmiştir (7). Ancak ilaçlar dışında araştırılması gereken başka nedenlere bağlı olarak da hipoglisemi oluşabilir. Hastanın refahı, hipoglisemik semptomlar nedeniyle doğrudan ve sonraki hipoglisemi atakları korkusu nedeniyle dolaylı olarak etkilenebilir. Hastanın hipoglisemi korkusu ilaç alma isteğini aşarsa, hafif hipoglisemi semptomları bile Tip 2 DM tedavisini etkileyebilir (6). Tekrarlayan hipoglisemik ataklar, düşük yaşam kalitesine, artan kaygıya, depresyona ve ruh hali değişimlerine yol açabilir. Hipoglisemi, mortalite ve morbiditeyi etkilemesinin yanı sıra bireyin yaşam kalitesini de önemli ölçüde etkiler. Diyabetli bireylerde gelişen hipoglisemiye bağlı olarak hastaların günlük yaşamları, işe alınma ve iş performansı, sosyal etkileşimleri ve araç kullanımı gibi birçok durum etkilenir. Hipogliseminin doğrudan etkilerine ek olarak, hipoglisemiden korkma ve kaçınma nedeniyle ilaca uyumsuzluk ve bu durumda kasıtlı olarak gelişen hiperglisemiden kaynaklanan ciddi uzun vadeli sağlık sonuçları üzerinde önemli dolaylı etkileri olabilir (5). Ayrıca diyabet hastalarında hipoglisemi korkusu siktir ve tedaviye uyumu ve dolayısıyla glikemik kontrolü de olumsuz yönde etkiler (7).

Hipoglisemi, beyin işlevlerini etkilemekte ve hatta ölüme bile neden olmaktadır. Bakar ve ark. tarafından yapılan çalışmada acil servise gelen DM hastalarının %66,7'sinin hipoglisemi tanısı aldığı belirlenmiştir. Bu durum diyabetli bireylerde hipogliseminin önlenmesinin önemini ortaya koymaktadır (9). Diyabetli bireylerin öz-yeterlilik düzeyinin yüksek olması hipoglisemi ve hastalığa/tedavilere bağlı diğer komplikasyonların önlenmesinde önemlidir. Öz-yeterlilik diyabetli hastalarda öz bakım davranışlarının en önemli yordayıcısıdır. Öz-bakım davranışlarına uygun bir şekilde bağlılık ise hastalık komplikasyonlarını %50'ye kadar azaltabilir (10). Öz-yeterlilik, birçok kronik sağlık durumu için öz-yönetim üzerinde olumlu bir etkiye sahiptir (11). Bandura'nın sosyal bilişsel kuramının beş yapısından biri olan öz-yeterlilik, bir kişinin belirli bir davranışı kendi yeteneği dahilinde etkin bir şekilde yerine getirmek için ihtiyaç duyduğu güven düzeyi olarak tanımlanır (12). Başka bir ifade ile öz-yeterlilik algısı bireyin kendisini hastalığı yönetme becerisi anlamında yeterli hissedebilme algısıdır. Literatürde diyabet hastalarında artan öz-yeterlilik düzeyinin metabolik kontrolü olumlu etkilediğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Ayrıca yüksek öz-yeterlilik düzeyinin ilaç ve tedavilere, beslenme, fiziksel aktivite ve yaşam tarzı değişikliklerine uyumu artırarak yaşam kalitesini artırdığı gösterilmiştir (10,11,13-16). Tüm bu veriler hipoglisemi korkusunun diyabetli bireylerde düşük öz-yeterlilik ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu ilişkinin ortaya konulması ile diyabetli hastalarda hipoglisemi önlemek ve öz-yeterlilik düzeyini geliştirmeyi sağlayacak çalışmaların yapılması için veri kaynağı olacaktır. Bu doğrultuda bu çalışma, insülin kullanan diyabetli bireylerde hipoglisemi korkusu ve öz-yeterlilik algısı ile ilişkili faktörleri belirlemek amacıyla yapılmıştır.

## Gereç ve Yöntem

### Araştırmanın Tipi, Yeri ve Zamanı

Kesitsel analitik tipteki bu araştırma Aralık 2016 - Şubat 2017 tarihleri arasında bir Devlet Hastanesi'nde yapılmıştır.

### Araştırmanın Evren ve Örneklemi

Araştırmanın evrenini bir Devlet Hastanesi'nde Diyabet Eğitim Birimi hemşiresi tarafından izlenen hastalar oluşturmaktadır. Diyabet eğitim hemşiresi tarafından takip edilen yıllık olarak takip edilen hasta sayısı yaklaşık 980 kişidir (N=980). Araştırmanın örnekleme %95 güven aralığında, %50 sıklıkta hipoglisemi korkusu ve öz-etkililik düzeyi, %10 hata payı ile 118 olarak hesaplanmıştır. Araştırma; araştırmanın yapıldığı tarihler arasında Diyabet Eğitim Birimi'nde toplam 188 hasta takip edilmiş olup araştırmaya dahil edilme kriterlerine uygun olan toplam 136 hasta ile tamamlanmıştır.

Araştırmaya dahil edilme kriterleri; (a) en az bir yıldır diyabet hastası olup insülin tedavisi alıyor olmak, (b) en az okur-yazar olmak, (c) işitme ve anlama sorunu olmamak ve (d) çalışmaya katılmaya gönüllü olmaktır.

### Veri Toplama Araçları

Verilerin toplanmasında literatür taranarak hazırlanan "Hasta Tanıtım Formu", "Çok Boyutlu Diyabet Anketi'nin Öz-yeterlilik Algısı Alt Ölçeği" ve "Hipoglisemi Korku Ölçeği" kullanılmıştır.

### Hasta Tanıtım Formu

Bu form araştırmacılar tarafından literatür taraması doğrultusunda oluşturulmuştur (17–20). Hastaların yaşı, cinsiyeti, medeni durumu, eğitim durumu, gelir durumu, çalışma durumu gibi sosyo-demografik özelliklerini belirlemeye yönelik soruların yanı sıra hastalığa ilişkin tanıtıcı özelliklere (diyabet tipi, hastalık süresi, kullandığı ilaçlar, beslenme ve fiziksel aktivite durumu, insülin kullanımından sonraki zaman diliminde hipoglisemi yaşama durumu, hipoglisemi konusunda bilgi durumu vb.) ilişkin sorular bulunmaktadır. Hasta tanıtım formu toplam 17 sorudan oluşmaktadır.

### Hipoglisemi Korku Ölçeği (HKÖ)

Diyabetli bireylerde hipoglisemi korkusunu belirlemek için, Cox ve ark. tarafından geliştirilen bu ölçek davranış (15 madde) ve kaygı (18 madde) olmak üzere iki alt gruptan ve toplam 33 maddeden oluşmaktadır (21). Yanıtlar; "0 puan: hiçbir zaman; 1 puan: nadiren; 2 puan: bazen; 3 puan sık sık; 4 puan: her zaman" arasında değişmektedir. Elde edilen puanın yüksek olması hastaların hipoglisemi korkusunun yüksek olduğunu göstermektedir. Bu ölçeğin Türkçe geçerlik ve güvenilirlik çalışması Erol ve ark. tarafından yapılmış olup ölçeğin kaygı alt boyutundaki 19. Madde ölçekten çıkartılmış ve Türkçe ölçek toplam 32 maddeden oluşmuştur. Ölçekten alınacak puan aralığı 0-128 arasındadır. Ölçek puanının değerlendirilmesinde ölçeğin kesme noktası bulunmamakla birlikte ölçekten elde edilen puan ortalaması ne kadar yüksekse hipoglisemi korkusunun da o derece yüksek olduğu şeklinde yorum yapılmaktadır (17). Ölçeğin kaygı alt grup için Cronbach alfa katsayısı 0,91, davranış alt grup için 0,77 ve toplam ölçek için 0,90 olarak hesaplanmış ve bu hali ile toplumumuz için geçerli ve güvenilir bir ölçüm aracı olduğu belirtilmiştir (17). Bu çalışmada toplam ölçek Cronbach alfa değeri 0,93 olarak hesaplanmıştır.

### Çok Boyutlu Diyabet Anketi'nin Öz-yeterlilik Algısı Alt Ölçeği

"Çok Boyutlu Diyabet Anketi" Talbot ve ark. tarafından geliştirilmiş olup Türkçe geçerlik güvenilirlik çalışması Coşansu ve Erdoğan tarafından yapılmış olan üç ana

bölüm, altı alt boyut ve toplam 40 maddeden oluşan bir ankettir (22,23). Puan hesaplamasında, anketin toplam puanı yoktur ve her bir alt boyut ayrı ayrı değerlendirilmekte ve ayrı ayrı kullanılabilir. Bu araştırmada anketin üçüncü bölümünde Öz-yeterlilik algısını belirlemeye yönelik yedi maddeden oluşan alt boyut kullanılmıştır. Yanıtlar Likert tipi ölçek üzerinde sıfırdan başlayıp 10 ve katları olarak sıralanan ve 100 ile biten bir cetvel üzerinde (0 - hiç emin değilim, 100 - çok eminim) işaretlenir. Elde edilen puanın yüksek olması Öz-yeterlilik algısının yüksek olduğunu gösterir (22). Coşansu ve Erdoğan tarafından bu ölçeğin Cronbach Alpha değeri 0,82 olarak bulunmuş olup (21), bu çalışmada 0,87 olarak hesaplanmıştır.

### Verilerin Toplanması

Araştırma formları araştırma kriterlerine uyan ve araştırma hakkında bilgi verilerek aydınlatılmış onamları alınan hastalara uygulanmıştır. Diyabet eğitim hemşiresi tarafından takip edilen ayaktan başvuran ve yatan hastalarla yüz yüze görüşülerek formlar araştırmacılar tarafından doldurulmuştur. Formun doldurulması yaklaşık 15 dakika sürmektedir. Daha önceden takip sürecinde olan hastaların tanıtıcı ve hastalık özelliklerine ilişkin bazı verileri (yaş, cinsiyet, medeni durumu, diyabet tipi, hastalık süresi, kullandığı ilaçlar) diyabet hemşiresi tarafından tutulan kayıtlardan elde edilmiştir.

### Verilerin Değerlendirilmesi

Verilerin değerlendirilmesinde Microsoft Excel ve Statistical Package for Social Sciences (SPSS) Release 21.0 programı kullanılmıştır. Anlamlılık düzeyi  $p < 0,05$  olarak kabul edilmiştir. Araştırmadan elde edilen veriler için tanımlayıcı istatistikler sayı ve yüzde olarak frekans dağılımları ile ortalama  $\pm$  standart sapma şeklinde verilmiştir. Ölçek puanlarının normal dağılıma dağılıma uygun olma durumu Kolmogorov-Smirnov testi ile belirlenmiş olup çarpıklık ve basıklık değerlerinin standart hataya bölünmesinden elde edilen sonuçlara göre ölçek skorlarının normal dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Verilerin normal dağılıma uyması nedeniyle ikili karşılaştırmalarda bağımsız gruplarda t testi, ikiden fazla grup arasındaki verilerin karşılaştırılması Tek Yönlü Varyans analizi kullanılmıştır. Ölçek puanları arasındaki ilişkiyi belirlemek için Pearson Korelasyon analizi yapılmıştır. Bağımsız değişkenlerin Öz-yeterlilik Algı Ölçeği ile HKÖ puanlarını anlamlı düzeyde yordama durumunu belirlemek amacıyla Çoklu Doğrusal Regresyon analizi yapılmıştır.

### Bulgular

Araştırmaya katılan bireylerin yaş ortalaması  $58,12 \pm 12,42$ 'dir. Ayrıca katılımcıların %66,9'u kadın



olup %75,0'ı elli yaş ve üzerindedir. Katılımcıların diğer sosyo-demografik özellikleri Tablo 1'de verilmiştir. Katılımcıların hastalığına ve hipoglisemi ile ilişkili özelliklerine bakıldığında hastaların ortalama hastalık süresi  $11,2 \pm 7,1$  yıl olarak hesaplanmıştır. Ayrıca katılımcıların %84,6'sının beş yıl ve daha fazla süredir bu hastalığa sahip olduğu, %79,4'ünün başka ek kronik sağlık sorunlarının da olduğu, %89,0'ının Tip 2 diyabet olduğu ve çoğunluğunun (%80,9) ilaç tedavisi olarak sadece insülin kullandığı, %19,1'inin oral antidiyabetiklerle birlikte insülin kullandığı ve çoğunluğunun (%72) hipoglisemi deneyimi yaşadığı belirlenmiştir (Tablo 2).

Araştırmaya katılan bireylerin HKÖ ve alt boyutları ile Öz-yeterlilik Algısı Ölçeği puanları Tablo 3'de verilmiştir. Tablo 3'e göre hastaların HKÖ toplam puan ortalaması  $52,58 \pm 11,21$ ; Davranış alt boyutu puan ortalaması  $28,12 \pm 4,76$  ve Kaygı alt boyutu puan ortalaması ise  $24,46 \pm 8,11$ 'dir. Hastaların Öz-yeterlilik Algısı Ölçeği puan ortalaması ise  $364,24 \pm 18,46$ 'dir (Tablo 3).

Katılımcıların sosyo-demografik özellikleri ile hastalık özelliklerine göre HKÖ ve Öz-yeterlilik Algısı Ölçeği puan ortalamaları Tablo 4'de verilmiştir. Tablo 4'e göre kadınların erkeklere göre HKÖ ve Öz-yeterlilik ölçeği puan ortalaması yüksek olup bu fark istatistiksel

olarak anlamlı bulunmamıştır (sırasıyla  $p=0,210$  ve  $p=0,383$ ). Katılımcıların yaş, medeni durum, çalışma durumu ve gelir durumuna göre HKÖ ve Öz-yeterlilik ölçeği puan ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (sırasıyla  $p=0,321$  ve  $p=0,418$ ;  $p=0,263$  ve  $p=0,371$ ;  $p=0,132$  ve  $p=0,303$ ;  $p=0,432$  ve  $p=0,361$ ;  $p=0,310$  ve  $p=0,416$ ).

Hastaların DM süresi, DM tipi, DM ilaç tedavisi türü, düzenli kontrollere gitme durumu, hipoglisemi yaşama durumu ve hipoglisemi belirtilerini bilme durumu ile HKÖ ve Öz-yeterlilik Algısı Ölçeği puanları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir. DM süresi beş yıl ve üzeri olanların HKÖ puan ortalaması ( $53,01 \pm 12,03$ ) ve Öz-yeterlilik Algısı Ölçeği puan ortalaması ( $452,34 \pm 16,23$ ), DM süresi beş yıldan daha az olan hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur (sırasıyla  $p=0,040$  ve  $p<0,001$ ). Tip 1 DM hastalarının hipoglisemi korkusu Tip 2 DM hastalarından istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olup ( $p<0,001$ ), Öz-yeterlilik Algı düzeyi ise tam tersi şekilde Tip 2 DM hastalarında daha yüksektir ( $p=0,020$ ). DM tedavisinde sadece insülin kullananların HKÖ puan ortalaması ( $55,14 \pm 8,52$ ) daha yüksek iken ( $p=0,012$ ), oral antidiyabetiklerle birlikte insülin kullanan hastaların Öz-yeterlilik Algısı Ölçeği puanları ( $410,62 \pm 14,65$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek

**Tablo 1** Hastaların sosyo-demografik özellikleri

Sosyo-Demografik Özellikler		n	%
Yaş	49 yaş ve altı	34	25,0
	50 yaş ve üzeri	102	75,0
Cinsiyet	Kadın	91	66,9
	Erkek	45	33,1
Medeni Durum	Evli	132	97,1
	Bekar	4	2,9
Eğitim Durumu	İlköğretim	101	74,3
	Lise ve üzeri	35	25,7
Çalışma Durumu	Çalışıyor	99	72,8
	Çalışmıyor	37	27,2
Gelir Durumu	Gelir giderden az	94	69,1
	Gelir giderle eşit	11	8,1
	Gelir giderden fazla	30	22,8
Toplam		136	100,0

Tablo 2 Katılımcıların hastalığına ve hipoglisemiye ilişkin özellikleri

Hastalığına ve Hipoglisemiye İlişkin Özellikler		n	%
DM süresi/yılı	Beş yıldan az	21	15,4
	Beş yıl ve üzeri	115	84,6
Başka ek kronik hastalığı	Var	108	79,4
	Yok	28	20,6
DM tipi	Tip 1	15	11,0
	Tip 2	121	89,0
DM ilaç Tedavisi	Sadece insülin	110	80,9
	İnsülin + Oral Antidiyabetik	26	19,1
Düzenli egzersiz yapma durumu	Evet	30	22,0
	Hayır	106	78,0
Düzenli kontrollere gitme durumu	Evet	92	67,6
	Hayır	44	32,4
İlaçlarını düzenli kullanma durumu	Evet	122	93,4
	Hayır	9	6,6
Hipoglisemi yaşama durumu	Evet	37	27,2
	Hayır	99	72,8
Hipoglisemi belirtilerini bilme durumu	Evet	121	89,0
	Hayır	15	11,0

Tablo 3 Hastaların Hipoglisemi Korku Ölçeği ve alt boyutları ile Öz-yeterlilik Algısı Ölçeği puanları

Ölçekler	Ortalama ± SS	Ortanca (Min-Maks)
Hipoglisemi Korku Ölçeği	52,58±11,21	54,00 (42-109)
-Davranış Alt Boyutu	28,12±4,76	29,00 (18-51)
-Kaygı Alt Boyutu	24,46±8,11	25,00 (22-59)
Öz-yeterlilik Algısı Ölçeği	364,24±18,46	170,00 (140-560)

SS= Standart sapma; Min= Minimum; Maks= Maksimum.

bulunmuştur ( $p=0,008$ ). Düzenli sağlık kontrollerine giden hastalar daha az hipoglisemi korkusu yaşamakta olup ( $p=0,032$ ), Öz-yeterlilik Algısı daha yüksektir ( $p<0,001$ ). Daha önceden hipoglisemi deneyimleyen hastaların HKÖ puanı daha yüksek iken ( $p<0,001$ ), Öz-yeterlilik Algısı Ölçeği puanı düşük olup bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0,023$ ). Hipoglisemi belirtilerini bilen hastaların hipoglisemi kor-

kusunu daha az iken ( $p<0,001$ ), Öz-yeterlilik Algısı daha yüksek bulunmuştur ( $p=0,018$ ).

Araştırmaya katılan hastaların HKÖ ile Öz-yeterlilik Algısı Ölçeği arasındaki korelasyona bakıldığında Öz-yeterlilik Algısı Ölçeği puanı ile HKÖ toplam puanı, Davranış alt boyutu puanı ve Kaygı alt boyutu puanı arasında negatif yönde ve orta düzeyde bir korelas-

Tablo 4

Hastaların sosyo-demografik özellikleri ile hastalık özelliklerine göre Hipoglisemi Korku Ölçeği ve Öz-yeterlilik Algısı Ölçeği puan ortalamaları

Sosyo-Demografik Özellikler		Hipoglisemi Korku Ölçeği	Öz-yeterlilik Algısı Ölçeği
Ortalama±SS		Ortalama±SS	Ortalama±SS
Yaş	49 yaş ve altı	51,34±5,12	372,13±10,07
	50 yaş ve üzeri	53,82±8,73	356,27±12,21
		t= -2,235 p= 0,321	t= -1,767 p=0,418
Cinsiyet	Kadın	54,58±13,03	386,26±21,15
	Erkek	50,58±12,72	342,14±19,13
		t= 0,203 p= 0,210	t= -0,147 p= 0,383
Medeni Durum	Evlü	50,76±8,71	385,38±14,11
	Bekar	54,40±10,58	343,02±13,52
		t= -1,178 p= 0,263	t= -1,558 p=0,371
Eğitim Durumu	İlköğretim	52,19±5,25	365,33±10,79
	Lise ve üzeri	52,21±7,44	358,78±16,02
		t= -1,812 p= 0,132	t= -1,787 p=0,303
Çalışma Durumu	Çalışıyor	53,98±8,15	387,45±12,42
	Çalışmıyor	51,27±6,35	346,12±8,21
		t= 1,271 p= 0,432	t= -2,167 p= 0,361
Gelir Durumu	Gelir giderden az	52,76±6,79	384,12±7,25
	Gelir giderle eşit	51,91±5,32	387,78±12,77
	Gelir giderden fazla	51,18±9,14	388,13±11,25
		F= 3,265 p= 0,310	F= 2,347 p= 0,416
DM süresi	Beş yıldan az	52,15±11,17	276,12±22,18
	Beş yıl ve üzeri	53,01±12,03	452,34±16,23
		t=-1,147 p=0,040	t=1,241 p<0,001
DM tipi	Tip 1	57,24±12,27	315,95±19,10
	Tip 2	47,92±13,32	412,45±18,22
		t=-2,539 p<0,001	t=1,742 p=0,020
DM ilaç Tedavisi	İnsülin	55,14±8,52	317,78±17,22
	İnsülin +Oral Antidiyabetik	50,02±15,13	410,62±14,65
		t=0,264 p=0,012	t=-1,327 p=0,008
Düzenli kontrollere gitme durumu	Evet	47,39±10,28	453,97±18,38
	Hayır	57,77±12,19	274,43±11,54
		t=1,955 p=0,032	t=1,180 p<0,001
Hipoglisemi yaşama durumu	Evet	62,18±12,25	352,01±17,49
	Hayır	42,98±13,83	376,39±22,21
		t=-2,679 p<0,001	t=0,877 p=0,023
Hipoglisemi belirtilerini bilme durumu	Evet	49,29±9,41	387,50±19,25
	Hayır	55,87±13,82	340,82±17,10
		t=0,533 p<0,001	t=1,516 p=0,018

t= Bağımsız Gruplarda t Testi; SS= Standart Sapma; F= Tek Yönlü Varyans Analizi

**Tablo 5** Hipoglisemi Korku Ölçeği ve alt boyutları ile Öz-yeterlilik Algısı Ölçeği arasındaki ilişki

Ölçekler		Hipoglisemi Korku Ölçeği	Davranış Alt Boyutu	Kaygı Alt Boyutu
Öz-yeterlilik Algısı Ölçeği	r	-0,578	-0,588	-0,548
	p	<0,001	<0,001	<0,001

r= Pearson korelasyon katsayısı

**Tablo 6** Hipoglisemi Korku Ölçeği yordayıcılarının değerlendirilmesi

	B	Std. Hata	Beta ( $\beta$ )	t	p
Sabit	3,73	0,27		19,08	<0,001
DM süresi (Beş yıl ve üzeri)	-0,07	0,16	0,09	3,36	<0,001
DM tipi (Tip 1)	0,23	0,33	0,18	1,35	<0,001
DM ilaç Tedavisi (Yalnız İnsülin)	-0,32	0,21	0,06	-1,07	0,17
Düzenli kontrollere gitme durumu (Hayır)	0,14	0,12	0,20	-5,13	0,04
Hipoglisemi yaşama durumu (Evet)	0,36	0,05	0,15	4,19	<0,001
Hipoglisemi belirtilerini bilme durumu (Hayır)	0,23	0,07	0,26	-3,54	<0,001

R<sup>2</sup> = 0,42; F = 16,71; p = 0,00**Tablo 7** Öz-yeterlilik Algısı Ölçeği yordayıcılarının değerlendirilmesi

	B	Std. Hata	Beta ( $\beta$ )	t	p
Sabit	1,62	0,27		23,19	<0,001
DM süresi (Beş yıl ve üzeri)	0,03	0,18	0,27	4,69	<0,001
DM tipi (Tip 1)	0,07	0,14	0,20	2,96	<0,001
DM ilaç Tedavisi (Yalnız İnsülin)	-0,38	0,33	0,14	2,14	0,45
Düzenli kontrollere gitme durumu (Hayır)	0,02	0,21	0,17	3,51	0,51
Hipoglisemi yaşama durumu (Evet)	0,17	0,16	0,19	0,77	<0,001
Hipoglisemi belirtilerini bilme durumu (Hayır)	0,53	0,12	0,31	2,37	0,38

R<sup>2</sup> = 0,53; F = 19,47; p<0,001

yon (sırasıyla r=- 0,578, p<0,001; r= - 0,588, p<0,001 ve r= - 0,548, p<0,001) bulunmuştur (Tablo 5).

Araştırmamızda katılımcıların DM süresi, DM tipi, DM ilaç tedavisi, düzenli kontrollere gitme durumu, hipog-

lisemi yaşama durumu ve hipoglisemi belirtilerini bilme durumunun Hipoglisemi Korku Ölçeği toplam puanını anlamlı düzeyde yordama durumunu belirlemek amacıyla yapılan çoklu regresyon analizine göre modelin anlamlı olduğu ve varyansın %42'sini açıkladığı

bulunmuştur ( $F= 16,71$ ;  $p<0,001$ ). DM süresi, DM tipi, düzenli kontrollere gitme durumu, hipoglisemi yaşama durumu ve hipoglisemi belirtilerini bilme durumu HKÖ toplam puanını anlamlı düzeyde yordadığı tespit edilmiştir (sırasıyla  $p <0,001$ ;  $p <0,001$ ;  $p = 0,04$ ;  $p <0,001$ ;  $p <0,001$ ) (Tablo 6).

Araştırmamızda katılımcıların DM süresi, DM tipi, DM ilaç tedavisi, düzenli kontrollere gitme durumu, hipoglisemi yaşama durumu ve hipoglisemi belirtilerini bilme durumunun Öz-yeterlilik Algısı Ölçeği toplam puanını anlamlı düzeyde yordama durumunu belirlemek amacıyla yapılan çoklu regresyon analizine göre modelin anlamlı olduğu ve varyansın %53'ünü açıkladığı bulunmuştur ( $F= 19,47$ ;  $p<0,001$ ). DM süresi, DM tipi ve hipoglisemi yaşama durumu Öz-yeterlilik Algısı Ölçeği toplam puanını anlamlı düzeyde yordadığı tespit edilmiştir (sırasıyla  $p <0,001$ ;  $p <0,001$ ;  $p = 0,04$ ;  $p <0,001$ ;  $p <0,001$ ) (Tablo 7).

## Tartışma

İnsülin kullanan diyabetli bireylerde hipoglisemi korkusu ile öz-yeterlilik algısı ve ilişkili faktörleri belirlemeye yönelik yapılan bu araştırmada; hastaların öz-yeterlilik algı düzeylerinin yanı sıra hastalığa ilişkin bazı özellikleri ve hipoglisemi deneyimlerinin hipoglisemi korkusunu etkilediği belirlenmiştir.

Tip 1 diyabette mutlak insülin eksikliğine kıyasla, insülin düzeyindeki göreceli eksiklik nedeniyle Tip 2 DM hastalarında görülme sıklığı daha düşüktür ve geniş bir yaş aralığındaki insanları etkileyebilir. Tip 1 DM hastalarında aşırı insülin alımı hipoglisemiye neden olabilir (24,25). Ek olarak, hipoglisemiye yanıt olarak glukagon salgılanması, Tip 1 DM hastalarında kısmen veya tamamen kaybolur. Ayrıca, düşen glikoz seviyelerine bir yanıt olarak epinefrin salgılanması tipik olarak Tip 1 diyabette azalır. Tip 2 DM hastalarında, hipoglisemiye karşı düzenleyici mekanizmalar hastalığın erken döneminde bozulmamıştır ancak hastalık ilerledikçe iyatrojenik hipoglisemi sıklığında ilerleyici bir artış vardır (24,25). Araştırmamızda Tip 1 DM hastalarının hipoglisemi korkusunun Tip 2 DM hastalarına göre yüksek çıkması literatürdeki bu bilgilerle örtüşmektedir. Araştırmaya katılan bireylerin çoğunluğunun uzun süreli bu hastalığa sahip olması, ek kronik hastalıklarının bulunması, yaş ortalamasının yüksek olması ve çoğunluğunun hipoglisemi deneyimi yaşaması literatürdeki bu bilgileri desteklemektedir.

Araştırmamızda hastaların orta düzeyde hipoglisemi korkusuna sahip olduğu ve Öz-yeterlilik algısının orta düzeyde olduğu belirlenmiştir. Literatürde Tip 1 ve Tip 2 DM hastalarının hipoglisemi korkusunu belirle-

mek amacıyla yapılan farklı çalışmalar bulunmaktadır (20,26–29). Çalışmaların yapıldığı örneklem grubunun özelliklerine göre farklı sonuçlar çıkmakla birlikte tüm çalışmaların ortak olarak elde ettiği sonuç insülin kullanan diyabet hastalarının değişen düzeylerde hipoglisemi korkusu yaşadığıdır. Araştırmamızda istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte kadınların erkeklere göre HKÖ ölçeği puan ortalaması yüksek bulunmuştur. Literatürde kadınların erkeklere göre hipoglisemi eğiliminin daha fazla olduğunu belirtmektedir. Bu eğilim kaslarda ve karaciğerde insülinin işlevine duyarlılığı azaltabilen yağ birikiminin artmasına ve kan lipid profillerindeki değişikliklere neden olan östrojen ve progesteron miktarındaki azalmadan kaynaklanmaktadır (9). Cinsiyet hipoglisemi insidansında rol oynamakla birlikte, hipoglisemi sırasında nöroendokrin aktivasyon ve sempatik sinir sistemi yanıtları sağlıklı erkek ve kadınlarda farklılık göstermez (9). Kadın cinsiyet hipoglisemi korkusu açısından risk faktörleri arasında yer almaktadır (27,29). Kadınların kaygı düzeyinin erkeklere göre yüksek olması, duygusal anlamda duyarlı olmaları ve yüksek kontrol duygusu kadınların sağlık sorunları karşısında daha fazla kaygılanmalarında etkindir (2,4). Bu çalışmada ise aksine her iki cinsiyet arasında hipoglisemi korkusu açısından anlamlı bir fark çıkmaması hipoglisemi korkusuna neden olan diğer risk faktörleri (diyabet tipi, hastalık süresi, hipoglisemi deneyimi vb.) ile ilişkili olabilir.

Bu araştırmada DM süresi beş yıl ve üzeri olanların hipoglisemi korku düzeyi DM süresi beş yıldan daha az olan hastalara göre yüksek bulunmuştur. Bu durum Gül ve ark. tarafından yapılan çalışma ile benzerlik göstermektedir (26). Hastalık süreci uzun olan bireylerin hipoglisemiyi engelleyen hormonal yanıt mekanizmalarının azalması ve kan glikozunun regülasyonunu sağlamak için verilen yoğun tedaviler nedeniyle deneyimlediği hipoglisemi ataklarının daha fazla olması bu sonucun ortaya çıkmasında etkili olabilir.

Bu araştırmada Tip 1 DM hastalarının ve DM tedavisinde sadece insülin kullananların hipoglisemi korkusu Tip 2 DM hastalarından daha yüksektir. Diyabet hastalarında akut komplikasyon olarak gelişen hipoglisemi insidansı, en yüksek oranda insülin tedavisiyle ilişkilidir ve tedavi seçimine bağlı olarak değişmektedir (4). İnsülin tedavisi alan hastaların yaklaşık %90'ı hipoglisemi yaşamıştır (9). Alwafi ve ark. tarafından diyabet insidansı ile ilgili olarak yapılan bir metaanaliz çalışmasında Tip 1 diyabetli bireylerin, Tip 2 diyabetli bireylere kıyasla daha yüksek hipoglisemi riskine sahip olduğunu ortaya koymuştur (3). Tip 1 diyabetin genç yaşta itibaren ve ilaç tedavisinde insülin kullanma zorunluluğu olan bir hastalık olması diğer diyabet tiplerine göre hipoglisemi riskinin daha yüksek

olmasına neden olmaktadır (30). Bu çalışmada hipoglisemi korkusunun Tip 1 DM hastalarında ve insülin tedavisi alan hastalarda yüksek çıkması bununla ilişkilendirilebilir.

Bu çalışmaya göre düzenli kontrollerine gittiğini ifade eden hastalar daha az hipoglisemi korkusu yaşamaktadır. Hastalığının sorumluluğunu alan, hastalığa ve tedaviye uyumu olan hastalar diyabet komplikasyonlarını daha az yaşamakta ve yaşam kalitesi artmaktadır (31). Önerilen şekilde düzenli olarak sağlık kontrollerine giden bireylerin hastalığın yönetimini sağlaması nedeniyle daha az hipoglisemi korkusu yaşamaları beklenen bir sonuçtur.

Araştırmamızda geçmişte hipoglisemi deneyimleyen ve hipoglisemi belirtilerini bilen hastaların HKÖ puanı daha yüksek bulunmuştur. Lamounier ve ark. son altı ay içinde şiddetli hipoglisemi deneyimi olan diyabet hastalarının hipoglisemi korkularının daha fazla olduğu belirlenmiştir (7). Literatürde geçmişte hipoglisemi yaşayan diyabetli bireylerin daha fazla hipoglisemi korkusu yaşadığı belirtilmektedir (6,32–34).

Bu çalışmada literatürle benzer şekilde cinsiyete göre Öz-yeterlilik ölçeği puan ortalaması arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (19,35–37). Ayrıca araştırmamızda DM süresi beş yıl ve üzeri olanların Öz-yeterlilik Algısı Ölçeği puan ortalaması DM süresi beş yıldan daha az olan hastalara göre yüksek bulunmuştur. Hastalık sürecinin uzun olması hastaların deneyimli olması nedeniyle öz-yeterlilik düzeyini artırabileceği gibi tükenmişlik nedeniyle öz-yeterlilik düzeyini azaltabilir (15,35). Literatürde her iki sonucu da gösteren farklı çalışmalar bulunmaktadır (19,35,36).

Bu çalışmada Tip 2 DM hastalarının ve tedavide insülinle birlikte oral antidiyabetik ilaç kullananların Öz-yeterlilik algı düzeyi yüksek bulunmuştur. Tip 2 diyabetin daha ileri yaşta ortaya çıkması hastalığa ilişkin tutum ve becerilerin ve hastalığa uyum sürecinin yaşla birlikte daha iyi gelişmesini sağlamış olabilir. Ayrıca oral antidiyabetik kullanımına eklenen insülin tedavisine ve hastalığa bağlı komplikasyonları önlemek için yaşam tarzı değişimleri zorunludur (15). Tüm bu faktörler Tip 2 diyabetli bireylerin öz-yeterlilik düzeyinin daha fazla gelişmesinde etkili olmuş olabilir.

Bu çalışmada düzenli kontrollerine giden hastaların Öz-yeterlilik algısı daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuç Tekin Yanık ve Erol (2016)'un çalışması ile benzerlik göstermektedir. Bireyin öz-yeterlilik algısı, sağlığı geliştirici davranışları başlatma ve sürdürmede önemli bir belirleyicidir (38). Öz-yeterlilik düzeyi yüksek olan hastalar hastalığının gerektirdiği beslenme,

fiziksel aktivite, düzenli ilaç kullanımı, düzenli sağlık kontrollerine gitme gibi sorumlulukları en etkin şekilde yürütürler. Bu nedenle özellikle kronik hastalıklarda hastaların öz-yeterlilik seviyelerini yükseltmeye yönelik girişimlerin planlanması gerekmektedir (39).

Bu çalışmada daha önceden hipoglisemi deneyimleyen hastaların Öz-yeterlilik Algısı Ölçeği puanı düşük bulunmuştur. Bu durum öz-yeterlilik düzeyinin düşük olmasının hipoglisemi gelişme riskini artırdığı şeklinde yorumlanabilir. Çünkü öz-yeterliliği yüksek bireylerin tedaviye uyumları daha iyi olduğundan daha az komplikasyon yaşarlar (31). Hipoglisemi belirtilerini bilen hastaların ise Öz-yeterlilik algısı daha yüksek bulunmuştur. Öz-yeterlilik düzeyi yüksek olan hastalar komplikasyonların önlenmesinde öz-bakım sorumluluğunu alır ve bilgi düzeyini artırır. Diyabet ile ilgili eğitim almanın hastanın bakım sorumluluğunu üstlenmesinde etkili olduğunu ve hastaların öz-yeterliliğini artırarak diyabet yönetimini kolaylaştırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur (14,15,19,37,40). Araştırmamıza katılan bireylerin tamamı diyabet eğitim hemşiresi tarafından diyabet ve insülin uygulaması konusunda eğitim almış olup bu doğrultuda hipoglisemi belirtilerini bildiğini ifade edenlerin öz-yeterlilik düzeyinin yüksek çıkması literatürü destekler niteliktedir.

Araştırmaya katılan hastaların Öz-yeterlilik Algı Ölçeği puanı ile HKÖ toplam puanı, Davranış alt boyutu puanı ve Kaygı alt boyutu puanı arasında negatif ve orta düzeyde bir korelasyon bulunmuştur. Başka bir ifadeyle hipoglisemi korkusu arttıkça öz-yeterlilik algı düzeyi azalmaktadır. Öz-yeterlilik algısı yüksek olan bireylerin hastalığın yönetimini sağlamak ile ilgili kendi yeteneklerine güvenme düzeyleri de yüksektir (19,40). Böylece öz-bakım sorumluluklarını alarak düzenli kontrollere gitme, beslenme, fiziksel egzersiz ve ilaç kullanımı gibi diyabet tedavilerine uyum düzeyi artmaktadır. Öz-yeterlilik düzeyi arttıkça kan glikoz regülasyonunun sağlanması ile tedaviye ve hastalığa bağlı komplikasyonlar azalmaktadır (10,13,35). Literatürde kronik hastalıklarda öz-bakım gücünü artırmak ve komplikasyonları azaltmak için hastaların öz-yeterlilik düzeyinin artırılması gerektiği vurgulanmaktadır (16). Öz-yeterlilik düzeyinin yüksek olması, diyabette öz-yönetimi kolaylaştıran başlıca faktörlerden birisidir (41). Tüm bu bilgiler ışığında öz-yeterlilik düzeyinin artması hastalığın yönetimini daha mümkün kılarak hipoglisemi korkusunu azalttığını söyleyebiliriz.

## Sonuç

Araştırma sonucunda insülin kullanan diyabetli hastaların hipoglisemi korkusu ve öz-yeterlilik algısının orta düzeyde olduğu belirlenmiştir. Ayrıca DM süresi,

DM tipi, DM ilaç tedavî türü, düzenli kontrollere gitme durumu, hipoglisemi yaşama durumu ve hipoglisemi belirtilerini bilme durumunun hipoglisemi korkusu ve öz-yeterlilik algı düzeyini etkilediği, öz-yeterlilik algısı azaldıkça hipoglisemi korkusunun arttığı bulunmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda diyabetli bireylerde hipoglisemi korkusunu azaltmak için öz-yeterlilik düzeyinin artırılması gerektiği söylenebilir.

### Teşekkür

Yazarlar çalışmanın yapıldığı kurum yöneticilerine ve araştırmaya katılan bireylere katkılarından dolayı teşekkür eder. Bu çalışma 19-23 Nisan 2017 tarihleri arasında düzenlenen 53. Ulusal Diyabet Kongresi kapsamında düzenlenen 19. Ulusal Diyabet Hemşireliği Sempozyumu'nda Sözlü Bildiri olarak sunulmuştur.

### Çıkar Çatışması Beyanı

Herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

### Etik Kurul Onayı

Araştırmanın yapılabilmesi için bir üniversitenin İnsan Araştırmaları Etik Kurulu'ndan etik kurul onayı (Tarih: 31/03/2016; Sayı: 2016/08) ve araştırmanın yapıldığı kurumdan yazılı izin alınmıştır. Araştırma "Helsinki Deklarasyonu"na göre yapılmış olup araştırmaya katılan bireylere araştırma hakkında bilgi verildikten sonra sözlü ve yazılı aydınlatılmış onamları alınmıştır.

### Bilgilendirilmiş Onam

Çalışmada yer alan tüm bireylerden bilgilendirilmiş onam ve verilerin yayınlaması için yazılı izin alınmıştır.

### Finansman

Bu araştırma, kamu, ticari veya kar amacı gütmeyen sektörlerdeki finansman kuruluşlarından herhangi bir finansal destek almamıştır.

### Verilerin Ulaşılabilirliği

Veriler, gizlilik veya diğer kısıtlamalar nedeniyle yalnızca yazarlardan talep edilebilir.

### Yazar Katkıları

BBÖ: Çalışmanın planlanması; Verilerin İşlenmesi; Formal Analizler; Araştırma; Metodoloji; Validasyon; Görselleştirme; Makalenin Yazımı; Makalenin düzenlenmesi.

ID: Çalışmanın planlanması; Verilerin İşlenmesi; Araştırma; Makalenin Yazımı.

### Kaynaklar

1. Sun H, Saeedi P, Karuranga S, Pinkepank M, Ogurtsova K, Duncan BB, et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and

country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract.* 2022;183:109119.

- Gonder-Frederick L. Fear of hypoglycemia: A review. *Diabetic Hypoglycemia.* 2013;5(3): 3–11.
- Alwafi H, Alsharif AA, Wei L, Langan D, Naser AY, Mongkhon P, et al. Incidence and prevalence of hypoglycaemia in type 1 and type 2 diabetes individuals: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract.* 2020;170:108522.
- Chantzaras A, Yfantopoulos J. Evaluating the Incidence and Risk Factors Associated With Mild and Severe Hypoglycemia in Insulin-Treated Type 2 Diabetes. *Value Heal Reg Issues.* 2022;30:9–17.
- Edridge CL, Dunkley AJ, Bodicoat DH, Rose TC, Gray LJ, Davies MJ, et al. Prevalence and incidence of hypoglycaemia in 532,542 people with type 2 diabetes on oral therapies and insulin: A systematic review and meta-analysis of population based studies. *PLoS ONE.* 2015;10(6): e0126427.
- Samya V, Shriram V, Jasmine A, Akila G V., Anitha Rani M, Durai V, et al. Prevalence of Hypoglycemia Among Patients With Type 2 Diabetes Mellitus in a Rural Health Center in South India. *J Prim Care Community Heal.* 2019;10:1-7.
- Lamounier RN, Geloneze B, Leite SO, Montenegro R, Zajdenverg L, Fernandes M, et al. Hypoglycemia incidence and awareness among insulin-treated patients with diabetes: The HAT study in Brazil. *Diabetol Metab Syndr.* 2018;10(83):1-10.
- Heller SR. Glucose concentrations of less than 3.0 mmol/L (54 mg/dL) should be reported in clinical trials: A joint position statement of the American diabetes association and the European association for the study of diabetes. *Diabetes Care.* 2017;40(1):155–7
- Bakar A, Qomariah SN, Santoso CH, Gustomi MP, Syaful Y, Fatmawa L. Factors the incidence of hypoglycemia in diabetes mellitus patients: A pilot study in the emergency room. *Enferm Clin.* 2020;30:46–9.
- Karimy M, Koohestani HR, Araban M. The association between attitude, self-efficacy, and social support and adherence to diabetes self-care behavior. *Diabetol Metab Syndr.* 2018;10(86):1-6.
- Amer FAM, Mohamed MS, Elbur AI, Abdelaziz SI, Elrayah ZAB. Influence of self-efficacy management on adherence to self-care activities and treatment outcome among diabetes mellitus type 2 sudanese patients. *Pharmacy Practice.* 2018;16(4):1-7.
- Hailu FB, Moen A, Hjortdahl P. Diabetes self-management education (DSME) – Effect on knowledge, self-care behavior, and self-efficacy among type 2 diabetes patients in Ethiopia: A controlled clinical trial. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy.* 2019;12:2489–99.
- Lee SK, Shin DH, Kim YH, Lee KS. Effect of diabetes education through pattern management on self-care and self-efficacy in patients with type 2 diabetes. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 2019;16(18):3323.
- Hamidi S, Gholamnezhad Z, Kasraie N, Sahebkar A. The Effects of Self-Efficacy and Physical Activity Improving Methods on the Quality of Life in Patients with Diabetes: A Systematic Review. *Journal of Diabetes Research.* 2022;2022:1-14.
- Jiang X, Wang J, Lu Y, Jiang H, Li M. Self-efficacy-focused education in persons with diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Psychology Research and Behavior Management.* 2019;12:67–79.
- Goodall RJ, Ellauzi J, Tan MKH, Onida S, Davies AH, Shalhoub J. A Systematic Review of the Impact of Foot Care Education on Self Efficacy and Self Care in Patients With Diabetes. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery.* 2020;60:282–92.
- Erol O, Enc N. Hypoglycemia fear and self-efficacy of Turkish patients receiving insulin therapy. *Asian Nurs Res.* 2011;5(4):222–8.
- Erol O. Hypoglycemia Fear and Nursing Role for It's Management: Review. *Türkiye Klinikleri J Nurs Sci;* 2012;4(1):37–44.

19. Şahin D, Ersoy S, Pala E. Self-efficacy, medical adherence and related factors in patients with diabetes. *Fam Pract Palliat Care*. 2021;13–21.
20. Yuksel M, Bektas H. Compliance with treatment and fear of hypoglycaemia in patients with type 2 diabetes. *J Clin Nurs*. 2021;30(11–12):1773–86.
21. Cox DJ, Irvine A, Gonder-Frederick L, Nowacek G, Butterfield J. Fear of hypoglycemia: quantification, validation, and utilization. *Diabetes Care*. 1987;10(5):617–21.
22. Coşansu G, Erdoğan S. Çok boyutlu diyabet anketi Türkçe formunun geçerlik ve güvenilirlik çalışması. *Anadolu Hemşirelik ve Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2010;13(4):10–8.
23. Talbot F, Nouwen A, Gingras J, Gosselin M, Audet J. The assessment of diabetes-related cognitive and social factors: the multidimensional diabetes questionnaire France. *Journal of Behavioral Medicine*. 1997;20(3):291–312.
24. Tourkmani AM, Alharbi TJ, Rashed AMB, AlRasheed AN, AlBattal SM, Abdelhay O, et al. Hypoglycemia in Type 2 Diabetes Mellitus patients: A review article. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 2018;12(5):791–794.
25. Yun JS, Ko SH. Avoiding or coping with severe hypoglycemia in patients with type 2 diabetes. *Korean Journal of Internal Medicine*. 2015;30:6–16.
26. Gül Ş, Duru Aşiret G, Okatan C. Tip 2 Diyabetes mellitus hastalarının hipoglisemi korkusunun incelenmesi. *Dokuz Eylül Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Elektronik Dergisi*. 2021;14(3):179–187.
27. Li S, Fang L, Lee A, Hayter M, Zhang L, Bi Y, et al. The association between diabetes-related distress and fear of hypoglycemia in patients with type 2 diabetes mellitus: A cross-sectional descriptive study. *Nurs Open*. 2021;8(4):1668–77.
28. Maclean RH, Jacob P, Choudhary P, Heller SR, Toschi E, Kariyawasam D, et al. Hypoglycemia Subtypes in Type 1 Diabetes: An Exploration of the Hypoglycemia Fear Survey-II. *Diabetes Care*. 2022;45(3):538–46.
29. Wang Y, Zeng Z, Ding J, Yuan R, Wang R, Zhang Y, et al. Fear of hypoglycaemia among patients with type 2 diabetes mellitus: a cross-sectional study. Vol. 11, *Scientific Reports*. 2021;11:7971.
30. Rossi MC, Nicolucci A, Ozzello A, Gentile S, Agliatoro A, Chiambrini A et al. Impact of severe and symptomatic hypoglycemia on quality of life and fear of hypoglycemia in type 1 and type 2 diabetes. Results of the Hypos-1 observational study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2019;29:(736–743).
31. Özkaptan BB, Kapucu S, Demirci İ. Relationship between adherence to treatment and acceptance of illness in patients with type 2 diabetes. *Cukurova Med J*. 2019;44(1):447–54.
32. Przekaz A, Bielka W, Mołęda P. Fear of hypoglycemia-An underestimated problem. *Brain Behav*. 2022;12(7):1–9.
33. Polonsky WH, Fisher L, Hessler D. The impact of non-severe hypoglycemia on quality of life in patients with type 2 diabetes. *J Diabetes Complications*. 2018;32(4):373–8.
34. Shi Min Ko M, Kit Lee W, Chang Ang L, Goh SY, Mong Bee Y, Ming Teh M. A Cross-Sectional study on risk factors for severe hypoglycemia among Insulin-Treated elderly type 2 diabetes Mellitus (T2DM) patients in Singapore. *Diabetes Res Clin Pract*. 2022;185(February):109236.
35. Kav S, Yılmaz AA, Bulut Y, Dogan N. Self-efficacy, depression and self-care activities of people with type 2 diabetes in Turkey. *Collegian*. 2017;24(1):27–35.
36. Gedik S, Kocoglu D. Self-efficacy level among patients with type 2 diabetes living in rural areas. *Rural Remote Health*. 2018;18(1):4262.
37. Tekin Yanık Y, Erol Ö. Tip 2 Diyabetli Bireylerin öz-yeterlilik düzeylerinin değerlendirilmesi. *Journal of Anatolia Nursing and Health Sciences*. 2016;19(3):166–174.
38. Akturk U, Aydınalp E. Examining the correlation between the acceptance of the disease and the diabetes self-efficacy of the diabetic patients in a family health center. *Annals of Medical Research*. 2018;25(3):359–64.
39. Farley H. Promoting self-efficacy in patients with chronic disease beyond traditional education: A literature review. *Nursing Open*. 2020;7:30–41.
40. Arslan S, Kılıç M, Toğan M. Diyabetli hastalara verilen eğitim ve izlemlerin öz - etkililik düzeyi ve sağlık inancına etkisi. *Kocaeli Med J*. 2021;10:171–82.
41. Canbolat Ö, Ekenler Ş, Polat Ü. Diyabet özyönetiminde engeller ve kolaylaştırıcılar. *SDÜ Tıp Fak Derg*. 2022;29(1):143–148



## COMPARISON OF THE EFFECTS OF CLINICOPATHOLOGICAL AND RADIOLOGICAL FINDINGS ON SURVIVAL IN WOMEN YOUNGER THAN 40 YEARS AND OLDER THAN 55 YEARS OF AGE WITH BREAST CANCER

40 YAŞ ALTI VE 55 YAŞ ÜSTÜ MEME KANSERLİ KADINLARIN KLİNİKOPATOLOJİK VE RADYOLOJİK BULGULARININ SAĞ KALIM ÜZERİNE ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Buket ALTUN ÖZDEMİR<sup>1</sup>, Servet KOCAÖZ<sup>1</sup>, Bülent ÇOMÇALI<sup>1</sup>, Mustafa Ömer YAZICIOĞLU<sup>1</sup>, Fırat CANLIKARAKAYA<sup>1</sup>, Cengiz CEYLAN<sup>2</sup>, Birol KORUKLUOĞLU<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Ankara City Hospital, General Surgery Department, Breast and Endocrine Surgery Clinic, Ankara, TÜRKİYE

<sup>2</sup> Bingöl State Hospital, General Surgery Clinic, Bingöl, TÜRKİYE

<sup>3</sup> University of Health Sciences, Faculty of Medicine, Department of General Surgery, Istanbul, TÜRKİYE

**Cite this article as:** Altun Özdemir B, Kocaöz S, Çomçalı B, Yazıcıoğlu MÖ, Canlıkarakaya F, Ceylan C, Korukluoğlu B. Comparison of The Effects of Clinicopathological and Radiological Findings on Survival in Women Younger than 40 Years and Older than 55 Years of Age with Breast Cancer. Med J SDU 2023; 30(1): 37-45.

### Öz

#### Amaç

Meme kanserli kadınların tümörleri, yaşla birlikte gelişen hormonal değişikliklere bağlı olarak klinik ve biyolojik farklılıklar göstermektedir. Bu nedenle bu çalışmada meme kanserli hastaların <40 yaş ve ≥55 yaşlarının radyolojik ve klinikopatolojik özelliklerini karşılaştırdık.

#### Gereç ve Yöntem

10 yıllık dönemde üç merkezde meme kanseri nedeniyle opere edilen 40 yaş altı 92 hasta ve 55 yaş ve üzeri 322 hasta olmak üzere toplam 759 hastanın dosyaları geriye dönük olarak incelendi ve Östrojen Reseptör (ER), Progesteron Reseptör (PR), İnsan Epidermal Büyüme Faktörü 2 (HER2), Lenfovasküler İnvazyon (LVI) durumu, Aksiller Lenf Nodu Metastazi (ALNM) varlığı, multifokalite, Duktal Karsinoma İn situ (DCIS) veya Lobuler Karsinoma İn situ (LCIS)

varlığı, tümör boyutu, tümör histopatolojik tipi, tümör derecesi ve skoru kaydedildi.

#### Bulgular

40 yaşın altındaki hastalarda tümörün memenin üst-iç ve alt-iç kadrantlarında daha az yerleştiği, multifokalitenin ise daha sık görüldüğü, büyük bir çoğunluğunun dens meme yapısına sahip olduğu, tümörün histolojik derecesinin yüksek olduğu, LVI ve LNM'nin daha sık görüldüğü, daha düşük ER reseptör pozitifliği ve daha yüksek Ki-67 proliferasyon indeksine sahip olduğu saptandı (sırasıyla p<0.001, p<0.001, p<0.001, p<0.001, p=0.021, p=0.039, p=0.001 ve p<0.001). 55 yaşının altındaki hastalarda tümörlerde multifokalitenin ve meme dokusunun yoğunluğunun daha az olduğu görüldü (sırasıyla p=0.002, p<0.001). 40 yaş altı hastalarda moleküler alt tiplerden luminal B ve TN daha fazla görülürken 55 yaş üzeri hastalarda luminal A alt tipi daha fazla görüldü (sırasıyla p<0.001, p=0.001).

**Sorumlu yazar ve iletişim adresi /Corresponding author and contact address:** B.A.Ö. / drbuketozdemir@yahoo.com

**Müracaat tarihi/Application Date:** 02.10.2022 • **Kabul tarihi/Accepted Date:** 21.02.2023

**ORCID IDs of the authors:** BAO: 0000-0002-1043-8108; SK: 0000-0002-0085-2380;

BÇ: 0000-0002-2111-1477; MÖY:0000-0001-6150-0226; FC: 0000-0003-4858-7480;

CC: 0000-0003-3471-8726; BK: 0000-0003-4164-6898

**Sonuç**

<40 yaş ile 55 yaş ve üzeri hastalar arasında klinikopatolojik farklılıklar doğrulandı. 40 yaşın altındaki hastalarda meme kanseri için olumsuz prognostik faktörler ortaya çıktı.

**Anahtar Kelimeler:** Lenf nodu metastazı, Lenfovasküler invazyon, Meme kanseri, Meme yoğunluğu, Moleküler alt tip

**Abstract****Objective**

Tumors of women with breast cancer show clinical and biological differences depending on the hormonal changes that develop with age. Therefore, in this study, we compared the radiologic, and clinicopathological features of breast cancer patient's < 40 age and ≥55 age.

**Material and Method**

The files of a total of 759 patients, including 92 patients under 40 aged, and 322 patients 55 aged and over who were operated on for breast cancer over a 10-year period in three centres were retrospectively reviewed and Estrogen Reseptor (ER), Progesteron Reseptor (PR), Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), Lymphovascular invasion (LVI) status, presence of axillary lymph node metastasis (ALNM), multifocality, presence of Ductal Carcinoma insitu (DCIS) or Lobular Carcinoma insitu (LCIS),

tumor size, tumor histopathological type, grade, and score were recorded.

**Results**

In patients under the age of 40, the tumor is less localized in the upper-inner and lower-inner quadrants of the breast, multifocality is more common, most of them have dense breast structure, the histological grade of the tumor is higher, LVI and LNM are more common. It was found that they had ER receptor positivity and higher Ki-67 proliferation index ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p = 0.021$ ,  $p = 0.039$ ,  $p = 0.001$  and  $p < 0.001$ , respectively). It was observed that the multifocality and density of breast tissue were lower in tumors in patients under 55 years of age ( $p = 0.002$ ,  $p < 0.001$ , respectively). Luminal B and TN were more common among molecular subtypes in patients under 40 years of age, while luminal A subtype was more common in patients over 55 years of age ( $p < 0.001$ ,  $p = 0.001$ , respectively).

**Conclusion**

Clinicopathological differences between <40 aged, and 55 aged and over patients were confirmed. Adverse prognostic factors for breast cancer at the age of under 40 patients were revealed.

**Keywords:** Breast cancer, Breast density, Lymph node metastasis, Lymphovascular invasion, Molecular subtype

**Introduction**

Breast cancer is the most common type of cancer in women. It ranks second among women deaths due to cancer (1). According to the International Cancer Research Agency 2018 statistics; 2.1 million patients were newly diagnosed with breast cancer (2). Among breast cancer risk factors; many factors are blamed such as; female gender, advanced age, family history, personal breast disease or cancer history, inherited genes that increase cancer risk, exposure to radiation, early menarche, late menopause, obesity, postmenopausal hormone therapy, never conceiving, and conceiving at an advanced age (3,4). Clinicopathological parameters used in breast cancer management and treatment which tumor size, axillary lymph node metastasis (ALNM), histological grade, lymphovascular invasion (LVI), estrogen receptor (ER), and progesterone receptor (PR) from hormone receptors, and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) status are the most important prognostic factors (5-7). Breast cancer is a heterogeneous

disease and 5 different molecular subtypes have been defined. These molecular subtypes consist of: luminal A, luminal B, HER2-enriched, triple-negative (TN) and basal-like groups (8, 9). Breast cancers of premenopausal and postmenopausal women have clinical and biological differences (10).

Since the menopausal status of the patients was not known, the patients were evaluated in two different ways to investigate the clinicopathological changes in breast cancer with age. The patients were divided into two groups as under 40 years old and over 40 years old. In addition, they were divided into two groups as under 55 years old and over 55 years old. Both age groups were evaluated within themselves.

**Material and Method**

1012 patients with invasive breast cancer who were operated in three general surgery clinics between April 1, 2010 and December 31, 2020 were included in the study. Informed consent was obtained from all

individual participants included in the current study.

Inclusion criteria of the patients in the study; older than 18 years, all the examinations performed before the diagnosis were in the patient file, and the mammography examinations before and after the diagnosis were performed, the pathologies of the biopsy and surgery specimen performed in our hospitals, and the patients came for regular polyclinic controls. 253 patients, whose surgical operations were performed in centers in different regions of Turkey and followed up in three centers participating in the study, were excluded from the study due to lack of data or difficulties in obtaining permission from the relevant clinics for ethics committee approval. From the retrospective file scanning of 759 patients whose data could be accessed, the patient's age, ER, PR, HER2, LVI status, presence of ALNM, multifocality, presence of DCIS or LCIS, tumor diameter, tumor histopathological type, grade, and score were recorded. Preoperative imaging reports and surgery reports of the patients were recorded. Besides, the mammography of the patients included in the study were evaluated as double-blind. From the follow-up notes, follow-up findings and overall survival times were calculated and recorded.

When specimens were evaluated immunohistochemically, nuclear staining for ER, PR and Ki-67 index and the presence of membranous staining for HER2 were accepted as positive findings. ER and PR are receptors that stimulate the growth of normal and neoplastic breast epithelium. ER and PR positive tumors are low grade and less aggressive. If the sample contains at least 1% positive invasive tumor nuclei, it is recommended that ER and PR tests be considered positive (11). In this way, the positivity of ER and PR was evaluated in our study. HER2's status was scored as 0, 1+, 2+ and 3+ according to staining intensity and membranous persistence. In cases where HER2 was 2+, DNA fluorescence in situ hybridization (FISH) result was checked. HER2 overexpression indicates aggressive clinical course and poor prognosis. The cases with Ki-67 proliferation index over 14% were accepted as Ki-67 positive.

The patients were divided into two groups as younger than 40 years old and above 40 years old. In addition, they were divided into two groups as under 55 and 55 and above. Both age groups were evaluated within themselves.

Statistical Package for Social Sciences (SPSS) software version 25.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) was used for statistical analysis. Descriptive

statistics, frequency and percentages of categorical variables were reported. Using the Chi-square test for categorical variables, we examined the relationship between patient age groups and molecular subtypes, tumor size, histopathological subtype, grade, presence of in situ carcinoma foci, multifocality, presence of LVI and ALNM status. Post-hoc analysis was performed with Bonferroni correction to find out where the significant difference between the groups originated. The significance of the difference between groups was analyzed using the Mann-Whitney U test for non-categorical variables such as ER positivity and Ki-67 proliferation index. The Kaplan-Meier method was used to calculate the mean survival length. Cox proportional hazard regression analysis was performed to estimate breast cancer-specific mortality hazard ratios (HR). If the p value was <0.05, the results were considered statistically significant.

## Results

The mean age of the patients was  $53.86 \pm 12.38$  (min: 21 years, median: 52 years and max: 94 years) years. Comparison of clinicopathological parameters of patients under 40 and over 55 years of age is summarized in Table 1. When the patients with breast cancer were evaluated in terms of the location of the tumor in the breast, it detected that the location of breast cancer was significantly less in the upper-inner and lower-inner quadrants in patients under the age of 40 ( $p < 0.001$ ). In terms of multifocality, significantly more multifocality was observed in breast cancer in patients under 40 years of age, while multifocality was observed less in patients over 55 years of age ( $p < 0.001$ ,  $p = 0.002$ , respectively). When the mammographic breast density was evaluated, it consisted of dense breast tissue in patients under 40 years of age, and non-dense breast tissue in patients 55 years of age and older ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ , respectively). When evaluated in terms of tumor grade, tumors of patients under 40 were significantly undifferentiated type ( $p < 0.001$ ). When evaluated in terms of LVI, LVI was significantly higher in patients under 40 years of age ( $p = 0.021$ ). When evaluated in terms of LNM, LNM was significantly higher in patients under 40 years of age ( $p = 0.039$ ). ER receptor positivity in patients under 40 years of age was significantly lower than patients aged 40 and over (56.5% vs 70.6%) ( $p = 0.001$ ). Ki-67 proliferation index and HER2 positivity were significantly higher in patients under 40 (41.3% vs 25.9%, 25% vs 16%, respectively) ( $p < 0.001$ ,  $p = 0.033$ , respectively). When evaluating in terms of molecular subtypes, luminal B and TN molecular subtypes were more common in patients under the age of 40, while luminal A and HER2-enriched molecular subtypes were less

Table 1

Comparison of clinicopathological parameters of patients under the age of 40 and above the age of 55.

			AGE 40		P Value	AGE 55		P Value			
			<40	≥40		<55	≥55				
DIAL	Central	N	4	20	<0.001	14	10	0.262			
		%	16.7	83.3		58.3	41.7				
	Upper inner quadrant	N	4	89		47	46				
		%	4.3	95.7		50.5	49.5				
	Upper outer quadrant	N	59	429		290	198				
		%	12.1	87.9		59.4	40.6				
	Lower inner quadrant	N	1	52		25	28				
		%	1.9	98.1		47.2	52.8				
	Lower outer quadrant	N	24	77		61	40				
		%	23.8	76.2		60.4	39.6				
	Multifocality	No	N	56		527	<0.001		318	265	0.002
			%	9.6		90.4			54.5	45.5	
Yes		N	36	140	119	57					
		%	20.5	79.5	67.6	32.4					
DCIS or LCIS presence	No	N	29	240	0.402	148	121	0.291			
		%	10.8	89.2		55	45				
	Yes	N	63	427		289	201				
		%	12.9	87.1		59	41				
Microcalcification	No	N	73	510	0.539	329	254	0.246			
		%	12.5	87.5		56.4	43.6				
	Yes	N	19	157		108	68				
		%	10.8	89.2		61.4	38.6				
Density	Not dense	N	3	136	<0.001	18	121	<0.001			
		%	2.2	97.8		12.9	87.1				
	Normal	N	9	260		130	139				
		%	3.3	96.7		48.3	51.7				
	Dense	N	80	271		289	62				
		%	22.8	77.2		82.3	17.7				
Grade according to Bloom Richardson	Undifferentiated	N	33	155	<0.001	121	67	0.054			
		%	17.6	82.4		64.4	35.6				
	Moderately differentiated	N	48	317		196	169				
		%	13.2	86.8		53.7	46.3				
	Differentiated	N	11	195		120	86				
		%	5.3	94.7		58.3	41.7				
LVI	No	N	50	444	0.021	281	213	0.598			
		%	10.1	89.9		56.9	43.1				
	Yes	N	42	223		156	109				
		%	15.8	84.2		58.9	41.1				
LNM	No	N	49	429	0.039	263	215	0.063			
		%	10.3	89.7		55	45				
	Yes	N	43	238		174	107				
		%	15.3	84.7		61.9	38.1				

Table 1  
Continued

Comparison of clinicopathological parameters of patients under the age of 40 and above the age of 55.

			AGE 40		P Value ≥55	AGE55		P Value			
			<40	≥40		<55	≥55				
Luminal	Luminal A	N	30	353	< 0.001	198	185	0.001			
		%	7.8	92.2		51.7	48.3				
	Luminal B	N	40	154		128	66				
		%	20.6	79.4		66	34				
	HER2-enriched	N	5	48		24	29				
		%	9.4	90.6		45.3	54.7				
	Triple-negative	N	11	69		54	26				
		%	13.8	86.3		67.5	32.5				
	Normal-like	N	6	43		33	16				
		%	12.2	87.8		67.3	32.7				
	Stage	Stage I	N	27		271	0.276		169	129	0.426
			%	9.1		90.9			56.7	43.3	
Stage IIa		N	35	222	143	114					
		%	13.6	86.4	55.6	44.4					
Stage IIb		N	14	88	58	44					
		%	13.7	86.3	56.9	43.1					
Stage IIIa		N	13	58	48	23					
		%	18.3	81.7	67.6	32.4					
Stage IIIb		N	0	2	2	0					
		%	0	100	100	0					
Stage IIIc		N	3	26	17	12					
		%	10.3	89.7	58.6	41.4					
Surgery technique	BCS	N	49	426	0.140	266	209	0.078			
		%	10.3	89.7		56	44				
	Mastectomy	N	20	116		90	46				
		%	14.7	85.3		66.2	33.8				
	MRM	N	23	125		81	67				
		%	15.5	84.5		54.7	45.3				
Tracking Status	Survive	N	86	602	0.320	404	284	0.047			
		%	12.5	87.5		58.7	41.3				
	Death	N	6	65		33	38				
		%	8.5	91.5		46.5	53.5				
Total %	N	92	667	57.6	437	322					
	%	12.1	87.9		42.4						

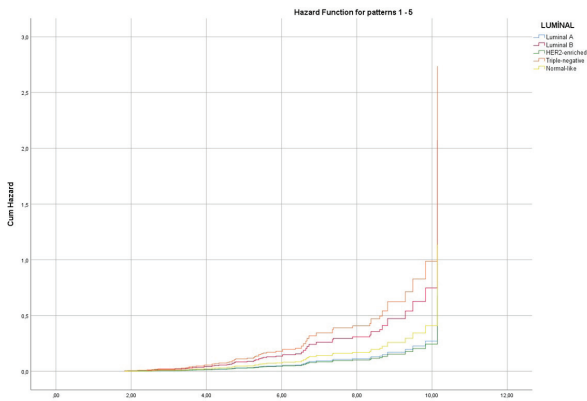
common. It was determined that TN subtypes were less common in patients 55 years of age and older, while luminal A and HER2-enriched subtypes were more common ( $p < 0.001$ ,  $p = 0.001$ , respectively).

When the patients were followed for an average of  $5.27 \pm 2.34$  years (min:1.82 years and max:10.48

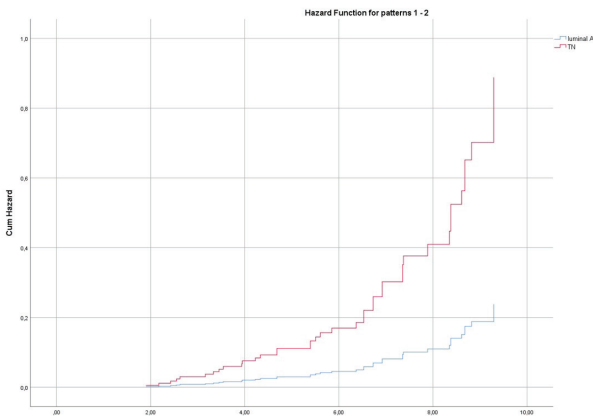
years), 6 of the patients under the age of 40 and 38 of the patients above the age of 55 died due to factors, associated with breast cancer. The effects of risk factors on HR in breast cancer are summarized in Table 2. When the patients were evaluated in terms of overall survival, patients aged 55 and over significantly died more ( $p = 0.047$ ). When Cox-Regression analysis was

**Table 2** Effects of risk factors on HR in breast cancer

	B	HR	95,0% CI for HR		P Value
			Lower	Upper	
AGE < 40	-0.423	0.655	0.263	1.631	0.363
AGE ≥ 55	-0.522	0.593	0.370	0.952	0.030
Multifocality	-0.605	0.546	0.333	0.895	0.016
LVI	-1.110	0.330	0.206	0.527	<0.001
Ki-67 Proliferation index	-1.119	0.327	0.198	0.537	<0.001
Luminal B & luminal A	-0.971	0.379	0.213	0.672	0.001
TN & luminal A	-1.317	0.268	0.139	0.518	<0.001

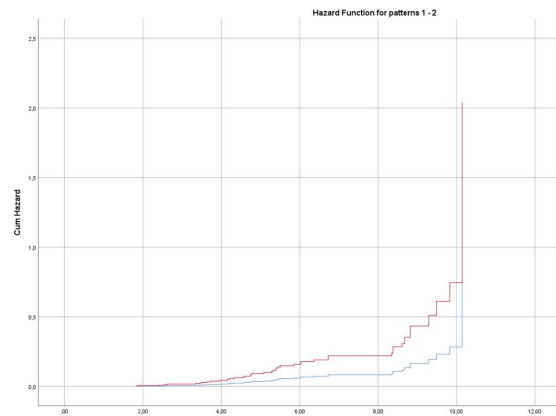


**Figure 1:** Chart showing Hazard ratio according to breast cancer subtypes.



**Figure 2:** Graph comparing Luminal A and TN hazard ratio from breast cancer subtypes

performed, HR was significantly higher in patients 55 years of age and older, those with multifocality, those with LVI and those with high Ki-67 proliferation index. Hazard ratio according to breast cancer molecular subtypes are shown in Figure 1. Compared to the luminal A molecular subtype, HR was significantly higher in luminal B, and TN molecular subtypes. The comparison of the HR of luminal A with luminal B and TN molecular subgroups, which are among the breast cancer molecular subtypes, are shown in Figure 2 and Figure 3.



**Figure 3:** Graph comparing Luminal A and Luminal B ratio from breast cancer subtypes

### Discussion

Breast cancer is most common in the upper outer quadrant of the breast (12, 13). Tumor location in the breast has clinical and prognostic importance. Tumors originating from the inner quadrant of the breast, the

nipple, or the middle part of the breast have worse prognostic outcomes than the upper outer quadrant of the breast (14-16). Kocic B et al. reported that in patients with breast cancer under the age of 40, tumor is most frequently detected in the upper outer quadrant of the breast (17). In our study, tumor was detected most frequently in the upper outer quadrant of the breast. In addition, it was found that in patients under the age of 40, tumor was less common in the lower-inner and upper-inner quadrants of the breast.

Fried G et al. reported that patients under 40 years of age (in the premenopausal period) with multifocal tumors and LVI have a high risk of local recurrence and poor prognosis (18). Foxcroft LM et al. reported multifocality at a rate of approximately 20% in mammography and 33.6% by USG in patients under 40 years of age (19). Appleton DC et al. suspected multifocality in 50% of patients under the age of 40 with preoperative Magnetic Resonance Imaging (MRI) and confirmed the presence of multifocality histologically in 40.5% (20). In our study, 39.13% of patients under the age of 40 had multifocality. Multifocality was 20.99% in patients 40 years and older, and 17.70% and even lower in those 55 years and older. Our study shows that with increasing age, multifocality decreases.

Durhan G et al. reported that 40.2% of patients with breast cancer under the age of 40 have microcalcifications in their mammograms (21). Muttarak M et al. reported that they detected microcalcification at a rate of 28.7% in mammography of patients with breast cancer under the age of 40, with or without breast pathology (22). In another study, Schnejder-Wilk A reported the rate of microcalcified tumors in mammography in patients with breast cancer under 45 years of age as 20.8% (23). In our study, microcalcification was found at a rate of 20.65% where there is breast pathology. Also, there was no significant difference between age groups.

Checka CM et al. reported in their study that there was an inverse relationship between age and breast density (24). In a similar study, Liao YS et al. classified at least 80% of mammograms of patients under the age of 55 as excessively dense or heterogeneously dense breasts (25). In our study, 86.96% of patients with breast cancer under the age of 40 had dense breast tissue, while it was found that dense breast tissue decreased to 19.25% in patients over 55 years old.

Erić I et al. classified the patients with breast cancer under the age of 40 according to the tumor grade, and reported that 16.5% of the patients consisted of grade 1, 54.4% grade 2 and 29.1% grade 3 tumors (26). In

another study, Bakkach J et al. reported that the rate of grade 3 patients in patients under the age of 40 was 40.2% (27). In our study, 11.96% of the patients under the age of 40 had grade 1, 52.17% grade 2 and 35.87% grade 3 patients. Tumor grade of patients over 40 years of age consisted of 29.24% grade 1, 47.53% grade 2 and 23.24% grade 3 patients. Our study shows that significantly undifferentiated tumors are seen more frequently in patients with breast cancer under the age of 40.

Bakkach J et al. reported that they detected LVI in 47.7% of patients aged 40 and under (27). In another study, Tvedskov TF et al. reported that LVI and ALNM were seen more (3.6 times) in patients under 40 years old (28). In our study, LVI (45.65% vs 33.43%) in patients under 40 years of age was significantly higher than in patients over 40 years of age.

Eugênio DS et al. reported that luminal B and TN molecular subtypes were observed more frequently in their studies on breast cancer patients under the age of 40 (29). In a similar study, Wang JM et al. reported that luminal B and TN molecular subtype tumors are common in breast cancer patients under the age of 40, and the risk of developing luminal A molecular subtype cancer is increased in patients over 40 years of age (30). In another study, Erić I et al. reported that breast cancers in patients under 40 years of age consist of patients with multicentric localization, TN molecular subtype, more ER negativity and high Ki-67 proliferation index (31). Similarly, in our study, ER receptor positivity was lower and Ki-67 proliferation index was higher in patients under 40 years of age. In addition, luminal B and TN molecular subtypes were found to be more common. We found out that the TN subtypes were less common in patients aged 55 years and older, while luminal A and HER2-enriched subtypes were more common.

Young patients' tumors have a more aggressive biological nature compared to older patients. Tumor nuclear grade and proliferation index are higher, LVI and LNM are more common. In addition, the disease relapses more frequently in younger patients and has a worse prognosis in terms of survival (31, 32). Although HR was high in patients under the age of 40 in our study, the cox-regression test was not significant due to the low number of patients who died in our study. HR was higher in patients 55 years and older due to concomitant chronic diseases. The presence of LVI, multifocality, high Ki-67 proliferation index, and having luminal B and TN molecular subtype tumors were found to cause an increase in HR.

Breast cancer in women under 40 years; it was found that it was less common in the inner quadrants of the breast, and multifocal was higher. While breast density was denser in mammography of patients under 40 years with breast cancer, patients aged 55 and over had lower breast density. Undifferentiated type tumors are more common in patients under the age of 40, and LVI is more common in these patients. It is seen that ER receptor positivity is lower, Ki-67 proliferation index is higher in patients under 40 years of age. When evaluated in terms of molecular subtypes, luminal B and TN molecular subtypes were more common in patients younger than 40 years of age, while molecular subtypes enriched with luminal A and HER2-enriched were more common over 55 years of age. The presence of LVI, multifocality, high Ki-67 proliferation index, luminal B, and TN molecular subtypes increase HR significantly in breast cancer.

Ankara City Hospital, Ankara Numune and Training and Research Hospital and Ankara Atatürk Training and Research Hospital data were included in the study. The authors consist of surgeons working in these three hospitals. Due to the retrospective nature of the study, data on menopause status were not available when patients were diagnosed with breast cancer.

#### Conflict of Interest Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

#### Ethical Approval

The study was found ethically appropriate by the decision of the Ankara City Hospital Ethics Committee, dated 06.01.2021 and numbered 1413. Education Institutions Scientific Research and Publication Ethics Directive" are complied with, and that none of the actions stated under the heading "Actions Against Scientific Research and Publication Ethics" are not carried out.

#### Consent to Participate and Publish

Written informed consent to participate and publish was obtained from all individual participants included in the study.

#### Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

#### Availability of Data and Materials

Veriler, gizlilik veya diğer kısıtlamalar nedeniyle yalnızca yazarlardan talep edilebilir.

#### Authors Contributions

BAÖ: Conceptualization; Investigation; Methodology; Writing-original draft

SK: Conceptualization; Methodology; Project administration; Writing-review & editing

BÇ: Formal analysis; Investigation; Validation

MÖY: Formal analysis; Investigation; Visualization

FC: Data curation

CC: Data curation

BK: Editing

#### References

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2020. Breast Cancer Statistics 2017. Retrieved from <https://gis.cdc.gov/Cancer/USCS/DataViz.html>.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.
- Thorat MA, Balasubramanian R. Breast cancer prevention in high-risk women. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2020;65:18-31.
- Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, et al. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci.* 2017;13(11):1387-97.
- Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer.* 2007;109(9):1721-8.
- Öztürk VS, Polat YD, Soyder A, Tanyeri A, Karaman CZ, Taşkın F. The Relationship Between MRI Findings and Molecular Subtypes in Women With Breast Cancer. *Curr Probl Diagn Radiol.* 2020;49(6):417-21.
- Morkavuk ŞB, Güner M, Çulcu S, Eroğlu A, Bayar S, Ünal AE. Relationship between lymphovascular invasion and molecular subtypes in invasive breast cancer. *Int J Clin Pract.* 2020;6:e13897.
- Pourteimoor V, Mohammadi-Yeganeh S, Paryan M. Breast cancer classification and prognostication through diverse systems along with recent emerging findings in this respect; the dawn of new perspectives in the clinical applications. *Tumour Biol.* 2016;37(11):14479-99.
- Tsang JYS, Tse GM. Molecular Classification of Breast Cancer. *Adv Anat Pathol.* 2020;27(1):27-35.
- Kocaöz S, Korukluoğlu B, Parlak Ö, Doğan HT, Erdoğan F. Comparison of clinicopathological features and treatments between pre- and postmenopausal female breast cancer patients - a retrospective study. *Prz Menopauzalny.* 2019;18(2):68-73.
- Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Haggerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28(16):2784-95.
- Sisti A, Huayllani MT, Boczar D, Restrepo DJ, Spaulding AC, Emmanuel G, et al. Breast cancer in women: a descrip-



- tive analysis of the national cancer database. *Acta Biomed.* 2020;91(2):332-41.
13. Han Y, Moore JX, Langston M, Fuzzell L, Khan S, Lewis MW, et al. Do breast quadrants explain racial disparities in breast cancer outcomes? *Cancer Causes Control.* 2019;30(11):1171-82.
  14. Sohn VY, Arthurs ZM, Sebesta JA, Brown TA. Primary tumor location impacts breast cancer survival. *Am J Surg.* 2008;195(5):641-4.
  15. Shahar KH, Buchholz TA, Delpassand E, Sahin AA, Ross MI, Ames FC, et al. Lower and central tumor location correlates with lymphoscintigraphy drainage to the internal mammary lymph nodes in breast carcinoma. *Cancer.* 2005;103(7):1323-9.
  16. Zhang M, Wu K, Zhang P, Wang M, Bai F, Chen H. Breast-Conserving Surgery is Oncologically Safe for Well-Selected, Centrally Located Breast Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2021;28(1):330-9.
  17. Kocic B, Filipovic S, Vrbic V, Pejicic I. Breast cancer in women under 40 years of age. *J BUON.* 2011;16(4):635-9.
  18. Fried G, Kuten A, Dedea S, Borovik R, Robinson E. Experience with conservative therapy in primary breast cancer: experiences Northern Israel Oncology Center, 1981-1990. *Harefuah.* 1996;130(9):589-93, 654.
  19. Foxcroft LM, Evans EB, Porter AJ. The diagnosis of breast cancer in women younger than 40. *Breast.* 2004;13(4):297-306.
  20. Appleton DC, Hackney L, Narayanan S. Ultrasonography alone for diagnosis of breast cancer in women under 40. *Ann R Coll Surg Engl.* 2014;96(3):202-6.
  21. Durhan G, Azizova A, Önder Ö, Kösemehmetoğlu K, Karakaya J, Akpınar MG, et al. Imaging Findings and Clinicopathological Correlation of Breast Cancer in Women under 40 Years Old. *Eur J Breast Health.* 2019;15(3):147-52.
  22. Muttarak M, Pojchamarnwiputh S, Chaiwun B. Breast cancer in women under 40 years: preoperative detection by mammography. *Ann Acad Med Singap.* 2003;32(4):433-7.
  23. Schnejder-Wilk A. Breast cancer imaging: Mammography among women of up to 45 years. *Pol J Radiol.* 2010;75(1):37-42.
  24. Checka CM, Chun JE, Schnabel FR, Lee J, Toth H. The relationship of mammographic density and age: implications for breast cancer screening. *AJR Am J Roentgenol.* 2012;198(3):W292-5.
  25. Liao YS, Zhang JY, Hsu YC, Hong MX, Lee LW. Age-Specific Breast Density Changes in Taiwanese Women: A Cross-Sectional Study. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(9):3186.
  26. Erić I, Petek Erić A, Koprivčić I, Babić M, Pačarić S, Trogrlić B. Independent factors FOR poor prognosis in young patients with stage I-III breast cancer. *Acta Clin Croat.* 2020;59(2):242-51.
  27. Bakkach J, Mansouri M, Derkaoui T, Loudiyi A, Fihri M, Hassani S, et al. Clinicopathologic and prognostic features of breast cancer in young women: a series from North of Morocco. *BMC Womens Health.* 2017;17(1):106.
  28. Tvedskov TF, Jensen MB, Lisse IM, Ejlersen B, Balslev E, Kroman N. High risk of non-sentinel node metastases in a group of breast cancer patients with micrometastases in the sentinel node. *Int J Cancer.* 2012;131(10):2367-75.
  29. Eugênio DS, Souza JA, Chojniak R, Bitencourt AG, Graziano L, Souza EF. Breast cancer features in women under the age of 40 years. *Rev Assoc Med Bras (1992).* 2016;62(8):755-61.
  30. Wang JM, Wang J, Zhao HG, Liu TT, Wang FY. Reproductive Risk Factors Associated with Breast Cancer Molecular Subtypes among Young Women in Northern China. *Biomed Res Int.* 2020;2020:5931529.
  31. Erić I, Petek Erić A, Kristek J, Koprivčić I, Babić M. Breast cancer in young women: pathologic and immunohistochemical features. *Acta Clin Croat.* 2018;57(3):497-502.
  32. Han W, Kim SW, Park IA, Kang D, Kim SW, Youn YK, et al. Young age: an independent risk factor for disease-free survival in women with operable breast cancer. *BMC Cancer.* 2004;4:82.



# BUĞDAY ÇİMİNİN İNSAN LENFOSİT HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

## EFFECT OF WHEATGRASS ON HUMAN LYMPHOCYTE CELLS

Okan SANCER<sup>1,2</sup>, Zehra SAFİ ÖZ<sup>3</sup>, Pınar ASLAN KOŞAR<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, Isparta, TÜRKİYE

<sup>2</sup> Süleyman Demirel Üniversitesi, Yenilikçi Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi, Genetik Araştırmalar Birimi, Isparta, TÜRKİYE

<sup>3</sup> Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, Isparta, TÜRKİYE

**Cite this article as:** Sancer O, Safi Öz Z, Aslan Koşar P. Buğday Çiminin İnsan Lenfosit Hücreleri Üzerine Etkisi. Med J SDU 2023; 30(1): 47-55.

### Öz

#### Amaç

Kemoterapötik ilaçlar kanser hücrelerinin ortadan kaldırılmasında etkili iken aynı zamanda sağlıklı hücrelerde de hasar oluşturabilmektedir. Bu çalışmada, buğday çimi (*Triticum aestivum* L.) ekstraktının fenolik bileşen içeriğinin analizi ve bu ekstraktın kemoterapötik tedavide kullanılan sisplatin ve etoposid'in sağlıklı hücrelerde oluşturduğu DNA hasarına karşı etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

#### Gereç ve Yöntem

Çimlendirilmiş buğdayların metanol ekstraktı hazırlanarak HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi) ile fenolik bileşen analizi yapıldı. Buğday ekstraktı konsantrasyonuna bağlı hücre canlılık testi uygulanarak IC<sub>50</sub> (Yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu) ve LD<sub>50</sub> (ortalama öldürücü doz) değerleri hesaplandı. Belirlenen bu konsantrasyon değerleri ile hücreler in kübe edilerek DNA hasarı varlığı Comet metodu ile değerlendirildi.

#### Bulgular

Fenolik bileşen analizi sonucunda p-hidroksibenzoik asit en yüksek miktarda, o-kumarik asit ise en düşük düzeyde tespit edildi. Lenfosit hücrelerine uygulanan farklı konsantrasyonlardaki buğday çimi ekstraktı, etoposid ve sisplatin için değerler sırasıyla IC<sub>50</sub>=204,6 µg/mL, LD<sub>50</sub>=15,84 µg/mL ve LD<sub>50</sub>=24,51 µg/mL ola-

rak bulundu. Comet analizi sonucunda kontrol grubuna kıyasla, etoposid LD<sub>50</sub> ve etoposid LD<sub>50</sub>+buğday çimi ekstraktı IC<sub>50</sub> grubu istatistiksel olarak anlamlı bulunurken (p<0,05), etoposid LD<sub>50</sub> ve etoposid LD<sub>50</sub>+buğday çimi ekstraktı IC<sub>50</sub> grubu arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunamadı (p>0,05). Bu sonuca benzer olarak kontrol grubuna kıyasla, sisplatin LD<sub>50</sub> ve sisplatin LD<sub>50</sub>+buğday çimi ekstraktı IC<sub>50</sub> grubu istatistiksel olarak anlamlı bulunurken (p<0,05), etoposid LD<sub>50</sub> ve etoposid LD<sub>50</sub>+buğday çimi ekstraktı IC<sub>50</sub> grubu arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı (p>0,05).

#### Sonuç

Çalışmamızda buğday çiminin etoposid ve sisplatin nedeni ile oluşan DNA hasarında azalmaya neden olduğu görülmüş olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Buğday çimi, Comet metodu, HPLC, MTT

#### Abstract

#### Objective

While chemotherapeutic drugs are effective at eliminating cancer cells, they can also damage healthy cells. The aim of this study was to analyze the phenolic component content of wheatgrass extract (*Triticum aestivum* L.) and to determine the effect of this

**Sorumlu yazar ve iletişim adresi /Corresponding author and contact address:** O.S. / okansancer@hotmail.com

**Müracaat tarihi/Application Date:** 24.01.2023 • **Kabul tarihi/Accepted Date:** 28.02.2023

**ORCID IDs of the authors:** O.S: 0000-0001-7935-5004; Z.S.Ö: 0000-0003-1359-5026;

P.A.K: 0000-0003-2602-5145

extract against DNA damage caused by cisplatin and etoposide used in chemotherapeutic treatment in healthy cells will.

### Material and Method

Sprouted wheat methanol extract was prepared and analysis of phenolic components was performed by HPLC (high performance liquid chromatography). IC<sub>50</sub> (half maximal inhibitory concentration) and LD<sub>50</sub> (median lethal dose) values were calculated by applying a cell viability assay based on wheat extract concentration. Cells were incubated at these determined concentration levels and the presence of DNA damage was assessed by the Comet method.

### Results

As a result of the phenol component analysis, p-hydroxybenzoic acid was determined in the highest amount and o-coumaric acid in the lowest amount. The values for wheatgrass extract, etoposide and cisplatin at different concentrations applied to lymphocyte cells were found to be IC<sub>50</sub>=204.6 µg/mL,

LD<sub>50</sub>=15.84 µg/mL and LD50=24.51 µg/mL, respectively. As a result of comet analysis, it was found that etoposide LD<sub>50</sub> and etoposide LD<sub>50</sub>+wheatgrass extract IC<sub>50</sub> group were statistically significant (p<0.05), compared to the control group, there was no statistical significance between etoposide LD<sub>50</sub> and etoposide LD<sub>50</sub>+wheatgrass extract IC<sub>50</sub> group (p>0.05). Similar to this result, cisplatin LD<sub>50</sub> and cisplatin LD<sub>50</sub>+wheatgrass extract IC50 group were found to be statistically significant compared to the control group (p<0.05), while there was no statistical significance between etoposide LD<sub>50</sub> and etoposide LD<sub>50</sub>+wheatgrass extract IC<sub>50</sub> group (p> 0.05).

### Conclusion

Although wheatgrass was observed in our study to cause a reduction in DNA damage caused by etoposide and cisplatin, no statistical significance was found.

**Keywords:** Comet method, HPLC, MTT, Wheatgrass

## Giriş

Kanser tedavisinde birçok farklı seçenek mevcut olmakla birlikte her geçen gün tedavi yöntemlerine bir yenisi daha eklenmektedir. Kemoterapi, kanser hücrelerinin büyüme ve çoğalmalarını engelleyerek, onları ortadan kaldırmayı hedefleyen güçlü ilaçların kullanıldığı bir yöntem olup kanser tedavisinde oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır (1). Bu yöntemde kullanılan ilaçlar kimyasal yapılarına ve vücuttaki mekanizmalarına göre sınıflandırılmaktadır.

Sisplatin, mesane, kan, meme, servikal, özofagus, baş ve boyun, akciğer, yumurtalık, testis ve sarkom gibi insan kanserlerinin tedavisinde yaklaşık 50 yıldır kullanılan ve klinik olarak oldukça etkili kemoterapötik ajanlardandır. Ancak ciddi yan etkileri nedeniyle klinik pratikte kullanımı sınırlılık göstermektedir. Sisplatin kanser hücresi tarafından alındıktan sonra hücrenel makromoleküllerle etkileşime girer ve sitotoksik etkilerini bir dizi biyokimyasal mekanizma yoluyla DNA'ya bağlanarak gerçekleştirir. Bu bağlanma ile DNA sentezi ve hücre büyümesinin inhibisyonuna yol açar. Birincil moleküler etki mekanizması, lipid peroksidasyonu yoluyla reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretilmesinden kaynaklanan apoptotik yollarının indüklenmesi, çeşitli sinyal iletim yollarının aktivasyonu, p53 aracılı hücre döngüsünün durması, pro-apoptotik genlerin/protein-

lerin yukarı regülasyonu ve proto-onkogenlerin ve anti-apoptotik genlerin/proteinlerin aşağı regülasyonu ile ilişkilendirilmiştir (2-4).

Etoposide klinik olarak kullanılan bir diğer kemoterapötik ajandır. Kliniklerde yaygın olarak kullanılan bu ajan akciğer ve meme kanseri, lenfoma, lösemi gibi çok sayıda kanserin tedavisi için kombinasyon kemoterapilerinin temel ve önemli bir parçasıdır. Etoposid hücrelerde bir Topoizomeraz II (TOP2) inhibitörü olarak görev yapmaktadır. Bu inhibisyon, etoposidin anti-kanser mekanizması olarak kabul edilir. TOP2 (alfa ve beta izoformları), DNA replikasyonu sırasında üzerinde oluşan düğümleri düzenleyen, eksik ve fazla sarılmasını düzenleyen enzimlerdir. TOP2 enzimlerinin inhibitörü olan etoposid, DNA üzerinde çift sarmal kırılmalarına neden olarak yapısında bozulmalara neden olur. Bu yapıların hücrelerde birikmesi sonucunda apoptotik mekanizma tetiklenir. Böylece kanser tedavisinde bütünleyici bir rol oynar. Genel olarak, TOP2 enzimleri geçici bir TOP2-DNA bölünme kompleksi (TOP2cc) oluşturur ve işlem tamamlanınca bu yapı ayrılır. İnhibitörler, TOP2 ile etkileşime girdiğinde ise DNA moleküllerini bağlama yeteneğini inhibe ederek veya enzim aracılı DNA parçalanma oranını artırarak çift zincir kırığı birikimine yol açar. Zamanla bu çift zincir kırıkları tamir edilemezse hücre apoptoz sürecine doğru ilerler (5, 6).

Kanser tedavisi farklı kemoterapötik ajanların hiperproliferatif özellikte olan hücrelerin yanı sıra, normal hücrelerin de birçok yönden toksik olarak etkilenmesi ile yönetilmektedir (7). Kanser hastaları arasında tamamlayıcı tıp yöntemlerinin kullanımı yaygındır ve kullanım oranı her geçen gün artmaktadır. Hastaların bu seçeneği standart onkoloji tedavilerine bir 'alternatif' olarak mı yoksa ek olarak mı kullandıkları açık değildir (8).

Buğday çimi (*Triticum aestivum* L.) ekstraktının sağlıklı ve hasta kişiler tarafından besin takviyesi olarak tüketimi oldukça yaygındır. Bunun nedeni diğer besinlerin yanı sıra buğday çiminin yüksek konsantrasyonlarda vitamin, mineral, klorofil ve enzimler de dahil olmak üzere çok etkili bir sağlık besin maddesi içermesinden kaynaklanmaktadır. Buğday çimi yeryüzünde bulunan 102 elementten 98'ini içeren bir besin kaynağıdır. Bu sayede vücuttan toksinleri bir miknatıs gibi çekme özelliğine sahiptir (9). Yüksek miktarda klorofil içeriği sayesinde ise kanserojenlerin metabolik aktivasyonunu engellediği ve bağışıklık sistemini güçlendirdiği bildirilmektedir. Buğday çiminin, ROT'u hidrojen peroksit ve oksijen molekülüne dönüştürme potansiyeline sahip süperoksit dismutaz (SOD) ve sitokrom oksidaz gibi antioksidan enzimler içerdiği bilinmektedir. Bu sayede DNA hasarını önleme ve onarmada etkilidir (10). Fenolik bileşikler, oksidatif stresin etkisini tersine çeviren ve çeşitli dejeneratif hastalık ve bozuklukların insidansını azaltan buğday çiminin bir başka ilginç bileşenini temsil eder (11). Apigenin, kersitin ve luteolin gibi yüksek biyoflavonoid konsantrasyonu, bitkiye önemli antioksidan aktivite kazandırır. Demir, fosfor, magnezyum, manganez, bakır ve çinko büyük miktarlarda bulunur. Buğday çimi, diğer diyetlerde görülmeyen 20 farklı amino asit ve yüzlerce enzime sahiptir. Ayrıca yüksek miktarlarda E vitamini, C vitamini, karoten ve tokoferoller de içerir (9). Genel olarak, buğday çimindeki biyolojik olarak aktif bileşikler, kardiyovasküler hastalıkların, ülseratif kolit, talasemi, karaciğer hasarı, diyabet, kanser ve alerjinin iyileştirilmesine ve önlenmesine de katkıda bulunur (12).

Bu çalışmada, buğday çim ekstraktının fenolik bileşen içeriğinin analizi ve kemoterapötik tedavide kullanılan sisplatin ve etoposid'in insan lenfosit hücrelerinde oluşturduğu DNA hasarı üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

### Buğday Çim Ekstraktı Hazırlığı ve Fenolik Bileşen Analizi

Bu çalışmada, çimlendirme ve ekstraksiyon yönteminde bazı modifikasyonlar uygulanarak aşağıdaki adımlar takip edilmiştir (7, 13).

Organik buğday taneleri (*Triticum aestivum* L.) içerisindeki istenmeyen yabancı maddelerden temizlenip, distile su ile yıkanarak hacminin yaklaşık 3 katı kadar su içerisinde 8-10 saat boyunca bekletildi ve suyu süzildükten sonra yıkanarak petri kaplarında kurutma kâğıtları arasına yerleştirilmiş bir şekilde su ile ıslatılarak  $20\pm 2^\circ\text{C}$ 'de, 10 gün boyunca çimlendirilmesi takip edildi ve tohumların kurumamasına özen gösterildi. Buğday çimleri taze şekilde kesilerek 15 gr olacak şekilde tartıldı ve distile su ile yıkandı. Daha sonra üzerine 120 mL metanol (Merck, Almanya) eklenerek homojenize edildi ve ultrasonik banyoda 1 saat boyunca bekletildi. Ekstrakt Whatman 1 nolu filtre kağıdından süzülüp  $40^\circ\text{C}$ 'de evapore edildi. Ekstrakt evapore edilmesinin ardından içerisine 5 mL metanol eklenerek çözünmesi sağlandı. Çözünen bu karışımdan HPLC analizi 20 µl kullanıldı. Fenolik bileşik içeriklerinin tespiti için 278 nm dalga boyu, 0,8 mL/dk akış hızı ve Agilent Eclipse XDB C18 (4,6x250 mm) (5 µm) ters faz kolonu kullanıldı. Kolon sıcaklığı  $30^\circ\text{C}$  olarak belirlendi. Ayırma, bir gradyan programı kullanılarak ikili çözücüler sistemi ile gerçekleştirildi. A çözültisi yüzde üç asetik asit ve B çözültisi metanol içermekteydi.

Hücre kültürü için metanol ekstraktının evapore edilmesinin ardından, tartılan 0.4 gr kuru ekstrakt, RPMI 1640 (Biological Industries, Beith Haemek, İsrail) ile dilüe edilerek farklı konsantrasyonların hazırlanması sağlandı.

### Kan Örneğinin Eldesi

Çalışmada 26 yaşında kadın gönüllü yer almıştır. Gönüllünün katılım kriterleri arasında sigara içmemesi, 6 ay süre boyunca radyasyona maruz kalmamış olması (radyolojik görüntüleme geçirmemiş), düzenli olarak gıda takviyesi ve herhangi bir medikal ilaç kullanmaması ve bilenen bir rahatsızlığı olmaması kriterleri yer almaktadır. Çalışmaya katılım sağlayan gönüllüden lityum heparinli tüplere (vacu SEL, Türkiye) 20 mL kan örneği alınmıştır. Çalışma Helsinki Bildirgesi kurallarına uygun olarak hazırlanmıştır. Bu çalışma Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan onay alınarak yapılmıştır (02.11.2022-2022/19).

### Lenfosit Hücrelerinin Eldesi

Lenfositlerin eldesi için kan örnekleri ilk işlem olarak 1:1 oranında RPMI 1640 ile karıştırıldı. Daha sonra bu karışım tekrar 1:1 oranında olacak şekilde yavaşça histopak-1077 (Sigma-Aldrich, İsviçre) üzerine eklenmiş ve 2000 rpm'de  $4^\circ\text{C}$ 'de 20 dakika santrifüj işlemi yapıldı. Alınan lenfosit tabakası yeni tüpler içerisinde RPMI 1640 medyumunu ile homojen hale getirilerek 2500 rpm'de  $4^\circ\text{C}$ 'de 5 dakika santrifüj işlemi uygulandı. Santrifüj sonrası süpernatant kısım uzaklaştırıldı.

rılarak bu aşama tekrar edildi. Elde edilen hücrelerin canlılığı tripan mavisi kullanılarak %98 oranında belirlenmiştir (14).

### Hücre Kültürü

Elde edilen lenfosit hücreleri 96 kuyucuklu mikropalakalara  $1 \times 10^4$  hücre/kuyucuk olacak şekilde eklendi. Hücre kültürü ortamı RPMI-1640, penisilin (100 IU/mL), streptomisin (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) ve %10 fetal bovin serum (FBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) içerecek şekilde hazırlandı. Bu medyumda hücreler 37°C'de 5% CO<sub>2</sub> içeren ve nemli ortamda 24 saat kültüre edildi (15).

### Lenfositler'lere Farklı Konsantrasyonlarda Buğday Çimi Ekstraktı, Etoposid Ve Sisplatin Uygulanması

Hücrelerin inkübasyonundan sonra kuyucuklara buğday çimi ekstraktından 39.05, 78.1, 156.25, 312.5, 625, 1250, 2500 µg/mL, sisplatin'ten (Koçak Farma, Türkiye) 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 µg/mL, etoposid'den (Koçak Farma, Türkiye) 11.71, 23.43, 46.87, 93.75, 187.5, 375, 750, 1500 µg/mL ve negatif kontrol grupları olacak şekilde uygulandı. Her konsantrasyon olası bir hatayı engellemek üzere üç tekrarlı olarak çalışıldı. Hücrelerin ekstraktla ve ilaçlarla 37 °C'de 5% CO<sub>2</sub> içeren ve nemli ortamda 24 saat kültür edilmesini takiben son konsantrasyonu 0.5 mg/mL olacak şekilde MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) solüsyonu eklendi. Mikropalakanın 4 saat 37 °C'de 5% CO<sub>2</sub> içeren etüvde inkübasyonu sonrası inverted mikroskop altında hücreler incelendi. Daha sonra tüm medyum alınarak 200 µL DMSO eklendi. Mikropalte okuyucu ile 570 nm'de absorbans değerleri ölçüldü (16).

### Comet Yöntemi

Comet uygulaması Singh et al. (1988) referans alınıp (14) ve bazı adımların modifikasyonları ile aşağıdaki şekilde uygulandı;

Comet çalışması için kullanılan tüm kimyasallar aksi belirtilmedikçe Sigma-Aldrich olarak kullanılmıştır. Elde edilen lenfositlerden oluşturulan çalışma grupları; buğday çimi IC<sub>50</sub> ve etoposid LD<sub>50</sub> konsantrasyon değerleri, buğday çimi IC<sub>50</sub> ve sisplatin LD<sub>50</sub> konsantrasyon değerleri, negatif ve pozitif kontrol olmak üzere 96 kuyucuklu mikropalakalarda  $1 \times 10^4$  hücre/kuyucuk olacak şekilde 1 saat 37 °C'de 5% CO<sub>2</sub> içeren etüvde inkübe edildi. Pozitif kontrol grupları sisplatin ve etoposid için belirlenen LD<sub>50</sub> konsantrasyon değerleri kullanılırken, negatif kontrol grubu için hiçbir etken madde olmadan hücreler inkübe edildi. Daha sonra hücreler 4 °C, 2500 RPM'de 10 dakika santrifüjlenerek süpernatant kısım uzaklaştırıldı ve bu aşama PBS

(fosfat tampon tuzu) ilave edilerek tekrarlandı. Yıkama sonrası hücreler 37 °C'de yaklaşık 1 saat bekletildi. Daha önceden hazırlanmış olduğumuz %0,7'lik düşük erime noktalı agarozdan 100 µL (Fisher Scientific, Massachusetts, ABD), hücre süspansiyonundan 20 µL karıştırıldı. Bu karışım yine daha önceden hazırlanan %1 normal erime noktalı agaroz (Serva Electrophoresis, Almanya) üzerine yayıldı. Lamlar 4 °C'de 60 dakika boyunca; pH: 10, 2,5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 10 mM Tris, %10 DMSO ve %1 Triton X-100 olarak hazırlanmış lizis tamponunda bekletildi. Sürenin tamamlanması sonrasında lamlar; pH: 13, 300 M NaOH, 1 mM EDTA olacak şekilde hazırlanmış soğuk elektroforez tamponunda karanlık ortamda 30 dakika boyunca bekletildi ve sonrasında 4 °C'de 30 dakika boyunca 25 V'de elektroforez işlemi uygulandı. Elektroforez işlemi ardından lamlar nötralizasyon tamponu ile yıkandı. 20 µg/mL etidyum bromür ile boyanan lamlar Zeiss Imager A1 floresan mikroskopu ve Zeiss Axiocam Icc 1 kamera ile rastgele seçilen 50 hücrenin fotoğrafı çekildi. OpenComet programı ile fotoğrafı çekilen hücrelerin DNA hasar tespiti gerçekleştirildi. DNA hasarı parametresi olarak kuyruk DNA yüzdesi kullanıldı.

### İstatistik Analiz

Elde edilen sonuçlar SPSS v20 programında one-way Anova (Tukey) kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. Sonuçlar ortalama±standart hata olarak verildi. p<0,05 anlamlı olarak kabul edildi. Konsantrasyon-canlılık grafiği, IC<sub>50</sub> ve LD<sub>50</sub> değerleri GraphPad Prism 5 programı ile normalize edilerek belirlendi.

### Bulgular

HPLC analizine ait standart ve numune kromatogramları şekil 1'de gösterilmiştir. Analizi yapılan 22 adet fenolik bileşen sonuçları Tablo 1'de verilmiştir. Çalışma sonucumuzda p-hidroksibenzoik asit en yüksek miktarda, o-kumarik asit ise en düşük düzeyde tespit edilmiştir.

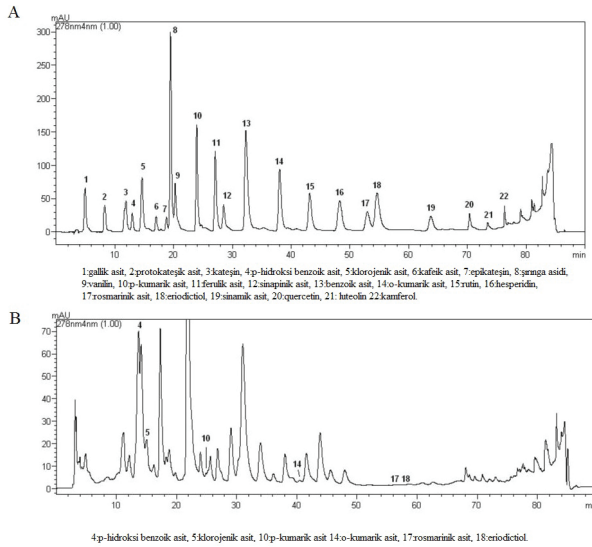
Konsantrasyona bağlı olarak hücrelerin canlılık değerleri hesaplanmış ve buğday çimi ekstraktı için IC<sub>50</sub>=204,6 µg/mL, etoposid için LD<sub>50</sub>=15,84 ve sisplatin için LD<sub>50</sub>=24,51 µg/mL olarak bulunmuştur. Sonuçlara ait grafik şekil 2'de gösterilmiştir.

Comet analizinde lenfositlere farklı dozlarda uygulanan; kontrol grubu, buğday çim suyu (IC<sub>50</sub>) grubu, sisplatin (LD<sub>50</sub>) grubu, sisplatin (LD<sub>50</sub>) ile buğday çim suyu (IC<sub>50</sub>) grubu, etoposid (LD<sub>50</sub>) grubu, etoposid (LD<sub>50</sub>) grubu ile buğday çim suyu (IC<sub>50</sub>) grubu yer almaktadır. Gruplar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında kontrol ve buğday çim suyu arasında, etoposid ve

Tablo 1 Fenolik bileşen analiz sonuçları

Fenolik Bileşenler	<i>Triticum aestivum</i> L. (µg/gr)	Fenolik Bileşenler	<i>Triticum aestivum</i> L. (µg/gr)
Gallik asit	*	Sinapinik asit	*
Protokateşik asit	*	Benzoik asit	*
Kateşin	*	o-kumarik asit	0,8
p-hidroksibenzoik asit	75,5	Rutin	*
Klorojenik asit	41,2	Hesperidin	*
Kafeik asit	*	Rosmarinik asit	1,5
Epikateşin	*	Eriodictiol	2,7
Siringik asit	*	Sinamik asit	*
Vanilin	*	Quercetin	*
p-kumarik asit	1,1	Luteolin	*
Ferulik asit	*	Kamferol	*

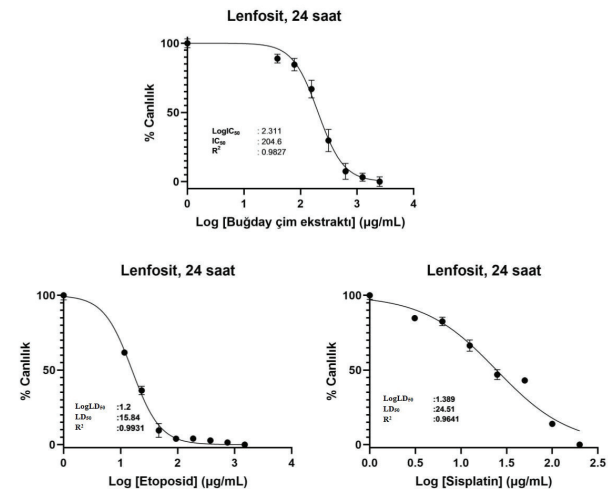
\*:tespit edilemedi.



Şekil 1:

A. Standart kromatogramı. B. Numune kromatogramı.

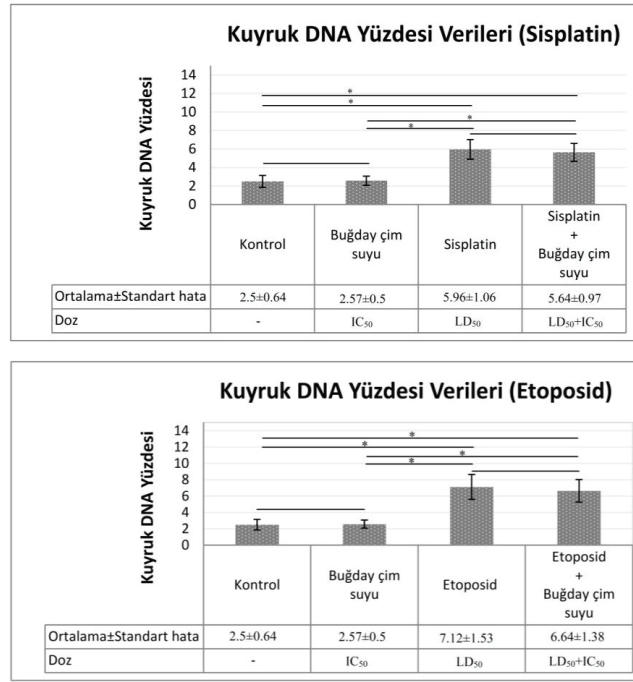
etoposid ile buğday çim suyu grubu arasında, sisplatin ve sisplatin ile buğday çim suyu arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunamazken ( $p>0,05$ ), kontrol grubuna karşı sisplatin grubu, sisplatin ile buğday çim suyu grubu, etoposid grubu, etoposid ile buğday çim suyu grubu arasında, buğday çim suyu grubuna



Şekil 2:

Hücre canlılık (%) - konsantrasyon eğrisi

karşı sisplatin grubu, sisplatin ile buğday çim suyu grubu, etoposid grubu, etoposid ile buğday çim suyu grubu arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptandı ( $p<0,05$ ). Comet analizine ait sonuçlar şekil.3'te gösterilmiştir.



**Şekil 3**  
Comet analizine ait veriler

## Tartışma

Bu çalışmada, buğday çim ekstraktının fenolik bileşen içeriğinin saptanması ve bu ekstraktın kemoterapötik tedavide kullanılan sisplatin ve etoposid'in insan lenfosit hücrelerinde oluşturduğu DNA hasarını üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Buğday çimi sularının bileşimi ve fizikokimyasal özellikleri, özellikle bitki rengi, kuru maddeler, çözünür katılar, proteinler, toplam fenolikler ve flavonoidler, C vitamini, antioksidanlar ve mineral içeriği gibi özellikler açısından önemli ölçüde değişiklik gösterebilir (17, 18). Buğday çimi sularının bu özellikleri, kullanılan buğday çimi türü, genetik, agronomik ve çevresel koşullar, pH, ışık yoğunluğu, işığa maruz kalma türü, sıcaklık ve bitki tarafından kökler yoluyla emilen mineraller gibi çeşitli faktörlerden etkilenir (18).

Fenolik bileşikler flavonoidler ve fenolik asitler olarak sınıflandırılır. Yapılan çalışmalarda buğday çimi suyu tanımlanan fenolikler bileşenler; kateşin, epikateşin, rutin, kuersetin, izokuersetin, apigenin-7-glukozit, apigenin, viteksin, izoviteksin, kaempferol, luteolin, pirogallol, krizin, vanilik asit, ellagik asit, gallik asit, protokatekuik asit, p-hidroksibenzoik asit, gentisik asit, siringik asit, ferulik asit, klorojenik asit, p-kumarik asit, kafeik asit, skopoletin, sinapik asit ve ros-

marinik asit olarak belirlenmiş. Ayrıca polifenolik öncü bileşik olan sinamik asit ve resveratol de bulunmuştur (11, 19-24).

Bu çalışmada buğday çimine ait fenolik bileşenler; p-hidroksibenzoik asit 75,5 µg/gr, klorojenik asit 41,2 µg/gr, eriodictiol 2,7 µg/gr, rosmarinik asit 1,5 µg/gr, p-kumarik asit 1,1 µg/gr, o-kumarik asit 0,8 µg/gr olarak bulunmuştur.

Buğday çiminden elde edilen metanol ekstratı ile Hep2 hücre hattının 48 saat kültüre edilmesi ile yapılan bir çalışmada IC<sub>50</sub> değeri 200 µg/mL olarak bulunmuştur (25). Yapılan bir başka çalışmada HL60 ve kan hücrelerini buğday çiminin 0.5-17.5 µg/mL değişen konsantrasyon ve 24, 48, 72 saat olarak kültüre edilmiş ve çalışma sonucunda herhangi bir sitotoksik etki görülmediği bildirilmiştir (16).

Çalışmamızda buğday çiminin lenfosit hücreleri üzerindeki IC<sub>50</sub> değeri 204,6 µg/mL olarak belirlenmiştir.

Sisplatin ile etoposid kombinasyonu bazı agresif kanser türlerine sahip hastalar için etkili bir tedavi seçeneğidir. Fakat hastalarda nefrotoksisite meydana gelmemesi için uygulanacak dozun iyi belirlenmiş olması gerekmektedir (26). Sisplatin ile etoposid ile yapılmış olan çalışmalarda LD<sub>50</sub> ve LC<sub>50</sub> değerleri farklı hücre



hatlarında ve farklı sürelerde kültür edilmesi sonucunda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bunlardan bazılarını örnek verecek olursak;

Renal hücreli karsinom kemoterapi dirençli bir yapıya sahiptir. Bu nedenle renal hücre hattında sisplatin LD<sub>50</sub> değeri 19,6 µg/mL olarak görülmüştür. Bu hücrelere NOX4 (siRNA) transfekte edildiğinde LD<sub>50</sub> değerinin 9,9 µg/mL'ye düştüğü ve böylelikle düşük dozda sisplatinin daha çok etkinlik gösterebildiği belirtilmiştir (27). Mirmalek vd. tarafından MCF-7 hücre hattında yapılan bir çalışmada sisplatin LD<sub>50</sub> değeri 20 µg/mL olarak bulunmuştur (28). Gibb vd. tarafından dört farklı hücre hattında yapılan çalışmada ise sisplatine ait LD<sub>50</sub> değerleri OVCAR-3, 5 µg /mL, SKOV-3, 5 µg/mL, UL-1, 7 µg/mL, and UL-2, µg/mL olarak bulunmuştur (29). Hosoyamada vd. tarafından yapılan bir başka çalışma da S3 hücre hattının sisplatin ile 20 saat inkübasyonunda LD<sub>50</sub>: 12 µg/mL, 40 saat inkübasyonunda LD50: 2,55 µg/mL olarak saptanmıştır. Ayrıca OMCD hücrelerinde 40 saat inkübasyon sonrasında LD<sub>50</sub>: 8,7 µg/mL olarak belirlenmiştir (30). Sisplatin'in HepG2 hücrelerine uygulandığı bir çalışmada LD<sub>50</sub> değeri 11,06 µg/mL olarak bulunmuştur (31). HepG2 hücreleri ile yapılan çalışmalar incelendiğinde sisplatinin sitotoksik dozlarının daha yüksek olduğu belirtilmektedir (32).

Örneğin 0, 5, 10, 20, 40 ve 80 µg/mL konsantrasyon aralığında sisplatin dozlarının kullanıldığı bir çalışmada, yüksek dozların (40 ve 80µg/mL) HepG2 hücrelerinde proliferasyonu ancak % 30–40 oranında azaltabildiği belirtilmektedir (32). MCF-7 ve DA-MB-231 hücrelerinin değişen dozlarda etoposid ile 12 saat inkübe edilmesi sonucunda LD<sub>50</sub> değeri 200 µM olarak bulunmuştur (33). Astrozitom hücre hattı ile yapılan bir diğer çalışmada 24 saat kültür sonucunda etoposid'in LD<sub>50</sub> değeri 75 µg/mL olarak bulunurken 24 saat sonunda 40 µg/mL olarak bulunmuştur (34). Çalışmalar kemoterapi tedavisinin başlangıç sırasında ya da ilerleyen aşamalarında dolaşımdaki lenfosit düzeyinin azaldığını göstermektedir(35-39).

Sisplatin ve etoposid ile yapılan hücre kültürü çalışmaları hücrelerin bu ajanlarla olan etkileşim süresi arttıkça hücreler üzerindeki toksik etkisi artmaktadır. Bunun sonucunda bu ajanlarda daha az süre etkileşimde bulunan hücrelere ait LC ve LD konsantrasyon değerleri yüksek bulunurken, sürenin artması ile birlikte LC ve LD konsantrasyon değerleri daha düşük bulunmuştur (30, 34, 40).

Çalışmamızda yapmış olduğumuz 24 saatlik hücre kültürü sonucunda etoposid'e ait LD<sub>50</sub>: 15,84 µg/mL, sisplatine ait LD<sub>50</sub>: 24,51 µg/mL olarak bulunmuştur.

Literatürde yapılan diğer çalışmalara kıyasla bizim çalışmamızda buğday çimine ait IC<sub>50</sub>, etoposid ve sisplatin'e ait LD<sub>50</sub> değerlerinin diğer çalışmalar ile benzer olmamasının nedeni farklı hücre türlerinde ve farklı inkübasyon süreleri uygulanmasından kaynaklanabilmektedir.

Çeşitli ilaç ve kimyasalların hücre toksisitesini ölçmek için MTT, XTT, ATP gibi çeşitli teknikler uygulanmaktadır. Bu yöntemlere ilave olarak DNA tek iplik kırığını analiz etmeye yönelik olan ve klinik araştırmalarda da yaygın olarak kullanılabilen bir yöntem olan Comet metodudur (41). Yapılan bir çalışma sonucunda cisplatin LD<sub>50</sub> konsantrasyonu hücrelere uygulanmış olup comet skoru 13,67±2,07 olarak bulunmuştur (31). Çin hamsteri yumurtalarına uygulanan etoposid'in meydana getirdiği DNA hasarını GC-MS/MS ve Comet yöntemi ile değerlendirme sonucunda; alkalın Comet yönteminin DNA iplik kırıklarını saptayabildiği, GC-MS/MS yönteminin ise DNA lezyonlarını saptayabildiğini ifade etmişlerdir. Ayrıca bu iki yöntemin birlikte kullanılmasının daha kullanışlı olabileceğini de belirtmişlerdir (42).

Çalışmamız sonucunda sadece sisplatin ve etoposid uygulanan hücrelerin kontrol ve buğday çim suyu uygulanan hücrelere kıyasla DNA kuyruk yüzdesinde artış olduğu (p<0,05), sadece sisplatin ve etoposid uygulanan hücrelere kıyasla, sisplatin ve etoposid ile birlikte buğday çim suyu uygulanan hücrelerin DNA kuyruk yüzdesinde anlamlı bir azalmanın olmadığı (p>0,05) bulunmuştur.

## Sonuç

Bu çalışma, buğday çimi ekstraktının, etoposid ve sisplatin kaynaklı DNA hasarı üzerindeki etkisinin bağımsızlık sisteminde yer alan lenfosit hücrelerinde incelenmiş olması nedeni ile diğer çalışmalardan farklılık göstermektedir. Buğday çimi, etoposid ve sisplatin kaynaklı DNA hasarında azalmaya neden olmuş ancak bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Tüm bu değerlendirmeler sonucunda, çalışmamız hastaların demografik özelliklerinin göz önünde bulundurulmuş geniş örneklemle yapılmış klinik çalışmalar ile desteklemesinin konunun aydınlatılmasında önemli katkılar sağlayacağı düşünülmüştür.

## Çıkar Çatışması Beyanı

Herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

## Etik Kurul Onayı

Çalışma için Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan onay alınmıştır (02.11.2022 tarih ve 2022/19 sayılı karar).

Çalışma Helsinki Deklarasyonuna uygun olarak yürütülmüştür.

### Bilgilendirilmiş Onam

Çalışmada yer alan tüm bireylerden bilgilendirilmiş onam ve verilerin yayınlaması için yazılı izin alınmıştır.

### Finansman

Bu araştırma, kamu, ticari veya kar amacı gütmeyen sektörlerdeki finansman kuruluşlarından herhangi bir finansal destek almamıştır.

### Verilerin Ulaşılabilirliği

Tüm veriler makalede mevcuttur.

### Yazar Katkıları

OS ve ZSÖ: Çalışmanın planlanması; Metodoloji; Araştırma; Formal Analizler; Makalenin Yazımı, Görüşleme.

PAK: Çalışmanın planlanması; Metodoloji; Araştırma; Validasyon; Makalenin düzenlenmesi.

### Kaynaklar

- Rommasi F, Esfandiari N. Liposomal nanomedicine: applications for drug delivery in cancer therapy. *Nanoscale Research Letters*. 2021;16(1):1-20.
- Sun C-Y, Zhang Q-Y, Zheng G-J, Feng B. Phytochemicals: Current strategy to sensitize cancer cells to cisplatin. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019;110:518-27.
- Fang C-y, Lou D-y, Zhou L-q, Wang J-c, Yang B, He Q-j, et al. Natural products: Potential treatments for cisplatin-induced nephrotoxicity. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2021;42(12):1951-69.
- Tchounwou PB, Dasari S, Noubissi FK, Ray P, Kumar S. Advances in our understanding of the molecular mechanisms of action of cisplatin in cancer therapy. *Journal of experimental pharmacology*. 2021;13:303.
- Kim SS, Wengier DL, Ragland CJ, Sattely ES. Transcriptional Reactivation of Lignin Biosynthesis for the Heterologous Production of Etoposide Aglycone in *Nicotiana benthamiana*. *ACS synthetic biology*. 2022;11(10):3379-87.
- Zhang W, Gou P, Dupret J-M, Chomienne C, Rodrigues-Lima F. Etoposide, an anticancer drug involved in therapy-related secondary leukemia: Enzymes at play. *Translational oncology*. 2021;14(10):101169.
- Gore RD, Palaskar SJ, Bartake AR. Wheatgrass: Green blood can help to fight cancer. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*. 2017;11(6):ZC40.
- Adams M, Jewell A. The use of complementary and alternative medicine by cancer patients. *International Seminars in Surgical Oncology*. 2007;4:10.
- Hassan N, Siddique MS. Wheat Grass (*Triticum aestivum* L.) Benefits Health in a Pandemic Scenario. *Journal of Research in Applied Sciences and Biotechnology*. 2022;1(1):24-9.
- Patel JB. Anticancer & cytotoxic potential of aqueous extract of *Triticum aestivum* on hela cell line. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 2016;6(3):84-9.
- Kaur N, Singh B, Kaur A, Yadav MP, Singh N, Ahlawat AK, et al. Effect of growing conditions on proximate, mineral, amino acid, phenolic composition and antioxidant properties of wheatgrass from different wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties. *Food Chemistry*. 2021;341:128201.
- Garg M, Sharma A, Vats S, Tiwari V, Kumari A, Mishra V, et al. Vitamins in cereals: a critical review of content, health effects, processing losses, bioaccessibility, fortification, and biofortification strategies for their improvement. *Frontiers in nutrition*. 2021;8:254.
- Caponio F, Alloggio V, Gomes T. Phenolic compounds of virgin olive oil: influence of paste preparation techniques. *Food Chemistry*. 1999;64(2):203-9.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*. 1988;175(1):184-91.
- Molaae N, Mosayebi G, Pishdadian A, Ejtehadifar M, Ganji A. Evaluating the proliferation of human PeripheralBlood mononuclear cells using MTT assay. *International Journal of Basic Science in Medicine*. 2017;2(1):25-8.
- Alitheen NB, Oon CL, Keong YS, Chuan TK, Li HK, Yong HW. Cytotoxic effects of commercial wheatgrass and fiber towards human acute promyelocytic leukemia cells (HL60). *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011;24(3): 243-250
- Ghumman A, Singh N, Kaur A. Chemical, nutritional and phenolic composition of wheatgrass and pulse shoots. *International journal of food science & technology*. 2017;52(10):2191-200.
- Rodríguez FC, Gallagher E, Rai DK, Burgess CM. Nutritional and physiochemical properties of wheatgrass juice and preservation strategies. *Food Chemistry Advances*. 2022:100136.
- Choi M-H, Lee MY, Yang S-H, Shin H-J, Jeon YJ. Hydrophobic fractions of *Triticum aestivum* L. extracts contain polyphenols and alleviate inflammation by regulating nuclear factor-kappa B. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2021;26(1):93-106.
- Rosa L, Moreno-Escamilla J, Rodrigo-García J, Alvarez-Parrilla E. Phenolic compounds. *Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables*. 2019:253-71.
- Eissa HA, Mohamed SS, Hussein A. Nutritional value and impact of wheatgrass juice (Green Blood Therapy) on increasing fertility in male albino rats. *Bulletin of the National Research Centre*. 2020;44(1):1-11.
- Hebbani AV, Bulle S, Kanu VR, Balachandrababu Malini A, Reddy VD, Chakravarthula VN. Nephro-protective activity of wheatgrass juice against alcohol-induced oxidative damage in rats. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2020;30(9):679-86.
- Skoczylas Ł, Korus A, Tabaszewska M, Gędoś K, Szczepańska E. Evaluation of the quality of fresh and frozen wheatgrass juices depending on the time of grass harvest. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2018;42(1):e13401.
- Thakur N, Dhaliwal HS, Sharma V. Qualitative and Quantitative RP-HPLC-PDA Method of Analysis of Polyphenols in Lyophilized Wheat Seedling Juice Powder. *International Journal on Emerging Technologies* 11(2): 36-43
- Shakya G, Balasubramanian S, Rajagopalan R. Methanol extract of wheatgrass induces G1 cell cycle arrest in a p53-dependent manner and down regulates the expression of cyclin D1 in human laryngeal cancer cells-an in vitro and in silico approach. *Pharmacognosy Magazine*. 2015;11(42):139.
- Fjällskog MLH, Granberg DP, Welin SL, Eriksson C, Öberg KE, Janson ET, et al. Treatment with cisplatin and etoposide in patients with neuroendocrine tumors. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*. 2001;92(5):1101-7.
- Maranchie JK. Silencing of Nox4 enhances cisplatin chemosensitivity of renal cell carcinoma. *The Journal of Urology*. 2008;179(4S):37-37.
- Mirmalek SA, Azizi MA, Jangholi E, Yadollah-Damavandi S, Javidi MA, Parsa Y, et al. Cytotoxic and apoptogenic effect of hypericin, the bioactive component of *Hypericum perforatum* on the MCF-7 human breast cancer cell line. *Cancer cell international*. 2015;16(1):1-9.

29. Gibb RK, Taylor DD, Wan T, O'Connor DM, Doering DL, Gerçel-Taylor Ç. Apoptosis as a measure of chemosensitivity to cisplatin and taxol therapy in ovarian cancer cell lines. *Gynecologic oncology*. 1997;65(1):13-22.
30. Hosoyamada M, Obinata M, Suzuki M, Endou H. Cisplatin-induced toxicity in immortalized renal cell lines established from transgenic mice harboring temperature sensitive SV40 large T-antigen gene. *Archives of toxicology*. 1996;70(5):284-92.
31. Hazman Ö, Evin H, Bozkurt MF, Cığerci İH. Hazman, Ömer, et al. "Two faces of arbutin in hepatocellular carcinoma (HepG2) cells: Anticarcinogenic effect in high concentration and protective effect against cisplatin toxicity through its antioxidant and anti-inflammatory activity in low concentration. *Biologia*. 2022; 77 :225–239
32. Shu X, Fan C, Long B, Zhou X, Wang Y. The anti-cancer effects of cisplatin on hepatic cancer are associated with modulation of miRNA-21 and miRNA-122 expression. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20(21):4459-65.
33. Parihar A, Parihar MS, Ghafourifar P. Significance of mitochondrial calcium and nitric oxide for apoptosis of human breast cancer cells induced by tamoxifen and etoposide. *International journal of molecular medicine*. 2008;21(3):317-24.
34. Ardeshiry LA, Rezaie TM, Mortazavi SA, Barzegar M, Moghadamnia SH, Rezaee MB. Study of anti cancer property of *Scrophularia striata* extract on the human astrocytoma cell line (1321). 2010; 9 (4): 403-410.
35. Mozaffari F, Lindemalm C, Choudhury A, Granstam-Björneklett H, Helander I, Lekander M, et al. NK-cell and T-cell functions in patients with breast cancer: effects of surgery and adjuvant chemo-and radiotherapy. *British journal of cancer*. 2007;97(1):105-11.
36. Wijayahadi N, Haron M, Stanslas J, Yusuf Z. Changes in cellular immunity during chemotherapy for primary breast cancer with anthracycline regimens. *Journal of chemotherapy*. 2007;19(6):716-23.
37. Murta EFC, de Andrade JM, Falcio RP, Bighetti S. Lymphocyte subpopulations in patients with advanced breast cancer submitted to neoadjuvant chemotherapy. *Tumori Journal*. 2000;86(5):403-7.
38. Sabbioni ME, Bernhard J, Siegrist H-P, Schmitz S-FH, Gertsch MC, Thürlimann B, et al. Does subjective burden of early breast cancer and its treatment affect immune measures during adjuvant therapy? *Breast cancer research and treatment*. 2004;87(1):75-86.
39. Onyema OO, Decoster L, Njemini R, Forti LN, Bautmans I, De Waele M, et al. Chemotherapy-induced changes and immunosenescence of CD8+ T-cells in patients with breast cancer. *Anticancer research*. 2015;35(3):1481-9.
40. Kumar A, Fillmore HL, Kadian R, Broaddus WC, Tye GW, Van Meter TE. The Alkylphospholipid Perifosine Induces Apoptosis and p21-Mediated Cell Cycle Arrest in Medulloblastoma Perifosine Induces Apoptosis and Mitotic Arrest. *Molecular Cancer Research*. 2009;7(11):1813-21.
41. Suman G, Jamil K. Application of human lymphocytes for evaluating toxicity of anti-cancer drugs. *Int J Pharmacol*. 2006;2(4):374-81.
42. Atha DH, Coskun E, Erdem O, Tona A, Reipa V, Nelson BC. Genotoxic effects of etoposide, bleomycin, and ethyl methanesulfonate on cultured CHO cells: Analysis by GC-MS/MS and comet assay. *Journal of nucleic acids*. 2020;2020:1-10



## PERMANENT ATRIAL FIBRILLATION IS RELATED WITH AN INCREASE IN DEPRESSION AND ANXIETY DISORDER IN TURKISH POPULATION

TÜRK POPÜLASYONUNDA KALICI ATRİYAL FİBRİLASYON ARTAN DEPRESYON VE ANKSİYETE BOZUKLUĞU İLE İLİŞKİLİDİR

Bayram Ali UYSAL<sup>1</sup>, Şenol TAYYAR<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kardiyoloji Ana Bilim Dalı, Isparta, TÜRKİYE

<sup>2</sup> Özel MEDDEM Hastanesi, Kardiyoloji Kliniği, Isparta, TÜRKİYE

**Cite this article as:** Uysal BA, Tayyar Ş. Permanent Atrial Fibrillation is Related with an Increase in Depression and Anxiety Disorder in Turkish Population. Med J SDU 2023; 30(1): 57-62.

### Öz

#### Amaç

Bu çalışmanın amacı Türk popülasyonunda Kalıcı Atriyal Fibrilasyon (AF) ve depresyon/anksiyete bozukluğu arasındaki ilişkiyi araştırmaktır. AF hastaları ve ilişkili faktörler yanısıra anksiyete/depresyon üzerine etkileri sınırlı olduğundan daha fazla verinin keşfedilmeye ihtiyacı olduğunu düşündük.

#### Gereç ve Yöntem

Bu çalışmaya kalıcı AF'si olan ardışık 45 hasta ve 45 kontrol grubu (sinüs ritmi) dahil edildi. Tüm katılımcılar Beck Depresyon Ölçeği (BDÖ) ve Hamilton Anksiyete Ölçeği'ni (HAÖ) doldurdu. Duygudurum bozuklukları ve depresyonu değerlendirmek için BDÖ kullanıldı. Anksiyete düzeyinin şiddetini ve belirti dağılımını değerlendirmek için HAÖ kullanıldı. BDÖ ve HAÖ iki grup arasında karşılaştırıldı.

#### Bulgular

İki çalışma grubu arasında klinik ve demografik özellikler açısından fark yoktu. Kalıcı AF'li hastalarda ortalama BDÖ ve HAÖ skorları anlamlı olarak yüksekti ( $p < 001$ ).

### Sonuç

Çalışmamız, Kalıcı AF'li hastaların kontrol grubuna göre daha yüksek BDÖ ve HAÖ skorlarına sahip olduğunu göstermektedir. Bildiğimiz kadarıyla çalışmamız Türk popülasyonunda kalıcı AF ile depresyon/anksiyete bozukluğu arasındaki ilişkiyi inceleyen ilk araştırmadır.

**Anahtar Kelimeler:** Anksiyete bozukluğu, Atrial fibrilasyon, Depresyon

### Abstract

#### Objective

The aim of this study was to explore the relationship with Permanent Atrial Fibrillation (AF) and depression/anxiety disorder in Turkish population. We thought that more data exploring needs of AF patients and the associated factors as well as the impact of anxiety/depression on needs are limited.

#### Material and Method

Forty-five consecutive patients with permanent AF and forty-five control group (sinus rhythm) were enrolled in this study. All participants completed Beck

**Sorumlu yazar ve iletişim adresi /Corresponding author and contact address:** B.A.U. / dr.bali82@hotmail.com

**Müracaat tarihi/Application Date:** 08.12.2022 • **Kabul tarihi/Accepted Date:** 03.02.2023

**ORCID IDs of the authors:** B.A.U: 0000-0002-8800-0835; Ş.T: 0000-0002-0018-516X

Depression Scale (BDS) and Hamilton Anxiety Scale (HAS). BDS was used to evaluate mood disorders and depression. HAS was used to evaluate severity of anxiety level and symptom distribution. BDS and HAS were compared between two groups.

### Results

There was no difference between two study group in terms of clinical and demographic characteristics. Mean scores of BDS and HAS were significantly higher in patients with permanent AF ( $p < 0.01$ ).

### Conclusion

Our study demonstrates that patients with Permanent AF had higher BDS and HAS scores compared to control group. In our knowledge our study is the first research that examining the relationship between permanent AF and depression/anxiety disorder in Turkish population.

**Keywords:** Anxiety disorder, Atrial fibrillation, Depression

## Introduction

Atrial fibrillation (AF) was determined more than a century and it is the most widespread cardiac arrhythmia in clinical practice in worldwide (1). AF affects 2.5-3.5% of populations in many countries, and the estimated prevalence of AF is 33.5 million individuals (2). In previous studies geographical variations were reported about AF. These studies showed that AF prevalence in countries with good socio-economic status was higher than lower ones (3). This rhythm disorder is more common in advanced ages (4). The most common AF type is permanent AF-40–50% of AF patients- about 20–30% of AF cases, it arises after the paroxysmal or persistent AF (5). Regardless of type, this arrhythmia is associated with high health care spendings (long hospitalizations and frequent admissions to the emergency department), uncontrolled hypertension (6), increased risk of cerebrovascular accidents (7), high morbidity and mortality (1, 5). Chronic process of AF including unexpected onset or repetitive events, different symptoms (shortness of breath, chest discomfort, palpitations), long and detailed treatment and several daily limitations may trigger anxiety and depression (8-10).

The most common psychiatric disorders in routine clinical practice are depression and anxiety disorders. These disorders occur more frequently in patients with somatic disease and often accompany each other (8). Decreased quality of life (QoL), inadequate functional capacity, and metabolic damage directly caused by organic diseases such as AF are the main causes of depression. (7). We thought that there is insufficient data about the association with permanent AF and depression /anxiety disorders. The purpose of this study is to explore the relationship with AF and depression, anxiety disorder in Turkish population.

## Material And Method

### Patients Selection

Forty-five patients with permanent AF and forty-five control group with sinus rhythm (SR) were enrolled in this study consecutively. The patients were followed up between October 2022 and November 2022 prospectively. Persistent AF was defined as AF that was long-standing, usually lasting more than one year, and that could not be restored to sinus rhythm or cardioversion had not been attempted (11). All patients and controls answered the Beck Depression Scale (BDI) and Hamilton Anxiety Scale (HAS). All study patients were questioned in terms of age, gender, smokers, and comorbidities (hypertension, hyperlipidemia, diabetes mellitus). Those under the age of 18 or those under follow-up with any major psychiatric disorder or using any psychiatric medication were excluded from the study.

Complete blood count and biochemical parameters were examined, electrocardiogram and echocardiogram were performed in all patients and control group. The participants were given detailed information about our research by us. Then, an informed consent form was signed by the participants. The study was prepared in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the ethics committee for clinical research at Suleyman Demirel University Medical Faculty (Date: 27/10/2022, No: 291).

### Beck Depression Scale

BDS is one of the frequently used scales in the evaluation of mood disorders and depression (10). BDS consists of 21 questions. 15 of these questions are related to emotional stress and 6 of them are related to psychosomatic symptoms and this questionnaire is filled by the patient. The scoring of each question is between 0 and 3. Higher BDS scores on the scale indicate more severe depression (10).

### Hamilton Anxiety Scale

HAS calculates the prevalence of anxiety symptoms and the severity of the anxiety levels. It is a test made by the researcher and includes 14 questions including mood and psychosomatic symptoms. In HAS, each item is scored with a 5-point Likert-type scale ranging from 0 to 4. Patients should perform the test within 72 hours of admission (6).

### Statistical Analysis

Statistical Package for Social Sciences software (SPSS 22, Chicago, Illinois) was used for statistical evaluation. Continuous variables were represented as mean  $\pm$  standard deviation. Categorical variables were represented as numbers and percentages. The normal distribution test of the candidates included in the study was performed using Kolmogorov-Smirnov. Chi-square, paired-sample correlations, and t-tests were used to compare related variables with each other. Differences were considered significant at a P

value of  $<0.05$ .

### Results

A total of 90 patients (47 women; mean age  $69.5 \pm 7.4$  years) were included in the study. 45 patients with permanent AF and 45 patients with SR as control group. Table 1 shows basic demographic and clinical characteristics of all study patients. There is no significant difference in the demographic and the clinical characteristics of two groups ( $p >0.05$ ). Table 2 shows the laboratory parameters of study patients. There is no significant difference between groups in laboratory findings ( $p >0.05$ ). Table 3 shows comparison of mean values of BDS and HAS in the study groups. Mean scores of BDS ( $16.1 \pm 4.2$  vs  $10.7 \pm 2.8$ ,  $P < .001$ ) and HAS ( $16.7 \pm 4.1$  vs  $12.2 \pm 3.6$ ,  $P < .001$ ) were significantly higher in patients with permanent AF.

**Table 1** Demographic and Clinical Characteristics of Study Participants.

Variables	Permanent AF group (n=45)	Control group (n=45)	p value
Age, years	70.3 $\pm$ 9.4	68.8 $\pm$ 4.9	0.341
Female, n (%)	23 (51.1)	24 (53.3)	0.833
Smoking, n (%)	3 (6.7)	4 (8.9)	0.694
Hypertension, n (%)	27 (60)	19 (42)	0.092
Hyperlipidemia, n (%)	8 (17.8)	7 (15.6)	0.777
Diabetes Mellitus, n (%)	7 (15.6)	4 (8.9)	0.334

**Table 2** Laboratory Parameters of Study Participants.

Variables	Permanent AF group (n=45)	Control group (n=45)	p value
Fasting glucose, mg/dL	103.1 $\pm$ 16.2	101.5 $\pm$ 11.5	0.58
Blood urea nitrogen, mg/dL	16.0 $\pm$ 3.7	15.7 $\pm$ 3.9	0.67
Creatinine, mg/dL	0.96 $\pm$ 0.17	0.94 $\pm$ 0.14	0.59
Hemoglobin, g/dL	14.1 $\pm$ 1.4	13.9 $\pm$ 1.4	0.56
Thyroid stimulating hormone, mg/dL	1.24 $\pm$ 0.67	1.03 $\pm$ 0.63	0.13
Ejection Fraction, (%)	62.8 $\pm$ 3.5	63.9 $\pm$ 2.2	0.080

**Table 3** Comparison of BDS and HAS in Study Patients

Variables	Permanent AF group (n=45)	Control group (n=45)	p value
Beck Depression Scale	16.1±4.2	10.7±2.8	<0.001
Hamilton Anxiety Scale	16.7±4.1	12.2±3.6	<0.001

p < 0.05 was accepted as statistically significant

## Discussion

The present study was showed that patients with permanent AF, mean score of BDS and HAS questionnaire was significantly more than control group.

Depression is seen as one of the most common psychiatric diseases seen in routine clinic and causing significant morbidity. It is an important clinical condition that increases the mortality rate and hospitalization rate in patients with other clinical conditions (11). The prevalence of major depression in studies was found to be 9% to 16% in outpatients and 5% to 10% in inpatients with organic disorders (12). Depression was more frequent in our study patients with permanent AF.

It may be related to the decrease in eating and drinking, deterioration in the amount of sleep quality, fatigue and limitation of physical activity, psychosomatic and psychological problems such as anxiety and depression, especially in the follow-up of patients who have undergone cardiac surgery, within 6 months after discharge (13).

The relationship between biobehavioral physiological stress and clinical cardiac arrhythmias has been studied previously (14, 15). The patients with persistent and paroxysmal AF have significantly lower QoL compared to normal healthy controls (16, 17). In another study, 30 percent of patients with AF had higher depression and anxiety scale scores, and depression-related symptoms were the strongest independent risk factor for future QoL in these patients (18). Moreover, Eaker et al. found that hypertension in male patients was significantly related to the burden of AF. Also, anxiety was significantly associated with total mortality (19).

In addition, Sang et al. were showed that there was a positive correlation with Increase of depression,

anxiety, and QoL and AF therapies especially catheter ablation in such patients (20).

Most studies evaluate depression and anxiety in patients with heart disease have been conducted in a chronic coronary syndrome population (21, 22). Our patients had no known coronary artery disease. Depression and anxiety rates are high in chronic diseases (hypertension, diabetes, etc.) (21). In our study, the rate of chronic disease was similar between the groups.

Dabrowski et al. also demonstrated that patients with AF have higher rates of depression disorder than general population by Using the BDI. In our study, level of depression scores was higher in patients with permanent AF. Dabrowski et al. also founded that women have AF significantly effected from depression, sleeping disorders, and physical symptoms than males (23). But in our study, there is no statistical significant difference in gender groups.

There is a complicated relationship between depression, anxiety, and AF (8). AF can cause depression and anxiety, whereas depression and anxiety may create such an environment where AF will be more easily established. We think that further studies are needed because of the complexity of this situation.

## Conclusion

Our study demonstrates that patients with AF had higher BDS and HAS scores compared to control group. This study, which is one of the limited numbers of studies examining the relationship between permanent AF and depression/anxiety disorder in Turkish population.

## Main Points

1. Atrial fibrillation is the most common cardiac arrhythmia in cardiology practice.



2. There are many somatic diseases like atrial fibrillation that can lead to depression and anxiety disorders.

3. Patients with atrial fibrillation have higher Beck Depression and Hamilton Anxiety Scales scores.

4. We recommend that patients with atrial fibrillation be consulted to the psychiatry department for the evaluation of depression and anxiety disorders.

### Acknowledgment

We thank all the volunteers who participated in the study.

### Conflict of Interest Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

### Ethical Approval

Süleyman Demirel University Faculty of Medicine Clinical Research Ethics Committee was approved this study (27.10.2022/No: 291). The study was conducted in line with the principles of the Helsinki Declaration.

### Consent to Participate and Publish

Written informed consent to participate and publish was obtained from all individual participants included in the study.

### Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### Availability of Data and Materials

Authors can confirm that all relevant data are included in the article.

### Authors Contributions

B.A.U: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Investigation; Methodology; Validation; Visualization; Writing-original draft.

Ş.T: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Investigation; Methodology; Validation; Visualization; Writing-original draft.

### References

- Camm AJ, Lip GY, De Caterina R, Savelieva I, Atar D, Hohnloser SH, et al. ESC Committee for Practice Guidelines (CPG), Bax JJ. 2012 focused update of the ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation: an update of the 2010 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association. *Eur Heart J*. 2012; 33(21): 2719-47.
- Morin DP, Bernard ML, Madias C, Rogers PA, Thihalolipa-van S, Estes NA., The State of the Art: Atrial Fibrillation Epidemiology, Prevention, and Treatment. *Mayo Clin. Proc.* 2016; 91(12): 1778-810.
- Camm AJ, Kirchhof P, Lip GY, Schotten U, Savelieva I, Ernst S, et al. Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2010; 31(19): 2369-429.
- Zoni-Berisso M, Lercari F, Carazza T, Domenicucci S. Epidemiology of atrial fibrillation: European perspective. *Clinical Epidemiology*. 2014; Jun (16): 213-20.
- Besli F, Basar C, Kecebas M, Turker Y. Improvement of the myocardial performance index in atrial fibrillation patients treated with amiodarone after cardioversion. *Journal of Interventional Cardiac Electrophysiology*. 2015; 42(2): 107-15.
- Yazıcı MK, Demir B, Tanrıverdi N, Karaağaoğlu E, Yolaç P. Hamilton anksiyete değerlendirme ölçeği, değerlendiriciler arası güvenilirlik ve geçerlik çalışması. *Türk Psikiyatri Dergisi* 1998; 9(2): 114-7.
- Snyder S, Strauss E, Burton R, Nuber G, Abernathy T, MA HS, et al. Cost offset from a psychiatric consultation-liaison intervention with elderly hip fracture patients. *American Journal of Psychiatry*. 1991; 148 (Aug): 1044-9.
- Patel D, Mc Conkey ND, Sohaney R, Mc Neil A, Jedrzejczyk A, Armaganian L. A systematic review of depression and anxiety in patients with atrial fibrillation: the mind-heart link. *Cardiovascular Psychiatry and Neurology*. 2013; 2013: 1
- Turker Y, Ongel K, Ozaydin M, Turker Y, Bas FY, Akkaya M. Mechanical prosthetic valve disease is related with an increase in depression and anxiety disorder. *Med Glas (Zenica)*. 2015; 12(1): 86-92.
- David BU, Burns MD. *Feeling Good: The New Mood Therapy*. NY: Signet Books. Chin, Richard. 1980; 42-3
- Katon W, Ciechanowski P. Impact of major depression on chronic medical illness. *Journal of psychosomatic research*. 2002; 53(4): 859-63.
- Katon W, Schulberg H. Epidemiology of depression in primary care. *General hospital psychiatry*. 1992; 14(4): 237-47.
- Jaarsma T, Kastermans M, Dassen T, Philippen H. Problems of cardiac patients in early recovery. *Journal of Advanced Nursing*. 1995; 21(1): 21-7.
- Lown B. Sudden cardiac death: biobehavioral perspective. *Circulation*. 1987; 76(1 Pt 2): I 186-96.
- Verrier RL. Mechanisms of behaviorally induced arrhythmias. *Circulation*. 1987; 76(1 Pt 2): I 48-56.
- Howes CJ, Reid MC, Brandt C, Ruo B, Yerkey MW, Prasad B, et al. Exercise tolerance and quality of life in elderly patients with chronic atrial fibrillation. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*. 2001; 6(1): 23-9.
- Van den Berg MP, Hassink RJ, Tuinenburg AE, van Sonderen EF, Lefrandt JD, de Kam PJ, et al. Quality of life in patients with paroxysmal atrial fibrillation and its predictors: importance of the autonomic nervous system. *Eur Heart J*. 2001; 22(3): 247-53.
- Thrall G, Lip GY, Carroll D, Lane D. Depression, anxiety, and quality of life in patients with atrial fibrillation. *Chest*. 2007; 132(4): 1259-64.
- Eaker ED, Sullivan LM, Kelly-Hayes M, D'Agostino Sr RB, Benjamin EJ. Tension and anxiety and the prediction of the 10-year incidence of coronary heart disease, atrial fibrillation, and total mortality: the Framingham Offspring Study. *Psychosomatic Medicine*. 2005; 67(5): 692-6.
- Sang CH, Chen K, Pang XF, Dong JZ, Du X, Ma H, et al. Depression, anxiety, and quality of life after catheter ablation in patients with paroxysmal atrial fibrillation. *Clinical Cardiology*. 2013; 36(1): 40-5.
- Rudisch B, Nemeroff CB. Epidemiology of comorbid coronary artery disease and depression. *Biological psychiatry*. 2003;

54(3): 227-40.

22. Koenig HG. Depression in hospitalized older patients with congestive heart failure. *General hospital psychiatry*. 1998; 20(1): 29-43.
23. Dąbrowski R, Smolis-Bąk E, Kowalik I, Kazimierska B, Wójcicka M, Szwed H. Quality of life and depression in patients with different patterns of atrial fibrillation. *Kardiologia Polska (Polish Heart Journal)*. 2010; 68(10): 1133-9.



## PANDEMİ DÖNEMİNDE AMELİYATHANE ÇALIŞANLARINDA TÜKENMİŞLİĞİN DEĞERLENDİRİLMESİ

### EVALUATION OF BURNOUT IN OPERATING ROOM WORKERS DURING THE PANDEMIC PERIOD

Devrim Tanıl KURT<sup>1</sup>, Müge ÇAKIRCA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ankara Bilkent Şehir Hastanesi, Anesteziyoloji ve Reanimasyon Kliniği, Ankara, TÜRKİYE

**Cite this article as:** Kurt DT, Çakırca M. Pandemi Döneminde Ameliyathane Çalışanlarında Tükenmişliğin Değerlendirilmesi. Med J SDU 2023; 30(1): 63-68.

#### Öz

##### Amaç

Koronavirüs pandemisiyle birlikte genelde tüm sağlık çalışanları, özelde de ameliyathane personelleri zor şartlarla çalışmak zorunda kaldılar. Bu çalışmanın amacı, ameliyathane çalışanlarında tükenmişlik seviyelerini incelemektir.

##### Gereç ve Yöntem

Şubat 2021'de ameliyathanede çalışan 162 sağlık çalışanına Kopenhag tükenmişlik ölçeği uygulandı. Katılımcıların kişisel, iş ve pandemi ile ilişkili olmak üzere üç alt başlıkta tükenmişlik seviyeleri ölçüldü. 50 puan üzerinde skorlar yüksek tükenmişlik olarak kabul edildi.

##### Bulgular

Kişisel tükenmişlik  $66.9 \pm 19.5$ , iş ile ilgili tükenmişlik  $66.8 \pm 16.1$ , pandemi ile ilişkili tükenmişlik  $74.3 \pm 12.1$  olarak bulundu. Tüm alt ölçekler için kadın cinsiyette olanların daha yüksek skora sahip oldukları bulundu.

##### Sonuç

Ameliyathane çalışanlarının pandemi dönemindeki tükenmişlik düzeyleri yüksek seviyelerde tespit edilmiştir. Tükenmişliği azaltacak veya önleyecek eylemlere bu konuda ihtiyaç bulunmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Anestezi, Pandemi, Tükenmişlik

#### Abstract

##### Objective

With the coronavirus pandemic, all healthcare professionals in general, and operating room personnel in particular, had to work under difficult conditions. The aim of this study is to examine burnout levels in operating room workers.

##### Material and Method

In February 2021, the Copenhagen burnout scale was administered to 162 healthcare workers working in the operating room. The burnout levels of the participants were measured under three sub-headings: personal, work and pandemic-related. Scores above 50 points were considered high burnout.

##### Results

Personal burnout was  $66.9 \pm 19.5$ , work-related burnout was  $66.8 \pm 16.1$ , pandemic-related burnout was  $74.3 \pm 12.1$ . It was found that females had higher scores for all subscales.

##### Conclusion

The burnout levels of the operating room workers during the pandemic period were determined at high levels. Actions to reduce or prevent burnout are needed in this regard.

**Keywords:** Anesthesia, Burnout, Pandemia

**Sorumlu yazar ve iletişim adresi /Corresponding author and contact address:** M.Ç. / mugeturkoglu81@gmail.com

**Müracaat tarihi/Application Date:** 30.11.2022 • **Kabul tarihi/Accepted Date:** 27.02.2023

**ORCID IDs of the authors:** D.T.K: 0000-0002-8330-504X; M.Ç: 0000-0001-8597-0134

## Giriş

Koronavirüs salgını Ocak 2020 tarihinde başlayarak tüm dünyaya hızla yayıldı (1). Hastanelere şiddetli hastalık nedeniyle yoğun, kitlesel başvurular oldu. Ölüm oranlarının yüksek seyrettiği salgın sürecinde sağlık çalışanları savunmasız şekilde virüsle karşılaştılar. Birçok sağlık çalışanı da bu dönemde koronavirüs enfeksiyonu nedeniyle kaybedildi. Tüm bu yaşananlar hastanede çalışanların tükenmişlik seviyesini artırırken, karantina süreçlerinde çalışmaya devam eden sağlık çalışanları ve özellikle riskli görev yapan ameliyathane çalışanları da tükenmişlik seviyesindeki artış ile yüz yüze geldiler (2).

Ameliyathane yaşam kurtarma senaryoları ile ilgili yüksek riskler içerir. Çalışma ortamı ve koşulları yönünden zorlayıcı bir ortamdır. Bunun yanında anesteziye bağlı yan etkiler, koronavirüse bağlı solunum yollarında oluşan hasarları yönetme, intraoperatif yaşanacak komplikasyonlar ile baş etme, kişisel koruyucu ekipmanlar ile iş yapmanın zorluğu, ameliyatların uzunluğu gibi ameliyathane ekibinin kaldırmak zorunda kaldığı yükler ve riskler oluşmuştur. Bu risklerin sorumluluğunu da anesteziyoloji ve reanimasyon hekimleri başta olmak üzere asistan hekimler, anestezi teknikerleri ve ameliyathane hemşireleri sıklıkla üstlenmiştir (3-5).

Stres, belirli bir seviyede gelişimi desteklerken, yüksek miktarda maruz kalındığında mesleki tatmini azaltır, mental ve fiziksel sağlığı etkileyerek tükenmişlik sendromu olarak bilinen psikolojik bir sendroma neden olur (6). Tükenmişlik, duygusal ve fiziksel yorgunluk semptomları ile karakterizedir. Bu durum, kişisel zararının yanında yetersiz hasta bakımına yol açması açısından da önemlidir (7). Evden çalışma imkanı bulan birçok alandan farklı olarak, sağlık çalışanlarında ve ameliyathane için esnek mesai dönemine geçilmemiş, nöbet sıklıkları azalmamıştır. Çalışma koşulları yoğun bakımın sorumluluğunun da eklenmesiyle zorlaşmıştır. Bu nedenlerden dolayı ve pandemi sırasında covid-19'lu hastaların ameliyatlarında da vakayı yönetmek aşısız ameliyathane çalışanlarında tükenmişlik düzeyinin artmasına katkıda bulunmuştur.

Bu çalışmada Ankara Bilkent Şehir Hastanesi ameliyathane çalışanlarının tükenmişlik düzeyinin ölçülmesi amaçlandı. Pandemiyle gelen ameliyathane çalışanlarındaki tükenmişlik sendromuna çözümlerin oluşturulabileceği ileri dönem çalışmalara ışık tutulabilmek hedeflendi.

## Gereç ve Yöntem

Çalışma için Ankara Şehir Hastanesi Klinik Araştırma-

lar Etik Kurulu'ndan (toplantı tarihi: 14.06.2017, karar no: 2017-081) izin alındıktan sonra Ankara Şehir Hastanesi ameliyathanesinde görev yapan başta anestezi hekimleri ve anestezi ekibi olmak üzere ameliyathane çalışanlarına Şubat- 1 Mart 2021 tarihleri arasında tükenmişlik seviyesinin ölçülmesi amaçlandı.

Ankete katılmayı kabul eden 162 kişinin demografik özellikleri, görevi, yoğun bakımda görev alıp almadığı, aylık nöbet sayısı, nöbet süresi (saat), nöbet ertesi izin kullanma, koronavirüs enfeksiyonu geçirme öyküsü, ailede koronavirüs enfeksiyonu geçirme öyküsü sorgulandı. Katılımcılara, izinleri alındıktan sonra Kopenhag Tükenmişlik Ölçeğine dayalı sorulardan oluşan anket sorularını yanıtlamaları istendi (8, 9).

Bu ölçekte 22 soru vardır ve 'hiç' ile 'her zaman' arasında değişen beşli skalada yanıtlar toplanarak sıfır ile 4 arasında puan verildi. Bu puanlar toplanarak skorlar elde edildi. Anket soruları; kişisel tükenmişlik, iş ile ilgili tükenmişlik ve pandemiye bağlı tükenmişlik soruları olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır. En yüksek puanın 88 olduğu skorlamada 50'nin üzerindeki puanlar yüksek tükenmişlik olarak kabul edildi. Cronbach ölçeği ile yanıtların tutarlılığı da not edildi.

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS (22.0, IBM Corp, Amork, NY, USA) paket programı kullanıldı. Anket sorularından elde edilen verilerin dağılımı Kolmogorov-Smirnov testi ile normallik göstermediğinden, yaygınlık ölçütü ve merkez olarak kişi sayısı (n) ve % olarak istatistik verildi. Bağımsız grupların aritmetik ortalamalarının karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Kategorik verilerin değerlendirilmesinde Ki-Kare testi kullanıldı. İstatistiksel olarak anlamlı kabul edilen değer  $p < 0.05$ 'di.

## Bulgular

Çalışmaya toplam 162 kişi katıldı. Katılımcıların yaş, cins, görev, yoğun bakımda çalışma, aylık nöbet sayısı, süresi, koronavirüs enfeksiyonu geçirme veya yakınlarının geçirmesi sorularına verilen cevaplara göre, anket sorularını cevaplayan ameliyathane çalışanlarının %33,3'ü erkek (n=54), %66,7'si kadındı (n=108). Yaşları 21-30 yaş arası 73 (%45.1), 31-40 yaş arası (31.5), 41-50 yaş arası 30 (%18.5), 51-60 yaş arası 8 (%4.9) kişi vardı. Anestezi hekimleri toplam 80 kişiydi ve bunların 32'si uzman 48'i asistandı. Hemşireler 27 ve teknisyenler 55 kişiydi. Pandemi döneminde yoğun bakımda da çalışan 83 kişi (%51.2) bulundu. Aylık nöbet sayısı <4 olan 18 kişi, 4-6 olan 66 kişi (41.8), 7-9 olan 53 kişi ve >9 olan 21 kişi vardı. Nöbet süresi 24 saat olan kişi sayısı %79.1'di. Tam gün nöbet sonrası %79.7 oranında kişi (n=126) nöbet sonrası izin kulla-

Tablo 1 Anket yanıtlarının değerlendirilmesi

Sorular (1. bölüm-Kişisel tükenmişlik)	Her zaman (n,%)	Sıklıkla (n,%)	Bazen (n,%)	Nadiren (n,%)	Asla (n,%)	Mean(SD)
Kendinizi ne sıklıkta fiziksel olarak yorgun hissediyorsunuz?	50 (30.9)	83 (51.2)	26 (16.0)	3 (1.9)	0	77.7± 18.3
Kendinizi ne sıklıkta duygusal olarak yorgun hissediyorsunuz?	50 (30.9)	74 (45.7)	31 (19.1)	6 (3.7)	1 (0.6)	75.61± 21.0
Ne sıklıkta 'artık dayanamıyorum' diye düşünüyorsunuz?	16 (9.9)	69 (42.6)	43 (26.5)	27 (16.7)	7 (4.3)	59.25± 25.3
Kendinizi ne sıklıkla güçsüz ve hasta gibi hissediyorsunuz?	19 (11.7)	64 (39.5)	54 (33.3)	24 (14.8)	1 (0.6)	61.72± 22.7
Kendinizi ne sıklıkla çok yıpranmış hissediyorsunuz?	20 (12.3)	68 (42.0)	42 (25.9)	24 (14.8)	8 (4.9)	60.49± 26.1
<b>Sorular (2. bölüm- İş ile ilgili tükenmişlik)</b>						
Sabah iş yerinde diğer iş gününü düşünerek yorgun hissediyor musunuz?	60 (37.0)	56 (34.6)	31 (19.1)	12 (7.4)	1 (0.6)	74.84± 24.76
Her çalışma saatinin sizin için yorucu olduğunu düşünüyor musunuz?	50 (30.9)	65 (40.1)	35 (21.6)	11 (6.8)	1 (0.6)	73.45± 23.09
Boş zamanlarınızda aileniz ve arkadaşlarınız için yeterli enerjiniz olmadığını düşünüyor musunuz?	23 (14.2)	74 (45.7)	50 (30.9)	13 (8.0)	2 (1.2)	65.89± 21.71
İşinizin duygusal olarak yorucu olduğunu düşünüyor musunuz?	83 (51.2)	52 (32.1)	20 (12.3)	5 (3.1)	2 (1.2)	82.25± 22.23
İşiniz sizi hayal kırıklığına uğrattı mı?	27 (16.7)	67 (41.4)	42 (25.9)	16 (9.9)	10 (6.2)	63.11± 26.89
İşiniz nedeniyle tükenmiş hissediyor musunuz?	57 (35.2)	58 (35.8)	30 (18.5)	12 (7.4)	5 (3.1)	73.14± 26.36
<b>Sorular (3. bölüm pandemiye bağlı tükenmişlik)</b>						
Pandemi döneminde çalışmanın daha zor olduğunu düşünüyor musunuz?	94 (58.0)	57 (35.2)	8 (4.9)	3 (1.9)	0 (0.0)	87.34± 17.00
Pandemi döneminde çalışmak için normalden daha fazla enerji harcıyor musunuz?	71 (43.8)	68 (42.0)	19 (11.7)	4 (2.5)	0 (0.0)	81.79± 19.10
Pandemi döneminde çalışmanızı verimli buluyor musunuz?	29 (17.9)	43 (26.5)	55 (34.0)	22 (13.6)	13 (8.0)	58.17± 18.51
Pandemi döneminde çalışırken çok özverili olduğunuzu düşünüyor musunuz?	77 (47.5)	66 (40.7)	17 (10.5)	1 (0.6)	1 (0.6)	83.48± 18.51
Pandemi yüzünden kendinizi depresif hissediyor musunuz?	50 (30.9)	70 (43.2)	32 (19.8)	7 (4.3)	3 (1.9)	74.22± 23.04
Pandemi döneminde çalışırken çok sabırlı olma gerektiğini düşünüyor musunuz?	86 (53.1)	58 (35.8)	14 (8.6)	4 (2.5)	0 (0.0)	84.87± 18.76
Pandemi döneminde stres yüzünden hapsolmuş gibi hissediyor musunuz?	62 (38.3)	69 (42.6)	22 (13.6)	6 (3.7)	3 (1.9)	77.93± 22.70
Pandemi döneminde COVID-19 enfeksiyonunu kapmaktan korkuyor musunuz?	85 (52.5)	40 (24.7)	26 (16.0)	9 (5.6)	2 (1.2)	80.40± 24.72
Pandemi döneminde ailenizden birinin COVID-19 enfeksiyonunu kapmasından korkuyormusunuz?	126 (77.8)	28 (17.3)	5 (3.1)	2 (1.2)	1 (0.6)	92.59± 15.81
Pandemi döneminde çalışırken ölüm korkunuz oluyor mu?	26 (16.0)	37 (22.8)	37 (22.8)	39 (24.1)	23 (14.2)	50.61± 32.48
Pandemi döneminde çalışırken hastanede yeterince korunduğunuzu düşünüyor musunuz?	4 (2.5)	46 (28.4)	52 (32.1)	36 (22.2)	24 (14.8)	45.37± 27.04

nabiliyordu. Henüz koronavirüs enfeksiyonu geçirmeyen kişi oranı %33.3 iken (n=108) ailesinden birinin hastalığa yakalanma oranı %46.9'du (n=76).

Kopenhag tükenmişlik ölçeğine dayanan anket sorularında kişisel tükenmişlik yanıtlarının değerlendirilmesi

(5 soru), iş ile ilgili tükenmişlik yanıtlarının değerlendirilmesi (6 soru) ve pandemiye bağlı tükenmişlik yanıtlarının değerlendirilmesi (11 soru) yer aldı. Sonuçlar tablo l'de verildi. Buna göre her üç bölümde de cevapların 50'den yüksek ortalama skor alması bu kişilerin tükenmişlik seviyesinin yüksek olması yönünde yorumlandı.

Yanıtların tutarlılığının değerlendirilmesinde cronbach alfa ölçeği kullanıldı ve sonuçlar yüksek tutarlılıkta bulundu (Kişisel Tükenmişlik;  $66.97 \pm 19.48$  cronbach alfa:0.91, iş ile ilgili tükenmişlik;  $66.77 \pm 16.13$  cronbach alfa:0.87, pandemi ilişkili tükenmişlik  $74.25 \pm 12.01$  cronbach alfa:0.73). Buna göre her üç ölçekte de toplam skorların 50'nin üzerinde olması ile yüksek tükenmişlik düzeyleri tespit edildi.

Her üç tükenmişlik ile ilgili olarak kadınlar istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek puan aldı (Tablo II). Yaş gruplarına göre pandemi ile ilişkili tükenmişlik seviyesinin anlamlı olarak 51-60 yaşındaki kişilerde yüksek olduğu bulundu.

## Tartışma

Koronavirüs enfeksiyonu hastalığı, 30 Ocak 2020'de Dünya Sağlık Örgütü tarafından "uluslararası boyutta halk sağlığı acil durumu" olarak tanımlanmıştır ve 11 Mart 2020'de de küresel salgın (pandemi) ilan edilmiştir (10). 31 Aralık 2020'de, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 222 Ülkede 81.475.053 doğrulanmış koronavirüs enfeksiyonu olgusu ve 1.798.050 ölüm olduğunu bildirmiştir (WHO) (10). Salgının en çok etkilediği meslek grubu sağlık çalışanlarıdır ve salgın ile birlikte tüm dünya da olduğu gibi ülkemizde de sağlık çalışanları üzerindeki iş yükü artmıştır.

Pandemi olmadan önce de sağlık çalışanları arasında tükenmişlik seviyelerinde yükseklikler gözlenirse de salgın ile birlikte iş yoğunluğundaki artış, koronavirüs enfeksiyonuna yakalanma ve yakınlarına bulaştırma kaygıları da stres seviyesinin yükselmesine neden olmuştur. Bu çalışma Türkiye'deki ameliyathane çalışanlarını kapsayan pandemi ilişkili tükenmişliğin önemli derecede yüksek olduğunu gösteren ilk çalışmadır ve bu grubun pandemi ile ilgili tükenmişlik puan ortalamasını  $74.25 \pm 12.01$  olarak belirlemiştir.

Çalışmamızda tükenmişlik düzeyini ölçmek için basit, kapsamlı ve güvenilir olan, kolay anlaşılabilir Kopenhag tükenmişlik ölçeğini kullandık. Bu anket tükenmişliğin fiziksel ve bilişsel yönlerini kapsayan, olumlu ve olumsuz ifadelerin kullanıldığı maddeler içerir (8, 9). Üç alt kısımdan oluştuğu için pandemi senaryosu için kullanımını daha uygun bulduk. Diğer çalışmalarda kullanılan farklı ölçekler nedeniyle literatür karşılaştırması yapmak zor olsa da İtalya'dan yapılan bir çalışmada aynı ölçek kullanılarak pandemi ilişkili tükenmişliğin önemli şekilde artış gösterdiğini bulmuşlar ve meslektaşlarını covid-19 nedeniyle kaybedenlerin daha fazla posttravmatik stres bozukluğu ve depresyon belirtisi gösterdiği belirtilmiştir (11).

Özellikle anestezi ekibinin bağımlılık yapan maddelere çabuk erişimleri nedeniyle risk altında oluşu da göz önüne alınırsa, artan depresyon olasılığı nedeniyle suicidal girişimler bu grup için daha tehlikelidir. koronavirüs enfeksiyonu nedeniyle değil madde aşırı kullanımı nedeniyle hayatını kaybeden anestezi ve sağlık çalışanları olmuştur (12). Pandemi döneminde İtalya'da hastalarla temas halinde olan sağlık çalışanlarının % 28.4'inde depresif, % 20.6'sinde anksiyete belirtilerinin olduğu ve çalışanların % 9.9'unda uykusuzluk görüldüğü raporlanmıştır (11). Bu çalışmamızda olguların 60'ının (% 37.0) hastanede koronavirüs enfeksiyonundan yeterince korunmadığını düşündüğünü tespit ettik.

Pandemi ile mücadelede sağlık çalışanları Türkiye'deki enfekte vakaların %11.5'ini oluştururken, 540 kişi yaşamını yitirmiştir (13). Çalışmamızda iş ile ilgili tükenmişlik ölçümlerinde işin duygusal olarak yorucu olduğunu düşünme, iş yerinde diğer iş günü düşünerek yorgun hissetme ve çalışma saatlerinin yorucu olduğunu düşünme puan ortalaması sırasıyla 82.25; 74.84; 73.45 idi. İş ile ilgili tükenmişlik puan ortalaması  $\pm$  SD'sinin  $66.77 \pm 16.13$  olduğu belirlendi. Bu nedenle ameliyathanede çalışan sağlık çalışanlarının beden ve ruh sağlığını koruyacak önlemler almak bu nedenle temel hedef olmalıdır.

Sağlık çalışanlarında tükenmişlik çok faktörlüdür ve hekimler arasında en az bir tükenmişlik belirti oranının 2011 yılı ile 2014 yıllarında % 45'den % 54'e çıktığı bildirilmiştir (14). Önceki pandemilerde zararlı etkilere neden olabileceği gösterilmiştir. Son 20 yılda virüslere bağlı akut ağır solunum yetmezliği sendromu (SARS), domuz gribi, Orta Doğu solunum sendromu (MERS) ve Ebola Virüs Hastalığı gibi salgınlar görülmüştür. Bu salgınlarda, artan iş yüküne bağlı fiziksel yorgunluk yanında bulaşıcı hastalığın psikolojik etkisi, kendileri ve ailelerine enfeksiyon bulaştırma korkusuna bağlı sağlık personeline tükenmişlik sendromunun yüksek oranlarda olduğu bildirilmiştir (15-17). Bizim çalışmamızda pandemi döneminde çalışmanın daha zor olduğunu düşünme, çalışmak için daha fazla enerjiye ihtiyaç duyma, daha özverili ve sabırlı çalışma, hap-solmuş hissetme, kendinin ve ailesinden birine koronavirüs enfeksiyonu bulaşmasından korkma puan ortalamaları sırasıyla 87.34; 81.79; 83.48; 84.87; 77.93; 80.40; 92.59 idi.

Salgın dönemi dışında da sağlık çalışanları arasında yüksek oranda görülen tükenmişlik sendromunun salgın döneminde daha da artması şaşırtıcı bir sonuç değildir. Bu dönemde hem iş yoğunluğu, hem de kendisi ve yakınlarına koronavirüs enfeksiyonu bulaşma riskinden dolayı daha fazla stres altında çalışan sağlık çalışanlarında tükenmişlik sendromunun görülme ris-

Tablo 2 Tükenmişlik yanıtlarının değerlendirilmesi

	n (%)	Mean± SD	p
<b>KİŞİSEL TÜKENMİŞLİK</b>			
<b>Cinsiyet</b>			
Kadın	108 (66.7)	69.90± 18.38	0.009*
Erkek	54 (33.3)	61.11± 20.45	
<b>Yaş grupları</b>			
21-30	73 (45.1)	70.00± 19.47	
31-40	51 (31.5)	62.05± 20.15	0.145
41-50	30 (18.5)	66.83± 17.49	
51-60	8 (4.9)	71.25± 19.22	
<b>Görev</b>			
Uzman hekim	32 (19.8)	58.75± 18.05	
Asistan hekim	48 (29.6)	73.95± 17.89	0.138
Hemşire	27 (16.7)	73.33± 15.12	
Teknisyen	55 (34.0)	62.54± 20.79	
<b>PANDEMİ-İLİŞKİLİ TÜKENMİŞLİK</b>			
<b>Cinsiyet</b>			
Kadın		75.65± 11.63	0.042*
Erkek		71.46± 12.41	
<b>Yaş grupları</b>			
21-30		72.38± 10.53	
31-40		73.26± 13.53	
41-50		78.79± 10.95	
51-60		80.68± 14.22	
<b>Görev</b>			
Uzman hekim		72.51± 12.35	
Asistan hekim		73.15± 8.73	
Hemşire		79.79± 10.32	
Teknisyen		73.51± 14.39	
<b>İŞ İLE İLGİLİ TÜKENMİŞLİK</b>			
<b>Cinsiyet</b>			
Kadın		69.07± 16.47	0.003*
Erkek		62.19± 14.49	
<b>Yaş grupları</b>			
21-30		69.29± 14.91	0.137
31-40		65.39± 16.64	
41-50		64.03± 15.98	
51-60		63.02± 23.09	
<b>Görev</b>			
Uzman hekim		62.89± 13.40	0.234
Asistan hekim		71.78± 12.64	
Hemşire		74.07± 13.44	
Teknisyen		61.09± 18.87	

\*p&lt;0.05 olan değerler

kinde artış beklenen bir durumdur. Anesteziyologlar sağlık çalışanları içinde yüksek riskli aerosol oluşturan tıbbi girişimleri hem yoğun bakımlarda hem de ameliyathanelerde gerçekleştiren grupta olmaları nedeniyle en riskli gruplar arasındadır. Ayrıca anestezi hekimleri sıklıkla yaşamı tehdit eden olayların yönetimi gibi stresli durumlara maruz kalan anestezi hekimlerinde hem hastalık hem de iş yükü açısından tükenmişlik sendromunun yaşanması riski de fazladır (18). Bu çalışmanın olgularının fiziksel, duygusal, güçsüz, çok yıpranmış ve dayanamayacak gibi hissetme puan ortalamaları sırasıyla 77.70; 75.61; 61.72; 60.49; 59.25 idi. Kişisel tükenmişlik puan ortalaması  $\pm$  SD'sinin  $66.97 \pm 19.48$  olduğu saptandı.

Sonuç olarak, bu çalışmada koronavirüs pandemisi sırasında ameliyathane çalışanlarındaki tükenmişlik seviyesi yüksek bulundu. Bu çalışanların tükenmişlik seviyesini azaltacak pandemi koşullarına özel, önerilerde bulunabilecek başka çalışmalara ihtiyaç vardır.

#### Çıkar Çatışması Beyanı

Herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

#### Etik Kurul Onayı

Çalışma için Ankara Şehir Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan (toplantı tarihi: 14.06.2017, karar no: 2017-081) izin alınmış ve çalışma "Helsinki Deklarasyonu"na uygun yürütülmüştür.

#### Bilgilendirilmiş Onam

Çalışmada yer alan tüm bireylerden bilgilendirilmiş onam ve verilerin yayınlaması için yazılı izin alınmıştır.

#### Finansman

Bu araştırma, kamu, ticari veya kar amacı gütmeyen sektörlerdeki finansman kuruluşlarından herhangi bir finansal destek almamıştır.

#### Verilerin Ulaşılabilirliği

Veriler, gizlilik veya diğer kısıtlamalar nedeniyle yalnızca yazarlardan talep edilebilir.

#### Yazar Katkıları

D.T.K. ve M.Ç: Çalışmanın planlanması; Verilerin İşlenmesi; Formal Analizler; Araştırma; Metodoloji; Validasyon; Görselleştirme; Makalenin Yazımı.

#### Kaynaklar

- Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020;395(10223):497–506.
- Brooks SK, Webster RK, Smith LE, et al. The psychological impact of quarantine and how to reduce it: rapid review of the evidence. *Lancet* 2020;395(10227):912–20.
- Cassella CW. Burnout and the relative value of dopamine.

- Anesthesiol 2011;114(1):213-7.
- Fahrenkopf AM, Sectish TC, Barger LK, Sharek PJ, Lewin D, Chiang VW Rates of medication errors among depressed and burnt out residents: Prospective cohort study. *BMJ* 2008;336(7642):488-91.
- Maceiras PR, Jokinen J, Kranke P. Stress and burnout in anaesthesia: A real world problem? *Curr Opin Anaesthesiol*.2015;28(2):151-8.
- Misiólek A, Gilmonte PR, Misiólek H. Prevalence of burnout in Polish anesthesiologists and anesthetist nursing professionals: A comparative non-randomized cross-sectional study. *J Health Psychol*.2017;22(4):465-74.
- Hagea WE, Hingrayc C, Lemognd C, Yrondif A, Brunaulta P, Bienvenuh T. Health professionals facing the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic: What are the mental health risks? *L'Encéphale* 2020; 46:73-80.
- Deliorman RB, Boz İ, Yiğit İ, Yıldız S. Tükenmişliği ölçmede alternatif bir araç: Kopenhag tükenmişlik envanterinin Marmara Üniversitesi akademik personeli üzerine uyarlaması. *Yönetim Dergisi* 2009;3:77-98.
- Kristensen TS, Borritz M, Villadsen E, Christensen KB. The Copenhagen burnout inventory: a new tool for the assessment of burnout. *Work Stress* 2005;19(3):192–207.
- World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19) outbreak. 2020. Url: <https://www.who.int/emergencies/diseases-outbreak-news/item/2020-DON233>
- Rossi R, Socci V, Pacitti F, Lorenzo GD, Marco AD, Siracusa A, et al. Mental Health Outcomes Among Frontline and Second-Line Health Care Workers During the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Pandemic in Italy. *JAMA Netw Open*. 2020;3:e2010185. doi:10.1001/jamanetworkopen.2020.10185
- Raudenska J, Steinerova V, Javurkova A, Urits I, Kaye AD, Viswanath O et al. Occupational burnout syndrome and posttraumatic stress among healthcare professionals during the novel coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*.2020;34:553e560.
- Türk Tabipler birliği. COVID-19 Pandemisi 6.Ay değerlendirme raporu: COVID-19 hastalığına yakalanmış sağlık çalışanları. Ankara:20/9/2020. url: [https://www.ttb.org.tr/kutuphane/covid19-rapor\\_6/covid19-rapor\\_6\\_Part35.pdf](https://www.ttb.org.tr/kutuphane/covid19-rapor_6/covid19-rapor_6_Part35.pdf)
- Shanafelt TD, Boone S, Tan L, Dyrbye LN, Sotile W, Satele D, et al. Burnout and satisfaction with work-life balance among US physicians relative to the general US population. *Arch Intern Med*. 2012;172(18):1377-85.
- Wong TW, Yau JKY, Chan CLW, Kwong RSY, Ho SMY, Lau CC, et al. The psychological impact of severe acute respiratory syndrome outbreak on healthcare workers in emergency departments and how they cope. *Eur J Emerg Med*. 2005;12(1):13–18.
- Maunder R, Lancee W, Balderson K, Bennett J, Borgundvaag B, Evans S, et al. Long-term psychological and occupational effects of providing hospital healthcare during SARS outbreak. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(12):1924–1932.
- Khasne RW, Dhakulkar BS, Mahajan HC, Kulkarni AP. Burnout among Healthcare Workers during COVID-19 Pandemic in India: Results of a Questionnaire-based Survey. *Indian J Crit Care Med*. 2020;24(8): 664–671.
- Sanfilippo F, Noto A, Foresta G, Santonocito C, Palumbo GJ, Arcadipani A et al. Incidence and Factors Associated with Burnout in Anesthesiology: A Systematic Review. *Biomed Res Int*. 2017;e-8648925



## EVALUATION OF LIVER ELASTICITY USING pSWE AND 2D-SWE TECHNIQUES IN HEALTHY CHILDREN

### SAĞLIKLI ÇOCUKLARDA KARACİĞER ELASTİKİYETİNİN pSWE VE 2D-SWE TEKNİKLERİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Hüseyin AYDIN<sup>1</sup>, Fatma İSSİ IRLAYICI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Suleyman Demirel University, Faculty of Medicine, Department of Radiology, ISPARTA, TÜRKİYE

<sup>2</sup> Suleyman Demirel University, Faculty of Medicine, Department of Pediatrics Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, ISPARTA, TÜRKİYE

**Cite this article as:** Aydın H, İssi Irlayıcı F. Evaluation of Liver Elasticity Using pSWE and 2D-SWE Techniques in Healthy Children. Med J SDU 2023; 30(1): 69-77.

#### Öz

##### Amaç

Share wave elastografi (SWE), karaciğer sertliğini non-invaziv olarak değerlendirebilen yeni bir ultrasonografi tekniğidir. Yetişkinlerde SWE'nin etkinliği çok sayıda çalışmayla gösterilmiştir, ancak pediatrik gruplarda çok az SWE çalışması vardır. Karaciğer sertliği değerleri (KSD), cihaza ve kullanılan SWE yöntemine göre değişiklik gösterdiğinden, standart referans değerleri henüz oluşturulmamıştır. Bu çalışmanın amacı, iki farklı SWE yöntemine göre, sağlıklı çocuklarda normal karaciğerin referans sertlik değerlerini belirlemektir.

##### Gereç ve Yöntem

Karaciğer sertliği değerleri, 8-18 yaş arası 107 sağlıklı çocukta, iki farklı SWE yöntemi olan point SWE (pSWE) ve 2-dimentional SWE (2D-SWE) ile ölçüldü. pSWE (EPQ) ve 2D-SWE (EQI) ölçümleri aynı cihaz (Philips Epiq Elite) ile, tek seansta ve en az 4 saat aç kaldıktan sonra alındı. Cinsiyet, yaş, vücut kitle indeksi (VKİ), bazı biyokimyasal belirteçler ((açlık kan şekeri, aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), albümin, trombosit, INR gibi)) ve karaciğer boyutunun, KSD'ye etkisi araştırıldı.

##### Bulgular

Ortalama KSD, pSWE ile  $4,04 \pm 0,84$  kPa ((%95 güven aralığı (CI):3,67-4,42)) ve 2D-SWE ile  $4,41 \pm 0,71$  kPa (%95 CI:4,09-4,72) bulundu. Üst sınır KSD'ler sırasıyla 4,42 kPa ve 4,72 kPa idi. 2D-SWE'de ölçülen KSD'ler, pSWE'den daha yüksekti ((sırasıyla medyan; min-maks, 4,34 kPa; 2,82-6 kPa ve 3,86 kPa; 2,55-5,78, ( $r=0,59$ ,  $p<0,001$ )). KSD ile yaş arasında düşük düzeyde anlamlı pozitif korelasyon saptandı ( $r=0,267$ ;  $p=0,006$ ). Fakat karaciğer büyüklüğü, cinsiyet, VKİ ve biyokimyasal belirteçler ile KSD arasında anlamlı ilişki saptanmadı.

##### Sonuç

8-18 yaş arası sağlıklı çocuklarda ortalama karaciğer sertliği referans değerleri, Philips Epiq Elite ultrason cihazı ile yapılan ölçümlerde, pSWE yöntemi ile  $4,04 \pm 0,84$  kPa ve 2D-SWE yöntemi ile  $4,41 \pm 0,71$  kPa olarak bulundu. Bu referans değerleri, kronik karaciğer hastalıklarında karaciğer parankiminin değerlendirilmesinde SWE yönteminin daha etkin kullanılmasına yardımcı olacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Çocuk, İki boyutlu-shear wave elastografi, Karaciğer sertliği, Shear wave elastografi, Ultrason

**Sorumlu yazar ve iletişim adresi /Corresponding author and contact address:** H.A. / huseyinrady@gmail.com

**Müracaat tarihi/Application Date:** 17.02.2023 • **Kabul tarihi/Accepted Date:** 27.02.2023

**ORCID IDs of the authors:** H.A: 0000-0003-4704-4759; F.İ.İ: 0000-0002-3182-1990

## Abstract

### Objective

Shear wave elastography (SWE) is a new ultrasonography technique that can non-invasively evaluate liver stiffness. The efficacy of SWE in adults has been demonstrated by numerous studies, but there are few SWE studies of pediatric groups. Since the liver stiffness values (LSV) vary according to the device and the SWE method used, standard reference values have not been established as yet. The aim of this study was to establish the reference values of normal liver stiffness in healthy children according to the two SWE methods.

### Materials and Method

Liver stiffness values were measured using the two different SWE methods of point SWE (pSWE) and 2-dimensional SWE (2D-SWE) in 107 healthy children aged 8-18 years with no liver disease. The pSWE (EPQ) and 2D-SWE (EQI) measurements were taken in one session on the same device (Philips Epiq Elite) and after at least 4 hours of fasting. The effects on liver elasticity values were investigated of gender, age, body mass index (BMI), some biochemical markers (such as fasting blood glucose, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), albumin, platelet, INR) and liver size.

### Results

The mean LSV was  $4.04 \pm 0.84$  kPa ((95% confidence interval (CI): 3.67-4.42)) on pSWE and  $4.41 \pm 0.71$  kPa (95% CI: 4.09-4.72) on 2D-SWE. The upper limit LSVs were found to be 4.42 kPa and 4.72 kPa, respectively. The LSVs measured on 2D-SWE were found to be higher than on pSWE ((median; min-max, 4.34 kPa; 2.82-6 kPa and 3.86 kPa; 2.55-5.78, respectively, ( $r=0.59$ ,  $p<0.001$ )). A low-level significant positive correlation was determined between LSV and age ( $r=0.267$ ;  $p=0.006$ ). No significant association was determined between LSV and hepatic size, gender, BMI and biochemical markers.

### Conclusion

In healthy children aged 8-18 years, the mean liver stiffness reference values obtained on the Philips Epiq Elite ultrasound device were  $4.04 \pm 0.84$  kPa using the pSWE method and  $4.41 \pm 0.71$  kPa using the 2D-SWE method. These reference values will help the SWE method to be used more effectively in the evaluation of liver parenchyma in chronic liver diseases.

**Keywords:** Children, Liver stiffness, Shear wave elastography, Two-dimensional shear wave imaging, Ultrasound

## Introduction

Ultrasonographic elastography is a new diagnostic imaging modality that finds use in the diagnosis and follow-up of chronic liver disease. Hepatic inflammation, edema, cell damage and the development of extracellular fibrosis represent the histopathological process of chronic liver disease (CLD), which may occur due to different etiological causes. In direct proportion to fibrosis, the tissue hardens and the intraparenchymal pressure increases, potentially resulting in portal hypertension, liver failure (cirrhosis) and associated complications. Even hepatocellular cancer may develop in some cases of CLD. Therefore, knowing the degree of fibrosis in the parenchyma is very important for predicting the prognosis, treatment planning and follow-up of CLD (1, 2). The gold standard method for evaluating liver fibrosis is biopsy. However, the search for non-invasive methods continues due to the disadvantages of vulnerability to complications because of its invasive nature, representing only 1/50,000 of the entire parenchyma, and requiring special training and equipment (3).

Sonographic elastography is a non-invasive imaging method, the effectiveness of which in the evaluation of liver stiffness (LS) has been investigated for approximately 20 years and the development process continues. There are basically two types of sonoelastography techniques. In Strain Elastography (SE), which is the first used elastography method, external pressure is applied to the liver several times (with the push-pull method) with the probe, and the shape change created in the tissue is evaluated qualitatively. The harder the tissue, the less deformation there will be. This technique can be applied in superficial tissues such as thyroid and breast where probe pressure can be applied easily. Information about tissue stiffness is evaluated visually on gray scale or color maps. Semi-quantitative measurements can be made by calculating the strain index as a proportion of the adjacent normal tissue color map. Tissue deformation can also be achieved with strong collimated sound waves (ARFI: Acoustic Radiation Force Impulse) produced by special probes (4, 5).

Another elastography method is the shear wave elastography (SWE) technique. In this method, the propagation velocity of sound waves caused by the force applied perpendicular to the tissue to propagate in the transverse plane (shear wave) in the parenchyma is measured. The oldest of the shear wave (SW) generation methods is Transient Elastography (TE), in which external mechanical pressure is applied to the liver with a special probe with a spring-piston mechanism. Another way to generate SW is with powerful collimated one/multiple ARFI packages created with special probes. There are different SW methods (pSWE, 2D-SWE and 3D-SWE) created with ARFI. In the point SWE (pSWE) method, the velocity of the shear waves created in a small area (1 cm) is measured with a single collimated and reinforced ARFI package. There is no color map in this method, and unlike TE, measurements are made with gray-beard imaging. In the 2D-SWE method, unlike pSWE, multiple parallel cylindrical ARFI packets are sent to the tissue in real time, enabling more than 1000 measurements per second from a larger area (5-7 cm). The obtained velocity values are evaluated both qualitatively with the color map and quantitative measurements are obtained with the region of interest (ROI) placed in the colored area. Thus, by avoiding large vascular structures and the gall bladder, it is possible to obtain a homogeneous color map, and measurement inconsistencies due to respiration are minimized due to the large number of measurements taken within milliseconds. These advantages provide significant convenience in the evaluation of LS, especially in children (6–8). 3D-SWE provides the opportunity to perform quantitative measurement in real time (9). The rate of SW propagation generated in the tissue is obtained quantitatively in kilo Pascal (kPa) or m/s (5, 9).

The degree of tissue hardening (ie., fibrosis) can be evaluated according to the flexibility of the tissues and the propagation speed of sound waves in the parenchyma using elastography (5). However, the variability of liver stiffness values (LSV) from device to device limits the routine use of these methods. Therefore, in order to interpret liver fibrosis, each center should establish normal LS reference values according to its own device. LS reference values have been established for some methods and devices in healthy adult groups. However, there have not been enough studies conducted on healthy children in this respect. Although reference values for TE in children have been determined, reference values have not yet been established for p-SWE/2D-SWE, which is faster, easier for routine use, and for which results equivalent to TE have been reported in experimental studies (10–15).

The aim of this study was to determine the liver stiffness reference values for pSWE and 2D-SWE of the devices used in our center in the healthy pediatric age group. Thus it was aimed to contribute to the more effective use of non-invasive SWE techniques in the detection, follow-up and evaluation of treatment response in cases of chronic liver disease.

## Material and Method

This case-control study was conducted in accordance with the ethical guidelines of the Helsinki Declaration and Institutional Ethics Committee approval was obtained. In keeping with the policies for a retrospective review, the informed consent requirement was waived.

### Study Population

In order to determine normal LSVs in the pediatric age group, the study initially included a total of 128 patients who presented at the pediatric gastroenterology clinic of Suleyman Demirel University Medical Faculty with cold, non-specific abdominal pain or similar mild ailments between February 2021 and December 2022 and were considered generally healthy. The clinical, laboratory and ultrasound (US) examination data of the patients were obtained from picture archiving and communication system (PACS). The results of the biochemical tests (fasting blood glucose (FBG), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), albumin, platelet, INR) and demographic data (gender, age, weight, height and BMI) performed within a week before the US examination were recorded. The subjects were selected from non-obese children with normal biochemical-microbiological test results (viral hepatitis markers, liver function tests, total bilirubin, serum albumin concentrations, complete blood count) and B-mode ultrasound examination findings.

Children were excluded from the study if they were aged >18 years or <8 years, or had any liver disease (eg., NAFLD, acute/chronic hepatitis, cholestatic chronic hepatitis, HBV/HCV infection), cardiopulmonary disease, chronic inflammatory disease, autoimmune disease, anti-inflammatory drug use, rapid weight loss, known endocrinological diseases, or any kidney disease determined in standard clinical and laboratory evaluations according to the PACS data. After the further exclusion of 6 children with normal laboratory findings but BMI>2SD, 12 with BMI<-2SD, and 3 without US images and/or measurements in PACS or with missing demographic data, a final total of 107 subjects were included in the study.

**Ultrasound Examination**

All US examinations were performed by single radiologist (H.A. who is an experienced ultrasound doctor with 25 years in clinical practice) using a Philips Epiq Elite machine (Philips Healthcare-Bothell, Washington, USA) with a 1-5MHz convex broadband transducer. The examinations were performed in the supine position, with both arms at maximum abduction, after at least 4 hours of fasting and at least 15 minutes of rest (16). The liver parenchyma was evaluated with subcostal and intercostal approaches in terms of parenchymal echo and space-occupying lesions with gray scale US. After general gray-scale examination, elastographic measurements were obtained in the right liver lobe in the last/second-last right intercostal space, 1–2cm under the liver capsule, avoiding areas with large vessels, without applying excessive pressure to the probe. Liver stiffness was evaluated in the same examination with two elastographic methods: pSWE (EPQ) and 2D-SWE (EQI).

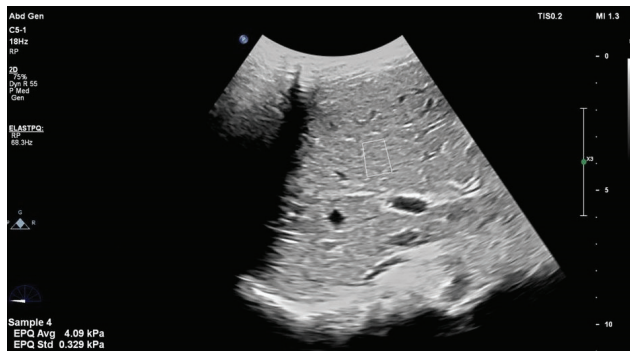
**pSWE (EPQ) Measurement**

The area 1cm in diameter to be measured was determined with the moving track-ball and then by pressing the "up-date" button, the image was recorded for a total of 5 seconds (Fig.1). This procedure was performed at least 5 times from the same region to

obtain an accurate stiffness average (17). If the measurement process is not suitable, the device does not give the measurement result. Measurements with a result >1kPa were considered successful. Finally, the median value of the measurements was calculated, and liver stiffness measurements (LSM) were recorded using the automatic calculation feature of the machine. As a result of 5 measurements, those with an IQR/median value of ≤30%, used as a reliability indicator, were considered successful. Participants with an IQR/median ratio of >30% of the average stiffness value were excluded from the study.

**2D-SWE (EQI) Measurement**

For 2D-SWE measurement, a colored map box was placed in a 5cm wide area free from large vessels in the region where the pSWE measurement was performed (Fig.2). When the color map was observed to be filled completely homogeneously, the recording was made for 5 seconds by the subject holding the breath at the end of the expiration. This recording process was repeated three times (13,18,19). When little or no color signal was obtained in the SWE box, the examination was considered inadequate and these subjects were excluded from the study. At the end of the examination, a single measurement was made by placing an ROI with a diameter of 10mm on the recorded image, to be in the central and homogeneous colored area as far as possible (5). The mean LSM was then noted on the



**A**

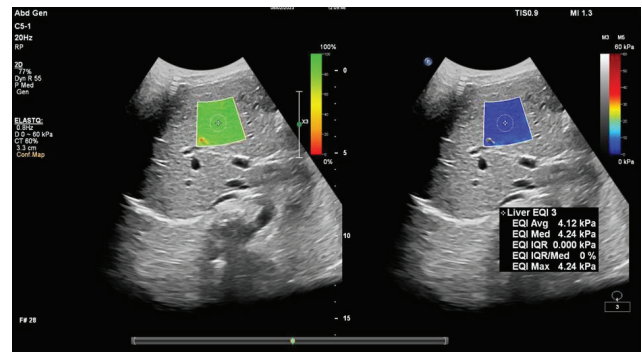
Abdominal: Measurements and Calculations

ElastPQ Stiffness Measurements			
Sample 1	Sample 3	Sample 5	
EPQ Avg	EPQ Avg	EPQ Avg	
EPQ Avg Vel	EPQ Avg Vel	EPQ Avg Vel	
Sample 2	Sample 4		
EPQ Avg	EPQ Avg		
EPQ Avg Vel	EPQ Avg Vel		

ElastPQ Stiffness Calculations	
EPQ Avg	3.61 kPa
EPQ Std	0.35 kPa
EPQ Med	3.67 kPa
EPQ IQR	0.64 kPa
EPQ IQR/Med	17 %
EPQ Avg Vel	1.10 m/s
EPQ Std Vel	0.06 m/s

**B**

**Figure 1:** Liver stiffness measurement with pSWE (A) and automatic hardness values of the device at the end of 5 measurements are shown (B).



**A**

EQI Liver Stiffness Calculations

Liver EQI Avg	4.41 kPa
Liver EQI Med	4.52 kPa
Liver EQI IQR/Med	10 %
Liver EQI IQR	0.46 kPa
Liver EQI Std	0.20 kPa
Liver EQI Avg Vel	1.21 m/s
Liver EQI Med Vel	1.23 m/s
Liver EQI IQR/Med Vel	5 %
Liver EQI IQR Vel	0.06 m/s
Liver EQI Std Vel	0.03 m/s

**B**

**Figure 2:** Liver stiffness measurement with 2D-SWE (A) and automatic hardness values of the device at the end of 5 measurements are shown (B).

report page, which includes the automatic calculations of the device (5).

The results of LSM using pSWE and 2D-SWE can be expressed in kPa or m/s. The units of kPa were preferred in this study(5).

### Power Analysis

The power analysis of the study was performed using GPower 3.1.9.2. software (Universitaet Kiel, Germany). The study was designed to be conducted on healthy children to determine the normal reference values of the pSWE (EPQ) and 2D-SWE (EQI) methods of assessing the elasticity of the liver. In the pilot study, the EPQ-median and EQI-median values were calculated with the information obtained from 10 children, and it was decided to select the sample group from the population by a simple random sampling method. The effect size was determined as  $d=0.526$  and  $n=46$  for the EPQ-median measurements, and  $d=0.358$  and  $n=96$  for the EQI-median measurements. By considering the largest sample value, it was decided to complete the study with a minimum of 96 healthy children. The study was completed a total of 107 children.

### Statistical Analysis

The statistical analyses of the study were performed using SPSS vn. 20.0 software (IBM Inc, Chicago, IL, USA). Descriptive statistics were calculated as mean $\pm$ standard deviation values, 5% trimmed mean, and 95% confidence interval around the mean, median, minimum, maximum, and percentiles (5, 10, 25, 50, 75,

90, 95). The normality assumption was analyzed using both Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk tests for all measurements. With the exception of the BMI-SD scores, the distribution of all the other measurements was found to be normal. The comparisons of all the measurement values between the genders was performed using the Independent Samples t-test, and One-Way Analysis of Variance with the Tukey HSD post-hoc test was used in comparisons according to age groups. The relationships between EPQ- and EQI-median values and other laboratory data (FBG, AST, ALT, albumin, platelet and INR) were analyzed with Pearson correlation analysis. A value of  $p<0.05$  was considered statistically significant in the analyses.

### Results

The characteristics of the subjects included in the study are presented in Table 1. The total 107 children comprised 66 (61.7%) females and 41 males with a mean age of  $13.4\pm 2.77$  years, mean weight of  $43.05\pm 12.87$  kg, mean height of  $152.36\pm 15.36$  cm, and mean BMI of  $18.14\pm 2.86$ kg/m<sup>2</sup>.

The mean median values of the EPQ and EQI measurements were  $4.04\pm 0.84$ kPa (EPQ-IQR: $0.87\pm 0.3$ , EPQ-IQR/median: $21.41\pm 7.61$ ), and  $4.41\pm 0.71$ kPa (EQI-IQR: $0.76\pm 0.57$ , EQI-IQR/median:  $17.16\pm 10.64$ ), respectively. A moderate and significant correlation was observed between the median values of EPQ and EQI ( $r=0.590$ ;  $p<0.001$ ). 95% confidence intervals were calculated with 5% trimmed mean values for all measurements (Table 2). The 5% trimmed mean is the

Table 1

Baseline characteristics of all the study participants

Male/Female (n)	41/66
	<b>Mean<math>\pm</math>SD</b>
Age (years)	13.4 $\pm$ 2.77
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	18.14 $\pm$ 2.86
BMI-SD	-0.82 $\pm$ 1.00
FBG (mg/dL)	94.59 $\pm$ 16.27
Albumin (g/dL)	4.57 $\pm$ 0.25
Aspartate aminotransferase (AST) (IU/L)	27.73 $\pm$ 16.69
Alanine aminotransferase (ALT) (IU/L)	19.95 $\pm$ 11.78
Platelet (10 <sup>3</sup> / $\mu$ L)	287.09 $\pm$ 71.14
INR	1.07 $\pm$ 0.09

BMI: body mass index, FBG: fasting blood glucose, SD: standard deviation

**Table 2**

The liver stiffness values measured with pSWE and 2D-SWE in healthy children aged 8 to 18 years

	Mean±SD (kPa)	5% Trimmed mean (kPa)	95% CI of mean (kPa)	Median (min-max) (kPa)
<b>pSWE (EPQ)</b>				
median	4.04±0.84	4.03	3.67 - 4.42	3.86; 2.55 -5.78
IQR	0.87±0.3	0.85	0.73 - 0.99	0.83; 0.43-1.56
IQR/medianian	21.41±7.61	21.01	18.04 - 24.78	21.5; 9 - 42
<b>2D-SWE (EPQ)</b>				
median	4.41±0.71	4.41	4.09 - 4.72	4.34; 2.82 -6
IQR	0.76±0.57	0.69	0.51 - 1.01	0.67; 0.13- 2.59
IQR/medianian	17.16±10.64	16.42	12.44 - 21.88	14.5; 3- 45
<b>Right lobe size (mm)</b>	<b>123.09±19.88</b>	<b>121.24</b>	<b>114.27 - 131.90</b>	<b>118; 100 -180</b>

CI: confidence interval, 2D-SWE: 2 dimensional shear wave elastography, EPQ: name of the pSWE method on the Philips Epiq Elite ultrasound device, EQI: name of the 2D-SWE method on the Philips Epiq Elite ultrasound device, IQR: interquartile range, pSWE: point shear wave elastography.

**Table 3**

Percentage values of measurements of liver stiffness using 2D-SWE and pSWE in healthy children aged 8-18 years.

	(%)	5	10	25	50	75	90	95
<b>pSWE (EPQ) (kPa)</b>								
median		2.64	3.13	3.39	3.88	4.74	5.26	5.71
IQR		0.44	0.49	0.65	0.83	1.03	1.35	1.53
IQR/medianian		9.30	11.30	15.75	21.50	25.25	29.70	40.20
<b>2D-SWE (EPQ) (kPa)</b>								
median		2.91	3.47	4.09	4.34	4.76	5.57	5.97
IQR		0.14	0.25	0.35	0.67	0.90	1.69	2.47
IQR/medianian		3.30	5.90	8.75	14.50	24.25	35.00	43.95

2D-SWE: 2 dimensional shear wave elastography, EPQ: name of the pSWE method on the Philips Epiq Elite ultrasound device, EQI: name of the 2D-SWE method on the Philips Epiq Elite ultrasound device, IQR: interquartile range, pSWE: point shear wave elastography.

mean value obtained as a result of subtracting the 5% extreme values in the distribution of the variable. When the measurement mean values and the trimmed mean values were examined, they were seen to be quite close to each other. Accordingly, it was observed that there were no extreme values in the measurements of the variables and that the distributions were not skewed. A similar situation was encountered when the

median values were analyzed. Significant percentiles of all the measurement values were also calculated (Table 3).

The correlation between the EPQ and EQI-median values was examined. The LSVs of EIQ were found to be moderately significantly higher than EPQ (med; min-max:4.34kPa; 2.82 - 6 and 3.86kPa; 2.55 – 5.78,

respectively) ( $r=0.59$ ,  $p<0.001$ ). The correlations between LSVs and patient descriptive information (age, height, weight, BMI) and laboratory findings (FBG, AST, ALT, albumin, platelet, INR) were analyzed. A very low-level positive correlation was observed between the age of the children and the median pSWE value ( $r=0.267$ ;  $p=0.006$ ). No significant correlation was found between other measurements and the median values of EPQ and EQI.

Since there was a low correlation between the EPQ-median value and age, the subjects were divided into three age groups; 96-132 months (Group A), 133-180 months (Group B), and 180+ months (Group C). The EPQ and EQI measurements were compared according to these groups (Table 4). The EPQ-median measurement results differed significantly according to age groups: median values were  $3.75\pm 0.70$  kPa in Group A,  $3.96\pm 0.90$  kPa in Group B and  $4.23\pm 0.76$  kPa in Group C ( $p=0.045$ ). In the median EQI values, a significant difference was observed in the age groups:  $4.24\pm 0.75$  kPa in Group A,  $4.23\pm 0.75$  kPa in Group B, and  $4.66\pm 1$  kPa in Group C ( $p=0.051$ ). The EPQ-IQR, EPQ-IQR/median, EQI-IQR and EQI-IQR/median measurement results did not differ significantly according to age groups.

The measurement results of the study group were compared according to gender in one-way analysis of variance. All the EPQ and EQI values were slightly higher in girls, but not at a statistically significant level. In girls, the EPQ-median values were close to each other in groups A and B, but significantly higher in group C ( $p=0.040$ ). The LSVs of EQI in girls were not significantly different according to age groups ( $p=0.137$ ). In boys, the LSVs of both methods were not significantly different ( $p=0.255$ ). There was no significant difference between height, weight and BMI measurements according to gender. The fasting blood glucose levels were significantly higher in boys than in girls ( $p=0.003$ ), however FBG levels were within normal reference limits.

## Discussion

The results of this study demonstrated normal LSM reference values in healthy children aged 8-18 years with two different SWE methods (pSWE and 2D-SWE). The mean LSVs in all children were  $4.04\pm 0.84$  kPa (95% CI:  $3.67-4.42$  kPa) for pSWE and  $4.41\pm 0.71$  kPa (95% CI:  $4.09-4.72$  kPa) for 2D-SWE. The 2D-SWE LSVs were higher than the pSWE values. While LSVs had a low level of significant positive correlation with increasing age, no significant difference was found according to gender.

To the best of our knowledge, few studies have been conducted with the SWE method to determine the normal stiffness reference values of the liver in healthy children (13–15,20–22). In these studies, different results were reported in liver parenchymal stiffness values due to the difference in the devices used, different sample sizes, and different age groups. Mjelle et al. reported that the median stiffness of the liver in children aged 4-17 years was 4.1 kPa (IQR: 3.6–4.7) for pSWE (Samsung) and 3.3 kPa (IQR: 2.7–4.39) for 2D-SWE (General Electric (GE))(21). Marginean et al. reported LSV  $3.72\pm 0.48$  kPa for 2D-SWE (GE) in children aged 3-18 years (20), and Galina et al. determined values of  $4.29\pm 0.59$  kPa for 2D-SWE (GE) in the 0-16 years age group (15). Franchi-Abella et al. reported  $6.58\pm 1.46$  kPa for 2D-SWE (Aixplorer, Supersonic Imaging) and Shin et al. reported  $5.5\pm 1.3$  kPa for 2D-SWE (Aixplorer, Supersonic Imaging) in the 0-18 years age group (13,14).

Keeping the age group high in the current study (8-18 years old) may have affected the higher LS values than in other studies, because a positive correlation has been shown between the increase in age and elasticity values in children (20,21,23–25). In the present study, a low level of significant positive correlation was observed with the increase in age in the pSWE method in LS values ( $r=0.267$ ;  $p=0.006$ ). In the 2D-SWE method, there was a significant increase in LS values, especially in the 180+ month group ( $p=0.051$ ). However, there are also studies reporting that age does not affect LSVs (26,27).

In this study, gender was not found to affect LSM values. Conflicting results have been reported in the literature regarding the effect of gender on LSM values. It has been suggested that LSM values may be lower in girls due to the anti-fibrotic effect of estrogen (15,20,25,28,29). In the present study, the fact that the EPQ-median values in girls were close to each other in the A and B age groups, but significantly higher in the C group may support this idea ( $p=0.040$ ). However, the EQI-median values in girls did not differ significantly between age groups. ( $p=0.137$ ). However, there are a few studies in literature reporting that gender has no effect on LSVs (24,30–33).

In the current study, there was no significant relationship between LS median values, liver size and BMI, and this finding was consistent with the literature (15,21,27,34).

In the current study, the LS values were found to be higher in 2D-SWE than in pSWE ( $4.04\pm 0.84/4.41\pm 0.71$ ,  $p<0.001$ ). There are very few studies comparing both

methods. Mjelle et al. reported median LS values as 3.3kPa (IQR: 2.7–4.3) for 2D-SWE (GE) and 4.1kPa (IQR: 3.6–4.7) for pSWE (Samsung) in a study of a healthy 4-17 years age group (21). These results contradict the results of the present study, which could be attributed to the difference between the study groups and the devices used. Therefore, a reliable comparison cannot be made. In a study conducted by Mulabecirovic et al., the 2D-SWE method of two different devices (GE and Samsung) was compared and significantly higher LSVs were determined with the GE device ( $4.5 \pm 0.8$  kPa and  $4.1 \pm 0.8$  kPa, respectively,  $p < 0.001$ ). The 2D-SWE LS values of the current study are similar to the values obtained from the GE device in the study by Mulabecirovic et al. However, such a comparison may not be accurate, as the aforementioned study was conducted on an adult healthy group.

This study had some limitations. Although biopsy is the gold standard method for liver disease detection, healthy children could not be biopsied due to its invasive nature and for ethical reasons. Therefore, it cannot be said with 100% certainty that the participants did not have liver disease. However, we minimized this limitation by including individuals who were completely normal in terms of anamnesis, laboratory findings and US reports. Second, the intra-observer reliability of the measurements could not be tested because the measurements were taken in one session. As it is difficult to apply in clinical practice, the subjects were not called for remeasurement. However, the 25 years of US experience of the examining physician may partially compensate for this limitation. In addition, intra-observer reliability could not be tested because the measurements were made by a single physician.

In conclusion, LS normal reference values were determined for two different SWE methods in the same session in healthy children aged 8-18 years, in this study. The LS median values were found to be higher in the 2D-SWE method compared to pSWE. The LSVs showed a weak positive correlation with increasing age, but no significant correlation was found with gender, BMI, liver size, and biochemical markers. These reference values created for healthy children will help the SWE method to be used more effectively in the evaluation of hepatic parenchyma in chronic liver diseases.

### Acknowledgment

We are grateful to Mustafa Akçam (Professor, Department of Pediatrics Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, Faculty of Medicine, S.Demirel University, Isparta), Ozgur Pirgon (Professor, Department

of Pediatric Endocrinology and Diabetes, Faculty of Medicine, S.Demirel University, Isparta), and Veysel A. Ayyıldız (Associate professor, Department of Radiology, Faculty of Medicine, S.Demirel University, Isparta) for careful reading of the manuscript and helpful comments and suggestions.

### Conflict of Interest Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

### Ethical Approval

We adhered to the Declaration of Helsinki principles. Ethical approval was attained from the Local Clinical Research Ethics Committee (Süleyman Demirel University Faculty of Medicine Clinical Research Ethics Committee, Date and decision number: 31.01.2023/14).

### Consent to Participate and Publish

In keeping with the policies for a retrospective review, the informed consent requirement was waived.

### Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### Availability of Data and Materials

Data are available on request due to privacy or other restrictions.

### Authors Contributions

HA: Planning the study; Methodology; Resources; Data curation; Formal analysis; Writing-original draft; Writing-review; Validation; Visualization;

FlI: Data curation; Investigation; Validation; Supervision; & editing.

### References

1. Selmi B, Engelmann G, Teufel U, El Sakka S, Dadrich M, Schenk J-P. Normal values of liver elasticity measured by real-time tissue elastography (RTE) in healthy infants and children. *J Med Ultrason.* 2014;41(1):31–8.
2. Shiina T, Nightingale KR, Palmeri ML, Hall TJ, Bamber JC, Barr RG, et al. WFUMB guidelines and recommendations for clinical use of ultrasound elastography: Part 1: basic principles and terminology. *Ultrasound Med Biol.* 2015;41(5):1126–47.
3. Sharma S, Khalili K, Nguyen GC. Non-invasive diagnosis of advanced fibrosis and cirrhosis. *World J Gastroenterol WJG.* 2014;20(45):16820.
4. Zhou H, Zhou Y, Ding J, Chen Y, Wen J, Zhao L, et al. Clinical evaluation of grayscale and linear scale hepatorenal indices for fatty liver quantification: a prospective study of a native Chinese population. *Abdom Radiol.* 2022;47(4):1321–32.
5. Ferraioli G, Wong VW-S, Castera L, Berzigotti A, Sporea I, Dietrich CF, et al. Liver ultrasound elastography: an update to the world federation for ultrasound in medicine and bi-



- ology guidelines and recommendations. *Ultrasound Med Biol*. 2018;44(12):2419–40.
6. Belei O, Sporea I, Gradinaru-Tascau O, Olariu L, Popescu A, Simedrea I, et al. Comparison of three ultrasound based elastographic techniques in children and adolescents with chronic diffuse liver diseases. *Med Ultrason*. 2016;18(2):145–50.
  7. Ferraioli G, Tinelli C, Dal Bello B, Zicchetti M, Filice G, Filice C, et al. Accuracy of real-time shear wave elastography for assessing liver fibrosis in chronic hepatitis C: a pilot study. *Hepatology*. 2012;56(6):2125–33.
  8. Tutar O, Beser ÖF, Adaletli I, Tunc N, Gulcu D, Kantarci F, et al. Shear wave elastography in the evaluation of liver fibrosis in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2014;58(6):750–5.
  9. Altay C, Seçil M. Sonoelastografinin Temel İlkeleri. 2019;
  10. Tran LC, Ley D, Bourdon G, Coopman S, Lerisson H, Tillaux C, et al. Noninvasive Pediatric Liver Fibrosis Measurement: Two-Dimensional Shear Wave Elastography Compared With Transient Elastography. *Front Pediatr*. 2022;10.
  11. Fitzpatrick E, Quaglia A, Vimalasvaran S, Basso MS, Dhawan A. Transient elastography is a useful noninvasive tool for the evaluation of fibrosis in paediatric chronic liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2013;56(1):72–6.
  12. Xie L-T, Yan C-H, Zhao Q-Y, He M-N, Jiang T-A. Quantitative and noninvasive assessment of chronic liver diseases using two-dimensional shear wave elastography. *World J Gastroenterol*. 2018;24(9):957.
  13. Shin HJ, Kim M-J, Kim HY, Roh YH, Lee M-J. Optimal acquisition number for hepatic shear wave velocity measurements in children. *PLoS One*. 2016;11(12):e0168758.
  14. Franchi-Abella S, Corno L, Gonzales E, Antoni G, Fabre M, Ducot B, et al. Feasibility and diagnostic accuracy of supersonic shear-wave elastography for the assessment of liver stiffness and liver fibrosis in children: a pilot study of 96 patients. *Radiology*. 2016;278(2):554–62.
  15. Galina P, Alexopoulou E, Zellos A, Grigoraki V, Sihanidou T, Kelekis NL, et al. Performance of two-dimensional ultrasound shear wave elastography: reference values of normal liver stiffness in children. *Pediatr Radiol*. 2019;49(1):91–8.
  16. Barr RG, Ferraioli G, Palmeri ML, Goodman ZD, Garcia-Tsao G, Rubin J, et al. Elastography assessment of liver fibrosis: society of radiologists in ultrasound consensus conference statement. *Ultrasound Q*. 2016;32(2):94–107.
  17. Fang C, Jaffer OS, Yusuf GT, Konstantatou E, Quinlan DJ, Agarwal K, et al. Reducing the number of measurements in liver point shear-wave elastography: factors that influence the number and reliability of measurements in assessment of liver fibrosis in clinical practice. *Radiology*. 2018;287(3):844–52.
  18. Jung C, Groth M, Petersen KU, Hammel A, Brinkert F, Grabhorn E, et al. Hepatic shear wave elastography in children under free-breathing and breath-hold conditions. *Eur Radiol*. 2017;27(12):5337–43.
  19. Dietrich CF, Bamber J, Berzigotti A, Bota S, Cantisani V, Castera L, et al. EFSUMB guidelines and recommendations on the clinical use of liver ultrasound elastography, update 2017 (long version). *Ultraschall der Medizin-European J Ultrasound*. 2017;38(04):e16–47.
  20. Mărginean CO, Meliț LE, Ghiga DV, Săsăran MO. Reference values of normal liver stiffness in healthy children by two methods: 2D shear wave and transient elastography. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–10.
  21. Mjelle AB, Mulabecirovic A, Havre RF, Rosendahl K, Juliusson PB, Olafsdottir E, et al. Normal liver stiffness values in children: a comparison of three different elastography methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2019;68(5):706.
  22. Mulabecirovic A, Mjelle AB, Gilja OH, Vesterhus M, Havre RF. Liver elasticity in healthy individuals by two novel shear-wave elastography systems—Comparison by age, gender, BMI and number of measurements. *PLoS One*. 2018;13(9):e0203486.
  23. Tokuhara D, Cho Y, Shintaku H. Transient elastography-based liver stiffness age-dependently increases in children. *PLoS One*. 2016;11(11):e0166683.
  24. Lewindon PJ, Balouch F, Pereira TN, Puertolas-Lopez M V, Noble C, Wixey JA, et al. Transient liver elastography in unselected control children: Impact of age and intercurrent illness. *J Paediatr Child Health*. 2016;52(6):637–42.
  25. Engelmann G, Gebhardt C, Wenning D, Wühl E, Hoffmann GF, Selmi B, et al. Feasibility study and control values of transient elastography in healthy children. *Eur J Pediatr*. 2012;171:353–60.
  26. Huang Z, Zheng J, Zeng J, Wang X, Wu T, Zheng R. Normal liver stiffness in healthy adults assessed by real-time shear wave elastography and factors that influence this method. *Ultrasound Med Biol*. 2014;40(11):2549–55.
  27. Fang C, Sidhu PS. Ultrasound-based liver elastography: current results and future perspectives. *Abdom Radiol*. 2020;45:3463–72.
  28. Sirlı R, Sporea I, Tudora A, Deleanu A, Popescu A. Transient elastographic evaluation of subjects without known hepatic pathology: does age change the liver stiffness. *J Gastrointest Liver Dis*. 2009;18(1):57–60.
  29. Corpechot C, Naggar EA, Poupon R. Gender and liver: is the liver stiffness weaker in weaker sex? *Hepatology*. 2006;44(2):513–4.
  30. Goldschmidt I, Streckenbach C, Dingemann C, Pfister ED, di Nanni A, Zapf A, et al. Application and limitations of transient liver elastography in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2013;57(1):109–13.
  31. Son CY, Kim SU, Han WK, Choi GH, Park H, Yang SC, et al. Normal liver elasticity values using acoustic radiation force impulse imaging: a prospective study in healthy living liver and kidney donors. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012;27(1):130–6.
  32. Horster S, Mandel P, Zchoval R, Clevert DA. Comparing acoustic radiation force impulse imaging to transient elastography to assess liver stiffness in healthy volunteers with and without valsalva manoeuvre. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2010;46(2–3):159–68.
  33. Madhok R, Tapasvi C, Prasad U, Gupta AK, Aggarwal A. Acoustic radiation force impulse imaging of the liver: measurement of the normal mean values of the shearing wave velocity in a healthy liver. *J Clin diagnostic Res JCDR*. 2013;7(1):39.
  34. Bailey SS, Youssfi M, Patel M, Hu HH, Shaibi GQ, Towbin RB. Shear-wave ultrasound elastography of the liver in normal-weight and obese children. *Acta radiol*. 2017;58(12):1511–8.



## TİROİD TÜMÖRLERİNDE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK NEOVASKÜLER PSMA VE CD34 EKSPRESYONLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

EVALUATION OF IMMUNOHISTOCHEMICAL NEOVASCULAR PSMA AND CD34 EXPRESSIONS IN THYROID TUMORS

Mehmet KIRAN<sup>1</sup>, İbrahim Metin ÇİRİŞ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Isparta Şehir Hastanesi, Tıbbi Patoloji Kliniği, Isparta, TÜRKİYE

<sup>2</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Ana Bilim Dalı, Isparta, TÜRKİYE

**Cite this article as:** Kiran M, Çiriş İM. Tiroid Tümörlerinde İmmünohistokimyasal Olarak Neovasküler PSMA ve CD34 Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi. Med J SDU 2023; 30(1): 79-88.

### Öz

#### Amaç

Bu çalışmanın amacı tiroid tümörlerinde Prostat Spesifik Membran Antijen (PSMA) ekspresyonunun ayrırcı tanıdaki yeri ve prognoz üzerine etkisinin araştırılmasıdır.

#### Gereç ve Yöntem

Farklı histolojik tipteki 95 tiroid kanseri tanısı alan hastaların parafin bloklarına immünohistokimyasal PSMA ve CD34 uygulandı. Tümöral ve ekstratümoral stromadaki vasküler ekspresyon yüzdesi ve tümör epitelindeki yoğunluk skoru değerlendirildi ve PSMA ekspresyon düzeyine göre gruplara ayrıldı. Nihai PSMA ifadesi, yoğunluk ve yüzde puanları çarpılarak belirlendi.

#### Bulgular

Tiroid tümörlerinde yeni damar oluşumu olan alanlarda PSMA ile ekspresyon artışı izlendi. Non-neoplastik tiroid dokusunda PSMA ile vasküler boyanma saptanmadı. Papiller Benzeri Nükleer Özellikler Gösteren Noninvaziv Foliküler Neoplazi (NİFTP) vakalarında agresif tümörlere göre karşılaştırıldığında ekspresyon artışı görülmedi

### Sonuç

PSMA ekspresyon artışının kötü prognozla ilişkili olduğu saptandı ve NİFTP vakalarının diğer tümörler ile ayırımında kullanılabileceği yönünde bulgular saptandı

**Anahtar Kelimeler:** Neovaskülerizasyon, PSMA ekspresyonu, Tiroid Karsinomu

### Abstract

#### Objective

The aim of this study was to investigate the place of Prostate Specific Membrane Antigen (PSMA) expression in differential diagnosis and its effect on prognosis in thyroid tumors.

#### Material and Method

Immunohistochemical PSMA and CD34 were applied to paraffin blocks of 95 patients diagnosed with different histological types of thyroid cancer. The percentage of vascular expression in the tumoral and extratumoral stroma and the density score in the tumor epithelium were evaluated and grouped according to PSMA expression level. Final PSMA expression was determined by multiplying intensity and percentage points.

**Sorumlu yazar ve iletişim adresi /Corresponding author and contact address:** M.K. / dr.mehmet.kiran@gmail.com

**Müracaat tarihi/Application Date:** 09.09.2022 • **Kabul tarihi/Accepted Date:** 27.02.2023

**ORCID IDs of the authors:** M.K: 0000-0003-3292-2213; İ.M.Ç: 0000-0002-5619-4989

## Results

An increase in expression was observed with PSMA in areas with neovascularization in thyroid tumors. No vascular staining was detected with PSMA in non-neoplastic thyroid tissue. No increase in expression was seen in Non-invasive follicular thyroid neoplasm with papillary like nuclear features (NIFTP) cases compared to aggressive tumors

## Giriş

Tiroid tümörleri günlük pratikte en sık karşılaşılan endokrin tümörlerdir (1). Klinikte tiroid nodülü popülasyonun yalnızca %5-10'unda gözlenmekte olup, bunların çoğunluğu benign foliküler neoplaziler iken yalnızca %2-5'i maligndir. Malign lezyonların %95'inden fazlası tiroidin primer malignitesidir ve bunlar epitelial orijinlidirler (1-5).

Benign tiroid nodülleri ve hiperplastik nodüller yaygın olarak görülürler. Bunların yaklaşık %50'sinden fazlası multinodüler guatr veya kronik tiroidit olgularıdır. Adenom gibi benign oluşumların dışında tiroiditler, granülomatöz hastalıklar, kistik hastalıklar ve malformasyonlar da tiroid nodülü şeklinde ortaya çıkar (2).

Tiroid kanserlerinde izlenen majör fenotipik özellikler tiroid papiller karsinomunda özgün nükleer özellikler; foliküler karsinomda invazivlik; medüller karsinomda nöroendokrin özellikler; az diferansiye karsinomda nekroz, insüler patern; indiferansiye karsinomda ise yüksek mitoz, anaplastik özellikler ve yaygın nekroz baskın nitelikler olarak görülür (1).

Anjiogenez büyüme aşamasında fizyolojik bir süreçtir ve önceden var olan damarlardan yeni damarların gelişmesi ve yenilenmesi anlamına gelir (3). Tümör büyümesinde ve yayılmasında anjiogenezis kritik öneme sahiptir. Tümör ile ilişkili anjiogenik faktörler tümör hücrelerinden ve tümördeki inflamatuvar hücre infiltrasyonundan sağlanır (4). Antianjiyogenik ilaçların kanser tedavisi için artan kullanımı, temel ve klinik araştırmalar sonucu ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte, bu tür ilaçların klinik yararları nispeten düşüktür. Gelişmelerin, tümör anjiyogenezini yöneten moleküler süreç hücrel mekanizmalarının ve antianjiyogenik tedavilere verilen yanıtın daha kapsamlı bir şekilde anlaşılmasından gelmesi muhtemeldir (6).

PSMA, tip II transmembran glikoproteini olup prostatik gland epitelinde yaygın olarak eksprese olur (7, 8). Prostat epitelinin yanı sıra tükürük bezi, ince bağırsak ve beyin dokusunda ve bazı solid tümörle-

## Conclusion

It was determined that increased PSMA expression was associated with poor prognosis, and it was found that it can be used to differentiate NIFTP cases from other tumors.

**Keywords:** Neovascular, PSMA Expression, Thyroid Cancer

rin damar endotelinde eksprese olmaktadır. Bazı tümörlerde ise tümör içerisinde yeni oluşan damarların endotelinde boyanma gösterir (9). PSMA, benign dokuların vasküler endotelial hücrelerinde ve de vasküler tümörlerin neoplastik hücrelerinde ekspresyon göstermez (10). Bu ekspresyon davranışı ile tümöral vasküler yapıların diğer vasküler yapılardan farklı olduğunu göstermekte ve tedavi imkânı sağlamaktadır (11).

PSMA'ya spesifik monoklonal antikor ilk olarak 1987 yılında tarif edilmiştir ve 7E11 olarak adlandırılmıştır. Başlangıçta 7E11 antikoru immünohistokimyasal olarak renal hücreli karsinom, transizyonel hücreli karsinom, mesane ve kolon karsinomlarında yeni oluşmuş vasküler endotelinde boyanma göstermiştir (12). Bu antikorun damar endotelinde olan pozitifliği immünohistokimyasal tanıda kullanılabilir. Serum PSMA düzeyleri klinik izlemde, PSMA işaretli ligandlar kullanılarak yapılan radyolojik görüntüleme ile klinik evrelemede ve immünoterapötik ilaç olarak tedavide kullanılabilir (13).

Günümüzde anti-anjiogenik tedaviye yönelik çok sayıda çalışmanın yapıldığı ve çoğu tümör için anjiogenezin kötü prognostik parametre olduğu kabul edilmekle birlikte bu alanda halen kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamızda tiroid tümörlerinde yeni damar oluşumlarını immünohistokimyasal olarak PSMA ve CD34 ile incelemeyi amaçladık. Elde edilen parametrelerin tiroid karsinomlarının klasik prognostik parametreler ile olan ilişkisini araştırdık.

## Gereç ve Yöntem

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Ana Bilim Dalı'nda Ocak 2014 - Aralık 2020 tarihleri arasında retrospektif arşiv taraması yapılarak rastgele seçilen 47 tiroid papiller karsinom, 16 NIFTP, dokuz malignite potansiyeli belirsiz iyi diferansiye neoplazi, dokuz foliküler karsinom, 11 tiroid medüller karsinom üç az diferansiye karsinom olmak üzere toplam 95 olgu çalışma grubunu oluşturmuştur. Dokuz adet olan malignite potansiyeli belirsiz iyi diferansiye

neoplazi yeni sınıflamaya göre tekrar değerlendirilmiş olup NİFTP kategorisine dahil edilmiştir.

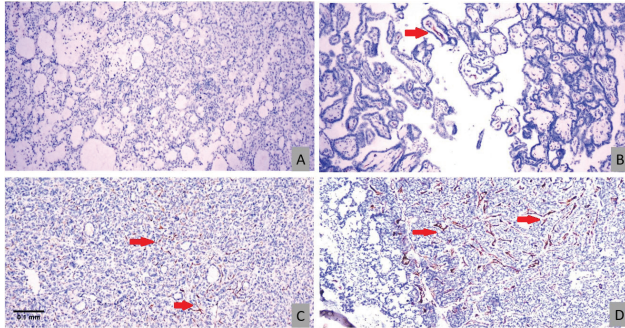
Çalışma grubundaki olgulara ait örnekler %10'luk formaldehit solüsyonu ile tespit edilmiş olup rutin doku takibi ile hazırlanmış parafin bloklardan elde edilen hematoksilin-eozin (H&E) boyalı preparatlar arşivden çıkarılarak tekrar değerlendirilmiş, tümöral ve non-tümöral tiroid dokusunu birlikte bulduran en fazla tümör hacmine sahip uygun parafin blok seçilmiştir. Histolojik değerlendirmenin yanı sıra olgulara ait hasta özellikleri (yaş, cinsiyet) ve raporlara dayanarak makroskopik özellikler (tiroid bezi ağırlığı, lezyon boyutu, yerleşimi, multifokalite kapsül invazyonu) ve mikroskopik özellikler (damar invazyonu, metastatik lenf nodu varlığı, lezyona eşlik eden bulgular) not edilmiştir. Ayrıca hasta kayıtları geçmişten günümüze kadar taranarak operasyon sonrası metastaz gelişimi ve ölüm durumları kaydedilmiştir.

Olguların tamamı PSMA ve CD34 markerları ile immünohistokimyasal olarak boyandı.

### PSMA

#### (Antikor Özellikleri, Boyanma ve Değerlendirme)

Tümöre ait bloklara immünohistokimyasal yöntemle PSMA uygulandı. PSMA antikor (klon 3E6, izotip: IgG1, kapa, DAKO flex, stabilize edici protein ve 0,015 mol/L sodyum azid içeren bir tampon içinde sıvı formda sağlanan kullanıma hazır monoklonal fare antikor; Carpenteria, USA) üreticinin talimatları doğrultusunda hazırlandı. Formalinle tespit edilmiş parafine gömülü bloklardan elde edilen 4 µm kalınlığında şarjlı lamlara alınan doku örnekleri otomatize immünohistokimya cihazı ile boyandı. Pozitif kontrol olarak prostat doku örneği kullanıldı.



**Şekil 1:**

A) PSMA vasküler ekspresyon skor 0 B) PSMA vasküler ekspresyon skor 1+ C) PSMA vasküler ekspresyon skor 2+ D) PSMA vasküler ekspresyon skor 3+ (PSMA DAB:200x)(kırmızı ok)

Tümöral alanlar içerisindeki vasküler yapılarda boyanma yüzdesi, boyanma şiddeti ışık mikroskobu (NikonEclipse N İ; Japonya) ile değerlendirildi. En yoğun alanda damar yoğunluğunun tümör hücrelerine oranı ışık mikroskobu (NikonEclipse N İ; Japonya) altında görüntü analiz programı (QuPath v3.0;Edinburg,İskoçya) ile otomatize yüzde oran hesaplandı. Tümör dışı tiroid dokusuna ait damar endotelinde boyanmalar yüzde olarak not edildi. Olgular tümör tipleri ve diğer ek özelliklere göre gruplandırıldı ve gruplar arasında PSMA ekspresyon skorları karşılaştırıldı.

Boyanma %0 ila %100 arasında yüzde olarak ve yoğun alanda tümör hücresi damar boyanma yüzdesi olarak değerlendirildi.

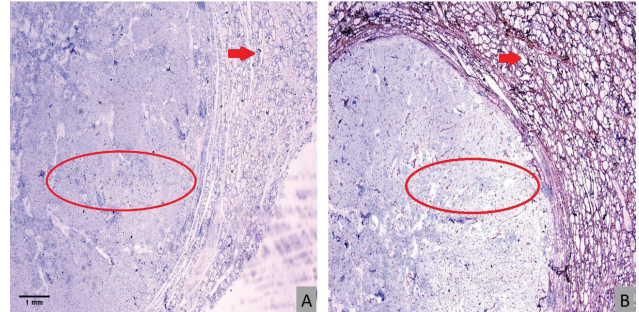
Damar endotelinin boyanması şiddetine göre; güçlü (skor; 3), orta (skor; 2), zayıf (skor; 1), negatif (skor; 0) olarak değerlendirildi (14, 15)

### CD34

#### (Antikor Özellikleri, Boyanma ve Değerlendirme)

Tümöre ait bloklara immünohistokimyasal yöntemle CD34 antikor (klon: QBEnd 10 izotip IgG1 kapa, DAKO Flex, stabilize edici protein ve 15 mmol/L sodyum azid içeren bir tampon içinde sıvı formda sağlanan kullanıma hazır monoklonal fare antikor; Glostrup,Danimarka) üreticinin talimatları doğrultusunda hazırlandı. Formalinle tespit edilmiş parafine gömülü bloklardan elde edilen 4 µm kalınlığında şarjlı lamlara alınan doku örnekleri otomatize immünohistokimya cihazı ile boyandı.

Tümöral ve non-tümöral alanlarda damar endoteli yatağını tespit etmek amacıyla boyamalar not edildi. Gruplar arasında karşılaştırma yapılmaksızın yalnızca damar yapılanmasının tespiti gösterildi.



**Şekil 2:**

PSMA ile non-neoplastik alanda boyanma görülmezken (kırmızı ok) neoplastik alanda skor 1+ boyanma (elips ile çevrelenmiş alan) (A) CD34 ile neoplastik ve non-neoplastik alanda vasküler boyanma (kırmızı ok ve elips ile çevrelenmiş alan) DAB 40x

### İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler IBM SPSS 22 (Chicago, USA) yazılımı kullanılarak yapıldı. Değişkenlerin normal dağılımına uygunluğu görsel ve analitik yöntemlerle (Kolmogorov-Smirnow/Sharpi-Wilk testleri) incelendi. Tanımlayıcı istatistikler sayı, yüzde, ortalama, standart sapma olarak verildi. Normal dağılıma sahip değişkenlerin iki bağımsız grup karşılaştırılmasında Student t Testi, normal dağılıma sahip olmayan değişkenler için Mann Whitney U Testi kullanıldı. Gruplar arasında sıklıklar bakımından fark saptanıp saptanmadığı Ki-kare testi kullanılarak karşılaştırıldı. İki değişkenden daha fazla normal dağılıma uymayan bağımsız grup karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Değişkenler arasındaki ilişki Spearman korelasyon analizi ile belirlendi. p değerinin 0,05'in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi.

### Bulgular

PSMA ekspresyon yüzdesi ortalama  $33,61 \pm 31,47$ 'dir. PSMA ekspresyon yüzdesi ile klinikopatolojik parametreler arasındaki ilişki Tablo 1'de özetlenmiştir. PSMA ekspresyon yüzdesi ile lenfovasküler invazyon, kapsül dışı invazyon, tiroid dışı invazyon, arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptandı ( $p < 0,05$ , Ki kare testi). PSMA ekspresyon yüzdesi ile yaş, cinsiyet, tiroid bezi ağırlığı, tümör boyutu, lokalizasyon, kapsül, papiller yapı, odak, sağ kalım, metastaz ve operasyon sonrası metastaz ile anlamlı ilişki bulunmadı ( $p > 0,05$ , Ki kare testi) (Tablo 1). PSMA ekspresyon yüzdesi ile lenfovasküler invazyon ( $p < 0,01$ ,  $r: 0,416$ ), kapsül dışı invazyon ( $p: 0,005$ ,  $r: 0,289$ ), tiroid dışı invazyon ( $p: 0,048$ ,  $r: 0,203$ ) ile orta derecede pozitif korelasyon izlendi (Spearman korelasyon).

Ayrıca yakın incelemede görüntü analiz yöntemi kullanılarak x400 büyüme alanında damar yoğunluğu/tümör hücresi sayısı hesaplandı. Tiroid tümörlerinde PSMA ekspresyon yüzdesi hotspot alanda %0-100 arasında değerlendirildi. Minimum damar yoğunluğu/tümör hücre oranı %0 olup maksimum %47,97 olarak saptandı. Hotspot alanda PSMA ekspresyon yüzdesi ile klinikopatolojik parametreler arasındaki ilişki Tablo 1'de özetlendi. Hotspot PSMA ekspresyon yüzdesi ile lenfovasküler invazyon, kapsül dışı invazyon, tiroid dışı invazyon, arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptandı ( $p < 0,05$ , Ki kare testi). Hotspot PSMA ekspresyon yüzdesi ile yaş, cinsiyet, lokalizasyon, tiroid bezi ağırlığı, tümör boyutu, kapsül, papiller yapı, odak, sağ kalım, metastaz ve operasyon sonrası metastaz ile anlamlı ilişki bulunmadı ( $p > 0,05$ , Ki kare testi) (Tablo 1). Hotspot PSMA ekspresyon yüzdesi ile lenfovasküler invazyon ( $p < 0,0001$ ,  $r: 0,416$ ), kap-

sül dışı invazyon ( $p: 0,01$ ,  $r: 0,289$ ), tiroid dışı invazyon ( $p: 0,048$ ,  $r: 0,203$ ) ile orta derecede pozitif korelasyon izlendi (Spearman korelasyon).

Tümör dışı tiroid dokusunda PSMA ekspresyonu CD34 ekspresyonuna göre değerlendirildi. PSMA ile ekspresyon %0-100 arasında değerlendirme olacak şekilde hesaplandı. Buna göre non-neoplastik tiroid dokusunda 86 (%90,52)'sinde boyanma görülmedi. Dört (%4,21) vakada %1 ekspresyon, dört (%4,21) vakada %5 ekspresyon ve bir (%1,05) vakada %10 boyanma görüldü. Non-neoplastik tiroid dokusunda PSMA ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p > 0,05$ , Kruskal Wallis test)

Tümör grupları arasındaki PSMA ekspresyon yüzdesi ilişkisi değerlendirildiğinde papiller tiroid karsinomu ve NİFTP, foliküler tiroid karsinomu ve NİFTP, medüller karsinom ve NİFTP arasında istatistiksel anlamda fark saptandı ( $p < 0,05$ , Kruskal Wallis Testi) (Tablo 2).

Tümör grupları arasındaki hotspot PSMA ekspresyon yüzdesi ilişkisi değerlendirildiğinde foliküler tiroid karsinomu ve NİFTP arasında istatistiksel olarak farklılık saptandı ( $p < 0,05$ , Kruskal Wallis Testi) (Tablo 2).

Papiller tiroid karsinomu histolojik varyantları ve foliküler tiroid karsinomu histolojik varyantları arasında PSMA ekspresyon yüzdesi ve hotspot PSMA ekspresyon yüzdesi arasında anlamlı fark görülmedi ( $p > 0,05$ , Kruskal Wallis test).

PSMA ekspresyon skoru ile klinikopatolojik parametreler arasındaki ilişki Tablo 3'te özetlenmiştir. PSMA ekspresyon skoru ile lenfovasküler invazyon, kapsül invazyonu, tiroid dışı invazyon, metastaz ve operasyon sonrası metastaz arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptandı ( $p < 0,05$ , Ki kare testi). PSMA ekspresyon skoru ile yaş, cinsiyet, tiroid bezi ağırlığı, tümör boyutu, lokalizasyon, kapsül, papiller yapı, odak, sağ kalım ile anlamlı ilişki bulunmadı ( $p > 0,05$ , Ki kare testi) (Tablo 3). PSMA ekspresyon yüzdesi ile lenfovasküler invazyon ( $p < 0,01$ ,  $r: 0,433$ ), kapsül dışı invazyon ( $p: 0,02$ ,  $r: 0,238$ ), tiroid dışı invazyon ( $p: 0,01$ ,  $r: 0,217$ ), metastaz ( $p: 0,034$ ,  $r: 0,217$ ) ve operasyon sonrası metastaz ( $p: 0,039$ ,  $r: 0,231$ ), ile orta derecede pozitif korelasyon izlendi (Spearman korelasyon testi).

Non-neoplastik tiroid dokusunda PSMA ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p > 0,05$ , Kruskal Wallis test).

**Tablo 1** PSMA yüzde ile klinikopatolojik parametreler arasındaki ilişki

	PSMA Ekspresyonu Ortalama±Standart Sapma	Psma yüzde Kikare testi p değeri	Hotspot yüzde Kikare testi p değeri
<b>Yaş</b>			
<50	35,92±31,35	0,431	0,855
≥50	30,81±31,75		
<b>Cinsiyet</b>			
Kadın	32,07±30,44	0,410	0,514
Erkek	38,17±34,62		
<b>Lokalizasyon</b>			
Sağ lob	29,18±28,76	0,492	0,643
İsthmus	45,0±7,07		
Sol lob	39,15±34,86		
Sağ lob + isthmus	0		
Sol lob + isthmus	5,85±2,54		
<b>Lenfovasküler invazyon</b>			
Yok	26,57±28,72	0,000	0,000
Var	60,0±27,53		
<b>Kapsül</b>			
Yok	35,88±31,34	0,371	0,576
Var	29,89±31,77		
<b>Kapsül dışı invazyon</b>			
Yok	35,88±31,34	0,007	0,005
Var	29,89±31,77		
<b>Papiller yapı</b>			
Yok	31,50±33,36	0,122	0,074
Var	36,92±28,38		
<b>Odak</b>			
Tek odak	32,43±31,55	0,626	0,888
Multiple odak	35,74±31,67		
<b>Tiroid dışı invazyon</b>			
Yok	30,84±31,81	0,048	0,048
Var	44,0±28,54		
<b>Sağkalım</b>			
Yaşıyor	33,97±31,44	0,285	0,292
Ölü	0		
<b>Metastaz</b>			
Yok	31,77±31,48	0,638	0,105
Var	44,29±30,31		
<b>Operasyon sonrası metastaz</b>			
Yok	31,79±30,71	0,305	0,073
Var	49,10±35,27		

**Tablo 2** PSMA yüzdesi ile tiroid tümörleri arasındaki ilişki

PSMA yüzde	p
Papiller Karsinom-NİFTP	0,004
Foliküler Karsinom-NİFTP	0,001
Medüller Karsinom-NİFTP	0,000
Hotspot PSMA yüzde	p
Foliküler Karsinom-NİFTP	0,003

**Tablo 3** PSMA skoru ile klinikopatolojik paramatereler arasındaki ilişki

Kategori	skor 0	skor 1	skor 2	skor 3	p değeri*
<b>Yaş</b>					
<50	9(%17,3)	14(%26,9)	9(17,3)	20(38,5)	0,302
≥50	14(%32,6)	8(%18,6)	6(%14,0)	15(%34,9)	
<b>Cinsiyet</b>					
Kadın	17(%23,9)	17(%23,9)	13(%18,3)	24(%33,8)	0,648
Erkek	6(%25,0)	5(%20,8%)	2(%8,3)	11(%45,8)	
<b>Lokalizasyon</b>					
Sağ lob	11(%21,6)	17(%33,3)	8(%15,7)	15(%29,4)	0,430
İsthmus	0	0	1(%50,0)	1(%50,0)	
Sol lob	12(%29,3)	4(%9,8)	6(%14,6)	19(%46,3)	
Sol lob +isthmus	0	1(%100,0)	0	0	
<b>Lenfovasküler invazyon</b>					
Yok	22(%29,0)	21(%28,0)	13(%17,3)	19(%25,3)	0,000
Var	1(%5,0)	1(%5,0)	2(%10,0)	16(%80,0)	
<b>Kapsül</b>					
Yok	13 (%22,0)	13(%22,0)	9(%15,3)	24(%40,7)	0,337
Var	10(%27,8)	9(%25,0)	6(%16,7)	11(%30,6)	
<b>Kapsül dışı invazyon</b>					
Yok	22(%27,2)	21(%25,9)	11(%13,6)	27(%33,3)	0,018
Var	1(%7,1)	1(%7,1)	4(%28,6)	8(%57,1)	
<b>Papiller yapı</b>					
Yok	18(%31)	13(%22,4)	6(%10,3)	21(%36,2)	0,172
Var	5(%13,5)	9(%24,3)	9(%24,3)	14(%37,8)	
<b>Odak</b>					
Tek odak	16(%26,2)	13(%21,3)	9(%14,8)	23(%37,7)	0,886
Multiple odak	7(%20,6)	9(%26,5)	6(%17,6)	12(%35,3)	
<b>Tiroid dışı invazyon</b>					
Yok	22(%29,3)	17(%22,7)	13(%17,3)	23(%30,7)	0,013
Var	1(%5)	5(%25)	2(%20)	12(%60)	
<b>Sağkalım</b>					
Yaşiyor	22(%23,4)	22(%23,4)	15(%16)	35(%37,2)	0,170
Ölü	1(%100)	0	0	0	
<b>Metastaz</b>					
Yok	22(%27,2)	20(%24,7)	12(%14,8)	27(%33,3)	0,034
Var	1(%7,1)	2(%14,3)	3(%21,4)	8(%57,1)	
<b>Operasyon sonrası dönem metastaz</b>					
Yok	23(%27,1)	19(%22,4)	15(%17,6)	28(%32,9)	0,039
Var	0	3(%30)	0	7(%70)	



## Tartışma

Anjiogenezis tümör büyümesi ve metastaz açısından kuvvetli bir kolaylaştırıcı faktör oluşturmaktadır. Tümör hücrelerinin lenfatik damar içinde bulunmaları metastaz için çok önemlidir. Lenfanjiogenezis de metastaza katkıda bulunmaktadır. Bilinen lenfanjiogenik büyüme faktörleri Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü-C (VEGF-C) ve Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü-D (VEGF-D)'dir (16). Bir araştırma yazısında vasküler invazyonu olan olgularda, vasküler invazyonu olmayanlara göre ortalama damar sayısı yüksek bulunmuştur (17).

O'Keefe ve ark. ile Chang ve ark. çalışmalarında anjiogenezisi majör stimüle eden protein olan VEGF ile PSMA ekspresyonu arasında uyum tanımlamışlardır (10, 18).

Michael ve ark. 119 mide ve 130 kolorektal kanser hastasına ait dokularda neovasküler PSMA ekspresyonunu incelenmişlerdir. Kolorektal kanserlerde lenf nodu metastazı olan olgularda %80 ve karaciğer metastazı olan olgularda %84,2 oranında PSMA ekspresyonu izlenmişlerdir (19). Bizim çalışmamızda da PSMA ekspresyonu lenfovasküler invazyon ve metastaz açısından değerlendirildiğinde anlamlı olarak fark bulundu. PSMA ekspresyonu arttıkça lenfovasküler invazyon ve metastaz oluşumu artmaktadır. PSMA mevcut antianjiogenik tedavi stratejileri için ek veya başka bir seçenek olabilir.

Çalışmamızda PSMA ekspresyonunun kapsül invazyonu, tiroid dışı invazyon, lenfovasküler invazyon, operasyon anında izlenen lenf nodu metastazı ve benign-malign tiroid dokusunda ekspresyon görülmesi açısından anlamlı sonuçlar elde edilmiştir.

Morganteti ve ark. berrak hücreli renal hücreli karsinomlarda vena cava inferiora tümör trombusu yapan vakalarında neovasküler PSMA ile güçlü ekspresyon görmüşler ve bu ekspresyonda izlenen artışın agresif tümör ile ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır (20). Bizim çalışmamızda da izlenen agresif morfoloji ve invazyonlarda saptanan aşırı ekspresyon bunu desteklemektedir.

Weidner ve ark., bazı neoplazmlarda intratümöral mikrovasküler yoğunluğu ölçmek için spesifik etkili yöntemler önerdi. Manuel olarak damar sayısı ve dereceleri 0 ila 3 gibi vasküler yoğunluk sınıflandırmasını kullanarak ya da panendotel hücre belirteçlerini kullanarak bilgisayarlı görüntü ile bunu gerçekleştirdiler (21). Weidner ve ark. bu çalışmalarında intratümöral mikrovasküler yoğunluğun morfolojik analizi için öz-

nel (nitel) yöntemler ve nesnel (nicel) yöntemleri içeren özel yöntemleri benimsemiştirler (21). Nitel yöntem ile yapılan çalışmada, PSMA ve CD34'ün sadece vasküler ekspresyonunu boyandı veya boynamadı olarak değerlendirdiler. Güçlü (yaygın güçlü) boyama 3, orta (yaygın zayıf veya fokal güçlü) boyama 2, zayıf boyama (damarların %5'inden azında zayıf boyama) 1 ve boyanma yokluğu 0 olarak puanlandırmışlar. Tümörle ilişkili neovaskülaritede PSMA skorunu, 2 veya daha yüksek bir boyama skoru olarak tanımladılar. Nicel yöntemde ise objektif intratümöral vasküler elemanlar 10 büyük büyütme alanında damar hücre sayısı piksel analiz yoluyla sayılarak ve her alandaki toplam vasküler alan ölçülerek yüzde olarak ifade edilmiş idi (21). Çalışmamızda ise bu çalışmaya benzer olarak QuPath piksel analiz programı vasıtasıyla 400x büyütme alanında yoğun vasküler boyanma alanının analizi yapıldı. Manuel yöntem ile doğru orantılı sonuçlar elde edildi ve istatistiksel olarak aralarında pozitif korelasyon saptandı. Kapsül invazyonu, lenfovasküler invazyon ve tiroid dışı invazyon açısından yüksek oranda anlamlılık görüldü.

Heitkötter ve ark. tiroid tümörleri üzerine PSMA ekspresyonunu ve Galyum 68 işaretli Pozitron Emisyon Tomografisi/Bilgisayarlı Tomografi (Ga-PSMA PET/BT) tutulumunu karşılaştırmışlardır. Elde edilen veriler üzerine yaptıkları değerlendirmede tiroid karsinomlarında neovasküler PSMA ekspresyonu özellikle tümörlerde diferansiyasyon kaybı olduğunda ve iyot bazlı radyoterapi hastalığı kontrol etmede etkisiz hale geldiğinde, PSMA hedefli radyoligandların veya anti-kor bazlı antianjiyogenik ajanların potansiyel terapötik kullanımına işaret edebilir şeklinde yorum yapmaktadırlar. Bu elde edilen sonuçlar doğrultusunda, iyi diferansiyasyonlu tiroid karsinomlarında güçlü PSMA ekspresyonu olduğunu ortaya koydular. Bununla birlikte, gelecekteki yapılacak çalışmaların da desteği ile, bu hastalarda olası bir radyoligand tedavisi için iyi diferansiyasyonlu tiroid kanserinde radyoetiketli PSMA ligandlarının düşünülmesi önerildi (22). Çalışmamızda da izlenen non-tümöral tiroid dokusunda ekspresyon görülmesi ve daha solum davranış sergileyen NİFTP vakalarında PSMA ekspresyonunun tümörlere göre daha az saptanması ilerideki radyoligand benzeri tedaviler açısından umut ışığı olmaktadır.

Wernicke ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, 32 glioblastom vakası değerlendirilmiş, bunların tümü endotel hücrelerinin morfolojisinden bağımsız olarak neo-vasküler PSMA ekspresyonunun PSMA'nın potansiyel yeni bir terapötik vasküler hedef olabileceği sonucuna varmışlardır (23). Çalışmamızda prognoz açısından agresif seyir ile ilişki gözlenmesi de bu kanıyı destekler niteliktedir.

Haffner ve ark. da yüksek dereceli oral skuamöz hücreli karsinom vakalarında PSMA ekspresyonunu değerlendirmiş ve kötü prognoz ile ilişkili olduğunu saptamışlardır (24). Bu da bizim çalışmamızda olduğu gibi solid tümörlerde kötü prognoz ile ilişkiyi desteklemektedir.

Schreiber ve ark. mesane ürotelyal karsinomlarında PSMA ekspresyonunu değerlendirmişler ve ürotelyal karsinom alanında non-tümöral mesane dokusuna oranla daha fazla ekspresyon görüldüğünü saptamışlardır. Ayrıca kas invazyonu, tümör evresi, tümör diferansiyasyonu açısından anlamlı sonuçlar elde ettiler (25). Çalışmamızda da tiroid dışı invazyon, kapsül invazyonu açısından anlamlı fark izlendi. Ancak tümör boyutu ve diferansiyasyon açısından anlamlı fark saptanmadı. Bu da çalışmamıza tümör boyutu olarak eklediğimiz parametrenin patolojik T evresi açısından eklenmemesi neden olabilir.

Kasoha ve ark. meme tümörleri üzerine yapmış oldukları PSMA ekspresyon çalışmasında özellikle uzak metastaz olan olgularda PSMA ekspresyonunun daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (26). Çalışmamızda lenf nodu metastazı olan ve 5 yıllık süreçte metastaz görülen olgularda PSMA ekspresyonu açısından anlamlı fark saptandı bu da bahsedilen çalışma ile benzerlik taşımaktadır.

Klein Nulent ve ark. adenoid kistik karsinomlarda PSMA ekspresyonu ve PET ilişkisini araştıran çalışmalarında nüks vakalarda PSMA ekspresyonunun daha fazla olduğu sonucuna varmışlardır (27). Çalışmamızda nüks açısından değil ama tiroid dışı invazyon, lenfovasküler invazyon gibi kötü prognostik kriterler açısından değerlendirme yapılmış olup kötü prognostik parametrelerin yüksek PSMA ekspresyonu ile uyumlu olduğu sonucuna varılmıştır.

Kim ve ark. renal hücreli karsinomda PSMA, Ki-67 ve diğer birçok immünohistokimyasal belirteçler ile yapmış oldukları çalışmada PSMA ekspresyonunun prognoz ile spesifik bir ilişkisinin olmadığını saptadılar (28). Çalışmamızda bu bulguya göre farklılık saptanmasındaki neden neovasküler ekspresyonun değerlendirilmemesidir. Bu nedenle bu açıdan neovasküler PSMA ekspresyonunun incelenmesi prognoz üzerine etkisi ve ilişkisi açısından farklı sonuçlar gösterecektir.

Schmidt ve ark. akciğer tümörlerinde neovasküler PSMA ekspresyonunu değerlendirmişlerdir. Büyük hücreli karsinom ve adenokarsinomlarda spesifik fark izlenmemekle birlikte küçük hücreli karsinom ve skuamöz hücreli karsinomlarda yüksek histolojik derece ile anlamlı fark saptamışlardır. Diğer klinikopatolojik

ve prognostik veriler ile anlamlı fark bildirmemişlerdir (29). Bizim çalışmamızda tümörler arasında histolojik fark üzerine parametremiz olmadığı için yorum yapamadık. Ancak foliküler karsinom-NIFTP, papiller karsinom-NIFTP, medüller karsinom-NIFTP arasında belirgin istatistiksel anlamlılık izlendi. İnvazyon ve metastaz yapmayan diğer tümörlere göre daha iyi prognoza sahip NIFTP vakalarında düşük ekspresyon görülmesi yüksek PSMA ekspresyonlarının kötü prognoz ile ilişkisini destekler niteliktedir.

Van de Wiel ve ark. yapmış olduğu solid tümörlerde PSMA ekspresyonunu değerlendirdikleri araştırmada renal hücreli karsinomlarda PSMA ekspresyonunun lenfovasküler invazyon, metastaz ve ölüm ile ilişkili olduğu ve kötü prognoza işaret ettiği saptamışlardır. Tiroid tümörlerinde ise lenfovasküler invazyon, tümör boyutu ve metastaz ile ilişkisi bildirmişlerdir. Meme karsinomlarında ise yalnızca metastaz ile ilişkisi saptamışlardır. Aynı şekilde kolorektal adenokarsinomlarda karaciğer ve lenf nodu metastazı ile anlamlı ilişki bildirmişlerdir (30). Yine bu bulgular bizim çalışmamıza benzer özelliktedir.

Van de Wiel ve ark. yapmış olduğu solid tümörlerde PSMA ekspresyonunu değerlendirdikleri araştırmada gastrik adenokarsinomlarda TNM evresi, grade ve survey açısından anlamlı fark izlememişlerdir. Pankreatik duktal adenokarsinomlarda ise özellikle TNM evresi KRAS mutasyonu açısından anlamlı fark saptanmamışlardır (30). Bu çalışmalar bizim çalışmamız arasında farklılık mevcuttu. Çalışmamızda tümör boyutu ile PSMA ekspresyonları arasında bu çalışmada olduğu gibi fark izlenmedi. Metastaz açısından bizim çalışmamızda bu çalışmadan farklı olarak PSMA ekspresyonunda anlamlı fark saptandı. Bunun nedeni tümör gelişimlerinde rol oynayan moleküler mekanizmaların farklı olması olabilir.

## Sonuç

Sonuç olarak; tiroid tümörlerinde kapsül invazyonu, tiroid dışı invazyon, lenfovasküler invazyon, metastaz önemli prognostik parametrelerdendir. Çalışmamızda izlenen bu parametrelerde PSMA ile anlamlı ilişki olması olguların seyri açısından bizlere ön fikir verebilir. Ayrıca non-neoplastik tiroid alanlarında ekspresyon görülmeyp neoplastik alanlarda izlenen neovasküler yapılarda görülen boyanma yalnızca benign-malign ayrımı konusunda değil ilerleyen süreçte tedavi açısından da bizlere ışık tutacaktır. Klinik seyri oldukça iyi, 2017 yılında literatüre giren ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından tanı kategorisine alınan NIFTP ile diğer tümörler arasında da ekspresyon farklılığı göstermesi bu açıdan klinik ve patolojik tanı açısından

dan katkı sunmaktadır. Bu konunun immünohistokimyasal ve moleküler ek çalışmalar ile desteklenmesinin ayrıntı tanı ve tedavi açısından önemli etkisi olacağını düşünmekteyiz.

### Çıkar Çatışması Beyanı

Herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

### Etik Kurul Onayı

Bu çalışma için SDÜ Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan onay alınmıştır (Tarih: 03.02.2021, No: 59).

### Bilgilendirilmiş Onam

Araştırma retrospektif olarak yapıldığı için bilgilendirilmiş onam beyanı bulunmamaktadır.

### Finansman

Bu araştırma, kamu, ticari veya kar amacı gütmeyen sektörlerdeki finansman kuruluşlarından herhangi bir finansal destek almamıştır.

### Verilerin Ulaşılabilirliği

Veriler, gizlilik veya diğer kısıtlamalar nedeniyle yalnızca yazarlardan talep edilebilir.

### Yazar Katkıları

MK: Çalışmanın planlanması; Verilerin İşlenmesi; Formal Analizler; Araştırma; Metodoloji; Validasyon; Görselleştirme; Makalenin Yazımı.

İMÇ: Çalışmanın planlanması; Formal Analizler; Finansman Eldesi; Araştırma; Metodoloji; Proje Yönetimi; Kaynakların Sağlanması; Denetim; Validasyon; Makalenin düzenlenmesi.

### Editöryal

Makalenin yazarlarından İMÇ derginin bölüm editörlerinden biri olarak görev almakla birlikte bu makalenin yayım süreçlerinin hiç bir aşamasında görev almamıştır.

### Kaynaklar

1. DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C. Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs. 3rd Edition Volume 8. Lyon: IARC Press; 2004.
2. Rosai J, Ackerman LV. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. 10th Edition, New York: Elsevier; 2011.
3. Vural P. Fizyolojik ve Patolojik Anjiogenezde Vasküler Endotelial Growth Faktörün Rolü. Türk Klinik Biyokimya Derg. 2018;16(1): 53-62
4. Crowther M, Brown NJ, Bishop ET, Lewis CE. Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. J Leukoc Biol. 2001 Oct;70(4):478-90. PMID: 11590184.
5. Rosai J. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology e-book 1st Ed ISBN: 9788131229842 Elsevier; 2011.

6. Kerbel RS. Tumor angiogenesis. N Engl J Med. 2008 May 8;358(19):2039-49. doi: 10.1056/NEJMra0706596. PMID: 18463380; PMCID: PMC4542009.
7. Rinker-Schaeffer CW, Hawkins AL, Su SL, Israeli RS, Griffin CA, Isaacs JT, et al. Localization and physical mapping of the prostate-specific membrane antigen (PSM) gene to human chromosome 11. Genomics. 1995;30(1):105-8.
8. Kawakami M, Nakayama J. Enhanced expression of prostate-specific membrane antigen gene in prostate cancer as revealed by in situ hybridization. Cancer research. 1997;57(12):2321-4.
9. Tsui P, Rubenstein M, Guinan P. Correlation between PSMA and VEGF expression as markers for LNCaP tumor angiogenesis. Journal of biomedicine & biotechnology. 2005;2005(3):287-90.
10. Chang SS, Reuter VE, Heston WD, Bander NH, Grauer LS, Gaudin PB. Five different anti-prostate-specific membrane antigen (PSMA) antibodies confirm PSMA expression in tumor-associated neovasculature. Cancer Res. 1999 Jul 1;59(13):3192-8. PMID: 10397265.
11. Morikawa S, Baluk P, Kaidoh T, Haskell A, Jain RK, McDonald DM. Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. The American journal of pathology. 2002;160(3):985-1000.
12. Silver DA, Pellicer I, Fair WR, Heston WD, Cordon-Cardo C. Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 1997;3(1):81-5.
13. Gong MC, Chang SS, Sadelain M, Bander NH, Heston WD. Prostate-specific membrane antigen (PSMA)-specific monoclonal antibodies in the treatment of prostate and other cancers. Cancer Metastasis Rev. 1999;18(4):483-90. doi: 10.1023/a:1006308826967. PMID: 10855791.
14. Wernicke AG, Varma S, Greenwood EA, Christos PJ, Chao KS, Liu H, et al. Prostate-specific membrane antigen expression in tumor-associated vasculature of breast cancers. APMM : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica. 2014;122(6):482-9.
15. Wernicke AG, Kim S, Liu H, Bander NH, Pirog EC. Prostate-specific Membrane Antigen (PSMA) Expression in the Neovasculature of Gynecologic Malignancies: Implications for PSMA-targeted Therapy. Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM. 2017;25(4):271-6.
16. Achen MG, Stacker SA. Tumor lymphangiogenesis and metastatic spread-new players begin to emerge. Int J Cancer. 2006 Oct 15;119(8):1755-60. doi: 10.1002/ijc.21899. PMID: 16557570.
17. Wong R, Farrell SG, Grossmann M. Thyroid nodules: diagnosis and management. Med J Aust. 2018 Jul 16;209(2):92-98. doi: 10.5694/mja17.01204. PMID: 29996756.
18. O'Keefe DS, Bacich DJ, Huang SS, Heston WDW. A Perspective on the Evolving Story of PSMA Biology, PSMA-Based Imaging, and Endoradiotherapeutic Strategies. J Nucl Med. 2018 Jul;59(7):1007-1013. doi: 10.2967/jnumed.117.203877. Epub 2018 Apr 19. PMID: 29674422; PMCID: PMC6910646.
19. Haffner MC, Kronberger IE, Ross JS, Sheehan CE, Zitt M, Mühlmann G, et al. Prostate-specific membrane antigen expression in the neovasculature of gastric and colorectal cancers. Human pathology. 2009;40(12):1754-61.
20. Morgantetti G, Ng KL, Samarantunga H, Rhee H, Gobe GC, Wood ST. Prostate specific membrane antigen (PSMA) expression in vena cava tumour thrombi of clear cell renal cell carcinoma suggests a role for PSMA-driven tumour neoangiogenesis. Translational andrology and urology. 2019;8(Suppl 2):S147-s55.
21. Weidner N. Chapter 14. Measuring intratumoral microvessel density. Methods Enzymol. 2008;444:305-23. doi: 10.1016/S0076-6879(08)02814-0. PMID: 19007671.
22. Heitkötter B, Steinestel K, Trautmann M, Grünwald I, Barth P,

- Gevensleben H, Bögemann M, Wardelmann E, Hartmann W, Rahbar K, Huss S. Neovascular PSMA expression is a common feature in malignant neoplasms of the thyroid. *Oncotarget*. 2018 Jan 4;9(11):9867-9874. doi: 10.18632/oncotarget.23984. PMID: 29515776; PMCID: PMC5839407.
23. Wernicke AG, Edgar MA, Lavi E, Liu H, Salerno P, Bander NH, et al. Prostate-specific membrane antigen as a potential novel vascular target for treatment of glioblastoma multiforme. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2011;135(11):1486-9.
  24. Haffner MC, Laimer J, Chaux A, Schäfer G, Obrist P, Brunner A, et al. High expression of prostate-specific membrane antigen in the tumor-associated neo-vasculature is associated with worse prognosis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Modern Pathology*. 2012;25(8):1079-85.
  25. Schreiber H, Hänze J, Nimphius W, Verburg FA, Luster M, Hofmann R, et al. Prostate specific membrane antigen (PSMA) in urothelial cell carcinoma (UCC) is associated with tumor grading and staging. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2020;146(2):305-13.
  26. Kasoha M, Unger C, Solomayer E-F, Bohle RM, Zaharia C, Khreich F, et al. Prostate-specific membrane antigen (PSMA) expression in breast cancer and its metastases. *Clinical & Experimental Metastasis*. 2017;34(8):479-90.
  27. Klein Nulent TJW, van Es RJJ, Krijger GC, de Bree R, Willems SM, de Keizer B. Prostate-specific membrane antigen PET imaging and immunohistochemistry in adenoid cystic carcinoma-a preliminary analysis. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2017;44(10):1614-21.
  28. Kim SH, Park WS, Park EY, Park B, Joo J, Joung JY, et al. The prognostic value of BAP1, PBRM1, pS6, PTEN, TGase2, PD-L1, CA9, PSMA, and Ki-67 tissue markers in localized renal cell carcinoma: A retrospective study of tissue microarrays using immunohistochemistry. *PloS one*. 2017;12(6):e0179610.
  29. Schmidt LH, Heitkötter B, Schulze AB, Schliemann C, Steinestel K, Trautmann M, Marra A, Hillejan L, Mohr M, Evers G, Wardelmann E, Rahbar K, Görlich D, Lenz G, Berdel WE, Hartmann W, Wiewrodt R, Huss S. Prostate specific membrane antigen (PSMA) expression in non-small cell lung cancer. *PLoS One*. 2017 Oct 27;12(10):e0186280. doi: 10.1371/journal.pone.0186280. PMID: 29077706; PMCID: PMC5659610.
  30. Van de Wiele C, Sathekge M, de Spiegeleer B, De Jonghe PJ, Debruyne PR, Borms M, et al. PSMA expression on neovasculature of solid tumors. *Histology and histopathology*. 2020;35(9):919-27.

## EXCESSIVE USE OF FLAXSEED MAY POSE A THREAT TO KIDNEY TISSUE: AN EXPERIMENTAL STUDY

KETEN TOHUMUNUN AŞIRI KULLANIMI BÖBREK DOKUSU İÇİN TEHDİT OLUŞTURABİLİR: DENEYSEL BİR ÇALIŞMA

İlkay ARMAĞAN<sup>1</sup>, Şükriye YEŞİLOT<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Süleyman Demirel University, School of Medicine, Department of Histology and Embryology, Isparta, TÜRKİYE

<sup>2</sup> Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Department of Health and Biomedical Sciences, Burdur, TÜRKİYE

<sup>3</sup> Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Bucak School of Health, Department of Nursing, Burdur, TÜRKİYE

**Cite this article as:** Armağan İ, Yeşilot Ş. Excessive Use of Flaxseed may Pose a Threat to Kidney Tissue: an Experimental Study. Med J SDU 2023; 30(1): 89-96.

### Öz

#### Amaç

İyileştirici etkisi nedeniyle yaygın olarak kullanılan keten tohumunun önerilen günlük doz aşıldığında, böbrek dokusu üzerindeki etkilerini araştırmayı amaçladık.

#### Gereç ve Yöntem

Erkek Wistar Albino cinsi ratlar her grupta 8 adet olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Gruplar: kontrol, OD-1 (1,4 mg/kg/gün), OD-2 (2,8 mg/kg/gün) ve OD-3 (5,6 mg/kg/gün) şeklinde isimlendirildi. Her bir doz aşımı olan gruba, 7 gün boyunca oral gavaj yolu ile öğütülmüş keten tohumu verildi. Deney sonunda kan ve böbrek örnekleri alındı. Kan örnekleri santrifüjlenerek böbrek fonksiyon analizleri için serumlarına ayrıldı. Böbrek örneklerinin yarısı -20 °C'de biyokimyasal analizler yapılana kadar saklandı ve kalan dokular histopatolojik analiz için %10 tamponlu formalin ile fikse edildi.

#### Bulgular

Serum üre ve BUN seviyeleri, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, doz aşımı olan tüm gruplarda önemli ölçüde arttı (tümü için  $p < 0.05$ ). TAS seviyeleri, OD-3 grubunda kontrole göre anlamlı olarak azaldı

( $p=0,044$ ). Tüm aşırı doz gruplarında renal TOS düzeylerinde kontrole göre artış vardı ve ayrıca OSI düzeyi, OD-3 grubunda kontrole göre anlamlı düzeyde arttı ( $p=0,016$ ). OD-1 ve OD-2 gruplarında kontrol grubuna göre histopatolojik değişiklikler gözlenmezken, OD-3 grubunda anlamlı olmayan histopatolojik değişiklikler belirlendi.

#### Sonuç

Önerilen günlük dozun üzerinde keten tohumu kullanımının böbrek dokusu için tehdit oluşturabileceği kanısına varıldı. Bu nedenle yararı için kullanılırken, toksik etkilerine maruz kalmamak için aşırı ve uzun süreli kullanımdan uzak durulmalıdır.

**Anahtar Kelimeler:** Böbrek, Doz aşımı, Keten tohumu

#### Abstract

#### Objective

We aimed to investigate the effects of flaxseed, which is widely used due to its healing effects, on the kidney tissue when the daily recommended dose is exceeded.

**Sorumlu yazar ve iletişim adresi /Corresponding author and contact address:** İ.A. / ilkayarmagan@sdu.edu.tr

**Müracaat tarihi/Application Date:** 03.02.2023• **Kabul tarihi/Accepted Date:** 27.02.2023

**ORCID IDs of the authors:** İ.A: 0000-0002-8080-9429; Ş.Y: 0000-0003-3354-8489

## Material and Methods

We divided the male Wistar Albino rats into four groups of eight, namely the control, OD-1 (1.4 mg/kg/d), OD-2 (2.8 mg/kg/d), and OD-3 (5.6 mg/kg/d) groups. Ground flaxseed was administered to each overdose group by oral gavage for 7 days. At the end of the experiment, blood and kidney samples were collected. Blood samples were centrifuged and serum was separated for renal function analyses. The half of the kidney samples were stored at -20 °C until biochemical analyses and we fixed the remaining tissues with 10% buffered formalin for histopathological analysis.

## Results

Serum urea and BUN levels were significantly increased in all overdose groups compared to the control group (for all  $p < 0.05$ ). TAS levels significantly

decreased in the OD-3 group compared to the control ( $p = 0.044$ ). There was an increase renal TOS levels in all overdose groups compared to the control and also, OSI level of the OD-3 group significantly increased compared to the control ( $p = 0.016$ ). While histopathological changes were not observed in OD-1 and OD-2 groups compared to the control group, there were non-significant histopathological changes in OD-3 group.

## Conclusion

It was concluded that the use of flaxseed above the recommended daily dose can pose a threat to kidney tissue. So, while being used for its benefit, in order not to be exposed to its toxic effects, overuse and long-term use should be avoided.

**Keywords:** Flaxseed, Kidney, Overdose

## Introduction

Herbal medicines have been used for therapeutic purposes since ancient times. With the development of the pharmaceutical industry, plant analyses have increased and many herbal medicines have been produced for use in medicine. Some of them are frequently used in modern medicine (such as acetylsalicylic acid, digoxin, and morphine).

Flax is a plant from the Linaceae family and its botanical name is *Linum usitatissimum*. Its seed is also known as flaxseed or linseed. Its spectrum of use in herbal medicine has increased due to a growing body of scientific evidence about it and has suggested that it may be useful in the treatment of some diseases. Flaxseed is a food with high nutritional value due to its content, therefore it is used as a medicinal product (1). Flaxseed contains a high percentage of fat, most of which is composed of alpha-linolenic acid, which is partially converted to docosahexaenoic acid, omega-3 fatty acids, and eicosapentaenoic acid in the body. It also has a variety of bioactive compounds such as fiber, flax protein, lignans, and cyanogenic glycosides (2, 3). The antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory effects of flaxseed have been proven in many studies, and thanks to these effects, many diseases are healed in herbal medicine (1, 2). It has been shown to have healing effects on burn wounds, skin, mucosal irritation, and even bone healing (3–5). It is used for the treatment of gastrointestinal system diseases such as reflux, gastritis, enteritis, ulcer, dyspepsia, and intestinal diverticulosis. Due to the fiber and mucilage

it contains, it is used in constipation so has a laxative effect (2). In addition, it is mentioned that flaxseed has positive effects on diabetes, cardiovascular disease, arthritis, osteoporosis, neurological disorders, cancer, and various chronic diseases (1, 6, 7).

It is generally consumed by people in 4 common forms; whole flaxseed, flaxseed oil, ground flaxseed, and partially defatted flaxseed meal (6). Although it varies according to the indication, it is recommended to use 50 g of flaxseed as an average daily dietary supplement (6, 8–10).

In addition to these positive effects, it is reported by scientific sources that it also contains some toxins. It contains low amounts of cyanogenic glycosides and is nontoxic (8) but can become toxic in long-term use (11). Cyanogenic glycosides can be converted to toxic hydrogen cyanide when the seeds are ground or crushed. Some commercial flaxseeds have been found to contain high levels of cadmium and are not recommended for long-term use. In addition, when flaxseed is not consumed with enough water, it can cause intestinal obstruction.

In light of this information, we predict that the kidney, which is the elimination organ, may be adversely affected as a result of the unawareness consumption of flaxseed who believe that they will get more benefits by consuming more doses. For this reason, we aimed to investigate the effects of flaxseed, which is widely used due to its healing effects, on the kidney tissue when the daily recommended dose is exceeded.

## Material and Method

### Flaxseed Product and Diets

Ground full-fat flaxseed was used in this study. It was mixed with distilled water and then mashed with a micro cutter, so finally, we prepared aqueous flaxseed mucilage. Each animal was fed with flaxseed at the determined dose by oral gavage except the control group for seven days. Three gradual overdoses were chosen based on the recommended daily dose (10).

### Subjects and Experimental Design

A total of thirty-two adult male Wistar rats (250-300g) were housed in cages with ad libitum food and water. Rats were maintained in a controlled temperature ( $22 \pm 2$  °C) environment with a 12 h light/dark cycle and all experiments were conducted during the light cycle. All procedures were arranged in accordance with animal welfare. The study was approved by the Local Ethical Committee for Experimental Animal Ethics of Suleyman Demirel University (Protocol Number: 15.09.2022-06/86) and conformed to the Experimental Animals Research Laboratory and the Animal Research: Reporting In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines and institutional guideline.

Thirty-two rats were divided into four groups randomly, each of 8 animals:

Group 1: Control (C): Rats were not treated with ground flaxseed.

Group 2: Overdose-1 (OD-1): Rats received 1.4 mg/kg/d ground flaxseed by peroral for 7 days.

Group 3: Overdose-2 (OD-2): Rats received 2.8 mg/kg/d ground flaxseed by peroral for 7 days.

Group 4: Overdose-3 (OD-3): Rats received 5.6 mg/kg/d ground flaxseed by peroral for 7 days (12).

### Sample Collection and Tissue Preparation

After the experiment, rats were euthanized under anesthesia with ketamine (90 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) intraperitoneally. Blood samples were taken and kidney tissues were removed. The blood samples were taken into the serum separated tubes and centrifuged at 10.000 rpm for 5 min. to separate serum for renal function marker analysis. The part of kidney tissue was placed in 10% neutral formalin for the histological procedure and the part of the tissue was collected for biochemical analyses. Renal tissues belonging to each group stored at -20°C were weighed separately and diluted 10 times with 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) after bringing them to room

temperature. Homogenization was completed by treatment with the tissue shredder (Janke&Kunkel, Ultraturrax T-25, Germany) and then with the sonicator (UW-2070, Bandeun Electronic, Germany). Tissue samples were centrifuged at 10.000 rpm for 10 min. with a refrigerated centrifuge, and the supernatant was taken and transferred to eppendorf tubes. TAS and TOS parameters were studied by spectrophotometric method using ELISA kits (Rel Assay Diagnostics kit, Mega Tip, Gaziantep/Türkiye) and microplate reader (Biotek® Instruments, USA) in the supernatants obtained.

### Identification of Serum Biochemical Markers

The renal biochemical parameters of urea, uric acid, BUN, and creatinine in serum were measured in a clinical chemistry autoanalyzer (Gesam production Chem 200, Italy) at the MAKU-VET Animal Hospital.

### Identification Of Tissue Total

#### Antioxidant Status (TAS)

It was carried out by applying the spectrophotometric protocol with commercially purchased TAS kits in the renal homogenates acquired from all groups. To indicate the total antioxidant status, the antioxidants present in the specimen induce the reduction of ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) radicals in the kit, causing the navy blue-green color of ABTS to disappear. The total antioxidant capacity is determined by measuring the wavelength of 660 nm in the microplate reader. This assay is set with Vitamin E analog (Trolox), a stable antioxidant solution, and defined as Trolox equivalent (mmol Trolox Equiv/L) (13).

#### Identification of Tissue Total Oxidant Status (TOS)

It was performed by applying spectrophotometric protocol with commercially purchased TOS kits in renal homogenates acquired from all groups. This assay is a colorimetric method evaluated spectrophotometrically at 530 nm. The oxidants in the specimen oxidize the iron ion complex. The ferric ion creates a chromogenic compound complex in an acidic medium. The density of the color is commensurate to the quantity of oxidant in the sample. The assay is adjusted with hydrogen peroxide and results are indicated as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> equivalent (µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Equiv/L) (14).

#### Identification of Tissue Oxidative Stress Index (OSI)

OSI, which is a marker of the rate of the oxidative stress, was calculated according to the following formula: OSI (arbitrary unit) = [TOS (µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> equiv/l) /TAS (mmol Trolox equiv/l) x 100] (15).

### Histopathological Procedure

At the end of the experiment, rats were weighed and sacrificed and their right kidney was removed. Kidneys were placed in 10% neutral buffered formalin at room temperature. Later, they were processed with alcohol, blocked with paraffin, and sectioned. Slides, formalin-fixed, paraffin-embedded, stained with H&E technique. On slices with 3-4  $\mu\text{m}$  thickness, the histopathological changes assessment of kidney tissue was performed using light microscopy. Cortex and medulla were evaluated at x200 or x400 magnifications separately in ten different areas of each slide and used a modified semi-quantitative scale for evaluation; [(0): no damage, (1): mild damage, (2): moderate damage, (3): severe damage] (16). Finally, the analyses were carried out on images taken using NIKON digital camera ((ECLIPSE Ni-U, Nikon, Tokyo, Japan).) and the scale bar was added to the images

### Statistical Analyses

The statistical analyses were made by using a

Windows® compatible SPSS® 20.0 program.

Biochemical parameters and histopathological scores were compared between the groups with One-way ANOVA (post hoc Tukey) tests. Variables are shown as mean  $\pm$  standard deviations.  $P < 0.05$  was set as the significance value.

## Results

### Biochemical Findings

Serum urea and BUN levels were significantly increased in all overdose groups compared to the control group (for all  $p=0.018$ ,  $p=0.033$ , and  $p=0.000$ , respectively). There was no significant change in creatinine levels compared to the control. The uric acid level increased in the OD-2 group compared to the control, but this increase was not statistically significant (Table 1). A statistically significant decrease in renal TAS levels was observed in the OD-3 group compared to the control ( $p=0.044$ ). Although there was an increase in

**Table 1** Effect of flaxseed on serum levels of renal function markers

	Urea (mg/dL)	Uric Acid (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Creatinin (mg/dL)
Control	52.0 $\pm$ 6.52	1.37 $\pm$ 0.69	24.29 $\pm$ 3.04	0.71 $\pm$ 0.10
OD-1	61.00 $\pm$ 4.72*	1.31 $\pm$ 0.40	28.50 $\pm$ 2.20*	0.71 $\pm$ 0.03
OD-2	60.25 $\pm$ 7.04*	1.85 $\pm$ 0.98	28.15 $\pm$ 3.29*	0.71 $\pm$ 0.07
OD-3	66.87 $\pm$ 3.64*	1.37 $\pm$ 1.03	31.25 $\pm$ 1.70*	0.72 $\pm$ 0.13

Values are expressed in mean  $\pm$  SD.  $n = 8$  per group. One way ANOVA (post hoc Tukey test) was used for comparison between groups. \* $p < 0.05$  was considered statistically significant when compared to the control group. BUN: Blood urea nitrogen; OD-1: Overdose-1; OD-2: Overdose-2; OD-3: Overdose-3.

**Table 2** Effect of flaxseed on total antioxidant/oxidant status in renal tissues

	TOS ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ eq/L)	TAS (mmol Trolox eq/L)	OSI (AU)
Control	4.90 $\pm$ 0.97	1.28 $\pm$ 0.20	0.38 $\pm$ 0.07
OD-1	5.50 $\pm$ 1.42	1.31 $\pm$ 0.22	0.42 $\pm$ 0.12
OD-2	5.08 $\pm$ 1.62	1.12 $\pm$ 0.19	0.46 $\pm$ 0.17
OD-3	6.49 $\pm$ 2.23	0.94 $\pm$ 0.33*	0.79 $\pm$ 0.45**

Values are expressed in mean  $\pm$  SD.  $n = 8$  per group. One way ANOVA (post hoc Tukey test) was used for comparison between groups.  $p < 0.05$  was considered statistically significant when compared to the control group. \*:  $p=0.044$ ; \*\*:  $p=0.016$ ; TAS: Total antioxidant status; TOS: Total oxidant status; OSI: oxidative stress index; OD-1: Overdose-1; OD-2: Overdose-2; OD-3: Overdose-3.

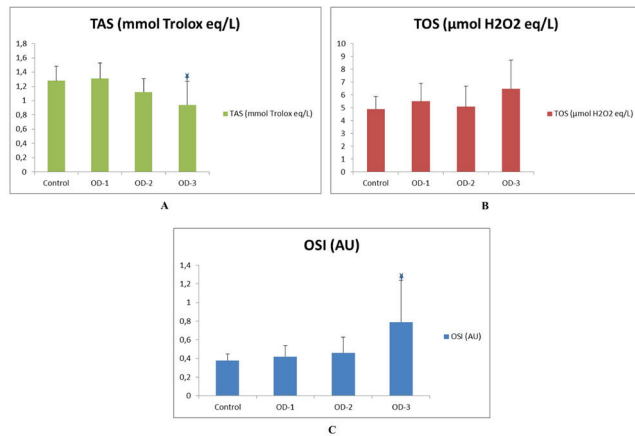


renal TOS levels all overdose treatment compared to the control but not statistically significant. According to the calculations, the OSI level of the OD-3 group showed a statistically significant increase compared to the control ( $p=0.016$ ) (Table 2, Figure 1).

### Histopathological Findings

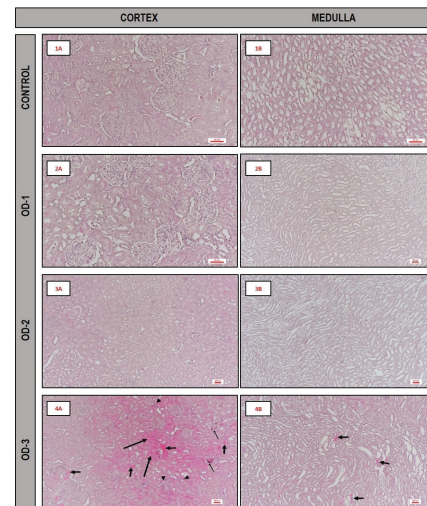
The control group showed normal tissue architecture based on the kidney tissues' histopathological evaluation. Both OD-1 and OD-2 groups showed normal structuring and no noticeable pathological changes were observed. But mild/moderate histopathological changes were observed in the OD-3 group. When the Malpighi corpuscle was evaluated, glomerular

degeneration and Bowman's capsule dilatation were observed in some of them. In addition, mild/moderate capillary hemorrhage and vasocongestion were observed in some intertubular areas. The eosinophilic changes, a marker of degeneration, were observed in some tubular epithelium (Fig. 2). Minimal mononuclear cell infiltration was observed in some areas. The histopathological scores were shown in Table 3.



**Figure 1:** Comparison of TAS, TOS, and OSI levels of kidney tissues in experimental groups.

A: Total Antioxidant Status (TAS) values; B: Total Oxidant Status (TOS) values; C: Oxidative Stress Index (OSI) values; \*comparison with the control group ( $p<0.05$ ).



**Figure 2:** Representative histopathological changes of kidney tissue between the groups.

(1A, 1B) Control rats, normal tissue architecture. (2A, 2B) Rats treated with 1.4 mg/kg/d, showing the cortex and medulla. Normal tissue architecture, no obvious pathological changes. (3A, 3B) Rats treated with 2.8 mg/kg/d, had normal tissue architecture, and no obvious pathological changes. (4A, 4B) Rats treated with 5.6 mg/kg/d, showing mild/moderate glomerular degeneration with a thick arrow, eosinophilic tubular epithelium with a long thin arrow, and intertubular hemorrhage/congestion with a short thin arrow. Mononuclear cell infiltration with an arrowhead. H-E, scale bars = 50 µm

**Table 3**

Effect of flaxseed on total antioxidant/oxidant status in renal tissues

	Control	OD-1	OD-2	OD-3
<b>Glomerular degeneration</b>	0.13 ± 0.35	0.25 ± 0.46	0.25 ± 0.46	0.38 ± 0.51
<b>Tubular degeneration</b>	0.25 ± 0.46	0.25 ± 0.46	0.13 ± 0.35	0.50 ± 0.53
<b>Hemorrhage/congestion</b>	0.13 ± 0.35	0.13 ± 0.35	0.25 ± 0.46	0.38 ± 0.51
<b>Mononuclear cell infiltration</b>	0.13 ± 0.35	0.13 ± 0.35	0.13 ± 0.35	0.25 ± 0.46

Values are expressed in mean ± SD. n = 8 per group. One way ANOVA (post hoc Tukey test) was used for comparison between groups.  $P < 0.05$  was set as the significance value. No significant difference between the groups. OD-1: Overdose-1; OD-2: Overdose-2; OD-3: Overdose-3.

## Discussion

Flaxseed has been used and is still being used in the health field, as its many healing effects have been discovered. Although it varies according to the purpose of use, 50 g/day of flaxseed is stated to be a safe dose by many sources (6, 8–10). Until now, many studies have been conducted on the curative effects and indications for use of flaxseed, and the toxic content of flaxseed has also been mentioned in the literature, however, the modeled-overdose experimental studies are limited.

Therefore, we aimed to see the biochemical and pathological changes on the tissue if the recommended daily dose is exceeded by using flaxseed overdose models in our experiment. We conducted this study using three different overdose experimental models. At the end of the experiment, the overdose groups were compared between each other and also to the control group in terms of oxidative stress and histopathological changes.

Oomah and Mazza reported in their study that long-term use of flaxseed would lead to some toxic effects (17). Histopathologically, there was no difference between OD-1 and OD-2 groups compared to the control group. It does not mean that long-term consumption of these doses is safe since the current experiment has an acute process. Pathological changes were observed in the OD-3 group, although not significant compared to the control group. According to these results, the OD-3 level signals danger for the kidney tissue and seems to be out of the safe range. Many studies mention many compounds in flaxseed that have a damaging effect on the human and animal body. Wiesenfeld et al. reported that the high amount of unsaturated fatty acids in its content oxidizes *in vivo* and causes the formation of free fatty acids. Therefore, long-term use of flaxseed will reduce antioxidant compounds while increasing oxidative stress (18). In the present study, especially in the OD-3 group, the increase in BUN and urea (for all  $p=0.018$ ,  $p=0.033$ , and  $p=0.000$ , respectively), and the increase in TOS and OSI ( $p=0.016$ ) in the tissue support the findings. While some literature mentions the antioxidant activity of flaxseed (19), paradoxically others mention that flaxseed triggers the formation of oxidative stress (18). Some studies have mentioned that oxidative stress results in kidney tissue damage (20, 21). In our study, it was seen that excess flaxseed disrupted the oxidative balance and tissue damage could be explained by this. When the literature is examined, it is revealed that the efficacy is dose-dependent or related to long-term exposure. Since kidney tissue is a tissue with a high blood supply,

it will be easily affected by oxidative stress, which has systemic activity. The presence of pathological changes in the kidney tissue of the OD-3 group and the shift of the balance in the oxidative system in favor of TOS indicate that the kidney tissue is affected.

In addition, linatine, a compound in flaxseed, is a pyridoxine antagonist. Pyridoxine deficiency is associated with homocysteinemia and leads to renal failure (22). This clinical condition develops as a result of long-term use. Although it was used for a short time in the current experiment, it may generate the pathological basis of future kidney failure due to the high dose. Elmowafy A., showed an increase in plasma levels of uric acid, urea, and creatinine in rats treated with 10% flaxseed diet compared to the control (23). Ahmed S. M. et al. found that uric acid, urea, and creatinine levels increased in the flaxseed oil treatment compared to the control group (24).

Another study has mentioned that cyanogenic glycosides (linamarin, linustatin, neolinustatin) in flaxseed are toxic if consumed without cooking (10). As a result of chewing and digesting flaxseed, hydrogen cyanide, a strong toxic compound, is produced (25). Consumption of flaxseed by grinding is one of the traditional methods and in the current experiment, rats were fed using this method. And the resulting oxidative stress is triggered probably by the toxic products, so the resulting reactive oxygen species (ROS) may damage tissue and cause pathological changes. As a matter of fact, oxidative stress-related kidney tissue damage studies have been reported in the literature until now (26–28). A study reported that if flaxseed consumption increases, urinary excretion of thiocyanate, a metabolite of cyanogenic glycosides, also increases (8). In other words, high-dose use or long-term use of flaxseed is a burden on the kidney. This means that the acute period of high-dose flaxseed consumption may adversely affect kidney functions.

Like many plants, flaxseed has a load of cadmium, a toxic heavy metal absorbed from the soil. Cadmium has a long half-life in the human body, thus high-dose exposure or long-term exposure causes accumulation in tissues. One of the organs primarily affected by cadmium toxicity is the kidneys, manifested by decreased glomerular function (29). Although pathological findings were observed in the highest dose group of the current study, it suggests that it may be a sign of toxicity, but further determination analyses are still required to confirm this toxicity.

Although no toxicity has ever been reported in clinical studies of adding flaxseed to the diet, it has

been reported that flaxseed contains potentially toxic compounds such as cyanogenic glycosides, linatine, and cadmium. In conclusion, it is important to recognize that conclusive scientific data is needed to support the concept of toxicity from any of these compounds. However, although there is no short-term striking effect of using flaxseed above the recommended daily dose, it is recommended to avoid at least long-term use to avoid its toxic effects.

### Acknowledgment

We would like to thank the support of the staff of the Experimental Animals and Medical Research Application and Research Center of Suleyman Demirel University.

### Conflict of Interest Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

### Ethical Approval

This study was approved by the Local Ethical Committee on Animal Research of Suleyman Demirel University, Isparta and was performed according to ethical rules (Protocol number: 15.09.2022-06/86).

### Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### Availability of Data and Materials

The datasets analyzed in this study are available through the corresponding author upon acceptable request.

### Author Contributions

İ.A: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Investigation; Methodology; Validation, Visualization; Writing-original draft.

Ş.Y.: Data curation; Formal analysis; Investigation; Methodology; Visualization; Validation; Writing-review & editing.

### References

- Goyal A, Sharma V, Upadhyay N, Gill S, Sihag M. Flax and flaxseed oil: an ancient medicine & modern functional food. *J Food Sci Technol*. 2014;51(9):1633–53.
- Vaughn CJ. Drugs and Lactation Database: LactMed. *J Electron Resour Med Libr*. 2012;9(4):272–7.
- Tolkachev ON, Zhuchenko J. Biologically active substances of flax: Medicinal and nutritional properties: (A review). *Pharm Chem J*. 2004;34(7):360–7.
- Hosseinian F, Beta T. Patented Techniques for the Extraction and Isolation of Secoisolariciresinol Diglucoside from Flaxseed. *Recent Patents Food, Nutr Agric*. 2009;1(1):25–31.
5. Zhang Z, Zhang Y, Wu Y, Xu Y, Jiang Y, Zhang Y, et al. Ultrasonic-Assisted Aqueous Two-Phase Extraction Combined with Macroporous Resin Enrichment of Lignans from Flaxseed Meal and Their Antioxidant Activities. *J AOAC Int*. 2022;105(4):1183–92.
- Parikh M, Neticadan T, Pierce GN. Flaxseed: its bioactive components and their cardiovascular benefits. *Am J Physiol Circ Physiol*. 2018;314(2):H146–59.
- Rodriguez-Leyva D, Dupasquier CMC, McCullough R, Pierce GN. The cardiovascular effects of flaxseed and its omega-3 fatty acid, alpha-linolenic acid. *Can J Cardiol*. 2010;26(9):489–96.
- Cunnane SC, Ganguli S, Menard C, Liede AC, Hamadeh MJ, Chen Z-Y, et al. High  $\alpha$ -linolenic acid flaxseed (*Linum usitatissimum*): some nutritional properties in humans. *Br J Nutr*. 1993;69(2):443–53.
- Martinchik AN, Baturin AK, Zubtsov V V, Molofeev VI. Nutritional value and functional properties of flaxseed. *Vopr Pitan*. 2012;81(3):4–10.
- Bloedon LT, Szapary PO. Flaxseed and Cardiovascular Risk. *Nutr Rev*. 2004;62(1):18–27.
- Banea-Mayambu JP, Tylleskär T, Gitebo N, Matadi N, Gebre-Medhin M, Rosling H. Geographical and seasonal association between linamarin and cyanide exposure from cassava and the upper motor neurone disease konzo in former Zaire. *Trop Med Int Health*. 1997;2(12):1143–51.
- Özgöçmen M, Yeşilot Ş. Does Excessive Consumption of Flaxseed Cause a Liver Damage in Rat Models? *SDÜ Tıp Fakültesi Derg*. 2021;28(2):333–41.
- Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem*. 2004;37(4):277–85.
- Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*. 2005;38(12):1103–11.
- Altındag O, Erel O, Soran N, Celik H, Selek S. Total oxidative/anti-oxidative status and relation to bone mineral density in osteoporosis. *Rheumatol Int*. 2008;28(4):317–21.
- Ozer MK, Bilgic S, Armagan I, Savran M. Thymoquinone protection from amikacin induced renal injury in rats. *Biotech Histochem*. 2020;95(2):129–36.
- Oomah BD, Mazza G. Flaxseed Products For Disease Prevention. In: *Functional Foods, Biochemical and Processing Aspects*. Lancaster: Technomic Publishing Company; 1998. P:91–127.
- Wiesenfeld P, Babu U, Collins TF, Sprando R, O'Donnell M, Flynn T, et al. Flaxseed increased  $\alpha$ -linolenic and eicosapentaenoic acid and decreased arachidonic acid in serum and tissues of rat dams and offspring. *Food Chem Toxicol*. 2003;41(6):841–55.
- Adolphe JL, Whiting SJ, Juurlink BHJ, Thorpe LU, Alcorn J. Health effects with consumption of the flax lignan secoisolariciresinol diglucoside. *Br J Nutr*. 2010;103(7):929–38.
- Bilgiç S, Gür FM, Aktaş İ. Biochemical and Histopathological Investigation of the Protective Effect of Lutein in Rat Kidney Exposed to Cisplatin. *Med Rec*. 2022;4(3):433–8.
- Bilgiç S, Korkmaz D, Azirak S, Güvenc A, Kocaman N, Ozer M. Olanzapine-induced renal damage and metabolic side effects: the protective effect of thymoquinone. *J Turgut Ozal Med Cent*. 2018;25(1):70–5.
- Klosterman H. J., Lamoureux G. L. P.J.L. Isolation, characterization, and synthesis of linatine. A vitamin B6 antagonist from flaxseed (*Linum usitatissimum*). *Biochemistry*. 1967;6(1):170–7.
- Elmowafy AAAE. Study the potential effect of fenugreek and flaxseed seeds on acute renal failure in rats. *J Res Fields Specif Educ*. 2022;8(42):863–98.
- Ahmed SM, Abo El-Naga NI, Hussein MM, Bedir AM. Biological Study to Evaluate the Effect of Intake Flaxseed Oil on Kidney Failure Rats. *Alexandria Sci Exch J*. 2022;43(3):9–19.
- Bolarinwa IF, Oke MO, Olaniyani SA, Ajala AS. A Review of Cyanogenic Glycosides in Edible Plants. In: *Toxicology - New*

- Aspects to This Scientific Conundrum. InTech; 2016. P:179–92.
26. Bilgiç S, Armağan I. Effects of misoprostol treatment on doxorubicin induced renal injury in rats. *Biotech Histochem.* 2020;95(2):113–20.
  27. Bilgiç S, Korkmaz DT, Azirak S, Güvenç AN, Kocaman N, Özer MK. Risperidone-Induced Renal Damage and Metabolic Side Effects: The Protective Effect of Resveratrol. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:1–10.
  28. Azirak S, Taştemi Korkmaz D, Bilgiç S, Özgöçmen M, Özer MK. Thymoquinone Prevents Valproic Acid-Induced Nephrotoxicity in Rat Kidney. *Eurasian J Biol Chem Sci.* 2022;5(2):77–84.
  29. Satarug S, Garrett SH, Sens MA, Sens DA. Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. *Environ Health Perspect.* 2010;118(2):182–90.



## EFFECTS OF PREOPERATIVE FINDINGS ON POSTOPERATIVE RESULTS IN PATIENTS UNDERGOING SURGERY FOR PRIMARY HYPERPARATHYROIDISM

PRİMER HİPERPARATİROİDİ CERRAHİSİ GEÇİREN HASTALARDA PREOPERATİF VE PEROPERATİF PARAMETRELERİN KARŞILAŞTIRILMASI, PREOPERATİF PARAMETRELERİN POSTOPERATİF SEYRİ ÜZERİNE ETKİSİ

İsmail HASIRCI<sup>1</sup>, Çetin KOTAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Health Sciences University, Konya City Hospital, Department of General Surgery, Konya, TÜRKİYE

<sup>2</sup> Yuzuncu Yıl University, Faculty of Medicine, Department of General Surgery, Van, TÜRKİYE

**Cite this article as:** Hasırcı İ, Kotan Ç. Effects of Preoperative Findings on Postoperative Results in Patients Undergoing Surgery for Primary Hyperparathyroidism. Med J SDU 2023; 30(1): 97-105.

### Öz

#### Amaç

Çalışmamızda, primer hiperparatiroidi (p-HPT) nedeni ile opere edilen hastalarda görüntüleme yöntemlerinin başarısı ve preoperatif bulguların postoperatif sonuçlara etkisi araştırıldı.

#### Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada Ocak 2008 ile Aralık 2010 tarihleri arasında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi kliniği tarafından p-HPT nedeni ile opere edilen 50 ardışık olgunun verileri prospektif olarak incelendi. Çalışma süresi boyunca hastaların demografik verileri, klinik bulguları, ameliyat öncesi ve sonrası laboratuvar sonuçları, ameliyat öncesi dönemde lokalizasyon amacıyla yapılan ultrasonografi (USG), sintigrafi ve bilgisayarlı tomografi (BT) bulguları, ameliyat ve patoloji raporları incelendi ve kaydedildi. Elde edilen veriler istatistiksel olarak analiz edildi.

#### Bulgular

Kas iskelet sistemi ağrılarının en sık (%80) hastaneye başvuru nedeni olduğu görüldü. Opere edilen hastalarda ameliyat sonrası serum parathormon (PTH) ve

kalsiyum seviyelerinin ameliyat öncesi döneme göre anlamlı oranda düştüğü tespit edildi ( $p<0.05$ ). İki taraflı boyun diseksiyonu yapılan hastaların oranı %30 idi. Bezlerin histopatolojik incelemesinde hastaların % 88'inde adenom tespit edilirken paratiroid hiperplazisi olarak rapor edilenlerin oranı ise % 12 idi. Ayrıca hastaların % 4'ünde patolojik bezler ektopik yerleşimli (retroözofagial, ön mediasten) iken, % 4 hastada ise çift adenom mevcut idi. USG'nin patolojik bezleri tespit etmedeki sensitivitesi %72 olarak hesaplandı. Bununla birlikte USG'nin ektopik yerleşimli (%4) ve çift adenom (%4) olan lezyonların tamamında doğru lokalizasyon yapamadığı görüldü. Eş zamanlı tiroidektomi yapılan hastalarda, ameliyat sonrası kalsiyum değerleri tiroidektomi yapılmayanlara benzerken 2. gün PTH değeri daha düşük bulunmuştur.

#### Sonuç

Ultrasonografi yüksek tanısal değere sahip olmakla birlikte atipik yerleşimli, multipl lezyonlarda yanlış lokalizasyona sebep olabilmektedir. Cerrahi eksplorasyon arttıkça postop hipokalsemi riski artmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Endokrin cerrahi, Paratiroid adenomu, Hiperparatiroidi.

Sorumlu yazar ve iletişim adresi /Corresponding author and contact address: İ.H. / drihasirci@hotmail.com

Müracaat tarihi/Application Date: 05.01.2023• Kabul tarihi/Accepted Date: 23.02.2023

ORCID IDs of the authors: İ.H: 0000-0001-8400-3361; Ç.K: 0000-0002-6336-4747

## Abstract

### Objective

To investigate the success of imaging methods and the effect of preoperative findings on postoperative results in patients who underwent surgery for primary hyperparathyroidism (p-HPT).

### Material and Method

In this study, the data of 50 consecutive patients who underwent p-HPT surgery at the General Surgery Clinic of Yuzuncu Yil University Faculty of Medicine between January 2008 and December 2010 were prospectively analyzed. During the study period, the patients' demographic data, clinical findings, preoperative and postoperative laboratory results, findings of ultrasonography, scintigraphy, and computed tomography performed for localization in the preoperative period, and surgery and pathology reports were evaluated and recorded. The obtained data were statistically analyzed.

### Results

Musculoskeletal pain was the most common (80%) reason for the patients' presentation to the hospital. In the operated patients, the serum parathormone and calcium levels significantly decreased compared to the preoperative period ( $p < 0.05$ ). The rate of

patients who underwent bilateral neck dissection was 30%. In the histopathological examination of the glands, adenoma lesions were detected in 88% of the patients, and the rate of those with a pathology result of parathyroid hyperplasia was 12%. In addition, 4% of the patients had ectopic pathological glands (retroesophageal, anterior mediastinum), and 4% had double adenomas. The sensitivity of ultrasonography in detecting pathological glands was calculated as 72%. However, ultrasonography did not accurately localize all ectopic (4%) and double adenoma (4%) lesions. The postoperative calcium values were similar between the patients that underwent simultaneous thyroidectomy and those that did not undergo this operation, but the parathormone values measured on the second postoperative day were significantly lower in the former.

### Conclusion

Although ultrasonography has a high diagnostic value, it can cause mislocalization in the presence of multiple lesions with atypical localization. The risk of postoperative hypocalcemia increases as surgical exploration increases.

**Keywords:** Endocrine surgery, Parathyroid adenoma, Hyperparathyroidism.

## Introduction

Primary hyperparathyroidism (p-HPT) is a common endocrine disease that occurs as a result of the excessive and uncontrolled secretion of parathyroid hormone (PTH) from one or more glands. The main effects of PTH are calcium mobilization from bones and renal calcium reabsorption. The resulting hypercalcemia is the main biochemical manifestation of the disease. p-HPT can be seen throughout life but peaks in middle age. It is two to three times more common in women (1). The imaging of the parathyroid glands aims to determine the location of the glands before a surgical intervention rather than diagnosis. As localization methods, in addition to non-invasive options, such as ultrasonography (USG), computed tomography (CT), magnetic resonance imaging (MRI), and sestamibi scintigraphy, there are invasive methods, including selective venous catheterization and angiography (2). In patients with recurrent HPT or a history of neck surgery, the necessity of a preoperative localization examination is indisputably accepted (3–5). In localization studies of parathyroid pathologies,

the most commonly used imaging methods are USG and sestamibi scintigraphy. The sensitivity of the combined use of these two techniques has been reported to be between 70-90% (6-8).

This study aimed to investigate the success of imaging methods and the effect of preoperative findings on postoperative results in patients who underwent surgery for p-HPT.

### Material and Method

This clinical study was prospectively conducted by examining 50 consecutive patients who underwent surgery with the diagnosis of p-HPT at the General Surgery Clinic of Yuzuncu Yil University Faculty of Medicine (YYUTF) between January 2008 and December 2010. The patients' demographic data, complaints, preoperative and postoperative laboratory findings, findings obtained from imaging examinations (USG, scintigraphy, and CT) performed to determine localization in the preoperative period, surgical findings, and histopathological examination results of

samples were recorded, and the obtained data were statistically analyzed.

The study was commenced after receiving approval from the ethics committee of YYUTF, dated 10.09.2008 and numbered 2008/08. Written informed consent was obtained from all participants. This study complies with universal ethical standards and the 1964 Declaration of Helsinki and its subsequent amendment. All the cases included in the study were patients who were evaluated by both the general surgery and endocrinology clinics and scheduled for surgery after the diagnosis of p-HPT was made. Patients diagnosed with secondary and tertiary HPT were excluded from the study. The diagnosis of p-HPT was diagnosed based on high serum calcium and parathormone levels, a low phosphate level, a high calcium level in spot urine, and normal kidney functions (9). Preoperative serum 25-OH vitamin D, thyroid-stimulating hormone (TSH), free T3 (fT3), free T4 (fT4), alkaline phosphatase (ALP), albumin, creatinine, creatinine in spot urine, calcium (Ca), and creatinine in 24-hour urine were also measured. The same endocrinology faculty member performed parathyroid adenoma localization in all the patients using preoperative USG. PTH values were determined in the serum samples obtained at the 30th minute after surgery (early PTH level), and in addition to PTH, calcium and phosphorus values were also measured in the serum samples taken on the postoperative first, second, and third days. The parathyroid gland was surgically removed, histopathologically examined in the pathology laboratory, and its weight and size were recorded.

Sestamibi scintigraphy was performed in 13 cases with indications. In addition, CT or MRI was performed in patients whose lesions could not be visualized with scintigraphy. The same surgical team with sufficient experience in thyroid and parathyroid surgery performed surgery in all the cases. The side of the lesion was explored in patients detected to have a single lesion on radiological images, and bilateral neck exploration in those with bilateral lesions or without any lesion detected by radiological imaging methods. In cases where p-HPT was accompanied by a thyroid nodule, lobectomy or bilateral total thyroidectomy was also performed.

### Statistical Analysis

SPSS v. 17.0 software package was used for statistical analysis of the data. Categorical measurements (gender, complaint, comorbidity, surgical findings, and type of surgery) were obtained as numbers and percentages, and continuous measurements

(calcium, phosphorous, urine calcium, PTH, alkaline phosphatase, and creatinine) as mean (and minimum-maximum where necessary). The independent-samples t-test was used to compare continuous measurements between the patient with and without hypocalcemia. The paired-samples t-test was conducted to compare time-varying dependent measurements, i.e., comparison of the values before and after surgery. The statistical significance level was taken as 0.05 in all the tests.

## Results

### Preoperative Characteristics

The preoperative characteristics of the patients are summarized in Table 1. Of the 50 patients included in the study, 84% were women. The mean  $\pm$  standard deviation (SD) (minimum-maximum) value of age was  $51.2 \pm 11.23$  (20-77) years. Ten patients were asymptomatic and diagnosed using the results of biochemical analysis. Among the common patient complaints at the time of presentation to the hospital were musculoskeletal pain (80%), gastrointestinal system complaints (burning sensation in stomach, etc.) (56%), and bone fractures (8%). Common comorbidities were thyroid nodules (56%), hypertension (24%), and nephrolithiasis (24%). Of the 25 cases in which bone mineral density was measured due to various indications, 11 had osteoporosis and 13 had osteopenia, and one had normal bone mineral density. In addition, two patients had a family member with multiple endocrine neoplasia (type 1 in one and type 2A in the other).

### Preoperative Laboratory Values

The preoperative mean  $\pm$  SD serum parathormone ( $488.94 \pm 582.84$  pg/ml), calcium ( $11.605 \pm 1.56$  mg/dL), and spot urine calcium ( $26.620 \pm 18.06$  mg/dL) levels were above the reference values. However, the mean  $\pm$  SD serum phosphorus level was below the reference range ( $2.5072 \pm 0.77$  mg/dL). The urea and creatinine levels were normal in all the patients (Table 1).

### Surgical Findings

Unilateral exploration was performed in 70% of the patients with a single adenoma detected by imaging methods. In 40% of these patients, lobectomy was added to treatment due to the presence of a thyroid nodule.

In 12% (n = 6) of the patients, the pathological parathyroid gland could not be removed at the first operation (persistent HPT). Unilateral exploration was performed in four of these patients. In the second operation

**Table 1** Preoperative laboratory values of the patients

	n	Minimum	Maximum	Mean	SD
Age, years	50	20	77	51.22	11.235
Vitamin D (ref: 20-120 mg/L)	29	2.7	160.0	24.659	33.2288
Daily urine Ca (ref: 0-250 mg/dL)	45	77.0	450.0	218.49	8.7227
Daily urine Cr (ref: 11-20 mg/dL)	46	7.6	182.3	54.728	34.0673
Daily urine volume	46	460	2,200	1,146.09	408.142
Spot urine Ca (ref: 6.6-21.3 mg/dL)	48	2.5	94.5	26.620	18.0685
Spot urine Cr (ref: 0.7-1.5 mg/dL)	47	24.4	948.0	98.878	133.0383
Serum Cr (ref: 0.8-1.2 mg/dL)	50	0.3	1.2	0.671	0.2277
PTH (ref: 15-65 pg/ml )	50	94	2,900	488.94	582.844
Serum Ca (ref: 8.4-9.7 mg/dL)	50	10.0	19.2	11.605	1.5608
Serum P (ref: 2.7-4.5mg/dL)	47	1.00	5.10	2.5072	0.77236
ALP (ref: 5-270U/L )	50	106	3,068	507.90	583.083
Albumin (ref: 3.5-5.2 g/L)	50	3	5	4.36	0.412
24-hour urine Ca/Cr (0.09-0.16)	45	0.11	2.05	0.4927	0.31692
TSH (ref: 0.35-4.94 microU/l)	49	0.0	35.0	1.921	4.9696
ft3 (ref: 1.71-3.71pg/mL)	46	1.5	6.3	2.978	0.8069
ft4(ref: 0.7-1.8 ng/dL)	49	0.7	1.9	1.100	0.2691
Spot urine Ca/Kr (ref: 0.09-0.16)	47	0.03	2.06	0.3713	0.30914

ALP: Alkaline Phosphatase, Ca: Calcium, Cr: Creatinine, ft3: Free Tri-Iodothyronine (T3), ft4: Free Thyroxine (T4), P: Phosphorus, PTH: Parathyroid Hormone, SD: Standard Deviation, TSH: Thyroid-Stimulating Hormone

undertaken in these patients, adenoma lesions were found during bilateral exploration performed on average 4.6 days after the first operation.

In two patients who developed persistent HPT despite bilateral exploration, ectopic adenomas were removed during the reexploration procedure performed at 15 months and three months after the first operation, respectively.

Simultaneous with parathyroidectomy, bilateral total thyroidectomy (28%) was performed in 14 patients with thyroid nodules, thyroid lobectomy in the same number of patients [n = 9 (18%) on the right, n = 5 (10%) on the left], and total thyroidectomy on one side and subtotal thyroidectomy on the other side in one (2%) patient (Table 2).

#### Imaging and Localization Findings

In addition to neck USG performed in all the patients, sestamibi scintigraphy was undertaken in 13 cases, and localization examinations with CT and MRI in one

patient. USG successfully detected the localization of pathological glands in 78% of the patients, this rate was 53.8% in scintigraphy.

#### Comparison of Preoperative Imaging and Surgical Findings

There was no relationship between the accuracy of localization with USG and adenoma size. The effect of USG on the diagnostic accuracy of pathological parathyroid gland localization was statistically significant ( $p < 0.05$ ). It was determined that diagnostic accuracy was statistically significant in pathological parathyroid glands with a lower localization than those with an upper localization ( $p < 0.001$ ). Pathological glands could not be accurately localized by USG in two patients with double adenomas. When the patients with and without consistent surgical findings and USG findings were compared, the mean preoperative PTH value was significantly higher in those with consistent findings ( $p = 0.042$ ).



**Table 2** Types of operations performed together with parathyroidectomy

	n	%
<b>Only parathyroidectomy</b>	21	42.0
<b>Bilateral total thyroidectomy</b>	14	28.0
<b>Right lobectomy</b>	9	18.0
<b>Left lobectomy</b>	5	10.0
<b>Total thyroidectomy on one side and subtotal thyroidectomy on the other side</b>	1	2.0
<b>Total</b>	50	100.0

Adenoma lesions were reported in 90.9% (n = 22) of the patients with serum vitamin D levels below 20 mcg/l. This rate was found to be 85.7% (n = 7) among the patients with a vitamin D level above 20 mcg/l.

#### Laboratory Findings

Table 3 presents the serum PTH levels of the patients at the postoperative 15th minute and the serum PTH, Ca, and P levels at the postoperative first, second, and third days. The mean serum PTH value significantly decreased in the early postoperative period compared to the preoperative period ( $p < 0.05$ ). However, the serum PTH level significantly increased on the postoperative first, second, and third days compared to the early postoperative period ( $p < 0.05$ ). This value exceeded the normal level in 22% of the patients on the postoperative third day (minimum: 67 pg/ml, maximum: 212 pg/ml).

When the serum calcium values were examined, there was a significant decrease on the postoperative first day compared to the preoperative value, but no significant change was found in the following days. In addition, postoperative manifest hypocalcemia (<7 mg/dl) developed in a total of six patients.

The serum phosphorus level significantly increased from the postoperative second day compared to the preoperative period ( $p < 0.05$ ) (Table 4).

#### Pathology Findings

The histopathological diagnosis was in agreement with preoperative evaluation findings in 88% of the patients. However, in 12% of the patients, a frozen section examination was required in tissues considered to be parathyroid adenomas. Parathyroid adenomas were present in 44 patients who underwent surgery for p-HPT, and parathyroid hyperplasia was present in six patients. The smallest pathological parathyroid gland

excised was 90 mg, and the largest gland was 11,600 mg. The mean gland weight was 1941,38 mg.

The histopathological characteristics of the cases that did and did not undergo simultaneous thyroidectomy (n = 29 and n = 21, respectively) are summarized in Table 5. In a patient who underwent bilateral total thyroidectomy and adenoma excision due to a multinodular goiter and parathyroid adenoma, the pathology result of the thyroid paraffin section examination was reported as papillary cancer. No additional surgical treatment was applied to this patient.

In the group that simultaneously underwent thyroidectomy, the PTH value was significantly lower on the postoperative second and third days ( $p = 0.004$  and  $p = 0.077$ , respectively), and the phosphorus value was significantly lower on the postoperative first and second days ( $p = 0.029$  and  $p = 0.059$ , respectively). When the postoperative serum calcium values were compared, no significant difference was found between the two groups ( $p > 0.05$ ).

#### Discussion

Hypercalcemia is the main biochemical finding of p-HPT, which occurs as a result of the excessive and uncontrolled secretion of PTH from one or more glands. Although p-HPT can be seen at any age, and it is two to three times more common in middle-aged women (1). In the current study, the number of women with p-HPT was more than five times the number of men with this disease, and the mean age of all the cases was 51.2 years, which is consistent with the literature.

The clinical presentation of p-HPT has changed over the years, and the diagnosis of this disease is now

more frequently made based on biochemical/hormonal data alone in less symptomatic/asymptomatic patients. While nephrolithiasis was reported at a rate of 57% in earlier series, later studies indicated a much reduced rate, e.g., 17% reported (10). Twelve of our patients (24%) had a history of nephrolithiasis that could be directly associated with p-HPT. General complaints of the musculoskeletal system were present in 40% of the patients. To determine whether the complaints of patients with such non-specific complaints are associated with p-HPT, it is necessary to compare the incidence of these patient complaints with healthy individuals of similar age and characteristics in the medium-long term after surgery.

In light of the 2002 National Institutes of Health (NIH) conference surgical indication criteria, in the current study, three (6%) patients had urinary calcium excretion over 400 mg/day, 22 (44%) patients were aged below 50 years, 12 (24%) patients had a serum calcium value over 12 mg/dl, 29 (58%) patients had decrease of more than 30% in expected creatinine clearance according to age, and 12 (24%) patients had nephrolithiasis (11,12). When we evaluated five of the 2002 NIH operational criteria, namely age, history of urolithiasis, daily urinary calcium excretion, decrease in creatinine clearance, and serum calcium level, we determined that seven of the 50 patients did not meet any of these criteria, while two patients met four criteria. The mean number of criteria met by the patients was 1.56. It is possible that patients who underwent surgery without meeting the NIH criteria had other surgical indications that we did not evaluate in our study.

In this study, the mean calcium value was 11.6 mg/dl, and the calcium level was normal in two patients. In cases of vitamin D deficiency accompanying p-HPT, calcium can be found at normal levels.

The phosphorus level has been reported as  $2.9 \pm 0.1$  mg/dl in cases with mild p-HPT (13). In our patient group, the mean phosphorus value was 2.5 mg/dl. Phosphorus deficiency was evident in 25% of the p-HPT cases. In addition, 30 patients (60%) had low phosphorus levels ( $p < 2.7$ ). High phosphorus deficiency may be due to frequent vitamin D deficiency or the more severe course of p-HPT in our patient group. Although the vitamin D levels were lower in the patients with low phosphorus values, the difference was not statistically significant ( $17.9 \pm 23.2$  vs.  $41.08 \pm 46.8$ ,  $p = 0.089$ ).

The mean PTH level in mild p-HPT was previously reported as  $121 \pm 7$  pg/ml (13). In our sample, the

mean PTH level was 489 pg/ml, and the median PTH level was 276 pg/dl. This may be an indication that p-HPT was more severe in our patient group.

In patients with p-HPT, it is expected that the 25-OH vitamin D level is low, but the 1-25 OH vitamin D level is close to the upper limit (13). In our patient group, the mean 25-OH vitamin D level was 24.66 mcg/l. Among the 29 cases in which 25-OH vitamin D levels were measured, 10 had severe vitamin D deficiency ( $<10$ ), and 12 had mild vitamin D deficiency ( $<30$ ). Only seven patients had normal vitamin D levels. When the cut-off value of the vitamin D level was taken as 30 mcg/ml, it was determined that the mean calcium level was higher in the patients with a low vitamin D level compared to those with a normal vitamin D level. The phosphorus level of these patients being expected lower suggests that their high calcium level can be attributed to the more severe course of p-HPT only in these patients.

In mild p-HPT, the amount of urinary calcium excretion has been reported to be  $248 \pm 12$  mg/day. Similarly, in our study, we found the amount of urinary calcium excretion as 218.5 mg/day. The moderate urinary calcium excretion level of our patients despite severe p-HPT may be related to their high concomitant vitamin D deficiency. It has been reported that urinary calcium excretion is lower and PTH levels are higher in p-HPT cases with low vitamin D levels (14). Although urinary calcium excretion was not correlated with the vitamin D level in our study, the amount of daily urinary calcium excretion was found to be lower in the patients with a low vitamin D level (177 mg/day vs. 277 mg/day,  $p = 0.025$ ).

Parathyroid adenomas tend to be located more commonly in the lower pole (12). In the current study, parathyroid adenomas were found in the lower pole in most of the patients (58%). In some small adenomas, normal parathyroid tissue can be seen with a thin margin. The weight of the adenoma can vary from 300 mg to 6-7 g. Adenoma size ranges from 1 cm to 3-4 cm (15). In our patient group, the size of parathyroid adenomas ranged from 1 to 7.5 cm, and adenoma weight from 90 mg to 11.6 g. The mean adenoma weight was calculated as 1.9 g. These findings can be accepted as a further indication that p-HPT was more severe in our patients.

The sensitivity and specificity of sestamibi scintigraphy have been reported to be 50-100% and 75-100%, respectively (16). Concomitant thyroid pathologies can also have very important effects on scintigraphy findings. In our study, surgical findings were found

to be in agreement with scintigraphy findings in only seven (53.8%) of the 13 patients who underwent sestamibi scintigraphy.

In p-HPT, the sensitivity of USG in detecting the localization of enlarged glands is between 67 and 87% (17–21). Similar to the literature, in our study, the rate of agreement between USG and surgical findings was found to be 78%. We determined that the sensitivity of USG decreased in cases of atypical localization or double adenomas located in the upper pole.

Transient hypocalcemia is common after parathyroid surgery. Although transient hypocalcemia is seen in 10-20% of patients, this rate can increase to 35% in some series (22–24). The risk of transient hypocalcemia is low in mild HPT. If the parathyroids have been suppressed, secretion usually recovers rapidly within a few days. However, longer-term hypocalcemia may develop due to damage to the normal parathyroid glands or 'hungry bone syndrome'. Permanent hypoparathyroidism is seen in less than 1% of cases. In our study, there were 19 patients with a decreased phosphorus level on the postoperative third day compared to the preoperative value. In these patients, the vitamin D and urinary calcium excretion levels were higher compared to those with an increased phosphorus value, albeit not at a statistically significant level (26.9 vs. 12.2,  $p = 0.092$  and 248.9 vs. 199.1, respectively;  $p = 0.083$ ). These findings may indicate that higher vitamin D levels increase the risk of hungry bone syndrome development as a factor that accelerates mineralization.

The risk of permanent hypoparathyroidism after thyroid surgery varies depending on the extent of surgery. It may develop due to direct injury, unintentional removal, or devascularization of the parathyroids. In the current study, the serum calcium value decreased below 8.5 on the postoperative first day in 21 patients and remained below 8.5 mg/dl in 17 patients on the postoperative third day. On the postoperative third day, the PTH value increased in 35 patients compared to the earlier evaluation, and this decreased continued in 10 patients. The PTH value measured on the postoperative third day was below 10 in six patients. Since there was no long-term follow-up in our study, we do not know how many patients developed permanent hypoparathyroidism. However, we consider that these six patients are in the risk group. The common feature of this patient group is that all underwent bilateral exploration and thyroidectomy. Although the exact cause is unknown, increased bone turnover, increased ionized calcium levels, and suppression of parathyroid functions may play a role in hyperthyroidism.

It has been suggested that treatment of hyperthyroidism results in the increased mineralization of bone through a type of hungry bone syndrome. It has also been claimed that there may be overlooked damage in the parathyroids in some cases or calcium may decrease with the effect of calcitonin that enters circulation after thyroid manipulation (25). In our study, TSH was positively correlated with the postoperative third-day PTH and the increase in PTH from the early postoperative period to the postoperative third day. Similarly, the free T4 level was negatively correlated with the postoperative early PTH and postoperative third-day PTH levels. These findings may indicate that elevated thyroid hormone levels have a suppressive effect on postoperative PTH. The free T4 and postoperative second- and third-day calcium levels were found to be positively correlated. While elevated thyroid hormones increase calcium resorption from bones, they are also expected to decrease the PTH level. Our results suggest that high free T4 increased postoperative calcium and suppressed PTH for a longer time. Since the increase in TSH accompanies low thyroid hormone values, it is natural to see an increase in PTH. In a previous study, it was shown that the recovery of parathyroid cells was faster when surgical injury was applied to the parathyroid glands of rats in which hyperthyroidism was induced with TSH (26).

In p-HPT, tumor volume or weight is highly correlated with the serum calcium level. The mean correlation coefficient has been determined as 0.6, being reported to range from 0.4 to 0.8 (27-28-29). In our study, there was a significant correlation between adenoma weight and PTH and calcium levels ( $r = 0.633$  and  $r = 0.47$ , respectively;  $p < 0.001$  and  $p = 0.001$ , respectively). The correlation of calcium with PTH was similar ( $r = 0.46$   $p = 0.001$ ). It is known that increased cell mass causes more PTH secretion and a higher calcium level. In our study, as adenoma weight increased, the postoperative early PTH value also increased ( $r = 0.804$ ,  $p < 0.001$ ). This may be due to the late clearance of high PTH or the introduction of more parathyroid hormone into circulation after the surgical manipulation of large parathyroid adenomas. The higher correlation between adenoma weight and the early PTH level compared to the baseline PTH strengthens the latter possibility. Adenoma weight was negatively correlated with the increase in PTH on the postoperative first and third days ( $r = 0.724$ ,  $p < 0.001$  and  $r = 0.338$ ,  $p = 0.023$ , respectively). This is due to the inappropriate elevation of early PTH with surgical manipulation or greater suppression in the remaining parathyroids as the weight of the parathyroid gland increases. There was no significant correlation between the preoperative PTH value and the increase

in PTH on the postoperative third day compared to the earlier postoperative evaluation ( $p = 0.093$ ). This suggests that the negative correlation of adenoma weight with the increase PTH on the postoperative first and third days was not due to the suppression of the remaining glands but related to the elevation in the early postoperative levels of PTH released from the gland through surgical manipulation. According to these findings, we consider that a relatively high early PTH value, especially after the removal of large lesions does not warrant doubting surgical success; rather, it indicates that the postoperative hypoparathyroidism risk of these patients should not be underestimated by examining early PTH levels.

In a previous study reporting the results of 51 patients who underwent surgery for p-HPT at our clinic between 1999 and 2002, nine (17.6%) patients had papillary thyroid cancer, nine had lymphocytic thyroiditis, two (3.9%) had benign thyroid adenomas, and 24 (47%) had nodular hyperplasia (30). In another study from Turkey evaluating 60 patients, thyroid cancer was detected in nine patients (15%), and thyroid pathologies were reported in a total of 40 patients (77%) (31). In another series including 194 patients who underwent minimally invasive parathyroid surgery, diagnosis was deemed suspicious on preoperative USG and biopsy, and thyroid cancer was detected in seven (5.5%) of the 23 patients who underwent thyroidectomy (32). In our study, thyroid cancer was detected in two of 29 patients (6.9% in the thyroidectomy group and 4% in the whole sample) who underwent thyroidectomy due to suspected thyroid pathologies during preoperative evaluation.

## Conclusion

The PTH level and parathyroid weight of our patient group indicate moderate-severe HPT. Although vitamin D deficiency is common, it is not a risk factor for postoperative hypocalcemia. Although USG has a high diagnostic value, it may cause mislocalization in lesions with atypical localizations, those located in the upper glands, and multiple lesions. As surgical exploration increases, the risk of postoperative hypocalcemia also increases. This risk is even higher in patients that have undergone simultaneous thyroidectomy. The volume and weight of the parathyroid lesion are proportional to the degree of hypercalcemia and hyperparathyroidism. In p-HPT, an increase in calcium or a decrease in creatinine clearance may lead to a decrease in the renal phosphaturic effect of PTH.

## Conflict of Interest Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

## Ethical Approval

The study protocol was approved by Ethics Committee of Yuzuncu Yil University Faculty of Medicine (date-number: 10.09.2008-2008/08). All procedures performed in studies involving human participants comply with the universal ethical standards and the 1964 Declaration of Helsinki and its subsequent amendments or comparable ethical standards.

## Consent to Participate and Publish

Written informed consent to participate and publish was obtained from all individual participants included in the study.

## Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

## Availability of Data and Materials

Data are available on request due to privacy or other restrictions.

## Authors Contributions

İH: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Investigation; Methodology; Validation; Visualization; Writing-original draft.

ÇK: Conceptualization; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Supervision; Validation; Writing-review & editing.

## References

1. Silverberg SJ BJ. The Parathyroids: Basic and Clinical Concepts. Orlando, ABD; 2001. 349–60.
2. Urano T, Kebebew E. How to localize parathyroid tumors in primary hyperparathyroidism? *J Endocrinol Invest.* 2006; 29(9):840-7.
3. Wells SA, DeBenedetti MK DG. Recurrent or persistent hyperparathyroidism. *J Bone Min Res.* 2002;158–62.
4. Rodriguez JM, Tezelman S, Siperstein AE, Duh QY, Higgins C, Morita E, Dowd CF CO. Localization procedures in patients with persistent or recurrent hyperparathyroidism. *Arch Surg.* 1994, 129(8):870-5.
5. Mitchell BK, Kinder BK, Merrell RC. Localization Studies in Patients with Hyperparathyroidism. *Surg Clin North Am.* 1995; 75(3):483–98.
6. Mariani G1, Gulec SA, Rubello D, Boni G, Puccini M, Pelizzo MR, Manca G, Casara D, Sotti G, Erba P, Volterrani D GA. Preoperative localization and radioguided parathyroid surgery. *J Nucl Med.* 1995;1443–58.
7. Frasoldati A, Valcavi R. Challenges in neck ultrasonography: Lymphadenopathy and parathyroid glands. *Endocrine Practice.* 2004, 10(3):261-8.
8. Scheiner JD, Dupuy DE, Monchik JM, Noto RB, Cronan JJ. Pre-operative localization of parathyroid adenomas: A comparison of power and colour Doppler ultrasonography with nuclear medicine scintigraphy. *Clin Radiol.* 2001; 56(12):984-8.

9. Ohe MN, Santos RO, Barros ER, Lage A, Kunii IS, Abrahão M, et al. Changes in clinical and laboratory findings at the time of diagnosis of primary hyperparathyroidism in a University Hospital in São Paulo from 1985 to 2002. *Brazilian J Med Biol Res.* 2005; 38(9):1383–7.
10. Bilezikian JP, Brandi ML, Rubin M, Silverberg SJ. Primary hyperparathyroidism: New concepts in clinical, densitometric and biochemical features. *Journal of Internal Medicine.* 2005, 257(1):6-17.
11. Sywak MS, Knowlton ST, Pasieka JL, Parsons LL, Jones J. Do the National Institutes of Health consensus guidelines for parathyroidectomy predict symptom severity and surgical outcome in patients with primary hyperparathyroidism? *Surgery,* 2002; 132(6): 1013–20.
12. Suliburk JW, Perrier ND. Primary hyperparathyroidism. *Oncologist.* 2007 Jun;12(6):644-53.
13. Silverberg SJ BJ. Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism Primary hyperparathyroidism. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. 564–573 p.
14. Bussey AD, Bruder JM. Urinary calcium excretion in primary hyperparathyroidism: Relationship to 25-hydroxyvitamin d status. *Endocr Pract.* 2005 Jan;11(1):37–42.
15. Livolsi VA. Parathyroids IN: Bilezikian JP, Marcus R LM (Eds). *The Parathyroids Basic and Clinical Concepts* Orlando: Acad Press; 2001;4–10.
16. Denham DW, Norman J. Cost-effectiveness of preoperative sestamibi scan for primary hyperparathyroidism is dependent solely upon the surgeon's choice of operative procedure. *J Am Coll Surg.* 1998; 186(3):293-305.
17. Tziakouri C, Eracleous E, Skannavis S, Pierides A, Symeonides P, Gourtsoyiannis N. Value of Ultrasonography, CT and MR Imaging in the Diagnosis of Primary Hyperparathyroidism. *Acta radiol.* 1996 May;37(3P2):720–6.
18. Gofrit ON, Lebensart PD, Pikarsky A, Lackstein D, Gross DJ, Shiloni E. High-resolution ultrasonography: Highly sensitive, specific technique for preoperative localization of parathyroid adenoma in the absence of multinodular thyroid disease. *World J Surg.* 1997; 21(3):287-91
19. Chapuis Y, Fulla Y, Bonnichon P, Tarla E, Abboud B, Pitre J, et al. Values of ultrasonography, sestamibi scintigraphy, and intraoperative measurement of 1-84 PTH for unilateral neck exploration of primary hyperparathyroidism. *World Journal of Surgery.* 1996. 20(7):835-40
20. Mazzeo S, Caramella D, Lencioni R, Molea N, De Liperi A, Marcocci C, et al. Comparison among sonography, double-tracer subtraction scintigraphy, and double-phase scintigraphy in the detection of parathyroid lesions. *Am J Roentgenol.* 1996; 166(6):1465-70.
21. De Feo ML, Colagrande S, Biagini C, Tonarelli A, Bisi G, Vaggelli L, et al. Parathyroid glands: Combination of 99mTc MIBI scintigraphy and US for demonstration of parathyroid glands and nodules. *Radiology.* 2000; 214(2):393-402.
22. Brennan MF, Doppman JL, Kurdy AG, Marx SJ, Spiegel AM, Aurbach GD. Assessment of techniques for preoperative parathyroid gland localization in patients undergoing reoperation for hyperparathyroidism. *Surgery.* 1982; 91(1):6-11.
23. Lo CY, van Heerden JA P reoperations. *Textbook of Endocrine Surgery.* Philadelphia: Saunders; 2005. 418–525 p.
24. Gaz RD. *Surgery of the Thyroid and Parathyroid Glands.* Philadelphia: Saunders; 2003. 564–570 p.
25. De Beur SMJ, Streefen EA LM. Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. 586–602 p.
26. Pavlov A V. Regeneration of the parathyroid glands after partial resection. *Arkh Anat Gistol Embriol.* 1986; 77-80.
27. Parfitt AM. Parathyroid growth: *The Parathyroids: Basic and Clinical Concepts.* NewYork: Raven Press; 1994. 373–405 p.
28. Mallette LE, Bilezikian JP, Heath DA AG. *Manual of Endocrine Surgery.* 1974. 127–146 p.
29. Rao SD, Honasoge MD, Divine GW, Phillips ER, Lee MW, Ansari MR, Talpos GB PA. Effect of vitamin D nutrition on parathyroid adenoma weight: Pathogenetic and clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85(3), 1054–8.
30. Kösem M, Algün E, Kotan Ç, Harman M, Öztürk M. Coexistent thyroid pathologies and high rate of papillary cancer in patients with primary hyperparathyroidism: Controversies about minimal invasive parathyroid surgery. *Acta Chir Belg.* 2004; 104(5):568-71
31. Gul K, Ozdemir D, Korukluoglu B, Ersoy PE, Aydin R, Ugras SN, et al. Preoperative and postoperative evaluation of thyroid disease in patients undergoing surgical treatment of primary hyperparathyroidism. *Endocr Pract.* 2010; 16(1):7-13.
32. Monroe DP, Edeiken-Monroe BS, Lee JE, Evans DB, Perrier ND. Impact of preoperative thyroid ultrasonography on the surgical management of primary hyperparathyroidism. *Br J Surg.* 2008; 95(8):957-60.



## NEGATİF APPEKDEKTOMİYİ ÖNLEMEDE ALVARADO SKORU VE BİLGİSAYARLI TOMOGRAFİ

ALVARADO SCORE AND COMPUTED TOMOGRAPHY FOR PREVENT FROM NEGATIVE APPEKDECTOMY

Hüseyin Fahri MARTLI<sup>1</sup>, Yasir KEÇELİOĞLU<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ankara Atatürk Sanatoryum Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Genel Cerrahi Kliniği, Ankara, TÜRKİYE

<sup>2</sup> Ankara Şehir Hastanesi, Genel Cerrahi Kliniği, Ankara, TÜRKİYE

**Cite this article as:** Martlı HF, Keçelioğlu Y. Negatif Appendektomiye Önlemede Alvarado Skoru ve Bilgisayarlı Tomografi. Med J SDU 2023; 30(1): 107-110.

### Öz

#### Amaç

Negatif apependektomiye engellemek için bilgisayarlı tomografi ve Alvarado skorunun işlevselliği araştırıldı.

#### Gereç ve Yöntem

Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi E.A.H.'de Haziran 2020 ve Mart 2021 tarihleri arasında appendektomi operasyonu olan hastalar retrospektif olarak tarandı. Patoloji sonuçları ile korelasyonları yapıldı.

#### Bulgular

Alvarado skoru yüksekliği ile bilgisayarlı tomografide apandisit tanısı arasında pozitif yönde korelasyon bulunmuştur. Apandisiti olmayanların alvarado skorunun akut apandisiti olanlara göre düşük olması; akut apandisiti olanların perforans-gangren-plastrone apandisiti olanlara göre düşük olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

#### Sonuç

Alvarado Skorlama sistemi bilgisayarlı tomografiye göre daha düşük oranda spesifiktir ve negatif appendektomi oranını radyolojik tetkikler ile azaltmak mümkündür.

**Anahtar Kelimeler:** Alvarado Skoru, Apandisit, Bilgisayarlı Tomografi

### Abstract

#### Objective

The functionality of computed tomography and Alvarado score were investigated to prevent negative appendectomy.

#### Material and Method

Patients who had appendectomy surgery at Niğde Ömer Halisdemir University Training and Research Hospital between June 2020 and March 2021 were retrospectively scanned. Correlations with pathology results were made.

#### Results

A positive correlation was found between the high Alvarado score and the diagnosis of appendicitis in computed tomography. The lower alvarado score of those without appendicitis than those with acute appendicitis; It was found statistically significant that those with acute appendicitis were lower than those with perforated-gangrene-plastrone appendicitis.

#### Conclusion

Alvarado scoring system is less specific than computed tomography and it is possible to reduce the negative appendectomy rate with radiological examinations.

**Keywords:** Alvarado Score, Appendicitis, Computed Tomography

**Sorumlu yazar ve iletişim adresi /Corresponding author and contact address:** H.F.M. / fahri\_martli@hotmail.com

**Müracaat tarihi/Application Date:** 05.10.2022 • **Kabul tarihi/Accepted Date:** 01.12.2022

**ORCID IDs of the authors:** H.F.M: 0000-0002-2933-3170; Y.K: 0000-0002-7561-1741

## Giriş

Akut apandisit en sık akut karın nedenidir ve kümülatif olarak yaşam boyu apandisit olma olasılığı %7'dir (1). Apandisit tanısını koyarken iyi bir anamnez alınmalı ve bulgular üzerinden şüphe edilmelidir. Fakat apandisit ayırıcı tanısında pek çok hastalık bulunmaktadır (2). Bundan dolayı en doğru karar verebilmek için pek çok skorlama sistemleri geliştirilmiştir (3-6). Bunlardan en yaygın kullanılanı Alvarado Skorudur (4).

Alvarado skorunda bulantı, iştahsızlık, ağrı göçü, rebound, ateş, nötofil yüzdesinde sola kayma (hepsi birer puan); lökositoz ve sağ alt kadranda defans (iki puan) parametrelerine bakılır (7). Bakılan parametreler toplamalarına göre 1-4 puan arası apandisit değil; 5-6 puan apandisit şüphesi; 7 puan ve üzeri apandisit olarak gruplandırılır (6). Alvarado skorunun çalışmalarda sensitivitesi %99, spesifitesi ise %81'lerde dir (5, 8).

Bilgisayarlı tomografi apandisit tanısı koymada özellikle şüpheli vakalarda en çok önerilen görüntüleme tetkiğidir (9). Alvarado skorunda da 5-6 puan alanlarda apandisit şüphesi olduğu için görüntüleme önerilmektedir. Yapılan cohraine analizinde yetişkin hastalarda apandisit tanısı koymada bilgisayarlı tomografinin %95 sensitivitesi; %96 spesifitesi bulunmaktadır (9).

Negatif appendektomi oranı radyolojik tetkiklerin sık kullanılması ile %3-9 oranlarına gerilemiştir (10, 11). Bilgisayarlı tomografi akut apandisit tanısında yüksek sensitivite-spesifite ile (%96-99) altın standart olarak kabul edilmektedir (12). Özellikle pediatrik hastalarda, yaşlı hastalarda, immünsupresif hastalarda ayırıcı tanı da bulunmak anamnez, muayene ve laboratuvar tetkikleri ile kolay olmadığı için mutlak surette radyolojik tetkikler ile değerlendirmek gerekir (3).

Yapılan bu çalışmada Alvarado Skoru ile bilgisayarlı tomografi tetkiğinin peroperatif klinik ve patolojik tanı ile karşılaştırılması yapılmıştır. Özellikle "Rural Surgery" olarak tarif edilen taşra hastanelerinde ki cerrahiler her zaman radyolojik olarak desteklenmeyebilir ve dolayısıyla klinik skorlama sistemleri kullanımı daha ön plana çıkar. Skorlama sistemlerinin aralıklı olarak güvenilirliğinin test edilmesi gerektiği göz önünde bulundurularak tecrübe paylaşımı hedeflenmiştir.

## Gereç ve Yöntem

Çalışmada Haziran 2020 ve Mart 2021 yılları arasında Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde appendektomi operasyonu yapılan 337 hasta taranmıştır. Çalışma için Niğde Ömer Ha-

lisdemir Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan Aralık 2021 tarihinde 2021-105 numaralı onay alındı. Retrospektif olarak taranan hastanın ameliyat öncesi Alvarado skoru bilinen, anamnez notu eksiksiz olan ve preoperatif bilgisayarlı tomografi çekilen 222 hasta dahil edilmiştir. Hastaların Alvarado skoru, preoperatif bilgisayarlı tomografi ve appendektomi materyalinin patoloji sonucu ile karşılaştırılmıştır.

Bilgisayarlı tomografi sonuçları apandisit, plastro-ne-perfore apandisit, apandisit değil ve şüpheli apandisit olarak; patoloji sonuçları da süpüratif apandisit, perfore-gangrene-nekroze apandisit ve apandisit değil olarak ayrılmış ve Alvarado skoru ile karşılaştırılmıştır.

Alvarado skoru hesaplanamayan hastalar, 18 yaşından küçük hastalar, bilgisayarlı tomografi tetkiği çekilmeyen hastalar, insidental apandisit tesbit edilen hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir.

İstatistiksel analizler için SPSS 25 programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metotların (Ortalama, Standart Sapma, Medyan, Frekans, Oran, Minimum, Maksimum) yanı sıra verilerin dağılımı Shapiro-Wilk Testi ile değerlendirilmiştir. Niceliksel verilerin normal dağılım gösteren iki grup karşılaştırmalarında Student T testi kullanıldı. Niceliksel verilerin normal dağılım gösteren üç ve üzeri grup karşılaştırmalarında One Way ANOVA testi kullanıldı. Anlamlılık  $p < 0.05$  düzeyinde değerlendirildi.

## Bulgular

Çalışmaya dahil edilen hastaların ortalama yaşı  $34,3 \pm 11,2$  gelmiş olup %57,2 'si kadın (n:127), %42,8'i erkekti (n:95). Operasyonların 34'ü laparoskopik (%15,31), 188'i açık (%84,69) olarak yapılmıştır. Bizim çalışmamızda Alvarado Skorunun sensitivitesi %97 spesifitesi %78; bilgisayarlı tomografinin sensitivitesi %99 spesifitesi %92 olarak gelmiştir. Patoloji sonuçlarına bakarak negatif appendektomi oranı da %6,3 bulunmuştur.

Çalışmaya alınan 222 hastanın Alvarado Skorları ile bilgisayarlı tomografileri karşılaştırıldığında; bilgisayarlı tomografide apandisit tanısı alan 174 hastanın (%78,37) ortalama Alvarado skoru 6,66 1,52; perfore-gangrene-nekroze apandisit tanısı alan 8 hastanın (%3,60) ortalama Alvarado skoru 8,33 1,15; apandisit şüphesi olarak yorumlanan 34 hastanın (%15,21) ortalama Alvarado skoru 6,25 2,63; apandiksi normal olarak yorumlanan 6 hastanın (%2,70) ortalama Alvarado skoru 5,65 1,41 olarak hesaplanmıştır (Tablo 1). Bu sonuçlar eşliğinde Alvarado skoru yüksekliği ile bil-



**Tablo 1** Bilgisayarlı tomografi sonuçları ile Alvarado Skoru Karşılaştırılması

B.T.Sonucu	Sayı	Ort.Alvarado Skoru	Min-Max	p
Süpüratif Apandisit	174	6,66±1,52	3-10	0,018*
Perfore-Gangrene Apandisit	8	8,33 1,15	5-10	
Apandisit Şüphesi	34	6,25 2,63	3-9	
Normal Apandisit	6	5,65 1,41	3-7	

Ameliyat öncesi tomografi sonuçlarına göre alvarado skoru istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir.(p=0,018;p<0,05). (B.T.;Bilgisayarlı tomografi, Ort.; Ortalama)

**Tablo 2** Patoloji sonuçları ile Alvarado Skoru Karşılaştırılması

B.T.Sonucu	Sayı	Ort.Alvarado Skoru	Min-Max	p
Süpüratif Apandisit	182	6,8±1,52	3-10	0,001
Perfore-Gangrene-Plastrone	26	6,85±1,57	4-10	
Apandisit Değil	14	5,45±1,44	3-8	

Patoloji sonuçlarına göre alvarado skoru istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir. (p=0,001;p<0,01). Apandisiti olmayanların alvarado skorunun akut apandisiti olanlara göre düşük olması; akut apandisiti olanların perfore-gangrene-plastrone apandisiti olanlara göre düşük olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

gisayarlı tomografide apandisit tanısı arasında pozitif yönde korelasyon bulunmuştur.

Hastaları patoloji sonuçlarına göre süpüratif apandisit tanısı alan 182 hastanın (%81,09) preoperatif ortalama Alvarado skoru 6,8±1,52; perfore-gangrene-plastrone apandisit gelen 26 hastanın (%11,71) ortalama Alvarado skoru 6,85±1,57; apandiksi normal olarak gelen 14 hastanın (%6,3) hastanın Alvarado skoru 5,45±1,44 olarak hesaplanmıştır (Tablo 2). Bu sonuçlara göre; Apandisiti olmayanların alvarado skorunun akut apandisiti olanlara göre düşük olması; akut apandisiti olanların perfore-gangrene-plastrone apandisiti olanlara göre düşük olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

## Tartışma

Akut apandisit en sık akut karın nedeni olmakla beraber radyolojik tetkiklerini ve skorlama sistemlerinin yeteri kadar kullanılmadığı durumlarda negatif appendektomi oranı %20'lerdeydi (3, 8). Özellikle radyolojik tetkikleri sık kullanılması negatif appendektomi oranını %5'lerin altına düşürmüştür (3). Alvarado skoru ko-

lay uygulanabilir olması ile klinik pratikte sık kullanılan skorlama sistemleri arasındadır. Yapılan çalışmada sensitivitesi ve spesifitesi son yapılan bazı literatür ile uyumlu olarak gelmiştir fakat çok daha az düşük sensitivite ve spesifiteye sahip çalışmalarda bildirilmiştir (5, 8, 13). Negatif appendektominin azaltılması için yeteri kadar spesifik bulunamamıştır. Operasyon öncesi klinik skorlama sistemlerinin genel olarak spesifitesinin az olmasından dolayı tanısal laparaskopi ve peroperatif skorlama sistemleri kullanılmaktadır (3, 14). Bundan dolayı tanıya yaklaşmak için görüntüleme yöntemlerine ihtiyaç vardır.

Ayırıcı tanıda bulunmak ve tanıyı desteklemek için özellikle kadınlarda, yaşlılarda, çocuklarda, immun-deprese hastalarda bilgisayarlı tomografi sık kullanılır (15). Tanısal laparoskopinin öncesinde görüntüleme yöntemlerinin kullanıldığı çalışmalarda negative appendektomi oranı %3-4'lere kadar gerilemektedir (16). Negatif appendektominin engellenmesinde bilgisayarlı tomografi ön plana çıkmaktadır, ultrasonografik yöntemler bu aşamada faydalı bulunmamıştır (17). Literatürde %96'lara varan spesifite oranı bizim çalışmamızda daha düşük oranda bulunmuştur; bun-

da çalışmanın perfore-gangrene apandisit grubunu ileri ever apandisit olarak gruplandırılması ile beraber bilgisayarlı tomografinin kolaylıkla istenebilmesi ve apandisit kliniği olmayanlarda apandisiti düşündürtecek bulguların tesbit edilmesi olabilir.

Negatif appendektominin engellenmesinde literatürle uyumlu olarak bizim çalışmamızda da bilgisayarlı tomografi ön plana çıkmaktadır. Alvarado skoru sensitive olarak yüksek olsa da spesifitesi yeterli bulunmamıştır. Tanısal laparaskopi pratiğimizde bilgisayarlı tomografi sonucunun normal gelmesine rağmen şüphelenilen hastalarda uygulanmaktadır. Şüpheli apandisit durumunda ön planda bilgisayarlı tomografi yerine tanısal laparoskopinin yaygın kullanıldığı Hollanda gibi ülkelerde negative appendektomi oranı bilgisayarlı tomografi kullananlara göre daha fazladır (14, 18).

Çalışma retrospektif dizayn edilmesi en önemli limitasyonudur. Bunun dışında tek merkezli ve düşük hacimli bir çalışmadır. Genel olarak sonuçlar literatürle uyumlu gelmiştir.

#### Çıkar Çatışması Beyanı

Herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

#### Etik Kurul Onayı

Çalışma için Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan 27/12/2021 tarihinde 2021-105 (E-95860085-050.02.04-149130) numarası ile onay alınmış ve araştırma "Helsinki Deklarasyonu"na uygun yürütülmüştür.

#### Bilgilendirilmiş Onam

Çalışma retrospektif olarak yürütülmüş olduğundan bilgilendirilmiş onama ihtiyaç bulunmamaktadır.

#### Finansman

Bu araştırma, kamu, ticari veya kar amacı gütmeyen sektörlerdeki finansman kuruluşlarından herhangi bir finansal destek almamıştır.

#### Verilerin Ulaşılabilirliği

Veriler yazarlardan temin edilebilir.

#### Yazar Katkıları

HFM: Çalışmanın Planlanması, Kaynakların Sağlanması, Proje Yönetimi, Formal Analizler, Metodoloji, Araştırma, Validasyon, Görselleştirme, Makalenin Yazımı, Makalenin Düzenlenmesi.

YK: Çalışmanın Planlanması; Verilerin İşlenmesi; Formal Analizler; Araştırma; Metodoloji; Validasyon; Görselleştirme; Makalenin Yazımı.

## Kaynaklar

1. Addiss DG, Shaffer N, Fowler BS, Tauxe RV. The epidemiology of appendicitis and appendectomy in the United States. *American journal of epidemiology*. 1990;132(5):910-25.
2. Bhangu A, Søreide K, Di Saverio S, Assarsson JH, Drake FT. Acute appendicitis: modern understanding of pathogenesis, diagnosis, and management. *Lancet*. 2015;386(10000):1278-87.
3. Di Saverio S, Podda M, De Simone B, Ceresoli M, Augustin G, Gori A, et al. Diagnosis and treatment of acute appendicitis: 2020 update of the WSES Jerusalem guidelines. *World journal of emergency surgery*. 2020;15(1):27.
4. Loye A, Zhang XC. Calculated decisions: Alvarado score for acute appendicitis. *Emergency medicine practice*. 2019;21(6):Cd1-2.
5. Jose T, Rajesh PS. Appendicitis Inflammatory Response Score in Comparison to Alvarado Score in Acute Appendicitis. *Surgery journal*. 2021;7(3):e127-e31.
6. Martli Hf, Bolat H. Comparison of the Laparoscopic Appendicitis (LAPP) score with the Alvarado and Appendicitis Inflammatory Response (AIR) scores and computed tomography and pathology results. *Archives of Current Medical Research* 2022;3(2):147-53.
7. Alvarado A. A practical score for the early diagnosis of acute appendicitis. *Annals of emergency medicine*. 1986;15(5):557-64.
8. Ohle R, O'Reilly F, O'Brien KK, Fahey T, Dimitrov BD. The Alvarado score for predicting acute appendicitis: a systematic review. *BMC medicine*. 2011;9:139.
9. Rud B, Vejborg TS, Rapoport ED, Reitsma JB, Wille-Jørgensen P. Computed tomography for diagnosis of acute appendicitis in adults. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2019;2019(11).
10. Slotboom T, Hamminga JT, Hofker HS, Heineman E, Have-man JW. Intraoperative motive for performing a laparoscopic appendectomy on a postoperative histological proven normal appendix. *Scandinavian journal of surgery*. 2014;103(4):245-8.
11. Jeon BG. Predictive factors and outcomes of negative appendectomy. *American journal of surgery*. 2017;213(4):731-8.
12. Mostbeck G, Adam EJ, Nielsen MB, Claudon M, Clevert D, Nicolau C, et al. How to diagnose acute appendicitis: ultrasound first. *Insights into imaging*. 2016;7(2):255-63.
13. Shah SWA, Khan CA, Malik SA, Waqas A, Tarrar Am, Bhutta Ia. Modified Alvarado score: Accuracy in diagnosis of acute appendicitis in adults. *The Professional Medical Journal*. 2010;17(04):546-50.
14. Gelpke K, Hamminga JTH, van Bastelaar JJ, de Vos B, Bodegom ME, Heineman E, et al. Reducing the negative appendectomy rate with the laparoscopic appendicitis score; a multicenter prospective cohort and validation study. *International journal of surgery*. 2020;79:257-64.
15. Westfall KM, Purcell LN, Charles AG. Computed Tomography for Acute Appendicitis Diagnosis and Confirmation in Men: Trends and Cost Implications. *The American surgeon*. 2021;87(3):364-9.
16. Drake FT, Mottey NE, Castelli AA, Florence MG, Johnson MG, Steele SR, et al. Time-of-day and appendicitis: Impact on management and outcomes. *Surgery*. 2017;161(2):405-14.
17. Florence M, Flum DR, Jurkovich GJ, Lin P, Steele SR, Symons RG, et al. Negative appendectomy and imaging accuracy in the Washington state surgical care and outcomes assessment program. *Annals of surgery*. 2008;248(4):557-63.
18. Boonstra P, Van Veen R, Stockmann H. Less negative appendectomies due to imaging in patients with suspected appendicitis. *Surgical Endoscopy*. 2015;29(8):2365-70.

# PROTECTIVE ROLE OF ANKAFERD BLOOD STOPPER ON CADMIUM-INDUCED ACUTE NEPHROTOXICITY

## ANKA FERD BLOOD STOPPER'İN KADMIYUMA BAĞLI GELİŞEN AKUT BÖBREK HASARINA ETKİSİ

İlter İLHAN<sup>1</sup>, Halil İbrahim BÜYÜKBAYRAM<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, Isparta, TÜRKİYE

**Cite this article as:** İlhan İ, Büyükbayram Hİ. Protective role of Ankaferd Blood Stopper on Cadmium-Induced Acute Nephrotoxicity. Med J SDU 2023; 30(1): 111-118.

### Öz

#### Amaç

Kadmiyum (Kd) insan sağlığı üzerinde zararlı etkilere neden olabilen çok toksik ve kanserojen bir ağır metaldir. Kd maruziyetine bağlı olarak özellikle böbreklerde toksisite gelişebilir. Ankaferd blood stopper (ABS), cerrahide hemostatik özelliği nedeniyle kullanılan bitkisel bir karışımdır. Ayrıca ABS'nin yara ve doku iyileşmesini artırdığı gösterilmiştir. Bu çalışmada, ABS'nin Kd kaynaklı böbrek hasarına karşı olası koruyucu etkilerini değerlendirmeyi amaçladık.

#### Gereç ve Yöntem

Otuz iki erkek sıçan rastgele 4 gruba ayrıldı: kontrol, Kd (kadmiyum klorür, 2,5 mg/kg tek doz ip), ABS (ABS, 1,5 ml/kg tek doz ip) ve Kd+ABS (kadmiyum klorür, 2,5 mg/kg tek doz ip-ABS, 1,5 ml/kg tek doz ip). Deney sonunda sıçanların serumlarından üre ve kreatinin seviyeleri ölçüldü. Ayrıca böbrek dokularından spektrofotometrik olarak total oksidan status (TOS), total antioksidan status (TAS) seviyeleri, süperoksit dismutaz (SOD) ve glutasyon peroksidaz (GPx) enzim aktiviteleri ölçüldü. TOS ve TAS düzeylerinden oksidatif stres indeksi (OSI) hesaplandı. Ayrıca sıçanların böbrek dokusunda Bcl-2-associated X protein (Bax), B-cell-lymphoma-2 (Bcl-2), silenced information regulator 1 (SIRT1) ve p53'ün mRNA ekspresyonundaki değişiklikler qRT-PCR yöntemi ile değerlendirildi.

### Bulgular

Kadmiyum grubunda serum üre, kreatinin düzeyleri ve doku oksidatif stres belirteçleri, TOS ve OSI değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek ( $p<0.05$ ), Gpx aktivitesi anlamlı olarak düşüktü ( $p<0.05$ ). Ayrıca p53 ekspresyonu ve Bax/Bcl2 oranı Kd grubunda anlamlı artış göstermiştir ( $p<0.05$ ). Ancak ABS tedavisi, Kd uygulanan grupta üre, kreatinin, TOS, OSI düzeylerini ve Bax/Bcl2 oranı ile p53 ekspresyonunu anlamlı düzeyde azaltmıştır ( $p<0.05$ ).

### Sonuç

Ankaferd blood stopper akut Kd maruziyetinde oksidatif stresi ve mitokondri aracılı apoptozu azaltarak koruyucu etkiler göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kekik, Meyan, Oksidatif stres, Resveratrol, *Urtica dioica*

### Abstract

#### Objective

Cadmium (Cd) is a very toxic and carcinogenic heavy metal that can cause harmful effects on human health. Toxicity may develop due to Cd exposure, especially in the kidneys. Ankaferd blood stopper (ABS) is a herbal mix that is used for its hemostatic properties in surgery. Also, ABS enhances wound and tissue healing. In this study, we aimed to evaluate the possible ameliorative effects of ABS in Cd-induced renal damage.

Sorumlu yazar ve iletişim adresi /Corresponding author and contact address: İ.İ. / ilterilhan@gmail.com

Müracaat tarihi/Application Date: 20.01.2023• Kabul tarihi/Accepted Date: 08.03.2023

ORCID IDs of the authors: İ.İ: 0000-0003-3739-9580; H.İ.B: 0000-0003-0560-042X

## Material and Method

Thirty-two male rats were randomly divided into 4 groups: control, Cd (cadmium chloride, 2.5 mg/kg single dose, ip), ABS (ABS, 1.5 ml/kg single dose ip), and Cd+ABS (cadmium chloride, 2.5 mg/kg single dose ip- ABS, 1.5 ml/kg single dose ip). At the end of the experiment, urea and creatinine levels were analyzed from the rats' serum. In addition, total oxidant status (TOS), total antioxidant status (TAS) levels, superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GPx) activity were measured spectrophotometrically from renal tissues. The oxidative stress index (OSI) was calculated from TOS and TAS levels. Also, we evaluated alterations in the mRNA expression of Bcl-2-associated X protein (Bax), B-cell-lymphoma-2 (Bcl-2), silenced information regulator 1 (SIRT1), and p53 in kidney tissue of rats by using the qRT-PCR method.

## Results

In the Cd group, serum urea, creatinine levels, and tissue oxidative stress markers, TOS and OSI were significantly higher while Gpx activity was significantly lower than in the control group ( $p < 0.05$ ). Also, the expression of p53 and in Bax/Bcl2 ratio significantly increased in the Cd group ( $p < 0.05$ ). But, ABS treatment significantly decreased urea, creatinine, TOS, OSI levels, and Bax/Bcl2 ratio, p53 expression in Cd applied group ( $p < 0.05$ ).

## Conclusion

Ankaferd blood stopper showed protective effects by reducing oxidative stress and mitochondria-mediated apoptosis in acute Cd exposure.

**Keywords:** Licorice, Oxidative stress, Resveratrol, Thyme, *Urtica dioica*

## Introduction

Cadmium (Cd) is a divalent heavy metal element with atomic number 48. It is mostly used in nickel-cadmium batteries, steel plating, polyvinyl chloride (PVC), color pigments and alloys. In addition to industrial uses, Cd also exists in phosphate fertilizers due to manufacturing impurities (1). Human exposure to Cd is mainly caused by anthropogenic pollution. The main exposure route of Cd is the oral ingestion of contaminated foods and water. Besides, inhalation of contaminated air/cigarette smoking is another important exposure way (2).

Cd is a very toxic and carcinogenic element that has also a very long biological half-life (10 to 35 years). Although the intestinal absorption percent of the Cd is relatively low (%5-10), it has been stated that approximately half of the absorbed Cd accumulates in the kidneys (3). Therefore, kidneys are the major organs affected by Cd, and cumulative accumulation of Cd besides the acute exposure also underlies Cd toxicity. Nephrotoxicity mechanisms of Cd mainly depend on oxidative stress, and related consequences like the release of proinflammatory cytokines, loss of the regulation of autophagy, DNA damage, and finally apoptosis and cell necrosis (4-7).

Following intestinal absorption, Cd is transported to the liver and binds with the metallothionein proteins (Mt). The binding of the Cd to these proteins actually prevents toxic damage of Cd; however, Cd-bound proteins are released from the liver and transferred

to the kidneys via blood circulation. After glomerular filtration and tubular reabsorption, Cd accumulates in the kidneys due to exceeding the Cd binding capacity of kidney Mt proteins, or dissociation of Cd from Mt proteins (5, 8, 9). Free Cd acts as a reactive oxygen species (ROS) stimulating agent. It's been reported that free Cd causes oxidative stress via binding to some of the electron transport chain complexes, and some dehydrogenase enzymes in mitochondria, then inducing the activities of other oxidant enzymes such as NADPH oxidase, causing an increase in ROS (5). Increased ROS cause cellular damage and cell death through various mechanisms (10). Cadmium also causes genotoxicity through 1) DNA hypermethylation leading to reduced tumor suppressor gene expression and 2) histone acetylation causing increased proinflammatory cytokine levels such as IL-6, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$  (4). Another cellular protein affected by Cd is silenced information regulator 1 (SIRT1). SIRT1 is a Class III histone deacetylase and it reveals protective and regulatory effects on oxidative stress, inflammation, apoptosis, autophagy, and cell survival (11). SIRT1 unleashes its effects through many target molecules including NF- $\kappa$ B and p53. SIRT1 deacetylates and inhibits NF- $\kappa$ B, which is a well-known inflammatory protein that is associated with cellular damage in many oxidative and inflammatory processes. Besides, SIRT1 also deacetylates and inhibits the p53 protein which plays a major role in apoptosis (12). Many studies have shown that oxidative stress causes a decrease in SIRT1 activity whereas upregulated expression of SIRT1 protects the kidneys or ameliorates the toxic effects caused by oxidative stress (7, 13-16). Bax and

Bcl2 are also well-known proteins that play significant roles in the development of oxidative stress and mitochondria-mediated apoptosis (17). Bax stands as a pro-apoptotic protein, on the contrary, Bcl2 exerts anti-apoptotic effects. So, the tissue Bax/Bcl2 ratio is commonly used to predict especially the severity of oxidative stress-related mitochondrial damage (18).

Antioxidant effects of herbals are well-known and are attracting the attention of researchers worldwide. Ankaferd Blood Stopper® (ABS) is a medical product used to control minor and major hemorrhages for its hemostatic properties. ABS contains the extracts of *Urtica dioica* (nettle) root, *Vitis vinifera* (grape) dried leaf, *Glycyrrhiza glabra* (licorice) dried leaf, *Alpinia officinarum* (galangal) dried leaf, and *Thymus vulgaris* (thyme) dried herb. In recent years, researchers have focused on the antioxidant, antimutagenic and anti-inflammatory effects of ABS as well as its hemostatic effects (19-22). Since oxidative stress is the key process in the development of Cd-induced nephrotoxicity, in our study we aimed to investigate the possible ameliorative/therapeutic effects of ABS on Cd toxicity.

## Material and Method

### Animals and Experiment Protocols

Our project was approved by the Suleyman Demirel University Animal Experiments Local Ethics Committee with the decision dated 15.09.2022 and numbered 06/76. Experiments were carried out in Suleyman Demirel University Animal Production and Experimental Research Center within the framework of the procedures determined by the relevant ethics committee.

32 male Wistar Albino rats were kept in 12 hours of light and 12 hours of a dark cycle at 22-24 degrees during the experiment and were fed ad libitum. The rats were divided into 4 groups, 8 animals in each cage.

On the day of the experiment, 1 ml of saline was administered intraperitoneally (ip) to the control (C) group from the right inguinal region.

The ABS group was administered 1.5 ml/kg ABS (Ankaferd Health Products Ltd., Türkiye) ip from the right inguinal region on the day of the experiment (23). The Cd group received cadmium chloride (CdCl<sub>2</sub>, Catalog no: 13667, Alfa Aesar, USA) dissolved in saline at a dose of 2.5 mg/kg from the right inguinal region (24). ABS+Cd groups first received CdCl<sub>2</sub> at a single dose of 2,5 mg/kg from the right inguinal region.

One hour after the Cd administration, 1.5 ml/kg ABS was applied to the rats from the same area as ip.

One day after the Cd administration, rats were given 90 mg/kg Ketamine HCl and 10 mg/kg Xylazine for anesthesia. After sacrifice, blood, and kidney tissue were taken for biochemical and genetic analysis. Kidney tissues were homogenized with Ultra Turrax Janke & Kunkel T-25 homogenizer (IKA® Werke, Germany) and Bandelin Hd 4200 Ultrasonic Homogenizer in phosphate buffer (pH: 7.4) to perform the biochemical analyzes. Then, the homogenates were centrifuged at 10000 rpm for 10 minutes and the supernatants were aliquoted. Serum was obtained from blood samples after centrifugation at 3000 rpm for 10 minutes and aliquoted. All aliquots were stored at -80°C until analyze day.

### Biochemical Analyzes

Serum urea and creatinine levels were determined by spectrophotometric method with a Beckman Coulter AU5800 (Beckman Coulter, USA) and a commercial kit compatible with this device to show the kidney functions. To evaluate the oxidant-antioxidant status in kidney tissues of rats, TAS and TOS levels were measured spectrophotometrically using commercial kits (Rel Assay Diagnostics, Türkiye) by Beckman Coulter AU5800 autoanalyzer (Beckman Coulter, USA). The formula  $OSI = [(TOS / (TAS) \times 100)]$  was used to calculate the OSI values (25-27).

Superoxide dismutase (SOD) activity was measured from kidney tissue supernatants by the xanthine oxidase method using the Ransod commercial kit (Ransod Laboratories, United Kingdom). GPx activity was measured by the Valentine and Paglia method using a Ransel commercial kit (Ransod Laboratories, UK). Protein levels of supernatants were determined spectrophotometrically with a Beckman Coulter AU5800 autoanalyzer and compatible protein assay kit (Beckman Coulter, USA).

### Genetic Analyzes

#### RNA isolation

RNA isolation of kidney samples was performed with the GeneAll Ribospin RNA isolation kit (GeneAll Biotechnology, Korea). The amount and purity of the obtained RNAs were measured with the nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific NanoDrop™, USA). The concentration of each isolated RNA sample was standardized at 500ng/µl and stored at -80°C for the cDNA synthesis.

#### cDNA Synthesis

cDNA synthesis was carried out in a thermal cyclor

according to the protocol of A.B.T. cDNA Synthesis Kit (Atlas Biotechnology, Türkiye). The following concentrations were prepared for each sample: 10X reaction buffer 2 µl, dNTP mix (2.5 mM) 1 µl, Random hexamer (50 µM) 2 µl, Reverse Transcriptase (200 U/µl) 1 µl, RNase inhibitor 0.5 µl, RNase-free water 3.5 µl, and RNA sample 10 µl. The prepared mixture was placed in the thermal cycler and the kit protocol was used. All stages were performed in 1 cycle and obtained cDNAs were stored at -20 °C.

### qRT PCR

Primer designs were determined using the NCBI database. The genes and specific primer sequences used in the expression step are given in Table 1. Expression levels were measured by the Biorad CFX96 (Bio-Rad Laboratories, USA) real-time qPCR instrument using the A.B.T. 2X qPCR SYBR-Green MasterMix (Atlas Biotechnology, Türkiye). RT-qPCR conditions according to the manufacturer's protocol were pre-denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 40 cycles of 20 s at 95 °C and 30 s at 60 °C. Expression of the GAPDH gene was used for normalization and each sample was run in triplicate. The normalized data were made available for statistical analysis using the  $\Delta\Delta C_t$  method.

### Statistical Analyzes

Data distributions were analyzed using Shapiro-Wilk's test. Since our data were normally distributed, a one-way analysis of variance (ANOVA) test was used to compare the mean differences between groups. The

homogeneities of the data variances were evaluated with the Levene homogeneity test. Post-hoc Tukey test was used to evaluate inter-group comparisons. A p-value of less than 0.05 was considered significant.

## Results

### Oxidative Stress Markers

Tissue TAS and SOD levels were not significantly different between groups (TAS:  $F(3,28)=2.673$ ,  $p=0.067$ ; SOD:  $F(3,28)=2.641$ ,  $p=0.069$ ). However, there were significant differences in TOS, OSI, and GPx levels between groups (TOS:  $F(3,28)=21.08$ ,  $p<0.001$ ; OSI:  $F(3,28)=46.13$ ,  $p<0.001$ ; GPx:  $F(3,28)=8.367$ ,  $p<0.001$ ; Table 2).

TOS levels were significantly elevated in the Cd group compared to the other groups ( $p<0.001$  for all). OSI levels were also significantly increased in the Cd group than in the other groups (Cd vs C and Cd vs ABS,  $p<0.001$ ; Cd vs Cd+ABS,  $p=0.005$ ). There was also a significant increase in OSI levels in the Cd+ABS group compared to the both C and ABS groups ( $p<0.001$  for both, Table 2).

GPx levels were significantly decreased in the Cd group compared to the both C and ABS groups (Cd vs C,  $p<0.001$ ; Cd vs ABS,  $p=0.019$ ).

### Kidney Functions

One-way ANOVA showed significant differences in both urea and creatinine levels between groups (Urea:

**Table 1** Specific primers used in PCR analysis

Gene	Specific Primer Sequence	Product length
GAPDH (HouseKeeping)	F: AGGTTGTCTCCTGTGACTTC	130 bp
	R: CTGTTGCTGTAGCCATATTC	
SIRT1	F: GGTAGTTCCTCGGTGTCTCT	152 bp
	R: ACCCAATAACAATGAGGAGGTC	
P53	F: GAGTGCTGAAGGAGATCAATGAG	145 bp
	R: GTGGTCAGTCCGAGCCTTTT	
Bcl-2	F: ATCGCTCTGTGGATGACTGAGTAC	134 bp
	R: AGAGACAGCCAGGAGAAATCAAA	
Bax	F: AGGGTGGCTGGGAAGGC	93 bp
	R: TGAGCGAGGCGGTGAGG	

F: Forward, R: Reverse, GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, SIRT1: Silenced information regulator 1, Bcl-2: B-cell lymphoma 2, Bax: Bcl-2-associated X protein

**Table 2** Results of tissue oxidative stress parameters and serum kidney function tests

	Control Mean±SD	Cadmium Mean±SD	ABS Mean±SD	Cadmium+ABS Mean±SD
<b>TAS (mmol Trolox Eq/g protein)</b>	0.18 ± 0.03	0.20 ± 0.05	0.18 ± 0.02	0.16 ± 0.02
<b>TOS (µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/g protein)</b>	1.62 ± 0.39	<u>3.53 ± 0.82<sup>a,b,c</sup></u>	1.66 ± 0.43	2.26 ± 0.45
<b>OSI (Arbitrary Unit)</b>	0.90 ± 0.15	<u>1.79 ± 0.15<sup>a,b,d</sup></u>	0.90 ± 0.23	<u>1.45 ± 0.19<sup>e,f</sup></u>
<b>SOD (U/mg protein)</b>	15.57 ± 2.97	12.11 ± 2.32	14.19 ± 1.99	12.81 ± 3.21
<b>GPx (U/mg protein)</b>	2.49 ± 0.52	<u>1.41 ± 0.34<sup>a,g</sup></u>	2.10 ± 0.38	1.95 ± 0.49
<b>Urea (mg/dl)</b>	41.45 ± 11.08	<u>75.93 ± 14.17<sup>a,b,c</sup></u>	36.28 ± 13.21	44.67 ± 6.17
<b>Creatinine (mg/dl)</b>	0.36 ± 0.13	<u>0.81 ± 0.31<sup>a,b,d</sup></u>	0.31 ± 0.04	0.42 ± 0.15

'a': Cadmium vs. Control, p<0.001; 'b': Cadmium vs. ABS, p<0.001; 'c': Cadmium vs. Cadmium+ABS, p<0.001;  
'd': Cadmium vs. Cadmium+ABS, p<0.01; 'e': Control vs. Cadmium+ABS, p<0.001; 'f': ABS vs. Cadmium+ABS, p<0.01;  
'g': Cadmium vs. ABS, p<0.05.

F(3,28)=19.13, p<0.001; Creatinine: (F(3,28)=12.06, p<0.001). Serum urea levels were found to be significantly elevated in the Cd group compared to the other groups (p<0.001, Table 2.) Creatinine levels were also found significantly high in the Cd group compared to the other groups (Cd vs C and Cd vs ABS, p<0.001; Cd vs Cd+ABS, p=0.001). Serum urea and creatinine levels were not significantly different in the ABS group compared to the C group.

### Relative mRNA expressions

Kidney p53 mRNA expressions were elevated 2.11 fold in the Cd group compared to the C group (p<0.001, Fig. 1). ABS treatment with Cd administration decreased the p53 mRNA expression 0.55 fold compared to the Cd-only treated group (p=0.004, Fig. 1).

Mean SIRT1 mRNA expression was also decreased -but not significant- in the Cd group 0.59 fold compared to the C group (p=0.116, Fig. 1). ABS treatment with Cd caused a non-significant 1.61 fold increase in SIRT1 expression compared to the Cd group (p=0.201, Fig. 1). Also, SIRT1 expression was significantly 1.85 fold higher in the ABS group compared to the Cd group (p=0.038, Fig. 1).

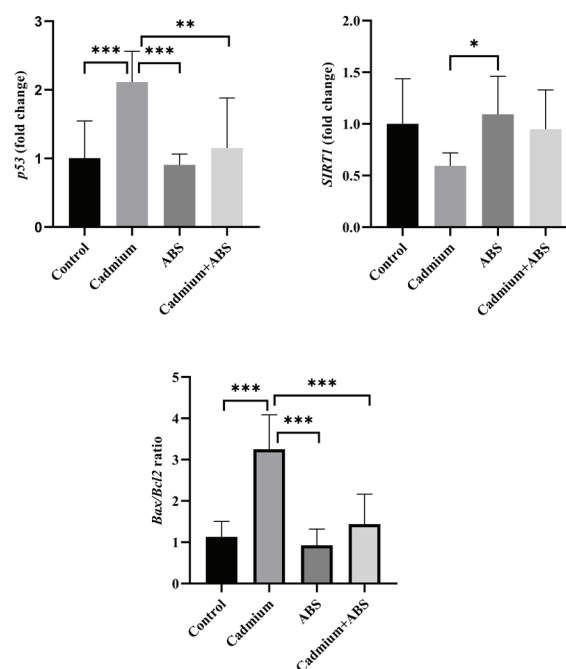
**Figure 1:**

Figure 1. Fold changes in mRNA expressions of p53 and SIRT1 genes and expression ratio of Bax to Bcl2 gene. \*\*\*: p<0.001; \*\*: p<0.01; \*: p<0.05.

There was a significant increase in Bax/Bcl2 ratio in the Cd group compared to the other groups ( $p < 0.001$  for all, Fig. 1). The ratio was 2.88 fold elevated in the Cd group compared to the C group and decreased 0.44 fold in the Cd+ABS group compared to the Cd group (Fig. 1).

## Discussion

In the current study, we have shown the negative effects of the ip. Cadmium administration on kidney functions via elevated serum urea and creatinine levels. For the underlying mechanisms, we have focused on oxidative stress markers and related genetic changes, as mentioned in the literature data. We have confirmed the increased oxidative stress by measuring tissue TAS, TOS, OSI levels, and activities of SOD and GPx. We also showed the changes in mRNA expressions of p53, SIRT1, Bax, and Bcl2, which are some of the prominent oxidative stress-affected proteins. As we aimed in the study, we showed that ABS - a herbal mix medical product- ameliorated the Cd-induced nephrotoxicity in rats.

The antioxidant effects of the herbals are well-known, and the intracellular molecular effects of many of them are well documented in the literature. The most important compounds in herbal products that act as antioxidants are polyphenols, sterols, carotenoids, and flavonoids. These compounds have free radical-scavenging effects mainly by donating a hydrogen atom to the free radicals or quenching oxygen, and some of them chelate metal ions that are taking part in oxidation reactions (28). Specifically for this study, all of the plant extracts in the ABS are known to have strong antioxidant and chelating properties.

There are a limited number of studies evaluating the protective effects of *Urtica dioica* in heavy metal toxicity. Siouda et al. showed the renal protective effects of *Urtica dioica* against HgCl<sub>2</sub> administration by measuring serum urea, creatinine levels, and kidney glutathione (GSH) levels, (29). Similarly, in 2021, Aldulaimi et al. showed that *Urtica dioica* treatment against copper sulfate toxicity caused a decrease in high serum urea and creatinine levels (30). Although these studies are not sufficiently detailed, they may be considered as remarkable as they reflect the renoprotective effects of *Urtica dioica* in heavy metal poisoning.

Resveratrol is the most important polyphenolic component of *Vitis vinifera* leaf, which is known to be responsible for its antioxidant and protective effects (31). Recent studies have shown strong ameliorative

effects of resveratrol in heavy metal-induced toxicity (32, 33). Among these studies, the most similar and comparable to our study was conducted by Cirmi et al. in 2021. In their study, the combined and separate effects of bergamot juice, curcumin, and resveratrol in Cd-induced kidney damage were evaluated. 2 mg/kg CdCl<sub>2</sub> was administered ip for 14 days to mice, concurrently with and without 20 mg/kg oral resveratrol. It was shown that Cd injection caused significant deteriorative alterations in the levels of urea, creatinine, GSH, GPx, and mRNA expressions of p53, Bax, and Bcl2. Resveratrol treatment has been found to reduce serum urea and creatinine levels and significantly increase kidney GSH and GPx levels. It was also found that resveratrol treatment reduced p53 and Bax mRNA expressions, but didn't change Bcl2 expressions. Unlike ours, neither the Bax/Bcl2 ratio was reported nor SIRT1 was studied in this study. In addition, this work has confirmed the oxidative stress with GSH and GPx, but we further measured TAS, TOS, OSI, and SOD levels. Even though the treatment durations and doses were different from our study, the results were strongly concordant with ours (33).

Dirican and Turkez found that *Glycyrrhiza glabra* extract ameliorated the genotoxicity, cytotoxicity, and oxidative stress (34). Mohamed et al. found that *Glycyrrhiza glabra* extract increased kidney GSH, SOD, catalase (CAT), kidney injury molecule (KIM 1) levels and reduced serum urea, creatinine levels, and kidney thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels in rats treated with 10 mg/kg CdCl<sub>2</sub> for 4 weeks (35). In addition to these studies, a study performed on fish (*O. niloticus*) indicated that *Glycyrrhiza glabra* reduced heavy metal accumulation in the flesh of the fish (36).

Arab et al. comprehensively studied the effects of *Alpinia officinarum* on Cd-induced renal damage. They reported that *Alpinia officinarum* extract improved kidney functions, mitigated oxidative stress, and showed antiapoptotic and cytoprotective effects throughout Bax/Bcl2 and SIRT1-mediated pathways (14).

*Thymus vulgaris*, another component of the ABS, has also been indicated to relieve renal functions and oxidative stress in Cd-induced nephrotoxicity (37, 38). The results we found in our research are generally compatible with the studies mentioned above, but these studies separately investigate the effects of the components in ABS on heavy metal toxicity. There is no research that examined the effects of all components of ABS together on heavy metal toxicity. Studies on ABS in the literature generally investigate its usage in



surgery. Nowadays, investigating the effects of ABS at the molecular level is gaining importance.

Recent studies suggest that ABS induces apoptosis and exhibits antineoplastic properties in osteosarcoma, malignant melanoma, colon cancer, and bladder cancer cells (39). But in case of severe damage in normal cells, ABS may show cytoprotective effects. For example, Koşmaz and Durhan suggested that ABS could mitigate experimental liver damage via its anti-inflammatory and antioxidant properties (40). Buyuktiryaki et al. found that ABS ameliorates necrotizing enterocolitis by suppressing apoptotic factors (41). Huri et al performed partial nephrectomy in rats and when the bleeding is mild or moderate, ABS induced renal tubular apoptosis; however, in the case of massive bleeding from the kidney tissue due to surgery, ABS decreased apoptosis in renal cells (42).

The main mechanism accused in the pathogenesis of Cd-induced toxicity is oxidative stress. Although TAS and SOD levels remained unchanged, the Cd group showed increased TOS and OSI levels and decreased GPx levels in our study. Since we have observed the acute effects of Cd and ABS, alterations in TAS and SOD may not have emerged yet. Although, our genetic analysis results suggested that ABS has a prominent anti-apoptotic effect on Cd-induced nephrotoxicity via Bax/Bcl2 pathway whereas this effect seems to be independent of antioxidant activity. Also, the change in SIRT1 levels was not statistically significant but the alterations in p53 levels support that ABS reduced apoptosis in Cd-induced kidney damage. SIRT1 also modulates inflammatory pathways, and ABS may have reduced apoptosis by exerting anti-inflammatory effects. However, as a limitation, inflammatory pathways were not investigated in our study.

## Conclusion

Taken together, we have revealed that ABS showed renoprotective effects by decreasing oxidative stress and mitochondria-mediated apoptosis, even in acute Cd exposure. In further studies, the intracellular effects of ABS may be elucidated in more detail by histological analyzes and measurement of protein levels. In addition, the application of different treatment doses and durations of ABS can be useful in terms of the possibility of seeing beneficial changes depending on the dose and time.

## Acknowledgment

The authors thank Dr. M. Yusuf Tepebaşı for his support in genetic analysis.

## Conflict of Interest Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

## Ethical Approval

This study was approved by the Suleyman Demirel University Animal Experiments Local Ethics Committee with the decision dated 15.09.2022 and numbered 06/76. Experiments were carried out in Suleyman Demirel University Animal Production and Experimental Research Center within the framework of the procedures determined by the relevant ethics committee.

## Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

## Availability of Data and Materials

Data is available on request from the authors.

## Authors Contributions

II: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Investigation; Methodology; Visualization; Writing-original draft.

HIB: Conceptualization; Formal analysis; Investigation; Methodology; Project administration; Supervision; Validation; Writing-review & editing.

## References

1. Kubier A, Wilkin RT, Pichler T. Cadmium in soils and groundwater: a review. *Applied Geochemistry*. 2019;108:104388.
2. Ruoyu W, Panting S, Yahui G, Ping J, Yuliang C, Hang Y, et al. Cadmium in food: Source, distribution and removal. *Food Chemistry*. 2023;405:134666.
3. Zhao D, Wang P, Zhao F-J. Dietary cadmium exposure, risks to human health and mitigation strategies. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 2022;1-25.
4. Guo AH, Kumar S, Lombard DB. Epigenetic mechanisms of cadmium-induced nephrotoxicity. *Current Opinion in Toxicology*. 2022;100372.
5. Yan L-J, Allen DC. Cadmium-induced kidney injury: Oxidative damage as a unifying mechanism. *Biomolecules*. 2021;11(11):1575.
6. Liu J, Qu W, Kadiiska MB. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2009;238(3):209-14.
7. Ma Y, Su Q, Yue C, Zou H, Zhu J, Zhao H, et al. The effect of oxidative stress-induced autophagy by cadmium exposure in kidney, liver, and bone damage, and neurotoxicity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(21):13491.
8. Souza-Arroyo V, Fabián JJ, Bucio-Ortiz L, Miranda-Labra RU, Gomez-Quiroz LE, Gutiérrez-Ruiz MC. The mechanism of the cadmium-induced toxicity and cellular response in the liver. *Toxicology*. 2022:153339.
9. Gao M, Dong Z, Sun J, Liu W, Xu M, Li C, et al. Liver-derived exosome-laden lncRNA MT1DP aggravates cadmium-induced nephrotoxicity. *Environmental Pollution*. 2020;258:113717.
10. Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A, Park JW, Nakahira K, Wang X, et

- al. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2007;9(1):49-89.
11. Dong Y-j, Liu N, Xiao Z, Sun T, Wu S-h, Sun W-x, et al. Renal protective effect of sirtuin 1. *Journal of Diabetes Research*. 2014;2014.
  12. Ogura Y, Kitada M, Koya D. Sirtuins and renal oxidative stress. *Antioxidants*. 2021;10(8):1198.
  13. Alshammari GM, Al-Qahtani WH, AlFaris NA, Albekairi NA, Alqahtani S, Eid R, et al. Quercetin alleviates cadmium chloride-induced renal damage in rats by suppressing endoplasmic reticulum stress through SIRT1-dependent deacetylation of Xbp-1s and eIF2 $\alpha$ . *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021;141:111862.
  14. Arab HH, Ashour AM, Eid AH, Arafa E-SA, Al Khabbaz HJ, Abd El-Aal SA. Targeting oxidative stress, apoptosis, and autophagy by galangin mitigates cadmium-induced renal damage: Role of SIRT1/Nrf2 and AMPK/mTOR pathways. *Life Sciences*. 2022;291:120300.
  15. Dong W, Yan L, Tan Y, Chen S, Zhang K, Gong Z, et al. Melatonin improves mitochondrial function by preventing mitochondrial fission in cadmium-induced rat proximal tubular cell injury via SIRT1–PGC-1 $\alpha$  pathway activation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2022;242:113879.
  16. Kim J-Y, Jo J, Kim K, An H-J, Gwon M-G, Gu H, et al. Pharmacological activation of Sirt1 ameliorates cisplatin-induced acute kidney injury by suppressing apoptosis, oxidative stress, and inflammation in mice. *Antioxidants*. 2019;8(8):322.
  17. Susnow N, Zeng L, Margineantu D, Hockenbery DM. Bcl-2 family proteins as regulators of oxidative stress. *Seminars in Cancer Biology*. 2009;19(1):42-9.
  18. Alsawaf S, Alnuaimi F, Afzal S, Thomas RM, Chelakkot AL, Ramadan WS, et al. Plant flavonoids on oxidative stress-mediated kidney inflammation. *Biology*. 2022;11(12):1717.
  19. Güneş E. Antioxidant effects of ankaferd blood stopper doped polyvinyl pyrrolidone in an experimental model created in insect. *Food and Chemical Toxicology*. 2021;148:111935.
  20. Uğur A, Sarac N, Cankal DA, Özle M. The antioxidant and antimutagenic activities of Ankaferd blood stopper, a natural hemostatic agent used in dentistry. *Turkish Journal of Medical Sciences*. 2016;46(3):657-63.
  21. Koluman A, Akar N, Malkan UY, Haznedaroglu IC. Qualitative/chemical analyses of Ankaferd hemostat and its antioxidant content in synthetic gastric fluids. *BioMed Research International*. 2016;2016.
  22. Koçak E, Akbal E, Taş A, Köklü S, Karaca G, Can M, et al. Anti-inflammatory efficiency of Ankaferd blood stopper in experimental distal colitis model. *Saudi Journal of Gastroenterology: Official Journal of the Saudi Gastroenterology Association*. 2013;19(3):126.
  23. Hortu I, Ozceltik G, Karadadas E, Erbas O, Yigitturk G, Ulukus M. The role of ankaferd blood stopper and oxytocin as potential therapeutic agents in endometriosis: a rat model. *Current Medical Science*. 2020;40(3):556-62.
  24. Abdel-Moneim AM, Said KM. Acute effect of cadmium treatment on the kidney of rats: biochemical and ultrastructural studies. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*. 2007;10(20):3497-506.
  25. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*. 2004;37(4):277-85.
  26. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*. 2005;38(12):1103-11.
  27. Altindag O, Erel O, Soran N, Celik H, Selek S. Total oxidative/anti-oxidative status and relation to bone mineral density in osteoporosis. *Rheumatology International*. 2008;28(4):317-21.
  28. Embuscado ME. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants—a mini review. *Journal of Functional Foods*. 2015;18:811-9.
  29. Siouda W, Abdennour C. Can *Urtica dioica* supplementation attenuate mercury intoxication in Wistar rats? *Veterinary World*. 2015;8(12):1458.
  30. Aldulaimi AMA, Al Jumaily A-AIH, Husain FF. The effect of aqueous *Urtica dioica* extract in male rats exposed to copper sulfate poisoning. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2021;735:012008.
  31. Katalinic V, Mozina SS, Generalic I, Skroza D, Ljubenkovic I, Klancnik A. Phenolic profile, antioxidant capacity, and antimicrobial activity of leaf extracts from six *Vitis vinifera* L. varieties. *International Journal of Food Properties*. 2013;16(1):45-60.
  32. Fu B, Zhao J, Peng W, Wu H, Zhang Y. Resveratrol rescues cadmium-induced mitochondrial injury by enhancing transcriptional regulation of PGC-1 $\alpha$  and SOD2 via the Sirt3/FoxO3a pathway in TCMK-1 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017;486(1):198-204.
  33. Cirmi S, Maugeri A, Micali A, Marini HR, Puzzolo D, Santoro G, et al. Cadmium-induced kidney injury in mice is counteracted by a flavonoid-rich extract of bergamot juice, alone or in association with curcumin and resveratrol, via the enhancement of different defense mechanisms. *Biomedicines*. 2021;9(12):1797.
  34. Dirican E, Turkez H. In vitro studies on protective effect of *Glycyrrhiza glabra* root extracts against cadmium-induced genetic and oxidative damage in human lymphocytes. *Cytotechnology*. 2014;66(1):9-16.
  35. Mohamed NE-S. Effect of aqueous extract of *glycyrrhiza glabra* on the biochemical changes induced by cadmium chloride in rats. *Biological Trace Element Research*. 2019;190(1):87-94.
  36. Mohammed E, Kamel M, El Iraqi K, Tawfik AM, Khattab MS, Elsabagh M. Zingiber officinale and *Glycyrrhiza glabra*, individually or in combination, reduce heavy metal accumulation and improve growth performance and immune status in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Research*. 2020;51(5):1933-41.
  37. Onoja RI, Chukwudi CU, Emejuo NT, Ugwuanyi HE, Ugwueze EU. Possible ameliorative effects of hydromethanol extract of *Thymus vulgaris* on cadmium induced hepatorenal toxicity in rats. *Notulae Scientia Biologicae*. 2020;12(3):568-77.
  38. Abou Asa S, El-Nahass E-S, Abdelhady D. Protective effect of thymus vulgaris extract against cadmium induced nephrotoxicity and testicular damage in albino rats. *Assiut Veterinary Medical Journal*. 2018;64(156):142-53.
  39. Sarı H, Çelik S, Çağlar F, Aktaş S, Bozkurt O, Yörükoğlu K, et al. A candidate antineoplastic herbal agent for bladder cancer: Ankaferd blood stopper. *International Journal of Clinical Practice*. 2021;75(11):e14789.
  40. Durhan A, Koşmaz K, Süleyman M, Tez M, Şenlikci A, Ersak C, et al. Assessment of Ankaferd Blood Stopper in experimental liver ischemia reperfusion injury. *Turkish Journal of Medical Sciences*. 2020;50(5):1421-7.
  41. Buyuktiryaki M, Tayman C, Koyuncu I, Cakir U, Turkmenoglu TT, Cakir E, et al. Therapeutic and preventative effects of ankaferd blood stopper in an experimental necrotizing enterocolitis model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019;110:105-10.
  42. Huri E, Haznedaroglu IC, Akgul T, Astarci M, Ustun H, Germiyanoulu C. Biphasic effects of ankaferd blood stopper on renal tubular apoptosis in the rat partial nephrectomy model representing distinct levels of hemorrhage. *Saudi Medical Journal*. 2010;31(8):864-8.

# PRESENCE OF POSTOPERATIVE HISTOPATHOLOGICAL MALIGNANCY IN PATIENTS WITH ATYPIA OF UNDETERMINED SIGNIFICANCE

## ÖNEMİ BELİRSİZ ATİPİLİ HASTALARDAKİ POSTOPERATİF HİSTOPATOLOJİK MALİGNİTE VARLIĞI

Salim İlksen BAŞÇEKEN<sup>1</sup>, Deniz TİKİCİ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Health Sciences University, Gazi Yaşargil Training and Research Hospital, Department of Surgical Oncology, Diyarbakır, TÜRKİYE

<sup>2</sup>Health Sciences University, Gazi Yaşargil Training and Research Hospital, Department of Gastroenterological Surgery, Diyarbakır, TÜRKİYE

**Cite this article as:** Başçeken Sİ, Tikici D. Presence of Postoperative Histopathological Malignancy in Patients with Atypia of Undetermined Significance. Med J SDU 2023; 30(1): 119-122.

### Öz

#### Amaç

Tiroid kanseri en sık görülen endokrin malignitesidir ve klinik görünümü nodüllerle karakterizedir. Tiroid patolojileri için yapılan biyopsilerde 'Önemi belirsiz atipi' (ÖBA) literatürdeki farklı malignite oranları nedeniyle klinisyenler için önemli bir endişe kaynağıdır. Bu çalışmada, AUS tanısı alan ve tiroid cerrahisi geçiren hastalarda malignite oranlarını güncel literatür ışığında sunmayı amaçladık.

#### Gereç ve Yöntem

2016-2021 yılları arasında kliniğimizde ince iğne aspirasyon biyopsisinde (İİAB) ÖBA tanısı alan ve tiroid cerrahisi uygulanan 174 hastanın demografik ve histopatolojik verileri retrospektif olarak analiz edildi. Hastalar histopatolojik özelliklerine göre malign ve benign olarak iki gruba ayrıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık Ki-kare ve Student t-testleri kullanılarak belirlenmiştir. P değeri <0.05 olarak kabul edilmiştir.

#### Bulgular

Yaş ortalaması 47.9±12 yıl (dağılım, 20-81) idi. Malignite oranı %43,5 idi. Kadınların %42,1'inde, erkeklerin

ise %50'sinde malignite tespit edildi. Ortalama nodül çapı 19,1±13,7 mm (1-97 mm) idi. Cinsiyet, yaş ve nodül çapı ile malignite arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı (p>0.05).

#### Sonuç

Bethesda sınıflamasına göre ÖBA için malignite oranı %15-30 olarak belirtilmiştir. Çalışmamızda malignite oranı, ülkemizde yapılan benzer çalışmalara benzer olarak, %43.5 saptanmıştır. ÖBA tanısıyla tiroid cerrahisi planlanan vakalarda, yüksek malignite olasılığı nedeniyle, lobektomiye alternatif olarak total tiroidektomi de bir seçenek olarak düşünülmelidir.

**Anahtar Kelimeler:** ATA kılavuzu, Bethesda sınıflaması, İİAB, Önemi belirsiz atipi, Tiroid kanseri.

#### Abstract

#### Objective

Thyroid cancer is the most common endocrine Malignancy, and nodules characterize its clinical presentation. 'Atypia of undetermined significance' (AUS) in biopsies performed for thyroid pathologies is an essential concern for clinicians due to different

Sorumlu yazar ve iletişim adresi /Corresponding author and contact address: S.İ.B. / salimilksen@gmail.com

Müracaat tarihi/Application Date: 16.01.2023• Kabul tarihi/Accepted Date: 10.03.2023

ORCID IDs of the authors: S.İ.B: 0000-0002-0918-3208; D.T: 0000-0003-1759-2973

malignancy rates in the literature. In this study, we aimed to discuss the malignancy rates in patients who underwent thyroid surgery for AUS.

### Material and Method

The demographic and histopathologic data of 174 patients diagnosed with AUS on fine needle aspiration biopsy (FNAB) and who underwent thyroid surgery in our clinic between 2016 and 2021 were retrospectively analyzed. According to histopathologic features, patients were divided into two groups, malignant and benign, and the relationship with age, gender, and nodule diameter was investigated. Statistical significance between groups was determined using Chi-square and Student t-tests. P value <0.05 was accepted.

### Results

The mean age was 47.9±12 years (range, 20-81).

The malignancy rate was 43.5%. Malignancy was detected in 42.1% of females and 50% of males. The mean nodule diameter was 19.1±13.7 mm (range, 1-97 mm). There was no statistically significant difference between gender, age, nodule diameter, and Malignancy (p>0.05).

### Conclusion

According to the Bethesda classification, the malignancy rate for AUS is 15-30%. In our study, the malignancy rate was 43.5%, similar to studies published in our country. Because of the high malignancy rate, total thyroidectomy should be considered an alternative to lobectomy in cases planned for surgery with a diagnosis of AUS.

**Keywords:** ATA guideline, Atypia of undetermined significance, Bethesda Classification, FNAB, Thyroid malignancy.

## Introduction

Thyroid cancer is the most common endocrine Malignancy and the ninth most common of all cancers (1). Although most cases are differentiated thyroid carcinoma, the life expectancy is over 90%. Ultrasonography-guided fine-needle aspiration biopsy (FNAB) is the most effective diagnostic tool for evaluating thyroid nodules (2).

The National Cancer Institute (NCI) published the Bethesda Classification in 2007 to report FNAB results. The Bethesda classification categorizes thyroid nodules as non-diagnostic, benign, atypia of undetermined significance (AUS) or follicular lesion of undetermined significance (FLUS), follicular neoplasia or suspected follicular neoplasia, suspected Malignancy, and malignant. AUS has been defined as smears containing cellular and/or nuclear atypia originating from follicular, lymphoid, or other cells but not containing sufficient findings for Malignancy or follicular neoplasia (3).

In this study, we aimed to present the malignancy rates in patients diagnosed with AUS and who underwent thyroid surgery in the light of current literature.

### Material and Method

Between 2016 and 2021, demographic and histopathologic data of 174 patients with FNAB diagnosis of AUS (Bethesda Category 3) and who underwent thyroid surgery in the Department of

General Surgery of Health Sciences University, Gazi Yaşargil Training and Research Hospital were retrospectively analyzed. In addition, six patients were excluded due to a history of head and neck radiation, concomitant cancer, and previous thyroid surgery.

All patients underwent routine neck ultrasonography preoperatively, and in case of suspicious nodules, FNAB was performed by endocrinologists. In addition, patients diagnosed with two times AUS on FNAB results underwent related thyroid lobectomy surgery.

### Statistical Analysis

Statistical analysis was conducted using SPSS for Windows, Version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Data were evaluated as mean±SD, and normality of distribution was used with the Kolmogorov-Smirnov test. Statistical significance between groups was determined using the chi-square and Student's t-tests. P value was accepted as <0.05.

### Results

168 patients who underwent thyroidectomy and had AUS twice with FNAB were included in the study. 142 (84.5%) were female, and 26 (15.5%) were male (Table 1). Female to male ratio was 5.46:1. Malignancy was detected in 42.1% of females and 50% of males. There was no statistically significant difference between gender and Malignancy (p=0.463) (Table 2). The mean age was 47.9±12 (range, 20-81). The mean age of malignant patients was 48.5±11.2 years and 47.4±12.5 for non-malignants. There was

**Table 1** Patients' Demographics and Histopathological Data

<b>Variables (Total)</b>	<b>168</b>
<b>Age (Year)</b>	47,9±12 (20-81)
<b>Gender (Ratio)</b>	5,46/1
Female (n/%)	142 (%84,5)
Male (n/%)	26 (%15,5)
Nodul Diameter (mm)	19,1±13,7 (1-97)
<b>Histopathologic Characteristics</b>	
Papillary Carcinoma	61 (%36,3)
WDT-UMP*	7 (%4,2)
Follicular Carcinoma	3 (%1,8)
Medullary Carcinoma	1 (%0,6)
Anaplastic Carcinoma	1 (%0,6)
Benign	95 (%56,5)

\* Well-Differential Carcinoma of Uncertain Potential for Malignancy

**Table 2** Relationship between Atypia of Uncertain Significance and Malignancy

Variables	Benign (n)	Malign (n)	P
<b>Gender</b>			,463
Female	82	60	
Male	13	13	
<b>Age</b>			,298
≤55	30	20	
>55	65	53	
<b>Nodul Diameter (mm)</b>	20±13,1 mm	18,9±14 mm	,444

no statistically significant difference between age and Malignancy ( $p=0.429$ ) (Table 2). Patients were divided into two groups based on age (Group 1: age>55 years, Group 2: age≤55 years), and no statistically significant difference was observed between Malignancy ( $p=0.298$ ) (Table 2). The malignancy rate was 43.5%. Demographic and histopathologic characteristics of the patients are shown in Table 1.

The mean nodule diameter was 19,1±13,7 mm (range, 1-97 mm). The characteristics of nodule diameter are shown in Table 2. There was no statistically significant difference between nodule diameter and malignancy status ( $p=0.444$ ).

## Discussion

In this study, we aimed to discuss the association of thyroid malignancy in patients who operated for AUS. Although the Bethesda classification has defined AUS, there are differences among clinicians in management. The most important reason for this situation is the variability in the rates of Malignancy (6-75%) for AUS in the literature (4-7). The most prominent example of this variability is in the 2007 Bethesda classification; the malignancy rate for AUS was 5-15% (8), whereas this rate changed to 15-30% in the 2017 Bethesda classification (9).

The Bethesda classification recommends a second FNAB in patients with AUS (9). In our clinic, following the American Thyroid Association (ATA) guideline, the relevant thyroid lobectomy operation is recommended for patients with two biopsies of AUS (10).

In our study, age, gender, and nodule diameter were not associated with thyroid malignancy in patients with AUS. The association of age, gender, and nodule diameter with thyroid malignancy has been reported in the ATA guideline (10). The literature review revealed that no study showed any association between these factors and an increased risk of Malignancy in patients diagnosed with AUS.

It is a well-known fact that there are racial/ethnic differences in the incidence and prognosis of thyroid cancer. Abelardo et al. reported that the rates of AUS-related thyroid malignancies in the Philippines and other Asian countries are much higher than in the general literature (11). This condition demonstrates that Bethesda Classification's category rates may vary in different countries. In a similar study conducted in our country, the malignancy rate was 49.1% (6). In the present study, thyroid malignancy rates were similarly high. So, it should be considered in terms of the surgical procedure chosen for patients scheduled for thyroidectomy with the diagnosis of AUS in Turkey.

In patients with radiologically suspected malignancy and cytology results consistently twice with 'Atypia of Undetermined Significance', total thyroidectomy may be an option in addition to lobectomy. The management of cases should be discussed in a multidisciplinary endocrine council based on age, radiologic features of the nodule, and the status of the other thyroid lobe. Thus, we consider that a second surgical intervention can be prevented in selected patients.

### Conflict of Interest Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

### Ethical Approval

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee (Gazi Yaşargil Training and Research Hospital Clinical Research Ethics Committee, Date: 30.12.2022, Decision No: 286).

### Consent to Participate and Publish

Informed consent forms could not be obtained due to the retrospective design of the study.

### Funding

This research did not receive any specific grant from

funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### Availability of Data and Materials

Data are available on request due to privacy or other restrictions.

### Authors Contributions

Conceptualization: SİB; Data curation: SİB, DT; Formal analysis: DT, SİB; Investigation: SİB, DT; Methodology: DT, SİB; Validation: SİB, DT; Visualization: SİB, DT; Writing-original draft: SİB, DT

### References

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249.
2. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, et al. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid.* 2009;19(11):1167-1214.
3. Cibas ES, Ali SZ. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *Thyroid.* 2009;19(11):1159-65.
4. Nayar R, Ivanovic M. The indeterminate thyroid fine needle aspiration: experience from an academic center using terminology similar to that proposed in the 2007 National Cancer Institute Thyroid Fine Needle Aspiration State of the Science Conference. *Cancer.* 2009;117:195-202.
5. Ryu YJ, Jung YS, Yoon HC, Hwang MJ, Shin SH, Cho JS, Lee JS, Kim HK, Kang HC, Lim HS, Yoon JH, Park MH. Atypia of undetermined significance on thyroid fine needle aspiration: surgical outcome and risk factors for malignancy. *Ann Surg Treat Res.* 2014;86(3):109-14
6. Akin Ş, Helvacı N, Çınar N, Önder S, Bayraktar M. Atypia of Undetermined Significance in Thyroid Fine-Needle Aspiration Cytology: Pathological Evaluation and Risk Factors for Malignancy. *South Clin Ist Euras.* 2017; 28(2): 82-86
7. Kakudo K, Higuchi M, Hirokawa M, et al. Thyroid FNA cytology in Asian practice-Active surveillance for indeterminate thyroid nodules reduces overtreatment of thyroid carcinomas. *Cytopathology.* 2017;28:455-66
8. Ali SZ, Cibas ES. The Bethesda system for reporting thyroid cytopathology: definitions, criteria, and explanatory notes. New York: Springer; 2010
9. Ali SZ, Cibas ES. The Bethesda system for reporting thyroid cytopathology: definitions, criteria, and explanatory notes. 2nd ed. Cham: Springer; 2018.
10. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, Pacini F, Randolph GW, Sawka AM, Schlumberger M, Schuff KG, Sherman SI, Sosa JA, Steward DL, Tuttle RM, Wartofsky L. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid.* 2016;26(1):1-133.
11. Abelardo AD, Sotalbo KCJ. Clinical management of thyroid aspirates diagnosed as atypia of undetermined significance in the Philippines. *Gland Surg.* 2020;9(5):1788-1796.

# PROGNOSTIC VALUE OF KI67 IN BORDERLINE MUCINOUS OVARIAN TUMORS

## BORDERLINE MÜSİNÖZ OVER TÜMÖRLERİNDE KI67'NİN PROGNOSTİK DEĞERİ

İrfan ÖCAL<sup>1</sup>, Sinem DEMİR<sup>1</sup>

<sup>1</sup> İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Ana Bilim Dalı, İzmir, TÜRKİYE

**Cite this article as:** Öcal İ, Demir S. Prognostic Value of Ki67 in Borderline Mucinous Ovarian Tumors. Med J SDU 2023; 30(1): 123-129.

### Öz

#### Amaç

Overin müsinöz borderline tümörleri (MBT), borderline over tümörlerinin en sık görülen ikinci alt tipidir. Belirsiz patogenezi ve biyolojik davranışları nedeniyle, benign veya malign kategorilere açıkça sınıflandırılmadıkları için klinik seyir hakkında daha prognostik bilgi sağlayan ve rutin pratikte kolaylıkla değerlendirilebilecek bir parametrenin belirlenmesine ihtiyaç vardır. Ki67, tümör hücreleri de dahil olmak üzere hücresele proliferasyonla güçlü bir şekilde ilişkili olan ve rutin olarak kullanılan bir immünohistokimyasal belirteçtir. Bu çalışmada MBT'lerde Ki67 sayımının prognostik önemini değerlendirmeyi ve prognostik eşik değerini belirlemeyi ve klinikopatolojik özellikleri, nüks ve uzun süreli sağkalım durumu ile ilişkisini araştırmayı ve ayrıca literatüre daha fazla bilgi sağlamayı amaçladık.

#### Gereç ve Yöntem

Müsinöz borderline over tümörü tanısı koyulan toplam 20 vaka çalışmaya alındı. Tümörü en iyi temsil eden örnek üzerinde immünohistokimyasal çalışmalar yapıldı. Nükleer boyanma pozitif kabul edildi ve iki patoloğ tarafından değerlendirildi

#### Bulgular

Ki67 proliferasyon indeksi (P.I) medyan %15 (1-47% ve ortalama %16'dır. Ki67 P.I. progresyonla %20 eşik değerinde ve 5 yıllık OS ile %30 eşik değerinde ista-

tistiksel olarak anlamlılığa ulaştı. (sırasıyla p=0.021 ve p=0.032). Ki67 P.I. yaşla birlikte artma eğilimindeydi. Ki67 P.I. ile tümör boyutu, lateralite, kapsül bütünlüğü, intraepitelyal karsinom ve fokal atipi dahil olmak üzere diğer klinikopatolojik parametreler arasında istatistiksel bir ilişki yoktu.

#### Sonuç

Çalışmamızda Ki67 %20'den yüksek olduğunda nüksün daha sık oluşu, Ki67 %30'dan yüksek olduğunda 5 yıllık sağkalımın daha düşük oluşu Ki67 indeksinin daha agresif seyir ve ölüm ile ilişkili olduğunu düşündürdü. Bu nedenle Ki 67'nin hastaların takip sıklığını belirlemede ve prognozlarını tahmin etmede faydalı olacağını öngördük. Ancak bu sonucun daha geniş seriler ile desteklenmesi gerektiğini düşünüyoruz.

**Anahtar Kelimeler:** Borderline, Ki67, Müsinöz, Over, Tümör

#### Abstract

#### Objective

Ovarian borderline tumors (OBTs) are an intermediate type of ovarian neoplasm. Ovarian mucinous borderline tumors (MBT) are the second most common subtype of OBT. Because of their uncertain pathogenesis and biological behaviour they cannot be classified clearly into benign and malignant categories. There is a need to identify a parameter that provides more prog-

**Sorumlu yazar ve iletişim adresi /Corresponding author and contact address:** İ.Ö. / drirfanocal@hotmail.com

**Müracaat tarihi/Application Date:** 11.10.2022 • **Kabul tarihi/Accepted Date:** 12.03.2023

**ORCID IDs of the authors:** İ.Ö: 0000-0002-9748-9871; S.D: 0000-0001-7982-1917

nostic information about the clinical course and can be evaluated easily in routine practice. Ki67 is a routinely used immunohistochemical marker that is strongly associated with cellular proliferation, including tumor cells. We aimed in this study to evaluate the prognostic significance and to determine prognostic cut-off value of Ki67 counting in the MBTs and to investigate its relationship with clinicopathologic features, recurrence, and long term survival status and also to provide more information to the literature.

### Material and Method

A total of 20 cases diagnosed with ovarian mucinous borderline tumors were identified. Immunohistochemical studies were performed on the most representative sample of the tumor. Positive signal was nuclear and it was evaluated by two pathologists.

### Results

Ki67 proliferating index (P.I) value with a median of 15% (1-47%) and a mean of 16% Ki67 P.I. reached

statistical significance at 20% cut-off value with progression and at 30% cut-off value with 5-year OS. ( $p=0.021$  and  $p=0.032$ , respectively). Although the Ki67 P.I. tended to increase with age, there was no statistical association between Ki67 P.I. and other clinicopathological parameters including tumor size, laterality, capsule integrity, intraepithelial carcinoma and focal atypia.

### Conclusion

In our study, recurrence was more frequent when Ki67 was greater than 20%, and 5-year survival was lower when Ki67 was greater than 30%, suggesting that the Ki67 index was associated with a more aggressive course and death. Therefore, we predicted that Ki 67 would be useful in determining the frequency of follow-up of patients and predicting their prognosis. However, we think that this result should be supported by larger series.

**Keywords:** Borderline, Mucinous, Ovary, Tumor, Ki67

## Introduction

Ovarian borderline tumors (OBTs) are an intermediate group of neoplasm that do not classify clearly into benign and malign categories, due to their lack of understanding biological behavior, uncertain pathogenesis, and unclear management (1). Ovarian mucinous borderline tumors (MBT) are the second most common subtype of OBT with a rate of about 30% to 50% in North America and Europe, but they are the most common subtype of OBT in Asia.(2)MBT is defined as an architecturally complex non-invasive mucinous neoplasm showing gastrointestinal-type differentiation (2). MBTs usually present as large, unilateral, variable-sized cystic masses and may contain multiple cystic areas (3). The mean tumor size is about 20 cm, some cases may be as large as 50 cm (2). Epithelial stratification with small papillary infoldings or tufts must cover at least 10% of all the tumors (4). Otherwise, the diagnosis should be mucinous cystadenoma with focal epithelial proliferation. The nuclear atypia is generally low grade (2). A part of the tumors may contain acellular mucin pools within the stroma and may develop granulomatous response against the ruptured glands and extracellular mucin (5).

The distinction of MBTs from their benign forms is very important but establishing the correct diagnoses can be difficult in these tumors. Overdiagnoses should be avoided because of their clinical outcomes regarding

staging and follow-up (3). For this reason, detailed macroscopic examination and enough sampling are mandatory for these tumors, and at least one section per centimeter's largest tumor size should be sampled. In addition, it is recommended to increase to two blocks sampling in mucinous tumors that are larger than 10 cm (4). Standart treatment protocol consists of total surgical resection and surgical staging includes omentectomy, peritoneal sampling, appendectomy, and peritoneal washing for cytology (6, 7).

Clarifying the biology of borderline tumors and their risk of progression to invasive form has been wondered by researchers since the category was identified (8). However, over the years, it was observed that these tumors were related to quite heterogeneous behavior and many potential prognostic parameters were investigated (9). There is a need to identify a parameter that provides more prognostic information about the clinical course and can be evaluated easily in routine practice. Ki67 is a routinely used immunohistochemical marker that is strongly associated with cellular proliferation, including tumor cells. It labels nuclear protein (encoded by MKI67 gene) of the proliferating cells (10). Ki67 proliferation index is often related with the clinical course of cancers (8). There are neoplasms such as neuroendocrine tumors that Ki67 assessment has been accepted an independent prognostic parameter so that their grading system based on the Ki67 counting (11). In several tumors such as breast



cancers, in addition to assessment of hormonal status, Ki67 counting is used to make risk stratification. To date, the prognostic importance of Ki67 counting has not been adequately evaluated in OBTs. There is limited reports in the literature on this subject.

Our purpose in this study was to evaluate the prognostic significance of Ki67 counting in the MBTs and to investigate its relationship with clinicopathologic features, recurrence, and long term survival status and also to provide more information to the literature.

## Material and Method

A total of 20 cases diagnosed with pure mucinous borderline ovarian tumors from hysterectomy ± unilateral or bilateral salpingooferectiony surgery and no other malignancy between the years 2010 to 2019 in the Izmir Katip Celebi University Atatürk Training and Research Hospital were included in the study. The clinicopathological informations including tumor size, laterality, age at diagnoses, and death if occurred, were obtained from the hospital database. An extensive sampling was performed to all the tumors. Then, the most demonstrative Hemotoxylin-Eosin (H&E) section was selected for Ki67 immunohistochemical staining. Full-thickness 5 µm sections were obtained from formalin-fixed, paraffin-embedded blocks from all cases. Immunohistochemical staining was evaluated on microwave oven processed formalin-fixed paraffin-embedded tissue, and citrate pH 6 as antigen retrieval. The immunohistochemical staining was provided by Ventana Detection System. The Ki67 antibody clone was 30-9 rabbit monoclonal primary antibody (Ventana). Brown nuclear staining was considered positive and was evaluated by two pathologists independently. Discordant results were reevaluated in double-headed microscopes and a consensus was reached. All H&E sections were scanned at low magnification to chose the "hot spot" area for Ki67 proliferating index (P.I.) assessment. Then, cells showing nuclear staining were counted in at least 500 neoplastic cells and the average of the obtained values were calculated (figure 1).

## Statistical Analyses

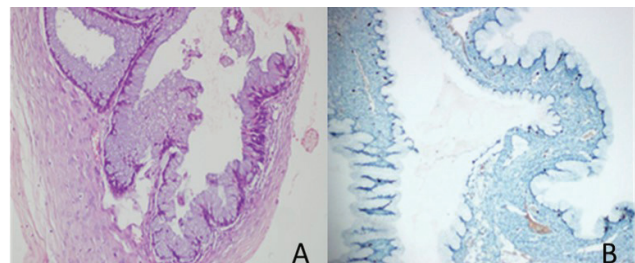
Disease-free survival (DFS) was evaluated from the surgery time to any status related to disease (disease relapse, metastasis) or death. Overall survival (OS) was defined as the period from the surgery time until the date of death from any event or the date who was alive on the last follow-up. For survival status, the last follow-up date was February 2021.

Pearson's Chi-square and Fisher's exact tests were

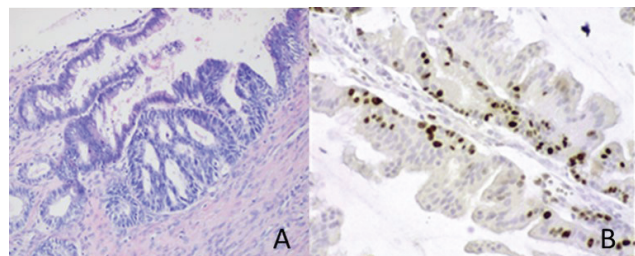
performed to evaluate the association between the Ki67 P.I. and clinicopathological variables. We investigated statistical association of Ki67 P.I. with progression, 5-year DFS, and 5-year OS with increasing values of ten percent (eg. 10%, 20%, and 30%). SPSS for Microsoft Windows Software (version 18.0, SPSS Chicago, IL, USA) was used for statistical analyses. A P-value ≤ 0.05 was considered statistically significant. Kaplan-Meier curves were used to determine 5-year DFS, 5-year OS with the long-rank test.

## Results

The study population consisted of totally 20 patients. The medical data of all patients were reviewed retrospectively (Table 1). The age at diagnosis of patients ranged from 29 to 94 with a median of 50.5 years. The tumors tended to be predominantly located in left over (left over, n=15/20 (75%) and right over, n=4/20 (%25)). The tumor diameter ranged from 4 cm to 30 cm with a median size of 17 cm and an average size of 18.9 cm. There were accompanying intraepithelial carcinoma (figure 2) and focal atypia in two cases (case 1 and case 4, respectively). Except two cases (case 11 and case 17), the capsule was intact in the remaining cases. The surgical procedures were hysterectomy and adnexectomy. Hysterectomy was performed to 11 patients (55%) and adnexectomy was performed to 9 patients (45%).



**Figure 1:** A-B) Borderline mucinous ovarian tumor (case 16) (Hematoxylin and eosin stain, X20) and Ki67 P.I. (X10) in the same case.



**Figure 2:** A-B) Borderline mucinous ovarian tumor with intraepithelial carcinoma (case 1) (Hematoxylin and eosin stain, 20x magnification) and Ki67 P.I. (40X magnification) in the same case.

**Table 1** Clinicopathological features of the patients in the study

Cases	Age (y)	Size (cm)	Lateralite	Surgery	Surface	Ki67	Prognostic factors	Recurrence	Death
1	59	10	left	H	intact	18%	intraepithelial carcinoma	no	no
2	37	13	left	U	intact	18%	no	no	no
3	52	10	left	H	intact	20%	no	no	no
4	50	15	left	H	intact	30%	focal atypia	yes	yes (after 5 years)
5	73	35	right	H	intact	25%	no	yes	yes
6	40	18	left	U	intact	4%	no	no	no
7	48	7	left	H	intact	2%	no	no	no
8	53	25	right	H	intact	32%	no	no	no
9	55	23	left	H	intact	32%	no	no	no
10	35	10	left	U	intact	3%	no	no	no
11	59	30	right	H	interrupted	2%	no	no	no
12	33	30	left	U	intact	22%	no	no	no
13	41	30	left	U	intact	2%	no	no	no
14	29	15	left	U	intact	1%	no	no	no
15	77	28	left	H	intact	12%	no	no	no
16	51	20	left	U	intact	5%	no	no	no
17	28	16	right	U	interrupted	9%	no	no	no
18	94	15	left	H	intact	47%	no	yes	no
19	31	10.5	left	U	intact	29%	no	no	no
20	57	18	left	H	intact	7%	no	no	no

The median follow-up time was 49 months (ranged 1-120 months). 5-yr OS could be evaluated for 16 patients. During the follow-up time, disease progression was observed in three patients as lung metastases (case 4), periton metastases (case 18) and local recurrence (case 5). The lung metastasis occurred at her 2nd month after the operation and the patient was lost in 58th month. The reason of death was unknown. The periton metastasis was observed at her 1st month after the operation and the patient was alive at her last follow-up. All metastases were confirmed to be of ovarian origin radiologically and immunohistochemically.

Ki67 P.I. was a median of 15% (1-47%) and a mean value of 16%. It has reached statistically significance at 20% cut-off value of Ki67 P.I. with progression and at 30% cut-off value of Ki67 P.I. with 5-year OS. ( $p=0.021$

and  $p=0.032$ , respectively). According to the death/alive status data of patients, the 5-year OS was 95%. The 5-year DFS was 89.4%. Although the Ki67 P.I. tended to increase with age, no statistical correlation was found. Also, there was no statistical association between the Ki67 P.I. and the other prognostic factors including intraepithelial carcinoma, focal atypia, capsule integrity, and tumor size (Table 2).

## Discussion

Borderline mucinous ovarian tumors which were defined as an intermediate category of neoplasia. In the present study were discussed and evaluated the prognostic significance of Ki67 P.I. and whether it correlates with clinicopathological characteristics of borderline mucinous ovarian tumors.

**Table 2** Relationship between Ki67 proliferating index and clinicopathologic prognostic factors

	Ki67 P.I. (cut off 10%) p-value	Ki67 P.I. (cut off 20%) p-value	Ki67 P.I. (cut off 30%) p-value
<b>Age</b> (<45, >45)	0.19	0.26	0.06
<b>Tumor size</b> (<10 cm, >10 cm)	0.25	0.4	0.6
<b>Lateralite</b> (right/left ovary)	0.82	0.64	0.78
<b>Capsul integrity</b> (intact, interrupted)	0.09	0.22	0.45
<b>Prognostic factors (+/-)</b>	0.17	0.76	0.26
<b>Recurrence</b>	0.08	<b>0.021</b>	<b>0.028</b>
<b>5-yr overall survival</b>	0.3	0.12	<b>0.032</b>

MBTs occur in a wide age range with mean age of 45 years, including pediatric patients (2). In our study, similar to Guadagno et al.'s results, the patient's ages were mostly over 40 years old (12). When we compared the age groups with Ki67 P.I. in three cut-off values, there was no statistically significant difference above and before the age of 40. Guadagno et al. observed the Ki67 P.I. tended to be lower in patients under 40 years of age and was statistically significant. They determined the cut of value for Ki67 P.I. as 10% (12). This difference may be due to the fact that this study includes not only MBTs but also borderline serous ovarian tumors. Remarkably, in our population, Ki67 P.I. values were below 30% in all cases before the age of 40. Additionally, the maximum Ki67 P.I. value was detected in the oldest case (case 18-94 years old) and this patient later presented with relapse.

Intraepithelial carcinoma has been observed in approximately 40% to 55% of MBTs and defined as the fields showing high grade cytologic atypia (hyperchromasia, prominent nucleoli, and a significantly increased mitotic activity) and usually with marked demarcation (12, 13, 14). The diagnoses of intraepithelial carcinoma should be given based on the nuclear cytomorphology. Epithelial stratification or cribriform growth pattern is not compulsory. Although some studies in the literature observed that higher recurrence risk is associated with intraepithelial carcinoma most of studies reported no significant difference in overall survival (5, 15, 16). In our study, the results were concordant with the literature and there was no statistical significance in cases with or

without intraepithelial carcinoma (p-value < 0.05). We had not observed recurrence or death in the patient who had an area of intraepithelial carcinoma.

Due to the heterogeneous clinic behavior of borderline over tumors, it is difficult to predict the risk of disease progression. Therefore, supportive markers were needed and were thought that Ki67 could be an indicator for reflecting the disease progression. Although there are very few studies, the results were similar. In some studies in the literature reported that benign over tumors (7.5-12%) showed lower Ki67 expression than borderline neoplasms (22-40%) and higher positivity levels in carcinomas (55-70%). (17,18) Similarly, Giurgea et al. investigated the Ki67 immunopositivity in borderline tumors and its benign and malign counterparts. They observed that benign and borderline tumors presented low proliferation index (9.09% and 13.3%, respectively). Contrarily, the malign tumor's Ki67 P.I. was more than 50% (8). However, the number of studies which investigate the relationship between Ki67 proliferation index and risk of progression to malign form is quite rare, the available studies demonstrated the same results: low Ki67 expression in benign tumors is increasing in borderline and malignant forms. But it seems to be there is a significant difference between benign and malign forms but this difference does not exist between benign and borderline forms. From these results, we thought that increased expression may be associated development of malignancy. Munstedt et al. followed 92-patients with early stages of ovarian carcinomas and observed tumor recurrences and

overall survival status. Then, the patients who showed lower Ki67 expression (<10%) no recurred during the follow-up times but the recurrences occurred mostly in the patients who showed Ki67 expression more than 15% (19). This supports the relationship between higher Ki67 proliferating index and recurrences. In a large population study (n=202), it was found that 88% of BOTs showed less than 10% Ki67 expression (20).

Guadagno et al. observed Ki67 immunopositivity in their series of serous and mucinous borderline over tumors with an average value of 14% (12). In our study, MBTs had Ki67 P.I. with the average value was 16% and was slightly higher than that reported in the literature (8, 12). We have thought this difference might be due to the fact that our study only included MBTs. The reason we included only mucinous type of borderline over tumors in this study was to find more independent an objective Ki67 cut-off value in a more homogeneous group. We investigated whether there is a cut-off value such as in neuroendocrine tumors associated with progression or survival in our population. When we compared statistically with values increasing by ten percent (eg: 10%, 20%, and 30%), we found that at 20% Ki67 cut-off value was statistically associated with progression. (p=0.021). The cut-off value at 30% Ki67 cut off value was statistically significant with 5-yr OS (p=0.032)

Identification of markers that may predict the risk of disease progression in MBTs has a great significance. Especially, when it comes to fertility status in young women, it becomes more important to predict the risk of progression in terms of treatment modalities. Consequently, in our study, it was found that Ki67 P.I. more than 20% was associated with recurrence and more than 30% was associated with 5-yr OS. However, due to the limited number of patients in our study, we believe that further studies are needed to evaluate this possible correlation more clearly in large populations.

#### Conflict of Interest Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

#### Ethical Approval

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee (Izmir Katip Celebi University Non-Invasive Clinical Research Ethics Committee, Date: 04.03.2021, 2021-GOKAE-0116, Decision No: 0098).

#### Consent to Participate and Publish

Informed consent forms could not be obtained due to the retrospective design of the study.

#### Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

#### Availability of Data and Materials

Data are available on request due to privacy or other restrictions.

#### Authors Contributions

İ.Ö: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Investigation; Methodology; Validation; Visualization; Writing-original draft; Writing-review & editing.

S.D: Resources; Writing-review & editing.

#### References

- Longacre TA, Gilks CB. Surface Epithelial Stromal Tumors of the Ovary. In: Gynecologic Pathology. 1st Ed. London: Elsevier; 2009.
- Vang R, Khunamornpong S, Köbel M, Longacre TA, Ramalingam P. Who Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. Lyon: IARC; 2020.
- Hauptmann S, Friedrich K, Redline R, Avril S. Ovarian borderline tumors in the 2014 WHO classification: evolving concepts and diagnostic criteria. *Virchows Arch.* 2017;470(2):125–142. doi:10.1007/s00428-016-2040-8
- Kurman RJ, Carcangiu ML, Harrington CS, Young RH. WHO classification of tumours of female reproductive organs. Lyon: IARC; 2014.
- Rodríguez IM, Prat J. Mucinous tumors of the ovary: A clinicopathologic analysis of 75 borderline tumors (of intestinal type) and carcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2002;26(2):139-52. doi:10.1097/0000478-200202000-00001
- Cadron I, Leunen K, Van Gorp T, Amant F, Neven P, Vergote I. Management of borderline ovarian neoplasms. *J Clin Oncol.* 2007;25(20):2928-37. doi:10.1200/JCO.2007.10.8076
- Tinelli R, Tinelli A, Tinelli FG, Cicinelli E, Malvasi A. Conservative surgery for borderline ovarian tumors: A review. *Gynecol Oncol.* 2006;100(1):185-191. doi:10.1016/j.ygyno.2005.09.021
- Giurgea LN, Ungureanu C, Mihailovici MS. The immunohistochemical expression of p53 and Ki67 in ovarian epithelialborderline tumors. Correlation with clinicopathological factors. *Rom J Morphol Embryol.* 2012;53(4):967–973
- Malpica A, Longacre TA. Prognostic indicators in ovarian serous borderline tumours. *Pathology.* 2018;50(2):205-213. doi:10.1016/j.pathol.2017.12.001
- Klöppel G, La Rosa S. Ki67 labeling index: assessment and prognostic role in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Virchows Arch.* 2018;472(3):341-349. doi:10.1007/s00428-017-2258-0
- Rindi G, Arnold R, Bosman F. Nomenclature and classification of neuroendocrine neoplasms of the digestive system. In: WHO Classification of Tumors of the Digestive System. 4th Ed. Lyon: IARC; 2010.
- Guadagno E, Pignatiello S, Borrelli G, et al. Ovarian borderline tumors, a subtype of neoplasm with controversial behavior. Role of Ki67 as a prognostic factor. *Pathol Res Pract.* 2019;215(11):152633. doi:10.1016/j.prp.2019.152633
- Riopel MA, Ronnett BM, Kurman RJ. Evaluation of diagnostic criteria and behavior of ovarian intestinal- type mucinous tumors: Atypical proliferative (borderline) tumors and intraepithelial, microinvasive, invasive, and metastatic carcinomas.

- Am J Surg Pathol. 1999;23(6):617-35. doi:10.1097/00000478-199906000-00001
14. Khunamornpong S, Settakorn J, Sukpan K, Suprasert P, Siri-aungkul S. Mucinous tumor of low malignant potential ("borderline" or "atypical proliferative" tumor) of the ovary: A study of 171 cases with the assessment of intraepithelial carcinoma and microinvasion. *Int J Gynecol Pathol.* 2011;30(3):218-30. doi:10.1097/PGP.0b013e3181fcf01a
  15. Kim KR, Lee HI, Lee SK, Ro JY, Robboy SJ. Is stromal microinvasion in primary mucinous ovarian tumors with "mucin granuloma" true invasion? *Am J Surg Pathol.* 2007;31(4):546-54. doi:10.1097/01.pas.0000213430.68998.2c
  16. Lee KR, Scully RE. Mucinous tumors of the ovary: A clinicopathologic study of 196 borderline tumors (of intestinal type) and carcinomas, including an evaluation of 11 cases with "pseudomyxoma peritonei." *Am J Surg Pathol.* 2000;24(11):1447-64. doi:10.1097/00000478-200011000-00001
  17. Garzetti GG, Ciavattini A, Goteri G, et al. Ki67 antigen immunostaining (MIB 1 monoclonal antibody) in serous ovarian tumors: Index of proliferative activity with prognostic significance. *Gynecol Oncol.* 1995;56(2):169-74. doi:10.1006/gyno.1995.1026
  18. Halperin R, Zehavi S, Dar P, et al. Clinical and molecular comparison between borderline serous ovarian tumors and advanced serous papillary ovarian carcinomas. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2001;22(4):292-6.
  19. Münstedt K, Von Georgi R, Franke FE. Correlation between MIB1-determined tumor growth fraction and incidence of tumor recurrence in early ovarian carcinomas. *Cancer Invest.* 2004;22(2):185-94. doi:10.1081/CNV-120030206
  20. Heeran MC, Høgdall CK, Kjaer SK, et al. Prognostic value of tissue protein expression levels of MIB-1 (Ki-67) in Danish ovarian cancer patients: From the "MALOVA" ovarian cancer study. *APMIS.* 2013;121(12):1177-86. doi:10.1111/apm.12071



# PAROTİS BEZİNİN HIGH GRADE ONKOSİTİK MUKOEPİDERMOİD KARSİNOMU, MAML2 TRANSLOKASYONU, NADİR BİR OLGU

## HIGH-GRADE ONCOCYTIC MUCOEPIDERMOID CARCINOMA OF PAROTID GLAND, MAML2 TRANSLOCATION, A RARE CASE

Ramazan Oğuz YÜCEER<sup>1</sup>, Mehmet KIRAN<sup>1</sup>, İbrahim Metin ÇİRİŞ<sup>1</sup>, Yusuf Çağdaş KUMBUL<sup>2</sup>, Kayhan BAŞAK<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, Isparta, TÜRKİYE

<sup>2</sup> Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Anabilim Dalı, Isparta, TÜRKİYE

<sup>3</sup> Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Kartal Dr. Lütfi Kırdar Şehir Hastanesi, Patoloji Kliniği, İstanbul, TÜRKİYE

**Cite this article as:** Yuceer RO, Kiran M, Çiriş İM, Kumbul YÇ, Başak K. Parotis Bezinin High Grade Onkositik Mukoepidermoid Karsinomu, MAML2 Translokasyonu, Nadir Bir Olgu. Med J SDU 2023; 30(1): 131-134.

### Öz

Mukoepidermoid karsinom (MEK) tükürük bezinin en sık görülen malign tümürüdür ve en sık parotiste görülür. Onkositik mucoepidermoid karsinom (OMEK) nadir subtıptir. Burada 28 yaşında endometriyum kanseri nedeniyle takip edilen kadın hastanın, sağ parotiste izlenen kitlesinin primer tümör mü metastatik tümör mü olduğunu histolojik, immünhistokimyasal ve moleküler sonuçlarıyla sunmayı amaçladık.

**Anahtar Kelimeler:** MAML2, Mukoepidermoid karsinom, Onkositik, Parotis

### Abstract

Mucoepidermoid carcinoma (MEC) is the most common malignant tumor of the salivary gland and is most commonly seen in the parotid. Oncocytic mucoepidermoid carcinoma (OMEK) is a rare subtype. Here, we aimed to present the histological, immunohistochemical, and molecular results of a 28-year-old female patient followed for endometrial cancer, whether the mass in the right parotid is a primary or metastatic tumor.

**Keywords:** MAML2, Mucoepidermoid carcinoma, Oncocytic, Parotid

### Giriş

Baş boyun kanserlerinin %5'den azını tükürük bezi maligniteleri oluşturur ve bu malign tümörler en sık parotis bezinden kaynaklanır. Mukoepidermoid karsinom (MEK), tüm tükürük bezi tümörlerinin %10-15'ini oluşturur ve kadınlarda erkeklere göre daha sık izlenir (1). MEK; müsinöz, intermediate (berrak hücreli) ve skuamoid tümör hücrelerinden oluşmaktadır (2). Histolojik olarak sitolojik atipi derecesi, kist oluşum mik-

tarı, mukus, epidermoid ve intermediate hücre sayısı ile mitozla göre düşük, orta ve yüksek derece olarak sınıflandırılır (3). Düşük dereceli MEK, submandibular ve submental bezde daha sık izlenir ve erken evrede tespit edilir. Yüksek dereceli MEK ise, daha sık olarak parotis bezinde izlenir ve ileri evre ile ilişkilidir. MEK'in, berrak hücreli, onkositik, sklerozan, Warthin-benzeri, silyalı, iğsi hücreli ve mukoasiner histolojik varyantları vardır (4, 5).

**Sorumlu yazar ve iletişim adresi /Corresponding author and contact address:** R.O.Y. / r.yuceer66@hotmail.com

**Müracaat tarihi/Application Date:** 21.04.2022 • **Kabul tarihi/Accepted Date:** 05.08.2022

**ORCID IDs of the authors:** R.O.Y: 0000-0002-9418-8862; M.K: 0000-0002-9418-8862;

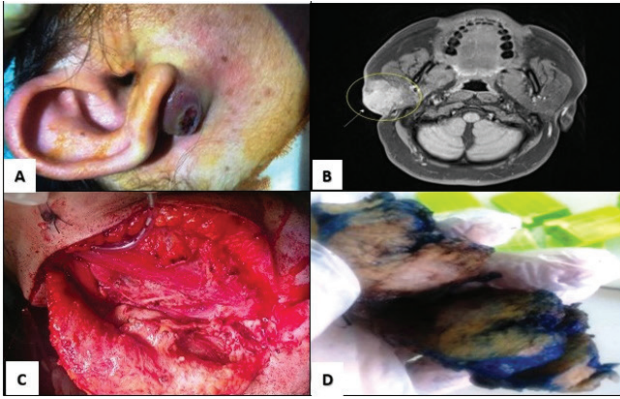
İ.M.Ç: 0000-0002-5619-4989; Y.Ç.K: 0000-0002-0713-2933; K.B: 0000-0003-1960-8924

## Giriş

Baş boyun kanserlerinin %5'den azını tükürük bezi maligniteleri oluşturur ve bu malign tümörler en sık parotis bezinden kaynaklanır. Mukoepidermoid karsinom (MEK), tüm tükürük bezi tümörlerinin %10-15'ini oluşturur ve kadınlarda erkeklere göre daha sık izlenir (1). MEK, müsinöz, intermediate (berrak hücreli) ve skuamoid tümör hücrelerinden oluşmaktadır (2). Histolojik olarak sitolojik atipi derecesi, kist oluşum miktarı, mukus, epidermoid ve intermediate hücre sayısı ile mitozla göre düşük, orta ve yüksek derece olarak sınıflandırılır (3). Düşük dereceli MEK, submandibular ve submental bezde daha sık izlenir ve erken evrede tespit edilir. Yüksek dereceli MEK ise, daha sık olarak parotis bezinde izlenir ve ileri evre ile ilişkilidir. MEK'nin, berrak hücreli, onkositik, sklerozan, Warthin-benzeri, silyalı, içsi hücreli ve mukoasiner histolojik varyantları vardır (4, 5).

## Olgu Sunumu

Endometrium karsinomu nedeniyle başka bir klinikte takip edilen 28 yaşında kadın hasta sağ kulak altında ve arkasında şişlik şikâyeti ile Kulak Burun Boğaz hastalıkları kliniğine başvurdu. Şişliği yaklaşık 3 ay önce fark ettiğini, hızla büyüdüğünü, son 1 aydır üzerinde kabuklanma ve akıntı olduğunu, ağrı olmadığını belirtti. Fizik muayenede sağ aurikula lobülünün anterior, inferior ve posterioruna yerleşen, çevresi hiperemik, bazı bölgelerinde krutlanma gösteren, üzerin-



### Resim 1:

Resim 1A) Sağ kulak lobülünün ön, alt ve arka kısmında yer alan, çevresinde hiperemik, bazı yerlerinde kabuklu, üzerindeki derinin bütünlüğü bozulmuş, deriden çıkıntı yapan kitle. Resim 1B) 37 mm çapında, heterojen kontrastlanma ile sağ parotis bezinde lobüle görünüm

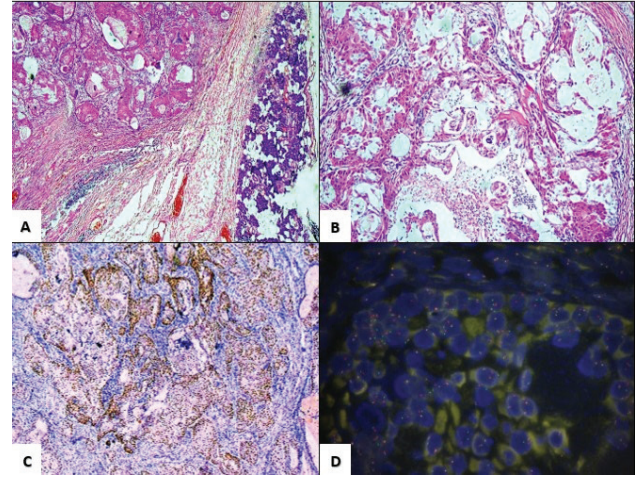
Resim 1C) Total parotidektomi, supraomohyoid boyun diseksiyonu sonrası Nervus auricularis Magnus sinir grefti.

Resim 1D) Materyalin kesit yüzeyi hemorajik, çoğu alanda mukoid zemin, düzensiz sınırlı ve çevreleyen dokuya infiltratif görünüm.

deki cildin bütünlüğü bozulmuş, ciltten protrüde olan, parotis bezine fikse, düzensiz şekilli, yaklaşık 4x3 cm boyutlarında kitle palpe edildi (Resim 1A).

Baş boyun bölgesinde palpe edilen lenf nodu izlenmedi. Fasiyal sinir, larenks ve nazofarenks muayeneleri normaldi. Hastanın özgeçmişinde 1 ay önce endometrium kanseri tanısı aldığı, günde 1 paket sigara kullandığı, tip 1 diabetes mellitus hastalığı olduğu öğrenildi. İlerleyen dönemde gebelik planlaması olan hastanın endometrium kanseri için cerrahi tedaviyi kabul etmediği ve megestrol asetat tedavisi kullandığı öğrenildi. Hastanın tam kan sayımı ve rutin biyokimyasal tetkikleri normaldi. Ciltten protrüde olan kitleden insizyonel biyopsi yapıldı. Histopatolojik inceleme sonucu az diferansiye karsinom infiltrasyonu olarak raporlandı. Ayrıca tümörde yaygın müsin varlığı ve skuamöz diferansiyasyon nedeniyle az diferansiye MEK olabileceği yorumu yapıldı.

Tümörün çevre dokular ile ilişkisinin belirlenmesi için boyun kontrastlı magnetik rezonans görüntülemesi (MRG) yapıldı. MRG 'sağ parotis yüzeysel lobu içerisinde 35 x 32 mm boyutlarında lobüle şekilli, T1 sekanslarda hipointens, T2 sekanslarda izo – hiperintens görünümde, anteriorunda 12 mm kistik komponenti bulunan, kontrast enjeksiyonu sonrası solid kı-



### Resim 2:

Resim 2A) Normal görümlü parotis bezine komşu yerlerde kistik ve solid adalar şeklinde onkositik yuvalar (H&E 20x).

Resim 2B) Müsinöz alanlarda eozinofilik granüler sitoplazmalı pleomorfik nükleuslu ve belirgin nükleollü hücreler (H&E 100x).

Resim 2C) Neoplastik hücrelerde yaygın p63 ile orta ila güçlü nükleer immünoaktivite (H&E 100x).

Resim 2D) Floresan in situ ayırma probu ile hibridizasyonda MAML2 de rearrangement izlendi. FISH probunun 5' ucu Spectrum Orange ile ve 3' ucu Spectrum Green ile etiketlenmiştir.



sınırları heterojen kontrastlanan kitlesel lezyon' olarak raporlandı (Resim 1B).

Hastanın pozitron emisyon bilgisayarlı tomografisinde boyun bölgesinde tutulum olmamakla birlikte sağ parotis bölgesinde SUVmax'ı 22,1 olan 33 x 30 mm boyutunda kitlesel lezyon mevcuttu. Hastaya total parotidektomi ve supraomohyoid boyun diseksiyonu yapıldı. Fasiyal sinirin marjinal mandibuler dalı tümör ile invaze idi. İnvaze olan sinir bölümü eksize edilip nervus aurikularis magnus sinir grefti ile onarıldı (Resim 1C).

Makroskopik incelemede, 3.8x2.6x2.2 cm ölçülerinde düzensiz sınırlı yer yer protrüde görünümde olup kesit yüzü kanamalı, çoğu alanda mukoid kıvamda sarı renkli lezyon izlendi (Resim 1D). Mikroskopik incelemede tümörde santral olarak kistik alanlar yanı sıra fokal nekroz ile infiltratif bir büyüme paterni görüldü (Resim 2A). Çoğu alanda musin içerisinde solid gelişim gösteren eozinofilik granüler sitoplazmalı, belirgin nükleollü yuvarlak oval nükleuslu pleomorfik neoplastik hücreler izlendi. Onkositik yuvalar dikkati çekti (Resim 2B). Onkositik yuvalar, genellikle belirgin hücreler arası köprüleşme göstermekte olup, belirgin keratinizasyon izlenmedi. Mitotik figür izlenmedi. Perinöral invazyon görüldü. İmmünohistokimyasal incelemede tümörde CK5/6, p63, CK14 ile yaygın pozitiflik, S100, östrojen reseptör, androjen reseptör, GCDFP15, GATA3 ile negatiflik izlendi (Resim 2C). Histokimyasal PAS, PAS-D ile müsin lehine boyanma görüldü. Mastermind like transcriptional coactivator 2(MAML2) genini 11q21 lokusunda çevreleyen bir ayırma probu kullanılarak MAML2 translokasyonunu saptamak için floresan in situ hibridizasyon (FISH) çalışması yapıldı (Resim 2D). Histopatolojik, immünohistokimyasal ve moleküler bulgular birlikte değerlendirildiğinde olguya onkositik mucoepidermoid karsinom (OMEK) tanısı konuldu. Anaplazi, nekroz ve perinöral invazyon nedeniyle bu olgu Armed Forces Institute of Pathology (AFIP) yöntemine göre yüksek dereceli olarak sınıflandırıldı. Hasta şu an radyasyon onkolojisi ve medikal onkoloji bölümlerince 29 aydır nüks bulgusu olmadan takip edilmektedir.

## Tartışma

En sık görülen malign tükürük bezi tümörü MEK'dir. Çoğunlukla parotis bezinde ortaya çıkar ve benign lezyonlarla örtüşen sitomorfoloji nedeniyle MEK tanısını koymak zor olabilir. Ayrıca MAML2 translokasyonu gösteren olguların daha iyi prognozlu oldukları bildirilmiştir (6, 7).

OMEK, onkositik hücrelerin baskın olduğu bir MEK varyantı olarak tanımlanır. Çeşitli derecelendirme sis-

temleriyle sınıflandırılmaktadır. Biz olgumuzda AFIP derecelendirme sistemini kullandık ve yüksek dereceli olarak yorumladık.

Histolojik olarak OMEK ayırıcı tanısında onkositom, Warthin tümörü, nekrotizan sialometaplazi, skuamöz metaplazili pleomorfik adenom, asinik hücreli karsinom, sekretuar karsinom, skuamöz hücreli karsinom ve tükürük bezi kanal karsinomu gibi benign ve malign neoplazmlar bulunmaktadır.

Olgumuzda öncelikle daha önce var olan endometrium kanseri metastazını ayırt etmek için immünohistokimyasal östrojen reseptör boyaması yapıldı ve negatifliği izlendi. Ayırıcı tanısında lobüler paternin olmaması ve kistik yapıların izlenmesi ile nekrotizan sialometaplazi'den, kondroid matriks izlenmemesi ile skuamöz metaplazi gösteren pleomorfik adenomdan, papiller yapıların olmaması ve lenfoid stroma içermemesi ile Warthin tümöründen ayrılmaktaydı. İmmünohistokimyasal olarak S100 negatifliği ile sekretuar karsinom dışlandı. Androjen reseptör, GCDFP15, GATA3 negatifliği ile diğer onkositik lezyonlardan ayrımı yapıldı (8-12). İmmünohistokimyasal p63 ile yaygın nükleer ekspresyon ve FISH ile MAML2 füzyonunun varlığı gösterilerek OMEK tanısı desteklendi.

Özetle nadir bir MEK morfolojik varyantı olan OMEK olgusunu sunmayı amaçladık. Onkositik neoplazmlarda mukositlerin varlığı OMEK şüphesini artırmalıdır ve ayırıcı tanı için immünohistokimyasal ve moleküler testlerin yapılması gerekmektedir. p63 immün boyama ve musikarmin histokimyasal boyamaya ek olarak, MAML2 yeniden düzenlemesinin analizi, doğru tanı için kritik kanıtlar sağlayabilir.

## Bilgilendirme ve Teşekkür

Prof. Dr. Kayhan BAŞAK (Kartal Lütfi Kırdar Şehir Hastanesi)'a FISH görüntüleri ve tanı aşamasındaki katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

Bu olgu sunumu 30. Ulusal Patoloji Kongresinde poster sunumu olarak sunulmuştur.

## Çıkar Çatışması Beyanı

Herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

## Bilgilendirilmiş Onam

Çalışmada yer alan bireyden bilgilendirilmiş onam ve verilerin yayınlaması için yazılı izin alınmıştır.

## Finansman

Bu araştırma, kamu, ticari veya kar amacı gütmeyen sektörlerdeki finansman kuruluşlarından herhangi bir finansal destek almamıştır.

**Verilerin Ulaşılabilirliği**

Tüm veriler makalede mevcuttur.

**Yazar Katkıları**

R.O.Y: Çalışmanın planlanması; Verilerin İşlenmesi; Formal Analizler; Araştırma; Metodoloji; Validasyon; Görselleştirme; Makalenin Yazımı.

M.K: Çalışmanın planlanması; Formal Analizler; Araştırma; Metodoloji; Kaynakların Sağlanması; Denetim; Validasyon; Makalenin düzenlenmesi.

İ.M.Ç: Araştırma; Validasyon; Makalenin Yazımı; Çalışmanın planlanması

Y.Ç.K: Formal Analizler; Araştırma; Görselleştirme; Makalenin yazımı; Çalışmanın planlanması

K.B: Formal Analizler; Araştırma; Görselleştirme; Makalenin yazım

**Editöryal**

Makalenin yazarlarından İMÇ derginin bölüm editörlerinden biri olmakla birlikte bu makalenin yayım süreçlerinin hiç bir aşamasında görev almamıştır.

**Kaynaklar**

1. Rapidis AD, Givalos N, Gakiopoulou H, Stavrianos SD, Faratzis G, Lagogiannis GA, et al. Mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. Review of the literature and clinicopathological analysis of 18 patients. *Oral oncology*. 2007;43(2):130-6.
2. El-Naggar AK GJ, Slootweg PJ, Chan JKC, Takata T WHO Classification of Tumours of the Head and Neck. WHO/IARC Classification of Tumours of the Head and Neck. , 4th edn Lyon: IARC Presslow. 2017.
3. Qureshi, S., Janjua, O.S., & Janjua, S.M. (2012). Mucoepidermoid carcinoma: A clinicopathological review of 75 cases. *International Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 3, 5-9.
4. Ellis GL AP. Atlas of Tumor Pathology. Tumors of the Salivary Glands. Amer Registry of Pathology; 1st edition (January 1, 1992)
5. Cipriani NA, Lusardi JJ, McElherne J, Pearson AT, Olivas AD, Fitzpatrick C, Lingen MW, Blair EA. Mucoepidermoid Carcinoma: A Comparison of Histologic Grading Systems and Relationship to MAML2 Rearrangement and Prognosis. *Am J Surg Pathol*. 2019 Jul;43(7):885-897. doi: 10.1097/PAS.0000000000001252. PMID: 31021855; PMCID: PMC6629427.
6. Behboudi A, Enlund F, Winnes M, Andrén Y, Nordkvist A, Leivo I, et al. Molecular classification of mucoepidermoid carcinomas-prognostic significance of the MECT1-MAML2 fusion oncogene. *Genes, chromosomes & cancer*. 2006;45(5):470-81.
7. León X, Szafranska J, Méndez JE. A case of necrotizing sialometaplasia. *Acta otorrinolaringologica espanola*. 2020;71(5):328-9.
8. Tandon A, Jaiswal R, Siddiqui S, Bordoloi B. Keratinizing pleomorphic adenoma: An unusual case report. *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP*. 2018;22(Suppl 1):S69-s72.
9. Yorita K, Nakagawa H, Miyazaki K, Fukuda J, Ito S, Kosai M. Infarcted Warthin tumor with mucoepidermoid carcinoma-like metaplasia: a case report and review of the literature. *Journal*

of medical case reports. 2019;13(1):12.

10. Damjanov I, Skenderi F, Vranic S. Mammary Analogue Secretory Carcinoma (MASC) of the salivary gland: A new tumor entity. *Bosnian journal of basic medical sciences*. 2016;16(3):237-8.
11. Panchbhai AS. Primary squamous cell carcinoma of salivary gland: Report of a rare case. *Journal of cancer research and therapeutics*. 2015;11(3):664.
12. Birkeland AC, Foltin SK, Michmerhuizen NL, Hoesli RC, Rosko AJ, Byrd S, et al. Correlation of Crtc1/3-Maml2 fusion status, grade and survival in mucoepidermoid carcinoma. *Oral oncology*. 2017;68:5-8.

# POPÜLER BİR TAMAMLAYICI TIP TEDAVİSİ: PROLOTERAPİ

## A POPULAR COMPLEMENTARY MEDICINE TREATMENT: PROLOTHERAPY

Aydan ÖRSÇELİK<sup>1</sup>, İlker SOLMAZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Tıp Fakültesi, Spor Hekimliği Ana Bilim Dalı, Ankara, TÜRKİYE

<sup>2</sup> Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Geleneksel Tamamlayıcı Tıp Merkezi, Ankara, TÜRKİYE

**Cite this article as:** Örsçelik A, Solmaz İ. Popüler Bir Tamamlayıcı Tıp Tedavisi: Proloterapi. Med J SDU 2023; 30(1): 135-142.

### Öz

Kronik kas iskelet sistemi hastalıklarının tedavisinde neredeyse yüz yıllardır kullanılan bir tamamlayıcı tıp tedavi yöntemi olan proloterapi son on yılda hem Türkiye hem de dünyada popüler hale gelmiştir. Proloterapi yönteminin uygulayıcıları tarafından "hastalığı tedavi ederek ağrıda ve fonksiyonlarda iyileşme sağladığı, yaşam kalitesini artırdığı" bilinmektedir. Son dönemde kullanımının yaygınlaşmasıyla birlikte daha çok çalışma yapılmakta ve kanıta dayandırılmaktadır. Bu derleme ile proloterapi tedavisi hakkında güncel literatür ile desteklenmiş bilgiler aktarılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Ağrı, Proloterapi, Kas-iskelet sistemi

### Abstract

Prolotherapy, which is a complementary medicine treatment method used for almost centuries in the treatment of chronic musculoskeletal diseases, has become popular both in Turkey and in the world in the last ten years. Prolotherapy practitioners is saying that "prolotherapy method provides improvement in pain and functions, increases the quality of life by treating the disease". With its widespread usage recently, more studies are being conducted and it is becoming more evidence-based therapy method. In this review, information supported by the current literature about prolotherapy treatment has been conveyed.

**Keywords:** Musculoskeletal System, Pain, Prolotherapy

### Giriş

Proloterapi kronik kas iskelet sistemi hastalıklarının tedavisinde kullanılan bir tedavi yöntemidir (1, 2). Bu tedavide vücudun rejenerasyon süreci uyarılarak iyileşme sağlanmaya çalışılmaktadır. Yöntem 1930'lu yıllardan itibaren uygulanmaya başlanmış ve uygulayıcısı olan George Hackett'in deneyimlerinden faydalanılarak 1950'lerde kitap yazılmıştır (3).

1959 yılında proloterapi tedavisi sırasında proloterapi solüsyonu olarak kullanılan fenol enjeksiyonuna bağlı alerjik reaksiyon gelişmesi sonucu bir vakanın ölümünün bildirilmiştir. Bu vakadan sonra ortaya çıkan ön yargı bu yöntemin kullanımını neredeyse ortadan kaldırmıştır (3).

Günümüzde ise proloterapi, giderek daha popüler hale gelen, rejeneratif enjeksiyon bazlı bir tedavidir. Proloterapi hasarlı veya dejenere olmuş ligaman,

**Sorumlu yazar ve iletişim adresi /Corresponding author and contact address:** A.Ö. / aydan.orscelik@sbu.edu.tr

**Müracaat tarihi/Application Date:** 15.08.2022 • **Kabul tarihi/Accepted Date:** 03.09.2022

**ORCID IDs of the authors:** A.Ö: 0000-0002-8610-8869; İ.S: 0000-0002-1959-8159

tendon ve kıkırdak gibi bağ dokusunun iyileşmesinde kullanılır (3, 4). Yaralanmayı takiben, vücut bağ dokusunu onarıma geçer, yaralanma ile ortaya çıkan ağrı eğer onarım yetersiz kalırsa kronikleşir ve kronik kas-iskelet sistemi ağrısı ile sonuçlanır. Kronik kas-iskelet sistemi ağrısı bu yetersiz onarılmış dokuların dejenerasyonundan, ligamanların laksitesine bağlı ortaya çıkan instabiliteden kaynaklanır. Proloterapi tedavisi mevcut dejenerasyonu ve instabiliteyi doku düzeyinde düzeltmek için kullanılmaktadır (2, 3). Proloterapinin ağrıyı azaltmaya ve rejenerasyon mekanizmasına etkileri henüz tam olarak anlaşılamamıştır (3). Ancak, lokal inflamatuvar etki, lokal büyüme faktörü salınımının uyarılması ve nöropatik inflamasyonun aşağı regülasyonunun kombinasyonu mekanizma olarak tanımlanabilmektedir (3, 5, 6). Bunların bir sonucu olarak, ligaman laksitesi olan eklem instabilitesi azalırken ağrıda azalmaktadır (3, 7).

Proloterapi tedavisinde, uygulama prosedürü hiç değişmemekle birlikte, farklı solüsyonlar kullanılabilir. Proliferan solüsyonlar, hassas ligaman ve tendinöz yapılara ve bitişik eklem boşluklarına enjeksiyon için kullanılır. Tahriş edici maddeler, ozmotikler ve kemotaktikler, proloterapide yaygın olarak kullanılan proliferantlardır. Hücreleri hasarlayarak etki gösteren tahriş edici maddeler fenol, guaiacol ve tanik asit olarak örneklendirilebilir. Partiküller yani ponza taşı da tahriş edicidir ancak hücrel travma yapar ve doğrudan makrofajları çeker. Sodyum morrhuate bir kemotaktiktir ve inflamatuvar hücreleri çeker. Glikoz, gliserin ve çinko sülfat ozmotik proliferantlardır ve hücrelerde ozmotik şoka neden olur (3, 7, 8).

Bilimsel olarak kanıt düzeyi yüksek kabul edilen randomize kontrollü çalışmalarda kullanılan en yaygın solüsyon hipertonic dekstrozdur (9–11). Proliferan solüsyonlar uygulandıkları bölgedeki hücrelerin ozmotik yırtılmasına neden olabilir ve insan hücrelerinde çeşitli büyüme faktörü artışına yönlendirebilir. Ayrıca hipertonic ortam, DNA kodlayan büyüme faktörlerinin salınmasına yol açabilir (3, 12). Ayrıca çeşitli proliferan solüsyonlar fibroblast uyarımına neden olur. Büyüme faktörleri fibroblastları aktive eder ve ayrıca serbest bırakır. Aktif fibroblastlar yeni kolajen fibrilleri salgırlar. Kolajen fibriller, hasarlı ligaman ve tendonların onarımı için gereklidir ve iyileşmeyi destekler (2, 3). Proloterapi ligaman, tendon ve eklem stabilize edici yapıları sıkılaştırır ve güçlendirir. Dolayısıyla, proloterapi eklemlerin stabilitesini bu yolla artırabilir (2, 3, 13). Artmış eklem stabilizasyonu, lokal kan akışını ve mekanoreseptörlerin uyarılabilirliğini artırarak ve ayrıca ağrı reseptörlerinin uyarılabilirliğini azaltarak doku iyileşme süreciyle ilişkilendirilebilir (2, 3, 13).

Günümüzde proloterapi solüsyonu olarak fenol yerine hipertonic dekstroz solüsyonu güvenle kullanılabilir (5, 9, 14–16). Yan etki ve komplikasyon riski çok düşüktür. Bunun bir sonucu olarak, farklı konsantrasyonlarda (%10-30) hipertonic dekstroz çözeltileri, bugüne kadar proloterapi tedavileri için yapılan çalışma ve kitaplarda yaygın olarak yer almaktadır. Bu çalışmalarda, dekstroz solüsyonlarının %10'undan fazlası enflamatuvar yanıt ve proliferasyon oluşturmak için önerilmektedir. Dekstroz çözeltilerinin optimal konsantrasyonlarını belirlemek için bir hayvan çalışması yapılmıştır. Bu çalışma %10'luk konsantrasyonun altında yalnızca hücre proliferasyonunu indüklediğini iddia etmiş; ancak, inflamasyon histolojisi üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı raporlanmıştır (17). Yüksek glikoz konsantrasyonları, platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) aktivasyonunu uyarır. PDGF'nin iki etkisi vardır; birincisi, mezangiyal hücrelerde TGF-beta gen ekspresyonunu indükler. İkincisi, DNA sentezini uyarır. %10'luk glukoz konsantrasyonlarının üzerinde, bağ dokusu büyüme faktörü ve mezangiyal hücrelerde diğer gen ekspresyonu için uyarı yapar (3). Kıkırdak hacim stabilitesi proloterapi enjeksiyonları ile iyileştirilmiştir ve bu manyetik rezonans görüntüleme ile değerlendirilebilir (17).

“Modifiye Proloterapi” olarak adlandırdığımız yöntemde proloterapi uygulamasında %5 dekstroz solüsyonu kullanılmaktadır (13). Modifiye olarak adlandırılır çünkü hipertonic solüsyonlar yerine düşük doz dekstroz kullanılmaktadır. Proloterapide çok net olmasa da tariflenen mekanizmalara benzer şekilde, %5 dekstroz çözeltisi, anjiyogenetik faktörlerde PDGF -A ve B, insülin benzeri büyüme faktörü-I ve vasküler endotelial büyüme faktörü-A) ve apoptotik faktörlerde (kaspaz-3 ve -8) yetişkin fibroblast kültüründe gen ekspresyonunu artırmıştır (18). %5'lik dekstroz konsantrasyonunun aynı zamanda azalmış ağrı algısına neden olan duyu sinirleri hedeflediği ve tekrarlanan enjeksiyonların duyu sinirleri iyileştirdiği ve nöropatik ağrıyı sonlandırdığı bilinmektedir (19). Ayrıca, Maniquis-Smigel çalışmasında lokal anestetik içermeyen %5 dekstroz solüsyonunu faset eklemlere uygulamış ve kısa dönem için pozitif sonuçlar elde etmiştir. Bu çalışma, glikozun ağrı üzerinde salinden çok daha büyük bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir (20).

Başarısız bel cerrahisi sendromu (FBSS) olan ve en az 6 aydır şikâyetleri devam eden ve 3 ay konservatif yöntemlere rağmen sonuç alamayan 79 hastayı içeren çalışmamızda posterior ve lateral yaklaşımlar ile %5 dekstroz solüsyonu kullanarak proloterapi enjeksiyonları yapılmıştır. Tedavi öncesi ve sonrası değerlendirilmelerde Görsel Analog Skalası (VAS) ve Oswestry Engellilik İndeksi (ODI) kullanılmıştır. Hasta memnu-

niyeti 5'li Likert skalası kullanılarak değerlendirilmiştir. Tekrarlanan VAS ve ODI ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır. Bu sonuçlar, keşfedilmemiş bir alana öncülük eden ilk adım olarak görülmektedir. Bu tedavi yöntemi, revizyon cerrahisi kararı vermeden önce FBSS hastaları için denemeye değer bir seçenektir (19).

Başka bir çalışmamızda bir yıl boyunca radiküler bel ağrısı nedeniyle %5 dekstroz proloterapisi uygulanan 40 hasta değerlendirildi. 20 hastaya sadece proloterapi uygulandı. Diğer 20 hasta proloterapi ve fizik tedavi ile tedavi edildi. %5 dekstroz çözeltisi iliolumbar ve transvers ligament ve faset seviyesinde enjekte edildi. Hastaların ağrı, hareketlilik, yaşam kalitesi ve fonksiyonel durumlarının değerlendirilmesinde VAS, ODI ve Kısa Form-36 (SF-36) kullanıldı. Her iki grupta da tüm hastalarda ağrıda anlamlı bir azalma olduğu bildirildi. Ağrı ve engellilik skorları, her iki grupta 3, 12 ve 52. hafta takiplerinde anlamlı olarak iyileşme saptandı ve gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı. Disk herniasyonundan kaynaklanan radiküler bel ağrısı olan hastalara %5 dekstroz proloterapi etkili bir şekilde tedavi edilebileceği ortaya koyuldu (21).

Klasik proloterapi enjeksiyonlarından sonra enflamatuar reaksiyona bağlı aşırı ağrı ve yorgunluk ortaya çıkabilir. Buna göre nadiren tedaviden vazgeçilebilir. Ağrıyı azaltmak için, hipertonic dekstroz genellikle lokal anestetik olarak lidokain, sensörkain ve ksilokain ile birleştirilir. Lokal anestezikler fibroblast dokusunda kollajen sentezini inhibe ederek yara iyileşmesini geciktirir ve bozar. Bu durumda tedavinin sonucunu bozar (3).

Enjeksiyon yerlerine göre proloterapi göre entezofasiyal, miyofasiyal ve nörofasiyal olarak sınıflandırılabilir.

#### **Entezofasiyal / İntra-Artiküler Proloterapi**

Proloterapinin klasik ve geleneksel yöntemidir. Enjeksiyon yeri, ligamanların eklemlere bağlandığı kemik korteks/ entezis üzerindedir. Eklem içi uygulama da yine bu kapsamda kabul edilmektedir.

#### **Miyofasiyal Proloterapi**

Bu tipe enjeksiyon yeri, kemik korteks değil yumuşak dokudur ve deri altı fasyanın altındadır. Bu, kas ve tendonun dejenerasyonu, kas yırtılması, fasya kusurları için kullanılır. Dejenerasyon sonrası vücudun rejenerasyon mekanizması ile yeni damar ve sinir oluşumu gerçekleşir. Bu yapıların istenilenin üstünde olduğunda çevrili kas veya fasyanın işlevini engeller. Bunu engellemek ya da oluşmuş hasarı ortadan kaldırmak için uygundur.

Nörofasiyal Proloterapi: Enjeksiyon yeri periferik duyu sinirlerine ve özellikle fasyal penetrasyonlarına yakındır. Yani bu deri altı dokuya yapılıdır. Proloterapinin amacı yumuşak dokunun onarımı veya fonksiyonel restorasyonudur ve nörofasiyal proloterapi, küçük sinirlerde tam fonksiyonun restorasyonunu sağlar. Onarıcı proteinler ve bunların sinir onarımı ile olan ilişkisi daha az bilinmektedir. Sinirler, ligamanlar ve tendon, esas olarak kollajen bazlı yapı perinöryum ile kaplıdır. Sinirler, yumuşak doku kusurlarının onarımında yer almaları ve muhtemelen benzer büyüme faktörleri sırasına göre davranmaları beklenmektedir. Bu bakış açısına göre, dekstroz potansiyel olarak küçük yüzeysel sinirler için terapötiktir. Bununla birlikte, nörofasiyal proloterapinin bu sınıflandırması geniş çapta kabul görmemektedir (3, 8).

#### **Proloterapi Endikasyonları**

Kronik bel ağrısı, osteoartrit, epikondilit ve rotator manşet lezyonları gibi kronik kas-iskelet sistemi bozukluklarıdır.

#### **Proloterapinin Kontrendikasyonları**

Kalıtsal veya sonradan oluşan kanama eğilimi, osteomyelit, sistemik enfeksiyon, kronik enfeksiyon öyküsü veya tedavi bölgesinde aktif enfeksiyon, romatizmal veya diğer sistemik enflamatuar hastalıklar, onkolojik hastalıklar, 12 hafta içinde lokal kortikosteroid enjekte edilmiş olması ve solüsyona alerji olarak tanımlanabilir (1, 3, 4, 22).

#### **Proloterapinin Kullanıldığı Durumlar İle İlgili Literatür**

Kronik bel ve boyun ağrıları: Omurga boyunca en sık ağrı lomber bölgeye aittir. Kronik bel ağrısı en yaygın hastalıklardan biridir ve toplumdaki iş gücü kaybı nedenlerinin başında gelir (23). Geçici veya kalıcı sakatlığa neden olur (7, 23). Kronik bel ağrısı, spinal ligamanların onarımı ve güçlendirilmesine dayanan proloterapinin en yaygın endikasyonlarından biridir. Literatürde, kronik bel ağrısı için enjeksiyon ve egzersiz protokolleri hakkında bir tartışma vardır ve çalışmaların çelişkili sonuçları mevcuttur (24). Kore'de yapılan prospektif, randomize, kontrollü bir çalışmada sakroiliak eklem ağrısı olan, lokal anestetik bloka yanıtta  $\geq$ %50 iyileşme ile doğrulanan, 3 ay veya daha uzun süren ve tıbbi tedavi başarısız olan hastalara, iki gruba ayırarak, floroskopi eşliğinde iki haftalık aralarla maksimum üç eklem içi dekstroz proloterapi veya steroid enjeksiyonunu uygulanmıştır. Hastaların ağrı ve sakatlık skorlarında 2 haftalık takipte her iki grupta da benzer şekilde başlangıca göre anlamlı iyileşme gözlenmiştir. Onbeşinci ayda  $\geq$ %50 ağrıda azalma kümülatif insidansı Kaplan-Meier analizi ile değerlendirilmiş ve proloterapi grubunda %58.7 ve steroid grubunda

%10.2 olarak bildirilmiştir. Sakroiliak eklem ağrısında eklem içi proloterapi enjeksiyonu kortikosteroid enjeksiyonundan anlamlı derecede üstündür. Eklem içi steroid enjeksiyonuna kıyasla kısa dönemde ağrıda belirgin fark olmamakla birlikte proloterapi uygulanan grupta uzun dönem ağrının tekrarlamadığı bildirilmiştir (25). Sklerozan enjeksiyonlarla ilgili bir randomize kontrollü çalışmada, proloterapinin kronik bel ağrısında salin ile beraber uygulanan lidokain ile benzer sonuca sahip olduğunu bildirmiştir (26). Enjeksiyonlar normal uygulamadan farklı olarak 3 hafta boyunca haftada bir yapılmıştır. Spesifik olmayan kronik bel ağrısı için yapılan 2x2 faktöriyel başka bir randomize kontrollü çalışmada, proloterapi ile salin enjeksiyonu ve egzersiz tedavisi verilmeyen ile fleksiyon egzersizi karşılaştırılmıştır. Tüm ligaman enjeksiyonları takip boyunca ağrı ve özürüllük skorlarında anlamlı düşümlere neden olmuştur. Sonuçlar proloterapi ve salin için veya fleksiyon egzersizleri ve günlük yaşam için benzer olarak bulunmuştur (24). Spinal manipülasyon, egzersiz ve diğer müdahalelere entegre edildiğinde proloterapi, kronik bel ağrısı ve sakatlık üzerinde daha iyi etkiye sahip olabilir, ancak proloterapi tek başına kronik bel ağrısı için etkili bir tedavi olarak görülmemektedir (7). Bizde başarısız bel cerrahisi sendromu olan hastalar ile yaptığımız çalışmamızda proloterapi uygulaması ile egzersiz tedavisini birlikte kullandık ve başarı elde ettik (19). Ayrıca B12 vitamini kullanımının tedavinin etkinliğini artırdığı değerlendirilmektedir (27).

Spinal ağrı ile ilgili bir derleme 2005 yılına kadar yapılmış 26 gözlemsel kohort ve 5 randomize kontrollü 31 klinik proloterapi çalışmasından bahsetmektedir. Bu çalışmalardaki endikasyonlar bel ağrısı (22), boyun ağrısı (3), servikal baş ağrısı (3) ve sırt veya göğüs ağrısı (3) oluşturmaktadır. Bu çalışmalarda toplam 20 sklerozan çözelti kullanılmıştır. En yaygın kullanılan sklerozan çözelti %12,5 dekstroz, %12,5 gliserin, %1,25 fenol ve %0,25 lidokain karışımıdır. Tedavi protokollerinde doz, tedavi sayısı ve yardımcı tedavilerin kullanımı gibi geniş farklılıklar olduğu belirtilmiştir. Çoğu kohort çalışması yalnızca orta kalite düzeyinde olduğu ve enjekte edilen maddeler ve ortak müdahaleler açısından büyük farklılıklar gösterdikleri tespit edilmiştir (27). Mekanik bel ağrısında proloterapi tedavisi ile ilgili çalışmaların metodolojilerindeki kısıtlılık ve klinik protokollerin heterojenitesi bu çalışmaların toplu olarak değerlendirilmesini zorlaştırmaktadır (7, 28). Klinik çalışmaların çoğunda, tedavi ve kontrol grupları arasındaki farklılıklar her zaman istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, azalmış ağrı veya özürüllük gibi pozitif sonuçlar bildirdiği ortaya konulmuştur (28). Ayrıca Miller ve ark. tarafından yapılmış bir vaka serisinde orta şiddetli lomber dejenerasyon disk hastalığına

sekonder bacak ağrısına uygulanan intradiskal proloterapinin etkisi umut vadetmektedir. Bu çalışmada iki haftada bir disk içine %50 dekstroz ve %0.25 bupivakain uygulanmış ve hastaların %43.4'ü, tedavi öncesi ve 18 aylık ölçümlerle karşılaştırıldığında sayısal ağrı skorlarında ortalama bir iyileşme göstermiştir (29).

Bel bölgesini ilgilendiren ağrılı durumlarda sadece lomber ligamanlar değil aynı zamanda pelvik ve sakroiliak ligamanlar da bozulabilir veya zayıflayabilir. Bu nedenle lumbopelvik hareketin yetersiz otokontrollü ve kas dengesi ağrı ve rahatsızlığa neden olabilir. Lomber, pelvik ve sakroiliak ligamanlar postürü, dengesi ve yürüme yeteneklerini destekler. Bel bölgesine yönelik iyileşme hedeflenirken sakroiliak, pelvis ve lomber enjeksiyon noktalarının birlikte değerlendirilmesi ve hastanın duruş, denge ve yürüme kabiliyetinin iyileşmesini hızlandırabilmek için egzersiz tedavisi ile birlikte yapılması daha başarılı sonuçlara yol açabilir (19, 30). Ayrıca bu alanlarda gelişmiş olan tetik noktaların tedavisi de hem ağrı hem fonksiyon açısından pozitif yönde etki sağlayabilir.

Doğru hasta ve endikasyon seçimi, tekrarlayan enjeksiyonlar ve uzun süreli hasta takibinin proloterapi tedavisinin başarısındaki en önemli faktörler olduğunu düşünmekteyiz. Proloterapinin etki mekanizması göz önünde bulundurulduğunda bir seansta sadece bir vücut bölgesine enjeksiyon yapılmalıdır. Proloterapi uygulanacak birden fazla bölge varsa klinisyen tarafından bir seçim yapılmalıdır. Kliniğimizde tedaviye önce bel bölgesinden başlanmaktadır (30). Önce vücut kor bölgesinin iyileşmesi sağlanırsa genel tedavinin etkinliğinin artacağına inanmaktayız. Kor, anatomik ve fonksiyonel merkezin ana parçası ve vücudun dinamosudur. Kor, vücudun üst ve alt yarımaları arasındaki kuvvetin aktarılmasından sorumludur. Tüm hareketler buradan oluşturulur ve sonra ekstremitelere aktarılır (31). Morfolojik çalışmalar klinik uygulamamızı desteklemektedir (32). Tsuji ve ark. çalışmalarında, sakral eğim-diz fleksiyon kontraktürü ile patellofemoral ağrı sendromu arasında bir ilişki olduğunu gözlemlemiştir. Bu sürecin ana kaynağının bel hizalama problemi olduğunu iddia ettiler ve bu durumu omurga-diz sendromu olarak tanımladılar (33). Buradan yola çıkarak tedaviye "kor"dan başlanırsa diğer bölgelerin iyileşmesini daha hızlı ve daha uzun süre sağlayabileceğimize inanıyor ve pratikte tedaviye buradan başlamayı tercih ediyoruz.

Bel bölgesinde olduğu gibi servikal bölgede de instabilitenin travmatik omurga ağrısının başlıca nedeni olduğu ileri sürülmüştür. Whiplash yaralanmalarını takiben servikal kaynaklı ağrının tedavisinde proloterapi kullanımının ağrı ve fonksiyondaki iyileşmeyi göster-

diği çalışmalar mevcuttur (34–36). Bu çalışmalardan biri prospektif çalışma olup 6 vaka serisinden oluşmakta ve proloterapinin uygulanmadan önce ve sonra ölçülen servikal translasyon üzerine ve VAS skoruna etkisini belirlemek için yapılmıştır. Floroskopi eşliğinde servikal proloterapi uygulanmıştır. Sonuç olarak, proliferan enjeksiyonlar servikal fleksiyon, ekstansiyon translasyonunda ve VAS skorunda azalma olduğunu istatistiksel olarak göstermektedir. Travmatik servikal instabilitesi olan hastalarda cerrahi füzyon dışında birkaç uygulanabilir tedavi seçeneği olması nedeniyle, C-Arm floroskop altında servikal proliferan enjeksiyonların geçerli bir tedavi seçeneği olabileceği belirtilmektedir (34). Diğer çalışmada konservatif ve girişimsel prosedürlerden fayda görmeyen 18 kronik boyun ağrısı olan hastada eklem içi zigapofiziyal eklem içine 0,5-1 mL %20 dekstroz solüsyonu kullanılarak floroskopi eşliğinde intraartiküler proloterapi tedavisi uygulanmıştır. Hastaların on dördünün semptomları motorlu taşıt kazası sonrası gelişmiş. On beş hasta tedaviyi tamamlamıştır. Ortalama Boyun Engelilik Endeksi tedavi öncesi 24,71 iken tedavi sonrası 14,21 (2 ay), 13,45 (6 ay), 10,94 (12 ay) 'a düşmüştür. Tedavi süresince fizyoterapiye katılan hastaların, fizyoterapi almayanlara göre daha iyi sonuçlara sahip olduğu ortaya konulmuştur. Eş zamanlı fizyoterapi, işlem sonrası boyun sertliğini azaltmaya yardımcı olmuştur. İlginç olarak kadın cinsiyet iyileşmek için daha çok seansa ihtiyaç duymuştur (35).

### Osteoartrit

Diz osteoartriti, ilerleyen ağrı, fonksiyonel yetersizlik ve sertlik ile seyreden önemli bir hastalıktır. Sistematik bir inceleme ve meta-analiz, dekstroz proloterapinin etkisini, osteoartrit tedavisinde kontrol enjeksiyonları ve egzersiz ile karşılaştırılmıştır. Dekstroz proloterapinin altı aylık takipler sonucunda diğerlerinden üstün bulunmuştur (37). Buna benzer şekilde randomize kontrollü üç kollu bir çalışmada dekstroz proloterapi, salin ve evde egzersizi karşılaştırılmış ve proloterapi, salin enjeksiyonları ve ev egzersizlerinden daha iyi klinik ağrı, fonksiyon artışı ve sertlikte azalma sağlamıştır (38). Diz osteoartriti proloterapinin başarısını gösteren daha fazla çalışma vardır. Araştırmacılara göre enjeksiyon yerleri farklıdır; Sadece eklem içi (11, 39) ve eklem dışı ve eklem içi enjeksiyon kombinasyonu (40, 41). Kombine eklem içi ve dışı enjeksiyon tedavilerinin gençlerde bağ doku problemlerinde ve yaşlı hastalarda diz protezine alternatif olarak şiddetli osteoartritte önem arz ettiği değerlendirilmektedir. Bahsedilen çalışmalarda hem ağrıyı azalttığı hem de diz mekanik instabilitesinde ve kıkırdak dejenerasyonunda düzelme sağladığı bildirilmektedir. Sadece periaritiküler %5 dekstroz ile proloterapi tedavisi uygulanan 30 hastanın (19 hasta 3 seans, 11 hasta 2 seans,

tedaviler arası 20 gün ara) vizüel analog skoru tedavi öncesi 8,4' ten tedavi sonrası 2,9 olarak bulunmuştur (42).

### Epikondilit

Proloterapi epikondilit tedavisi için umut verici bir yöntem olsa da sınırlı sayıda çalışmada çelişkiler bulunmaktadır. Randomize çift kör bir çalışmada, lateral epikondilitli hastalarda proloterapi ve plasebo enjeksiyonları karşılaştırılmıştır. Proloterapinin ağrı ve fonksiyonda anlamlı derecede başarılı olduğu bulunmuştur (43). Üç kollu bir randomize kontrollü çalışmada kronik lateral epikondilitli olan hastalara ultrason eşliğinde dekstroz ile proloterapi ve dekstroz ve sodyum morrhuat ile proloterapi uygulanmıştır. Üçüncü grubu bekle ve gör grubu oluşturmuştur. Proloterapi uygulanan iki grupta, bekle ve gör grubuna göre ağrı ve fonksiyon açısından daha iyi sonuçlar ortaya çıkmıştır. Dekstroz proloterapi uygulanan grubun dekstroz ve sodyum morrhuat ile proloterapi uygulanan gruba göre daha hızlı ve enjeksiyon sonrası daha az ağrı iyileştiği; ancak 32 haftada proloterapi grupları arasında fark olmadığı gösterilmiştir. Sadece kavrama gücünün iyileşmesi dekstroz proloterapi grubunda hem başlangıçta hem de diğer gruplara göre belirgindir (9). Akçay ve ark. kronik lateral epikondilopatini tedavisinde salinin dekstroz proloterapisi ile hemen hemen benzer etki gösterdiğini bulmuşlar (44). Ancak bu çalışmada değerlendirme için kullanılan veriler enjeksiyonlar sırasında ve son enjeksiyondan sonraki 1. ayda alınmış olup çok kısa süreli etkiyi ortaya koymaktadır. Başka bir çalışmada tek başına ve fizyoterapi ile kombinasyon halinde kullanılan proloterapinin kısa ve uzun vadeli klinik etkisini karşılaştırılmıştır. Tüm gruplar, başlangıçta kıyasla önemli ölçüde iyileşmiş ancak benzer düzeyde iyileşme gösterilmiştir (45).

### Rotator Manşet Yaralanmaları

Omuz eklemi stabilitesi, çevredeki kaslara ve ligamentlere dayanır. Özellikle kronik süreçte birinde oluşan sorun diğerini de etkileyecektir. Bu nedenle omuz sorunları iyi bir tedavi ve tedavi sırasında ve sonrasında dikkatli takip gerektirir. Bertrand ve ark.'nın çalışması, omuzla ilgili en iyi bilinen proloterapi çalışmasıdır. Çift kör, randomize kontrollü olan çalışmada hastalar entezis bölgesine dekstroz uygulaması, entezis bölgesine salin uygulaması ve entezis bölgesine yüzeysel salin uygulaması olarak üç gruba ayrılmıştır. Çalışmada üç aylık enjeksiyonlar uygulanmış ve tüm hastalar fizik tedaviye alınmıştır. Entezis bölgesine dekstroz uygulanan grupta, diğer gruplara kıyasla daha uzun süreli ağrı iyileşmesi görülmüş ve hasta memnuniyeti açısından daha iyi sonuçlar ortaya çıkmıştır (46). Seven ve ark. 6 aydan uzun süredir devam eden kronik rotator manşet lezyonları ve semptomları olan 120

hasta ile başladıkları çalışmayı proloterapi (n=57) ve sadece egzersiz (n=44) olarak tamamlamıştır. Her iki gruba da ev egzersiz programı verilmiş, sadece egzersiz grubuna 12 hafta boyunca haftada üç seans fizyoterapi protokolü uygulanmıştır. Proloterapi grubuna 3 hafta ara ile uygulama yapılmıştır. Enjeksiyonlar başlangıç ağrı skorunun en az çeyreğine düşerse, 6 seans tamamlandıysa veya hastalar tedaviden çekilmek isterse sonlandırılmıştır. Omuz fonksiyonunun klinik değerlendirmesi Omuz Ağrısı ve Engellilik İndeksi (SPADI), Batı Ontario Döner Manşet İndeksi (WORC) ve omuz hareket açıklığı, ağrı için VAS ve hasta memnuniyeti için bir değerlendirme başlangıçta, 3, 6 ve 12. haftalarda ve en az bir yıllık son takipte yapılmıştır. Proloterapi grubunda ağrı, fonksiyon ve yaşam kalitesinde egzersiz grubuna göre daha iyi sonuçlar elde edildi. Sadece dış rotasyonda gruplar arasında herhangi bir takip döneminde fark yoktu. Ayrıca klinik sonuçları mükemmel-iyi olarak belirlediler. Günlük yaşamda ağrı hissetmemek 'mükemmel'; ağrının %50'den az olması "iyi" olarak değerlendirilmiş. Proloterapi grubundaki hastaların yaklaşık %93'ü mükemmel veya iyi sonuçlar bildirilmiştir. Kontrol grubunda ise bu oran %57 olarak saptanmıştır (12). Başka bir çalışmada hastalar PRP, Proloterapi, steroid ve lidokain enjeksiyonları olmak üzere randomize dört gruba ayrılmış, ultrason eşliğinde subakromiyal bursaya tek enjeksiyon ve tek seans uygulanmıştır. Tüm tedavi çeşitleri ağrı, fonksiyon ve yaşam kalitesinde iyileşme sağlamıştır. Kortikosteroid ağrı, fonksiyon ve yaşam kalitesi için kısa süreli rahatlama sağlamış, PRP ve proloterapi daha uzun süreli sonuçlar vermiştir (47). Bu makale randomize kontrollü planı ile iyi bir makaledir ancak proloterapi için ciddi kısıtlamaları vardır. Proloterapi enjeksiyonları sadece bursa içine uygulamadan ibaret değildir, kasların entezislerine de uygulama gereklidir. Ayrıca proloterapi sadece bir alana hipertonic bir solüsyon vermek demek değildir, enjeksiyona dayalı bir tekniktir ve bu tekniğin tanıya göre uygulama şekilleri bilinmektedir. Çalışmalar tüm uygulama yöntemleri için standardizasyon yapmak istemekte, bu sayede randomize kontrollü bir çalışma haline gelmektedir. Ancak bu çalışmada olduğu gibi bu durum, proloterapiyi değil, sadece hipertonic solüsyonun etkisi değerlendirilmesine sebep olmaktadır. Ayrıca proloterapide tek seans çoğu zaman yetersiz kalmaktadır. Seanslar aralıklarla tekrarlanarak iyi sonuçlar elde edilmektedir.

Konvansiyonel tedaviye dirençli supraspinatus tendinopati vakalarının değerlendirildiği bir çalışmada proloterapi ve plasebo kontrollü gruplar karşılaştırılmıştır. Supraspinatus entezine proloterapi grubunda bir doz hipertonic dekstroz, plasebo kontrollü gruba aynı teknikle bir doz normal salin uygulanmıştır. Pro-

loterapi tedavisi ağrı ve özürüllükte rahatlama sağladığı ve kısa bir süre için omuz aktif hareket açıklığını artırdığı raporlanmıştır. Makalenin kısıtlılıkları bölümünde geleneksel proloterapiden farklı olarak çok sayıda müdahale seansı ile çoklu enjeksiyon noktaları kullanmadıklarını beyan etmişlerdir (48). Çift kör, randomize kontrollü bir çalışma, omuz ağrısı ve bursit teşhisi konan hastalara 2 hafta ara ile 3 kez bursal enjeksiyon uygulamıştır. Enjeksiyonların bir kısmında dekstroz diğer kısmında salin solüsyonu kullanılmıştır. Üç seans bursal enjeksiyonun klinik yararlarına ilişkin kanıtların yeterli olmadığını beyan edilmiştir (49). Bu çalışma da daha önce başka bir çalışmada belirtildiği şekilde sadece bursalara uygulanmıştır. Başarısız rotator manşet onarım cerrahisinin (FRCRS) tedavisinde proloterapinin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada hastalara proloterapi ve evde egzersiz programı planlanmış ve başlangıca kıyasla her takip döneminde önemli gelişmeler elde edilmiştir. Hastaların yüzde sekseni mükemmel veya iyi sonuçlar bildirilmiştir. Ameliyattan sonra, omuz sertliği ve ağrı altı aylık konservatif tedaviye rağmen devam ediyorsa, cerrahlar ameliyatı düşünmektedir. Bu çalışmada, sonuçlar önceki artroskopik denemelere benzer olarak saptanmış, cerrahi öncesi denenmesi önerilmiştir (50).

Bu durumların dışında Aşil tendinopatisi, Osgood-Schlatter, kalça adduktör tendinopatileri (51), plantar fasit (51,52) ve hatta shin splint (53) gibi birçok aşırı kullanım yaralanmasında etkili olduğu bulunmuştur. Proloterapi yan etkileri: Yan etkiler enjeksiyonların lokalizasyonuna göre değişebilmektedir. Bu tedaviye yönelik yaygın olarak bildirilen yan etkiler enjeksiyon sonrası geçici ağrı ve sertliği içermektedir. 1950'lerde ve 1960'larda sklerozan maddeye veya sklerozan madde uygulanma yerine bağlı ciddi komplikasyonlar hatta ölümle sonuçlanan vakalar bildirilmiştir. Ayrıca geçici olarak enjeksiyon sonrası baş ağrısı, menopoz sonrası lekelenme, nörolojik özellikli ağrı, bulantı ve ishal görülebilir. Torakal bölge enjeksiyonlarında, herhangi bir enjeksiyonda olabileceği gibi, pnömotoraks gelişebileceği göz ardı edilmemelidir (3, 4, 19, 22).

## Sonuç

Kronik kas iskelet sistemi hastalıklarda yaygın olarak kullanılan proloterapinin doğru hasta seçimi ve dikkatli şekilde uygulanması ile başarılı sonuçlar elde edilebilmektedir. Konvansiyonel bir yöntem olması nedeniyle operasyon önerilmeden önce tercih etmek faydalı olacaktır.

## Çıkar Çatışması Beyanı

Herhangi bir çıkar çatışması yoktur.



**Etik Kurul Onayı**

Bu makale, insan veya hayvanlar üzerinde herhangi bir çalışma içermemektedir.

**Finansman**

Bu araştırma, kamu, ticari veya kar amacı gütmeyen sektörlerdeki finansman kuruluşlarından herhangi bir finansal destek almamıştır.

**Yazar Katkıları**

AÖ: Çalışmanın planlanması; Araştırma; Kaynakların Sağlanması; Makalenin Yazımı.

IS: Makalenin düzenlenmesi.

**Kaynaklar**

- Solmaz I. Kas İskelet Sistemi Ağrılarında Proloterapi Enjeksiyonları. *J Biotechnol Strateg Heal Res* 2019;3:91–114.
- Hackett G, Hemwall G, Montgomery G. Ligament and Tendon Relaxation Treated by Prolotherapy. 5th ed. Oak Park;2008.
- Solmaz I, Orscelik A. Features and Clinical Effectiveness of the Regenerative Injection Treatments: Prolotherapy and Platelet-Rich Plasma for Musculoskeletal Pain Management. In: Cascella M. From Conventional to Innovative Approaches for Pain Treatment (1st Ed) IntechOpen, 2019;73–86. Doi:10.5772/intechopen.77716
- Solmaz I. Kas iskelet sistemi ağrılarında proloterapi uygulamaları. In: Ozlü A. Kas iskelet sistemi hastalıklarında geleneksel ve tamamlayıcı tıp uygulamaları (1st Ed) Ankara, Akademisyen kitabevi, 2020; 153–70.
- Orscelik A, Akpancar S, Seven MM, Erdem Y, Koca K. The Efficacy of Platelet Rich Plasma and Prolotherapy in Chondromalacia Patella Treatment. *Turkish J Sport Med* 2020;55(1):28–37.
- Yıldız Y, Apaydın AH, Seven MM, Orscelik A. The Effects of Prolotherapy (Hypertonic Dextrose) in Recreational Athletes with Patellofemoral Pain Syndrome. *J Exp Integr Med* 2016;6(2):53.
- Dagenais S, Yelland MJ, Del Mar C, Schoene ML. Prolotherapy injections for chronic low-back pain. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;2007(2):CD004059.
- Waldman S. Pain Management. 2nd ed. Philadelphia: Saunders (Elsevier); 2011.
- Rabago D, Lee KS, Ryan M, Chourasia AO, Sesto ME, Zgierska A, et al. Hypertonic dextrose and morrhuate sodium injections (prolotherapy) for lateral epicondylitis (tennis elbow): Results of a single-blind, pilot-level, randomized controlled trial. *Am J Phys Med Rehabil* 2013;92(7):587–96.
- Rabago D, Patterson JJ, Mundt M, Zgierska A, Fortney L, Grettie J, et al. Dextrose and Morrhuate Sodium Injections (Prolotherapy) for Knee Osteoarthritis: A Prospective Open-Label Trial. *J Altern Complement Med* 2014;20(5):383–91.
- Topol GA, Podesta LA, Reeves KD, Giraldo MM, Johnson LL, Grasso R, et al. Chondrogenic Effect of Intra-articular Hypertonic-Dextrose (Prolotherapy) in Severe Knee Osteoarthritis. *PM&R* 2016;8(11):1072–82.
- Seven MM, Ersen O, Akpancar S, Ozkan H, Turkkan S, Yıldız Y, et al. Effectiveness of prolotherapy in the treatment of chronic rotator cuff lesions. *Orthop Traumatol Surg Res* 2017;103(3):427–33.
- Solmaz I, Orscelik A, Koroglu O. Modified prolotherapy by 5% dextrose: Two years experiences of a traditional and complementary medicine practice center in Turkey. *J Back Musculoskelet Rehabil* 2022;35(4):763–70.
- Solmaz I, Orscelik A, Karasimav Ö, Akpancar S. Is Prolotherapy Effective in the Treatment of Avascular Necrosis of the Femoral Head? *Altern Ther Health Med* 2019;25(5):57–9.
- Erdem Y, Gul D, Akpancar S. Comparison of Intraarticular Injections of Hyaluronic Acid versus Dextrose Applied with Periarthritic Prolotherapy in the Treatment of Recreational Athletes with Knee Osteoarthritis. *Turkish J Sport Med* 2020;55(1):6–13.
- Gül D, Orscelik A, Akpancar S. Treatment of Osteoarthritis Secondary to Developmental Dysplasia of the Hip with Prolotherapy Injection versus a Supervised Progressive Exercise Control. *Med Sci Monit* 2020;26:e919166.
- Jensen KT, Rabago DP, Best TM, Patterson JJ, Vanderby R. Early inflammatory response of knee ligaments to prolotherapy in a rat model. *J Orthop Res* 2008;26(6):816–23.
- Güran Ş, Dilşad çoban Z, Karasimav Ö, Demirhan S, Karaağaç N, Orscelik A, et al. Dextrose solution used for prolotherapy decreases cell viability and increases gene expressions of angiogenic and apoptotic factors. *Gulhane Med J* 2018;60(2):42–6.
- Solmaz I, Akpancar S, Orscelik A, Yener-Karasimav O, Gül D. Dextrose injections for failed back surgery syndrome: a consecutive case series. *Eur Spine J* 2019;21;28(7):1610–7.
- Maniquis-Smigel L, Dean Reeves K, Jeffrey Rosen H, Lyftogt J, Graham-Coleman C, Cheng A-L, et al. Short Term Analgesic Effects of 5% Dextrose Epidural Injections for Chronic Low Back Pain: A Randomized Controlled Trial. *Anesthesiol Pain Med* 2016;7(1):e42550.
- Köroğlu O, Orscelik A, Karasimav Ö, Demir Y, Solmaz I. Is 5% dextrose prolotherapy effective for radicular low back pain? *Gulhane Med J* 2019;61(3):123.
- Inceöz H, Akçalı DT, Solmaz I. Proloterapi ve Enjeksiyonlardaki Yeri. In: Babacan A. Ağrı ve Enjeksiyonlar (1st Ed) Ankara, Türkiye Klinikleri, 2019; 104–9.
- Dagenais S, Jaime C, Scott H. A systematic review of low back pain cost of illness studies in the United States and internationally. *Spine J* 2008;8(1):8–20.
- Yelland MJ, Glasziou PP, Bogduk N, Schluter PJ, McKernon M. Prolotherapy Injections, Saline Injections, and Exercises for Chronic Low-Back Pain: A Randomized Trial. *Spine (Phila Pa 1976)* 2004;29(1):9–16.
- Kim WM, Lee HG, Won Jeong C, Kim CM, Yoon MH. A Randomized Controlled Trial of Intra-Articular Prolotherapy Versus Steroid Injection for Sacroiliac Joint Pain. *J Altern Complement Med* 2010;16(12):1285–90.
- Dechow E, Davies RK, Carr AJ, Thompson PW. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of sclerosing injections in patients with chronic low back pain. *Rheumatology* 1999;38(12):1255–9.
- Dagenais S, Haldeman S, Wooley JR. Intraligamentous injection of sclerosing solutions (prolotherapy) for spinal pain: a critical review of the literature. *Spine J* 2005;5(3):310–28.
- Reeves KD, Klein RG, DeLong WB. Letters. *Spine (Phila Pa 1976)* 2004;29(16):1839–40.
- Miller, Matthew R, Matthews, Robert S RKD. Treatment of painful advanced internal lumbar disc derangement with intradiscal injection of hypertonic dextrose. *Pain Physician* 2006;9(2):115–21.
- Solmaz İ, Orscelik A. Approximately Three Years of Prolotherapy Experience of a Traditional and Complementary Medicine Center: An Epidemiologic Study. *Int J Tradit Complement Med Res* 2022;3(2):64–70.
- Orscelik A. The Importance of the Core Region in Sports Injuries and Sports Performance. *Turkiye Klin J Sport Med-Special Top* 2017;3(3):191–5.
- Tauchi R, Imagama S, Muramoto A, Tsuboi M, Ishiguro N, Hasegawa Y. Influence of spinal imbalance on knee osteoarthritis in community-living elderly adults. *Nagoya J Med Sci* 2015;77(3):329–37.
- Tsuji T, Matsuyama Y, Goto M, Yimin Y, Sato K, Hasegawa YIN. Knee – spine syndrome: correlation between sacral inclination and patellofemoral joint pain. *J Orthop Sci* 2002;7(5):519–23.
- Centeno CJ, Elliott J, Elkins WL, Freeman M. Fluoroscopically

- guided cervical prolotherapy for instability with blinded pre and post radiographic reading. *Pain Physician* 2005;8(1):67–72.
35. Hooper RA, Frizzell JB, Faris P. Case series on chronic whip-lash related neck pain treated with intraarticular zygapophysial joint regeneration injection therapy. *Pain Physician* 2007;10(2):313–8.
  36. DeChellis DM, Cortazzo MH. Regenerative medicine in the field of pain medicine: Prolotherapy, platelet-rich plasma therapy, and stem cell therapy—Theory and evidence. *Tech Reg Anesth Pain Manag* 2011;15(2):74–80.
  37. Hung C-Y, Hsiao M-Y, Chang K-V, Han D-S, Wang T-G. Comparative effectiveness of dextrose prolotherapy versus control injections and exercise in the management of osteoarthritis pain: a systematic review and meta-analysis. *J Pain Res* 2016;9:847–57.
  38. Rabago D, Patterson JJ, Mundt M, Kijowski R, Grettie J, Segal NA, et al. Dextrose Prolotherapy for Knee Osteoarthritis: A Randomized Controlled Trial. *Ann Fam Med* 2013;11(3):229–37.
  39. Reeves KD, Hassanein KM. Long-term effects of dextrose prolotherapy for anterior cruciate ligament laxity. *Altern Ther Health Med* 2003;9(3):58–62.
  40. Rabago D, Zgierska A, Fortney L, Kijowski R, Mundt M, Ryan M, et al. Hypertonic Dextrose Injections (Prolotherapy) for Knee Osteoarthritis: Results of a Single-Arm Uncontrolled Study with 1-Year Follow-Up. *J Altern Complement Med* 2012;18(4):408–14.
  41. Rezasoltani Z, Taheri M, Kazempour Mofrad M, Mohajerani S. Periarticular dextrose prolotherapy instead of intra-articular injection for pain and functional improvement in knee osteoarthritis. *J Pain Res* 2017;10:1179–87.
  42. Avşar MT, Okudan RN, Gümüş ZZ, Samancı R. Efficacy of Prolotherapy With Periarticular 5% Dextrose In The Treatment of Knee Joint Osteoarthritis. *Int J Tradit Complement Med Res* 2021;2(3):162–6.
  43. Scarpone M, Rabago DP, Zgierska A, Arbogast G, Snell E. The Efficacy of Prolotherapy for Lateral Epicondylitis: A Pilot Study. *Clin J Sport Med* 2008;18(3):248–54.
  44. Akcay S, Gurel Kandemir N, Kaya T, Dogan N, Eren M. Dextrose Prolotherapy Versus Normal Saline Injection for the Treatment of Lateral Epicondylopathy: A Randomized Controlled Trial. *J Altern Complement Med* 2020;26(12):1159–68.
  45. Yelland M, Rabago D, Ryan M, Ng S-K, Vithanachchi D, Manickaraj N, et al. Prolotherapy injections and physiotherapy used singly and in combination for lateral epicondylalgia: a single-blinded randomised clinical trial. *BMC Musculoskelet Disord* 2019;20(1):509.
  46. Bertrand H, Reeves KD, Bennett CJ, Bicknell S, Cheng A-L. Dextrose Prolotherapy Versus Control Injections in Painful Rotator Cuff Tendinopathy. *Arch Phys Med Rehabil* 2016;97(1):17–25.
  47. Sari A, Eroglu A. Comparison of ultrasound-guided platelet-rich plasma, prolotherapy, and corticosteroid injections in rotator cuff lesions. *J Back Musculoskelet Rehabil* 2020;33(3):387–96.
  48. Lin C-L, Huang C-C, Huang S-W. Effects of hypertonic dextrose injection in chronic supraspinatus tendinopathy of the shoulder: a randomized placebo-controlled trial. *Eur J Phys Rehabil Med* 2019; 55(4):480-7.
  49. Chang Y-J, Chang F-H, Hou P-H, Tseng K-H, Lin Y-N. Effects of Hyperosmolar Dextrose Injection in Patients With Rotator Cuff Disease and Bursitis: A Randomized Controlled Trial. *Arch Phys Med Rehabil* 2021;102(2):245–50.
  50. Akpancar S, Orselik A, Murat SM, Kenan K. The effectiveness of prolotherapy on failed rotator cuff repair surgery. *Turkish J Phys Med Rehabil* 2019;65(4):394–401.
  51. Rabago D, Nourani B. Prolotherapy for Osteoarthritis and Tendinopathy: a Descriptive Review. *Curr Rheumatol Rep* 2017;19(6):34.
  52. Apaydin AH, Orselik A, Yildiz Y. The Effects of Prolotherapy in Recreational Athletes with Plantar Fasciitis. *Turkish J Sport Med* 2018;53(1):37–46.
  53. Solmaz İ, Orselik A, Akpancar S, Seven MM. The Effectivity Of Prolotherapy Treatment In Shin Splint: A Randomized Controlled Study. *Int J Tradit Complement Med Res* 2022;3(1):1–7.

## \*ISPARTA SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ HASTANESİNDE ERİŞKİNLERDE DEMİR EKSİKLİĞİ ANEMİSİ PREVALANSI VE ETYOLOJİK FAKTÖRLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

\*THE PREVALANCE OF IRON DEFICIENCY ANEMIA IN ADULTS IN HOSPITAL OF ISPARTA SULEYMAN DEMİREL UNIVERSITY AND EVALUATION OF ETIOLOGICAL FACTORS

Emre KAPLANOĞLU<sup>1</sup>, Demircan ÖZBALCI<sup>1</sup>, Emine Güçhan ALANOĞLU<sup>1</sup>, Osman GÜRDAL<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı Isparta

<sup>2</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Ana Bilim Dalı Isparta

**Cite this article as:** Kaplanoğlu E, Özbacı D, Alanoğlu EG, Gürdal O. The Prevalance Of Iron Deficiency Anemia In Adults In Hospital Of Isparta Suleyman Demirel University And Evaluation Of Etiological Factors. Med J SDU 2021; 28(1): 57-65.

\*Bu makalenin basılı ve PDF halindeki orjinal versiyonları yazar sıralamasında hata içermekteydi. Yazar sıralaması "Emre KAPLANOĞLU<sup>1</sup>, Demircan ÖZBALCI<sup>1</sup>, Emine Güçhan ALANOĞLU<sup>1</sup>, Osman GÜRDAL<sup>2</sup>" şeklinde düzeltilmiştir. In the original print and PDF versions of this article contained an error in author order. The order of the authors has now been corrected as "Emre KAPLANOĞLU<sup>1</sup>, Demircan ÖZBALCI<sup>1</sup>, Emine Güçlühan ALANOĞLU<sup>1</sup>, Osman GÜRDAL<sup>2</sup>"

### Öz

#### Amaç

Demir eksikliği anemisi (DEA) dünyada ve ülkemizde en sık görülen hastalıktır ve etyolojisinde birçok neden yer almaktadır. Çalışmamızın amacı DEA' nın Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanesine başvuran hastalarda retrospektif olarak prevalansını ve etyolojisini araştırmaktır.

#### Gereç ve Yöntem

Çalışmaya Nisan 2017 - Kasım 2017 arasında Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları polikliniğine başvuran ve en az tam kan sayımı, ferritin, vitamin B12, folik asit değerleri istenmiş 18-65 yaş arasındaki toplam 1000 hasta alınmıştır. Hastalara ait cinsiyet, yaş, kadınlarda menopozal durum, ek hastalıkları ve etyolojik faktörleri kaydedilmiştir. Bütün hastaların hemoglobin, hematokrit, MCV, RDW, lökosit, trombosit, ferritin, vitamin B12, folik asit düzeyleri kayıt altına alınmıştır. Kadınlarda hemoglobin 12 g/dl altında, erkeklerde 13 g/dl altında (WHO'ya göre) ve ferritin 15 ng/ml altında (romatizmal hastalığı olanlar-

da 100 ng/ml' nin altında) olanlar DEA olarak kabul edilmiştir. DEA' si saptanan hastalarda etyolojik faktörleri incelemek için; diyetle demir alımı, kadınlarda menstrüel kanama, hemoroid, peptik ülser, mide operasyonu, gastrit, malignite gibi sebepler araştırılmıştır. Başvuruda saptanan ek hastalıklar sırasıyla kronik karaciğer hastalığı, kronik böbrek hastalığı, akciğer hastalıkları, bağı dokusu hastalıkları, endokrinolojik hastalıklar, hipertansiyon, diabetes mellitus, maligniteler, hemoglobinopatiler ve inflamatuvar bağırsak hastalıkları olarak gruplandırılmıştır.

#### Bulgular

Çalışmamızdaki kadınların % 25' inde, erkeklerin % 7,4' inde DEA saptanırken tüm hastalarda ise DEA prevalansını % 20,3 olarak bulduk. DEA etyolojisi ise kadınlarda en sık neden menoraji iken erkeklerde gastrit olarak saptandı. Çalışmamızda DEA olan erkeklerin % 55 ve kadınların % 34,4' ünde ise etyoloji saptanmadı.

#### Sonuç

Demir eksikliği anemisi ile ilişkili prospektif, pika ve

İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: demircanozbalci@sdu.edu.tr

Müracaat tarihi/Application Date: 20.02.2020 • Kabul tarihi/Accepted Date: 11.08.2020

ORCID IDs of the authors: D.Ö. 0000-0002-9635-3091; E.K. 0000-0002-5938-127X ;

E.G.A. 0000-0002-8099-9401; O.G. 0000-0003-4670-2254

parazitoz taramalarını da içeren, toplumsal kökenli çalışmalar yapılması gerekmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Demir eksikliği anemisi, prevalans, etyoloji.

## Abstract

### Objective

Iron deficiency anemia (IDA) is one of the most common diseases in our country and effecting lives of millions of people all over the world. There are multifold reasons for its etiology. This is a retrospective cross-sectional study to address the prevalence and etiology of IDA among patients in the SDU Research Hospital, Isparta, Turkey.

### Materials and Methods

A total of 1000 patients ages between 18-65 who were admitted to the Outpatient Clinic of Department of Internal Medicine, SDU School of Medicine, between April 2017 and November 2017. Complete blood count including ferritin, vitamin B12 and level of folic acid values were determined. Gender, age, menopausal status, additional diseases and etiologic factors of the patients were recorded. Hemoglobin, hematocrit, MCV, RDW, leukocyte, platelet, ferritin, vitamin B12 and folic acid levels were also documented. Hemog-

lobin levels were calculated as below 12 g/dl and 13 g/dl in females and males, respectively. Ferritin less than 15 ng/ml (patients with rheumatic diseases less than 100 ng / ml) were accepted as IDA. To examine the etiologic factors in patients with IDA; dietary iron intake, menstrual bleeding in women, hemorrhoid, peptic ulcer, gastric surgery, gastritis, malignancy were investigated. Additional diseases identified at admission were chronic liver/kidney/lung/rheumatoid/endocrinological, hypertension, diabetes mellitus, malignancies, hemoglobinopathies and inflammatory bowel disease.

### Results

In our study, 25 % of the women and 7,4 % of men had IDA, and we found that the prevalence of IDA was 20,3 % in all patients. The most common cause of IDA was menorrhagia in women and gastritis in men. However, we could not fully assess the etiologic factor in 55 % of men and 34,4 % of women with IDA.

### Discussion

Prospective, community based studies that also evaluate pika and parasitosis should be performed in patients with iron deficiency anemia.

**Keywords:** Iron deficiency anemia, prevalence, etiologic factors.

## Giriş

Demir eksikliği anemisi (DEA) dünyada en sık görülen hastalıktır ve etyolojisinde birçok neden yer almaktadır. Dünyada, yaklaşık olarak 1,2 milyar kişiyi etkilemektedir (1). Bu sayı özellikle demir izole demir eksikliği de işin içine katıldığında, iki katına kadar çıkabilmektedir (2). Özellikle, gelişmekte olan ülkelerde daha fazla olmak üzere, tüm yaş gruplarında görülebilmektedir. Yeni doğanlar, adolesanlar, laktasyon veya gebelik dönemindeki kadınlar ve menapozda olmayan tüm kadınlar, artmış ihtiyaçları nedeniyle risk altındadır (3). Ancak, risk grupları dışında da, erişkinlerde, demir eksikliği anemisi sık rastlanan bir sağlık sorunudur. Amerikan sağlıklı erişkin kan donörlerinde yapılan Rise çalışmasında, kadın donörlerin üçte ikisi, erkeklerin ise yarısında demir eksikliği anemisi saptanmıştır (4).

Kadınlarda en sık sebep olarak adet kanamaları göze çarpmaktadır; kadınlar, her adet döneminde yaklaşık 16 mg demir kaybetmektedirler (5, 6, 7). Gelişmekte olan ülkelerde sık sebep, malnütrisyon iken, gelişmiş ülkelerde ise en sık sebep gastrointestinal kanama-

lardır. Özefagus düzeyinden başlayıp, anala kanala kadar uzanan bölümde yer alan polip, tümör, ülser ve angiodisplazi gastrointestinal kanama etyolojisinde yer alırken, özellikle gelişmekte olan ülkelerde gastrointestinal sistem parazitozları, önemli bir malnütrisyon ve kanama sebebi olarak, demir eksikliği anemisi nedenleri arasında rol oynamaktadır (2, 3, 8). Özellikle son yıllarda önemli popülariteye sahip vegan diyet de, özellikle gelişmiş ülkelerde, önemli bir malnütrisyon ve demir eksikliği anemisi nedeni olarak ortaya çıkmaktadır (2, 3). Bunlar dışında genitoüriner ve nadiren solunum sisteminden kanamalar da nedenler arasında görülebilmektedir. Anti asit ilaçların kronik kullanımı, kronik böbrek yetmezliği ve gastrointestinal sistem cerrahisi, yine diğer önemli DEA sebepleri olarak göze çarpmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün ölçütleri göz önüne alındığında, hemoglobin düzeyinin erkekte 13 gr/dl; kadında 12 gr/dl'den az olması anemi olarak tanımlanmakta iken, ferritin değerinin 15 mg/dl'nin altında olması DEA ile uyumludur (2, 9). DEA, halsizlik, efor kısıtlaması, konsantrasyon güçlükleri ve bilişsel fonksiyonlarda bozukluklara yol açarak ciddi morbidite ve iş gücü kaybına sebep olmakta ve hem bireyde hem de toplumsal psikolojik, sosyal

ve ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Tedavisi oldukça basit ve ucuz olmasına rağmen ülkemizde ve dünyada gerek tedaviye ulaşamama, gerekse tedaviyi düzenli şekilde kullanmama sebebiyle etkin tedavi yapılamamaktadır. Demir, vücut tarafından, +2 değerlikli olarak emilebilmekte, +3 değerlikli demirin ise emilimi yetersiz kalmaktadır. +2 değerlikli demir preparatları, konstipasyon ve dispepsi gibi (%30-%40) şikâyetlere sebep olarak kullanım zorluğu oluşturmaktadır (10). Öte yandan +3 değerlikli demirin tedavi edici rolü yoktur. Bu sebeplerle, tedavi kolay ve ucuz olmasına karşın zorluklar mevcuttur.

Çeşitli indeksler kullanarak yaptığımız taramalarda, Isparta yöresinde beta talasemi minör prevalansı çalışmasını saptamamıza karşın (11), DEA prevalansı ve etyolojik faktörlere ilişkin çalışmaya rastlanmamıştır. Biz de polikliniğimize başvuran hastalardaki DEA prevalansı ve etyolojik faktörleri araştırmak amacıyla çalışmamızı planladık. Bu çalışma ile, Isparta bölgesindeki hastalık ile ilgili veriler ortaya konacak, bölgedeki prevalans ve etyolojik faktörleri literatür ile karşılaştırma olanağı bulunacak ve çözüm önerileri ve ilgili diğer konulardaki çalışmalara kaynak oluşturacaktır.

## Gereç ve Yöntem

Çalışmaya Nisan 2017 - Kasım 2017 arasında Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları polikliniğine başvuran ve en az tam kan sayımı, ferritin, vitamin B12, folik asit değerleri istenmiş 18-65 yaş arasındaki toplam 1000 hasta, hasta dosyalarından, retrospektif olarak incelenerek, tanımlayıcı bir araştırma yapılması planlandı. 18-65 yaş arası demir eksikliği anemisi tanısı konmuş ve bilgilerine dosya sisteminden ulaşılabilen hastalar çalışmaya alındı. Gebeliği olan, klinik ve laboratuvar bulgularına ulaşılmayan veya belirlenen yaş aralığı dışındaki hastalar çalışmaya dahil edilmedi.

Hastalara ait cinsiyet, yaş (numune kabul tarihinden doğum tarihi çıkarılarak hesaplanan), kadınlarda menopozal durum (menstruel siklusu olup olmadığı), ek hastalıkları ve etyolojik faktörleri kaydedildi. Bütün hastaların hemoglobin, hematokrit, MCV, RDW, lökosit, trombosit, ferritin, vitamin B12, folik asit düzeyleri kayıt altına alındı.

Kadınlarda hemoglobin 12 g/dl altında, erkeklerde 13 g/dl altında ve ferritin 15 ng/ml altında (romatizmal hastalığı olanlarda 100 ng/ml' nin altında) olanlar DEA olarak kabul edildi.

DEA' si saptanan hastalarda etyolojik faktörleri incelemek için; diyetle kırmızı et tüketimi, gastrointesti-

nal sistem kanama ve malabsorbsiyon yapabilecek patolojiler, malignite ve ayrıca kadınlarda menstrüel kanama incelendi. Günde iki saatten daha fazla ped değişimi, 7 günden uzun süren menstruel kanama veya sosyal yaşamı bozacak ölçüde anemi meydana getiren kanama, menoraji olarak tanımlandı. Kırmızı et alım azlığı, haftada üç porsiyondan az et tüketimi olarak tanımlandı.

Başvuruda saptanan ek hastalıklar; kronik karaciğer hastalıkları, böbrek hastalıkları, akciğer hastalıkları, romatizmal hastalıklar, endokrinolojik hastalıklar, hipertansiyon, diabetes mellitus, maligniteler, hemoglobinopatiler ve inflamatuvar bağırsak hastalıkları olarak gruplandırıldı.

Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma olarak gösterildi. Tanımlayıcı istatistik için yüzde/oran, ortalama  $\pm$  standart sapma (SD) değerleri verildi. DEA sıklığının cinsiyetler arasındaki farklılığını göstermek için çapraz tablolama Ki-Kare testi kullanıldı. Bütün nicel değişkenlerin normal dağılım durumları Shapiro-Wilk testi ile belirlenip bu değişkenlerin homojen olup olmadıkları ise Levene testi ile kontrol edildi. Etiyolojik olarak yaşa göre istatistiksel anlamlılığı, kadın ve erkeklerin ortalama hemoglobin, MCV, RDW ve ferritin değerlerinin karşılaştırılması bağımsız t-testi ve 2'den fazla grupların karşılaştırılmaları tek-yönlü varyans analiz ile tespit edildi. Test sonucunda normal dağılım göstermeyen ve homojen olmadığı saptanan verilerin karşılaştırılmasında parametrik olmayan bağımsız Mann-Whitney U testi yapıldı. Bu değerlerin 2'den fazla çoklu karşılaştırılmaları ise Kruskal-Wallis H testi hesaplandı. İstatistiksel analizler için SPSS 25.2 (Statistical Package for Social Sciences SPSS, Inc., Chicago, Illinois) paket programı kullanıldı.

Çalışma için Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu 16.11.2017 tarih ve 215 sayılı onayı alındı.

## Bulgular

Çalışmaya alınan toplam 1000 hastanın 732'si (% 73) kadın, 268'i (% 27) erkekti. Tüm hastaların yaş ortalaması 39 iken, erkek hastaların yaş ortalaması 41, kadınların ise 38 idi. Yaş aralıklarına göre dağılım şeklindeki gibidir (Tablo 1).

Çalışmamızdaki toplam 732 kadın hastanın 512' sinin (% 70) premenopozal, 126' sinin (% 17) postmenopozal ve 72' sinin (% 10) perimenopozal dönemde olduğu saptandı. Yirmi iki hastada (% 3) menopozal durum bilgisine dosya takiplerinden ulaşılamadı.

Çalışmada, tüm bireylerdeki ortalama hemoglobin değeri 12,8 gr/dl, erkeklerde 14,2 gr/dl ve kadınlarda 12,2 gr/dl olarak saptandı. Kadınların 259 (% 35)' unda, erkeklerin 68 (% 25)' inde anemi olduğu saptandı, tüm hastalarda anemi prevalansı % 32,7 (n=327) saptandı (Tablo 2). Anemisi olan erkeklerin ortalama hemoglobin değeri 10,39 gr/dl (4,6 - 12,9) iken kadınlarınki ise 9,9 gr/dl (3,9 - 11,9) idi.

Çalışmamızda anemisi olan toplam 259 kadın hastanın 205' inin (% 79) premenopozal, 33' ünün (% 13) postmenopozal ve 17' sinin (% 7) perimenopozal dönemde olduğu saptandı. Dört hastada (% 1) menopozal durum bilgisine ulaşılamadı (Tablo 3).

Çalışmamızdaki kadınların % 25 (n=183) inde, erkeklerin % 7,4 (n=20) inde DEA saptanırken, tüm hastalarda DEA prevalansı % 20,3 (n=203) saptandı.

DEA olan 183 kadından 159' unun (% 86) premenopozal, 12' ünün (% 6,5) postmenopozal ve 8' inin (% 4,3) perimenopozal dönemde olduğu saptandı. Dört hastada (% 2,1) menopozal durum bilgisine ulaşılamadı.

Çalışmamızdaki DEA olan kadın hastalardan romatolojik hastalığı (4 RA, 1 FMF, 1 sjögren, 1 psöriyatik artrit, 1 spondiloartropati) olup aynı zamanda ferritin düzeyi 15-100 ng/ml arasında olan 8 hasta varken, aynı durumda olan 1 erkek hasta (spondiloartropati) bulunmaktaydı.

Çalışmamızdaki DEA olan 18-35 yaş aralığındaki kadınlarda (n=81) etyolojik faktör değerlendirildiğinde

hastaların 28' inde menoreji, 12' sinde alım azlığı, 8' inde gastrit, 4' ünde alım azlığı ve menoreji birlikteliği bulunmaktayken 26' sında etyolojiye ait bir veri bulunamadı. 36-50 yaş aralığında (n=88) ise 31' inde menoreji, 10' unda gastrit, 8' inde alım azlığı, 3' ünde alım azlığı ve menoreji birlikteliği varken 31' inde etyolojiye ait bir veri bulunamadı. 51-65 yaş aralığında (n=14) 4' ünde gastrit, 3' ünde menoreji, 1' inde alım azlığı ve menoreji birlikteliği varken 6' sında etyolojiye ait bir veri bulunamadı.

DEA olan 18-35 yaş aralığındaki erkeklerde (n=9) etyolojik faktör değerlendirildiğinde, hastaların 1' inde hemoroid, 1' inde peptik ülser bulunmaktayken 7' sinde etyolojiye ait bir veri bulunamadı. 36-50 yaş aralığında (n=5) ise 1' inde gastrit, 1' inde malignite bulunmaktayken 3' ünde etyolojiye ait bir veri bulunamadı. 51-65 yaş aralığında (n=6) 2' sinde gastrit, 1' inde gastrektomi, 1' inde alım azlığı, 1' inde peptik ülser ve gastrit birlikteliği varken 1' inde etyolojiye ait bir veri bulunamadı (Tablo 4).

DEA olan hastalarda, 62 hastada menoreji, 25 hastada gastrit ve 21 hastada alım azlığı görüldü. Erkeklerde en sık görülen etyolojik faktör gastrit iken, kadınlarda menoreji olduğu saptandı.

Çalışmamızdaki DEA olan hastaların 136' sında ek hastalık bulunmamaktaydı. Hem DEA olan hem de ek hastalığı olanlarda ise; 14' ünde romatolojik (6 RA, 2 SLE, 2 spondiloartropati, 1 sjögren, 1 FMF, 1 psöriyatik artrit, 1 AS), 11' inde endokrinolojik hastalık (8 hipotiroidi, 3 nodüler guatr), 8' inde hemoglobinopati

**Tablo 1** Yaş Aralığı - Cinsiyet Dağılımı

	Kadın	Erkek
18-35 yaş	320	111
36-50 yaş	260	64
51-65 yaş	152	93

**Tablo 2** Anemi-Menopozal Durum Dağılımı

	Kadın hastalar
Premenapozal	205
Perimenapozal	17
Postmenapozal	33
Bilinmiyor	4

(talasemi minör), 7' sinde hipertansiyon (HT), 7' sinde diabetes mellitus (DM), 4' ünde kronik akciğer hastalığı, 4' ünde HT ve DM birlikteliği, 3' ünde malignite(1 mide kanseri, 1 ALL, 1 tiroid papiller ca), 2' sinde HT ve romatolojik hastalık birlikteliği varken, 1' er hastada ise kronik karaciğer, kronik akciğer hastalığı ve HT birlikteliği, kronik akciğer ve endokrinolojik hastalık birlikteliği, DM ve endokrinolojik hastalık birlikteliği, hemoglobinopati ve romatolojik hastalık birlikteliği, HT, DM ve malignite birlikteliği, HT, DM ve romatolojik hastalık birlikteliği vardı. Ayrıca DEA olan hiçbir hastada kronik böbrek ve / veya inflamatuvar barsak hastalığı bulunmamaktaydı.

Çalışmamızdaki DEA olan ve etyolojisinde alım azlığı saptanan (n=21) hastaların 1' inde DM, 1' inde HT, 1' inde ise HT ve DM birlikteliği vardı.

Çalışmamızdaki DEA olan ve etyolojisinde hemoroid (n=3), mide operasyonu (n=1) saptanan hastaların hiçbirinde ek hastalık yoktu.

Çalışmamızdaki DEA olan ve etyolojisinde peptik ülser saptanan (n=2) hastaların 1' inde hemoglobino-pati vardı.

Çalışmamızdaki DEA olan ve etyolojisinde gastrit saptanan (n=25) hastaların 4' ünde romatolojik hastalık, 3' ünde DM, 1' inde HT, 1' inde hemoglobinopati, 1' inde endokrinolojik hastalık, 1' inde HT ve DM birlikteliği, 1' inde HT ve romatolojik hastalık birlikteliği vardı.

DEA olan ve etyolojisi bilinmeyen (n=74) hastaların 8' inde romatolojik, 6' sında endokrinolojik, 4' ünde HT, 4' ünde hemoglobinopati, 2' sinde DM, 1' inde kronik akciğer, 1' inde malignite, 1' inde kronik akciğer ve endokrinolojik hastalık birlikteliği, 1' inde HT ve DM birlikteliği, 1' inde HT, DM ve romatolojik hastalık birlikteliği, 1' inde HT, ve romatolojik hastalık birlikteliği, 1' inde ise DM ve endokrinolojik hastalık birlikteliği vardı.

DEA olan hastaların (n=203) ortalama hemoglobin değeri  $9,8 \pm 1,6$  (3,9-12,9), MCV ortalaması  $66,9 \pm 8,7$  (45,9- 90,8), RDW ortalaması  $18,6 \pm 3,4$  (13,4-35,6), Ferritin ortalaması  $6,8 \pm 9,4$  (0,5-95,6) olarak saptandı.

DEA olan hastaların (n=203) 20' si erkek, 183' ü kadındı. Erkeklerin ortalama hemoglobin değeri  $10,2 \pm 1,6$  (8,0-12,9), MCV ortalaması  $64,6 \pm 7,4$  (54,4-78,5), RDW ortalaması  $20,7 \pm 4,9$  (16,1-32,5), Ferritin ortalaması  $7,61 \pm 4,3$  (2,07-20,4) olarak saptandı. Kadınların ise ortalama hemoglobin değeri  $9,7 \pm 1,6$  (3,9-11,9), MCV ortalaması  $67,2 \pm 8,8$  (45,9-90,8), RDW ortalaması  $18,4 \pm 3,1$  (13,4-35,6), Ferritin ortalaması  $6,81 \pm 9,87$  (0,5-95,6) olarak saptandı.

## Tartışma

Demir eksikliği anemisi tüm Dünya'da yaygın bir sorundur. Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan Ulusal Sağlık ve Beslenme Araştırması (NHANES)'nin 1988-1994 yıllarındaki sonuçlarına göre DEA 50 yaş-tan küçük erkeklerde  $< \%1$  ve 50 yaş üzerinde  $\%2-4$  iken 12-19 yaş gurubundaki menstruasyon gören genç kızlarda  $\%9-11$  ve postmenapozal kadınlarda  $\%5-7$ 'dir (12).

Van ili ve yöresinde erişkinlerde anemi sıklığı, erkeklerde  $\%11,9$  ve kadınlarda  $\%17,3$  olarak bulunmuştur (13). Çoban ve arkadaşları, yaşlı hastalarda anemi prevalansını  $\% 25$  olarak saptadılar (14). Ankara'da, 827 yaşlı hastada anemi prevalansı,  $\%7,3$  olarak saptanmıştır (15). İzmir'de, bakımevinde kalan 60 yaş üzeri 257 hastada ise prevalans  $\%54,9$  olarak saptanmıştır (16). Kılınç ve arkadaşları, 1491 hastalık çalışmalarında, Kahramanmaraş'ta 19-40 yaş arasındaki kadınlarda anemi prevalansının  $\%40$  olduğu gözlenmiştir (17). Malatya'da 823 gebe kadında anemi prevalansı  $\%27,1$  olarak saptanmıştır (18). Emiroğlu ve arkadaşlarının 472 hastalık çalışmasında anemi prevalansı  $\%37,9$  iken, kadın hastaların  $\%45,5$ 'inde anemi saptanırken, bu oran erkeklerde  $\%22,2$  idi (19). Saydam ve arkadaşlarının çalışmasında ise kadınlarda anemi prevalansı  $\%56$  olarak saptanırken bu hastaların  $\%37,1$ 'inde DEA bulunmaktaydı (20). Bizim çalışmamızda da anemi prevalansı  $\% 32,7$  olarak bulunmuştur; kadınlarda  $\% 35$  iken, erkeklerde  $\% 25$  olarak saptanmıştı. Yapılan çalışmalarda farklı prevalans yüzdelerinin, öncelikle çalışmaya alınan yaş gruplarının farklı olması ve bölgesel farklılıkların bulunması olduğu düşünülmüştür. Tüm çalışmalarda, bizim çalışmamızda olduğu gibi, kadınlarda anemi prevalansı, erkeklerden yüksektir. Çalışmamızda anemi prevalansı, diğer çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur.

Tüm dünyada olduğu gibi, ülkemizde de, menstruel siklus, gebelik ve doğum gibi faktörlerden dolayı kadınlar demir eksikliği anemisi için ekstra risk altındadır ve DEA kadınlarda daha fazla görülür (21). Gaziantep'te doğurgan çağıdaki kadınlarda, en önemli anemi sebebini DEA oluşturmaktadır. Bu çalışmada anemi sıklığı evlilerde  $\% 38,9$ , bekârlarda  $\%18,9$  olarak bulunmuştur (22). Karaoglu ve arkadaşlarının çalışmasında anemik gebelerin  $\%50$ 'sinde DEA saptanmıştır. Karakuş ve arkadaşlarının, Antalya'da yaptıkları 720 hastalık çalışmada, anemik hastaların  $\%90,7$ 'si kadındı ve bu hastaların  $\%50$ 'sinde DEA saptanmıştı; ayrıca kadınlarda, erkeklere oranla anlamlı oranda fazla hastada DEA saptanmıştır (23). Kılınç ve arkadaşlarının çalışmasında 19-40 yaş arası kadınlarda anemi prevalansı  $\%40$  olarak saptanmıştır (17). Bizim

çalışmamızda da, kadınların % 25' inde, erkeklerin ise % 7,4' inde DEA saptandı.

Emiroğlu ve arkadaşları, 65 yaş üzeri DEA prevalansını %43 olarak saptamışlardır (19). Erdem ve arkadaşlarının aile hekimine başvuran kadınlardaki anemi sebepleri içinde demir eksikliğinin % 90 ile ilk sırada yer aldığını saptamışlardır (24). Kılınç ve arkadaşları, 19-40 yaş arası DEA prevalansının %23,8 olarak saptarken (17), Asma ve arkadaşları, kadınlarda DEA prevalansını kadınlarda %17,5, erkeklerde %1,6 bulmuşlardır (25). Soydal ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya katılanların % 15,4'ünde DEA saptanmıştır (26). Ülkemizde, genellikle bölgesel ve belirli yaş gruplarında yapılan DEA çalışmaları göze çarpmaktadır. Erişkinlerde, toplumun tüm katmanlarını, yaş gruplarını ve ülkenin tümünden alınan örneklerle yapılan bir prevalans çalışmasına rastlanmamıştır ve bu, önemli bir eksik olarak gözlenmiştir. Yine yöresel bir çalışma olan çalışmamızda ise, DEA prevalansı % 20,3 olarak saptandı.

Karakuş ve arkadaşları, çalışmalarında DEA'lı kadın/erkek oranını 8,64 olarak saptamışlardır (23). Bizim çalışmamızda ise DEA'de kadın/erkek oranı 9,15 idi ve bu oran literatürle uyum göstermektedir.

Emiroğlu ve arkadaşlarının çalışmasında, anemik hastalarda ortalama hemoglobin değeri 10,6 gr/dl ve Karakuş ve arkadaşlarının çalışmasında 10,1 iken, bizim çalışmamızda erkeklerde ortalama hemoglobin değeri 10,3 gr/dl, kadınlarda ise 9,9 gr/dl (3,9 - 11,9) saptanmıştır ve bulgularımız literatürle uyumludur.

DEA'da etyoloji yaş ve cinsiyete göre farklılıklar göstermektedir. Erkeklerde ve menstrüel çağıdaki kadınlarda DEA sıklıkla gastrointestinal sistemden kayıplara bağlıdır. Doğurganlık çağındaki kadınlarda ise genital sistemden kanamalar ilk sıradadır, ancak gelişmekte olan ülkelerde nütrisyonel eksiklikler ilk sırada bulunmaktadır (2, 3, 5). Bazı hastalarda tanı sırasında birden çok faktör söz konusu olabilir. Demirden fakir diyet ile menstruasyona bağlı kayıpların birlikteliği özellikle gelişmekte olan ülkelerde en sık görülen kombinasyondur. Ayrıca, Helikobakter pylori (H.P) ile DEA arasındaki ilişki bulunmaktadır; H.pylori ile enfekte hastalarda DEA gelişme riski 2,8 kat arttığı gösterilmiştir (27, 28, 29). Karakuş ve arkadaşlarının çalışmasında erkeklerde görülen en sık DEA etyolojisi H.P. pozitif gastrit iken, kadınlarda menstrüasyon bozukluklarıydı. Çalım ve arkadaşlarının, İstanbul'da 150 hasta ile yapmış oldukları bir çalışmada da etyolojide en sık sebep eroziv gastrit olarak bulunmuştur; etyolojilerde cinsiyet farkı yoktur. İkinci en sık görülen etyoloji ise mide karsinomudur; hastaların yata-

rak araştırılması gereken hasta grubunda olmaları, malignite oranını yükseltmiş ve kadınlarda menstrüel kanamayı geri planda bırakmıştır (30). Karakuş ve arkadaşlarının çalışmasında, erkeklerde H.P. pozitif gastrit, kadınlarda da menoraji en sık DEA sebebi olarak bulunmuştur. Bizim çalışmamızda, DEA'si olan kadınlarda etyolojik faktör değerlendirildiğinde en sık neden menoraji iken gastrit ve kırmızı et alım azlığı diğer sık görülen nedenlerdi. Çalışmamızdaki DEA' si olan erkeklerde etyolojik faktör değerlendirildiğinde ise, en sık neden gastrit idi ve bulgularımız literatür ile uyum göstermektedir.

Ülkemizde de sık görülen parazitozlar (Ancylostoma duodenale ve Necator Americanus) duodenuma yapışarak DEA' ne neden olmaktadır (31). Öztürk ve arkadaşlarının Ankara' da yaptıkları çalışmada, etyolojik faktör olarak erkeklerde ilk sırada (% 51) diyetle demir alımında azalma bulunmuş, yetersiz demir alımının sebebi ise % 28,7' sinde pika ve % 22,3' ünde yetersiz beslenme tespit edilmiştir. İkinci sırada ise, (% 35,2) demir kaybı bulunmaktadır ve % 19,2' sinde demir kaybının sebebi gastrointestinal sistemdeki patolojilere ve % 16' sında da bağırsak parazitlerine bağlı bulunmuştur. Kadın hastalarda, en önemli etyolojik faktör, olan demir kaybının % 35,6' sında jinekolojik kaynaklı ve %21,4' ünde gastrointestinal sistem kaynaklı kayıp olduğu belirlenmiştir. İkinci sırada tamamı yetersiz beslenme ile demir alımında azalmaya bağlı bulunmuştur. Erkek hastaların % 13,8'i ve kadın hastaların % 12,2'sinde etyoloji bulunamamıştır. (32). Çalım ve arkadaşlarının çalışmasında da %15,3 oranında DEA etyolojisi aydınlatılamamıştır. Yüksel ve arkadaşlarının, 60 yaş üzeri DEA tanılı 714 hastanın geriye dönük olarak değerlendirildiği çalışmalarında, hastaların sadece 290' ında demir eksikliğini açıklayacak neden bulunabilmiştir (33).

Celal Bayar Üniversitesinde yapılan bir çalışmada halsizlik, yorgunluk, solukluk vb. yakınmaları ile başvuran ve hematoloji sonuçlarında DEA ortaya çıkan 17-82 yaşlarındaki 100 hastanın %22'sinde barsak protozonları saptanmıştır. Sonuç olarak, diğer nedenler gözden geçirildikten sonra bağırsak protozonlarının da DEA nedenlerinden biri olabileceğinin hatırlanması gerektiği kanısına varılmıştır (34). Bizim hastalarımızda parazitoza rastlanmadı, ancak parazitoz için ek tetkiklerin hastalara çoğunlukla istenmediği saptandı. Etyoloji saptanmayan hastalarda parazitoz açısından ileri tetkikler yapılması gerekmektedir; bizim grubumuzda ayrıca yapılabilecek ek tetkiklerde parazitoza rastlanması mümkün olabilir.

Selçuk Üniversitesinde yapılan bir çalışmada, kronik GİS kanaması olduğu düşünülen 72 olguya (33 ka-



Tablo 3 Anemi-Cinsiyet Dağılımı

Anemi-Cinsiyet	Anemik Olan	Anemik Olmayan	Toplam
Kadın	259 (%35,3)	473 (%64,7)	732
Erkek	68 (%25,3)	200 (%74,7)	268
Toplam	327 (%32,7)	673 (%67,3)	1000

Tablo 4 Anemi-Cinsiyet Dağılımı

Etyolojik Faktörler ve Cinsiyet-Yaş Gruplarının Değerlendirilmesi	Cinsiyet						Toplam (n=203)
	Kadın			Erkek			
	18-35 yaş (n=81)	36-50 yaş (n=88)	51-65 yaş (n=14)	18-35 yaş (n=9)	36-50 yaş (n=5)	51-65 yaş (n=6)	
Alım Azlığı	12(%57,1)	8 (%38)	0	0	0	1 (%4,9)	21
Menoraji	28(%45,1)	31(%50)	3(%4,9)	0	0	0	62
Alım Azlığı + Menoraji	4 (%50)	3(%37,5)	1(%12,5)	0	0	0	8
Peptik Ülser	0	1 (%50)	0	1(%50)	0	0	2
Menoraji + Peptik Ülser	0	1 (%100)	0	0	0	0	1
Gastrit	8 (%32)	10 (%40)	4 (%16)	0	1 (%4)	2 (%8)	25
Menoraji + Gastrit	1 (%50)	1 (%50)	0	0	0	0	2
Menoraji + Hemoroid	1 (%100)	0	0	0	0	0	1
Peptik Ülser + Gastrit	0	0	0	0	0	1 (%100)	1
Bilinmiyor	26 (%35,13)	31(%41,89)	6(%8,13)	7(%9,45)	3(%4,05)	1 (%1,35)	74
Toplam	81 (%39,90)	88 (%43,35)	14 (%6,89)	9 (%4,44)	5 (%2,47)	6 (%2,95)	203

dın, 39 erkek) yapılan alt ve üst endoskopik inceleme sonucunda, %16,6 olguda alt GİS, % 61,1 hastada üst GİS patoloji saptandı. %22,2 olguda DEA yol açan bir neden bulunamadı; bu sonuç bizim bulgularımıza daha yakındır. %20,9 olguda eroziv gastrit, %15,3 olguda doudenal ülser, saptandı. Toplam malignite oranı %6,9' du (35). Çalışmamızda DEA olan erkeklerin % 55 ve kadınların % 34,4' ünde etyoloji bilinmiyordu. Bu hastaların en azından bir kısmında daha ileri tetkiklerle nedenin bulunabileceği düşünülebilir. DEA ile başvuran ve etyoloji aydınlatılamayan olgularda, çölyak hastalığından şüphelenilmeli ve endoskopik olarak duodenum ikinci kısım biopsisi alınmalıdır (36, 37). Ayrıca pankreas yetersizliği ve ince barsak Crohn hastalığında da emilim kusuruna bağlı DEA' si sık olarak görülür (35). Bu sebeple, etyolojisi belli olmayan hastalarda, yapılacak tetkiklere enteroklizis ve MR enteroskopi de eklemek gerekebilir.

Çalışmamızın çeşitli zayıflıkları bulunmaktadır. Prospektif bir çalışma olmadığından, etyolojiler ile ilgili yapılabilecek bazı ek tetkikler yapılamamıştır. Hastalar incelendiğinde, etyolojisi belli olmayan bazı hastalarda parazit incelemelerinin yapılmadığı gözlenmiştir. Bu durum hem çalışmamızda etyolojik olarak parazit toz olmadığını açıklarken aynı zamanda çalışmanın zayıf bir tarafını göstermektedir. Birçok hastada da pika açısından sorgulama yapılmadığı veya sorgulansa bile kayıt oluşturulmadığı gözlenmiştir; bu sebeple çalışmamızda pika açısından değerlendirme yapamadık. Prospektif, hastaneye başvuru yapmayan daha büyük bir popülasyonda, çalışma çok daha değerli olabilirdi. Yine de, Isparta yöresindeki ilk çalışma olması, bu çalışmanın devam çalışmalarına ışık tutabileceğini düşündürmektedir.

## Sonuç

Çalışmamızda, DEA'nın Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanesine başvuran erişkin hastalardaki prevalansını ve etyolojisini araştırdık. Kadınların % 25'inde, erkeklerin % 7,4'ünde DEA saptanırken, tüm hastalarda ise DEA prevalansını % 20,3 olarak bulduk. DEA etyolojisinde ise kadınlarda en sık neden menoraji iken erkeklerde gastrit olarak saptandı. Çalışmamızda DEA olan erkeklerin % 55 ve kadınların % 34,4'ünde ise etyoloji bilinmiyordu. Dünyada ve Türkiye'de DEA etyolojisi ve prevalansı için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

## Kaynaklar

- Kassebaum NJ, Jasrasaria R, Naghavi M, Wulf SK, Johns N, Lozano R, et al. A systemic analysis of global anemia burden from 1990 to 2010. *Blood*. 2014 Jan 30;123(5):615-24. doi: 10.1182/blood-2013-06-508325.
- Chamaschella C. Iron deficiency. *Blood*. 2019 Jan 3;133(1):30-39. doi: 10.1182/blood-2018-05-815944. Epub 2018 Nov 6.
- Lopez A, Cacoub P, Macdougall IC, Peyrin-Biroulet L. Iron deficiency anaemia. *Lancet*. 2016;387(10021):907-916.
- Cable RG, Brambilla D, Glynn SA, et al; National Heart, Lung, and Blood Institute Recipient Epidemiology and Donor Evaluation Study-III (REDS-III). Effect of iron supplementation on iron stores and total body iron after whole blood donation. *Transfusion*. 2016;56(8):2005-2012.
- Miller EM. The reproductive ecology of iron in women. *Am J Phys Anthropol* 2016; 159(Suppl 61):S172-95.
- Levi M, Rosselli M, Simonetti M, et al. Epidemiology of iron deficiency anaemia in four European countries: a population-based study in primary care. *Eur J Haematol* 2016. [Epub ahead of print].
- DeLoughery TG. Iron deficiency anemia. *Med Clin N Am* 101 (2017) 319-332 <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcna.2016.09.004>.
- Pantopoulos K, Porwal SK, Tartakoff A, et al. Mechanisms of mammalian iron homeostasis. *Biochemistry* 2012;51(29):5705-24.
- Zimmermann MB, Hurrell RF. Nutritional iron deficiency. *Lancet* 2007;370(9586): 511-20.
- Tolkien Z, Stecher L, Mander AP, et al. Ferrous sulfate supplementation causes significant gastrointestinal side-effects in adults: a systematic review and metaanalysis. *PLoS One* 2015;10(2):e0117383.
- Tunç B, Cetin H, Gümrük F, Istanbul B, Yavrucuoğlu H, Kurt U, et al. The prevalence and molecular basis of beta-thalassemia in Isparta province and region. *Turk J Pediatr*. 2002 Jan-Mar;44(1):18-20.
- Looker AC, Dallman PR, Carroll MD, Gunter EW, Johnson CL. Prevalence of iron deficiency in the United States. *Jama*. 1997;277(12):973-6.
- Dilek İ, Altun S, Tuncer İ, Uygan İ, Topal C, Aksoy H. Demir eksikliği anemisinde hemoglobin, hematokrit değerleri, eritrosit indeksleri ve etyolojik nedenlerin değerlendirilmesi. *Van Tıp Dergisi*. 2000;7(2):51-6.
- Çoban E, Timuragaoglu A, Meric M. Iron Deficiency Anemia in the Elderly: Prevalence and Endoscopic Evaluation of the Gastrointestinal Tract in Outpatients. *Acta Haematol* 2003;110:25-28 DOI: 10.1159/000072410.
- Yıldırım T, Yalcin A, Atmis V, Cengiz OK, Aras S, Varlı M, et al. The prevalence of anemia, iron, vitamin B12, and folic acid deficiencies in community dwelling elderly in Ankara, Turkey. *Archives of Gerontology and Geriatrics* 60 (2015) 344-348.
- Sahin S, Tasar PT, Simsek H, Çiçek Z, Eskiizmir H, Aykar FS, et al. Prevalence of anemia and malnutrition and their association in elderly nursing home residents. *Aging Clin Exp Res* (2016) 28:857-862. DOI 10.1007/s40520-015-0490-5.
- Kılınc, M, Yuregir GT, Eker Bicer H. Anaemia and iron-deficiency anaemia in south-east Anatolia. *Eur J Haematol* 2002; 69: 280-283.
- Karaoğlu L, Pehlivan E, Egri M, Deprem C, Gunes G, Genc MF, et al. The prevalence of nutritional anemia in pregnancy in an east Anatolian province, Turkey *BMC Public Health* 2010, 10:329
- Emiroğlu C, Görpelioglu S, Aypak C. The relationship between nutritional status, anemia and other vitamin deficiencies in the elderly receiving home care. *J Nutr Health Aging*. 2019;23(7):677-682.
- Saydam BK, Genc RE, Sarac F, Turfan EC. Prevalence of anemia and related factors among women in Turkey. *Pak J Med Sci* 2017;33 (2): 433-438.
- Karagüzel N. Fertil çağdaki kadınlarda kontraseptif yöntemler ve anemi ilişkisi. (Uzmanlık Tezi) Tez Danışmanı: Doç. Dr. E. Zeynep Vural Tuzcular İstanbul 2006;36-71-72.
- Bozkurt A, Koçoğlu F, Beydağı H, Çevik I, Çelik B. Gaziantep kent merkezinde yaşayan 15-49 yaş kadınlarda anemi prevalansı. *Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 1995;20:244-8.
- Karakuş V, Giden A, Soysal DE, Bozkurt S, Kurtoğlu E. Erişkin Hastalarda Anemi Etiyolojisi, Risk Faktörleri ve Nüksün Değerlendirilmesi. *Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Tıp Dergisi* 2016;3(1):1-6.
- Erdem Ö, Erten Bucaktepe G, Kara İH. Aile hekimliği polikliniğine başvuran kadınlarda demir eksikliği anemisi ve gestasyon öyküsü ilişkisi. *Dicle Medical Journal/Dicle Tıp Dergisi*. 2009;36(2).
- Asma S, Gerekligöglu C, Erdogan AF, Yeral M, Kasar M, Boga C, et al. Prevalence of iron, folic acid and vitamin B12 deficiency in patients with thalassemia minor. *Turkish Journal of Family Medicine and Primary Care*. 2013;7(4).
- Soydal U, Yıldırım RC, Aycan S. The Prevalence of Iron Deficiency Anemia In the Workers of Ankara Soil and Fertilizer Research Insititute and the Related Factors. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. 2001;21(5):391.
- Hershko C, Ianculovich M, Souroujon M. A hematologist's view of unexplained iron deficiency anemia in males: impact of Helicobacter pylori eradication. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2007;38(1):45-53.
- Cardamone M, Alex G, Harari MD, Moss WP, Oliver MR. Severe iron-deficiency anaemia in adolescents: Consider Helicobacter pylori infection. *Journal of paediatrics and child health*. 2008;44(11):647-50.
- Muhsen K, Barak M, Henig C, Alpert G, Ornoy A, Cohen D. Is the association between Helicobacter pylori infection and anemia age dependent? *Helicobacter*. 2010;15(5):467-72.
- Çalım A, Kanat E, Mazı EE, Oygen Ş, Karabay U, Borlu F. Demir eksikliği ile yatan hastaların etyolojik değerlendirilmesi. *Med Bull Sisli Etfal Hosp*. DOI: 10.14744/SEMB.2018.47354.
- Yereli K, Saruç M, Özdemir E, Girginkardeşler N, Özbilgin A. Demir eksikliği anemisi saptanan erişkin hastalarda barsak protozoa insidansının araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 1998;22(1):29-31.
- Öztürk A, Özkan Y, Sezer M, Kandemir G, Başak M, Üskent N. Demir eksikliği anemisi: üç yıllık sonuçlarımız. *GATA Bülteni*. 1997;39:204-7.
- Yüksel M, Saka B, Vatanserver S. Yaşlılarda demir eksikliği anemisi etiyolojisinin ve sıklığının saptanması. *İç Hastalıkları Dergisi* 2012;19:87-97.
- Yereli K, Saruç M, Özdemir E, Girginkardeşler N, Özbilgin A. Demir eksikliği anemisi saptanan erişkin hastalarda barsak protozoa insidansının araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 1998;22(1):29-31.

35. Atamer T. Anemik Hastaya Yaklaşım. Türkiye Klinikleri Journal of Hematology. 2004;2(2):89-95.
36. Annibale B, Capurso G, Delle Fave G. The stomach and iron deficiency anaemia: a forgotten link. Digestive and liver disease. 2003;35(4):288-95.
37. Aydemir S, Kadioğlu G, Bayraktaroğlu T, Üstündağ Y, Özeltekin İ, Borazan A, et al. Demir Eksikliği Anemili Olgularda Celiac Hastalığı Prevalansı. Türkiye Klinikleri Journal of Gastroenterohepatology. 2004;15(3):101-5.

