

# Turkish Journal of Clinics and Laboratory



*Türk Klinik ve Laboratuvar Dergisi*

Eylül 2019, Cilt:10 Sayı:3





# TURKISH JOURNAL of CLINICS and LABORATORY

## Türk Klinik ve Laboratuvar Dergisi

### Editors in Chief / Baş Editörler

Mustafa ALTINBAS, Prof Dr

Serdar GUNAYDIN, Prof Dr

### Associate Editor / Yardımcı Editör

Orhan Eren GUNERTEM, Dr

### Editorial Board/ Yayın Kurulu

Berkant OZPOLAT, Prof Dr

Mehmet ILERI, Prof Dr

Fevzi TORAMAN, Prof Dr

Hatice Gul HATIPOGLU, Prof Dr

Bulent OZKURT, Prof Dr

Elvan ISERI, Prof Dr

Zubeyde NUR, Prof Dr

Isil OZKOCAK, Prof Dr

Kanat OZISIK, Prof Dr

Erkan DIKMEN, Prof Dr

Pinar OZISIK, Prof Dr

Mehmet Ali ONUR, Prof Dr

Zeliha Gunnur DIKMEN, Prof Dr

Hakan TUZ, Prof Dr

Tolga Resat AYDOS, Associate Prof

Tayfun IDE, DVM

Berrin GUNAYDIN, Prof Dr

Gokturk FINDIK, Prof Dr

Koray AYDOGDU, Dr

Salih CESUR, Associate Prof

Mehmet GUMUS, Prof Dr

### Franchise Owner / İmtiyaz Sahibi

Eyüp ÖZEREN

### Manager In Charge / Sorumlu Yazı İşleri Müdürü

Metin ÖZSOY

E-mail: mozsoy@ada.net.tr

### General Coordinator / Genel Koordinatör

Cihan SEVİM

### Graphic Design / Grafik Tasarım

Başak AY KARABAK

E-mail: basakay2510@gmail.com

Yayın İdare Merkezi

DNT ORTADOĞU YAYINCILIK A.Ş.

dntortadoguyayincilik.com

TURKISH JOURNAL of CLINICS and LABORATORY

Eylül 2019, Cilt: 11, Sayı: 3 Üç Ayda Bir Yayınlanır

Makale gönderim adresi: <http://dergipark.gov.tr/tjcl/>



## INTERNATIONAL ADVISORY BOARD / ULUSLARARASI DANIŞMA KURULU

Kevin McCUSKER, Prof Dr, (USA)

Terrence GOURLAY, Prof Dr, (England)

Youry OSTROVSKY, Prof Dr, (Belarus)

Konstadinos PLESTIS, Prof Dr. (Greece)

Nikos KOSTOMITSOPOULOS, MD, (Greece)

Quirino PIACEVOLI, Prof Dr, (Italy)

Mustafa CIKRIKIOGLU, Prof Dr, (Switzerland)

Ingp KUTSCHKA, Prof Dr, (Germany)

Thomas MODINE, Prof Dr, (France)

Thomas HIRNLE, Prof Dr, (Poland)

## PUBLICATION BOARD / YAYIN KURULU

Aydın ACAR (Ankara)

Zekeriya ALANOĞLU (Ankara)

Nermin AKDEMİR (Sakarya)

Ramazan AKDEMİR (Sakarya)

Murat ALBAYRAK (Ankara)

Didem ALİEFENDİOĞLU (Kırıkkale)

Murat ALTAY (Ankara)

Mustafa ALTAY (Ankara)

Fevzi ALTUNTAŞ (Ankara)

Ergin AYAŞLIOĞLU (Kırıkkale)

Koray AYDOĞDU (Ankara)

Özlem Gül UTKU (Kırıkkale)

Mehmet Ali BABADEMEZ (Ankara)

Lütfü BEKAR (Çorum)

Rasim BENGİ (Çorum)

Serap BİBEROĞLU (Karabük)

Murat BOZLU (Mersin)

Salih CESUR (Ankara)

İsmail CEYHAN (Ankara)

Mehmet ÇITIRIK (Ankara)

Selim ÇOLAK (Kırıkkale)

Figen ÇOŞKUN (Kırıkkale)

Cemile DAYANGAN SAYAN (Kırıkkale)

Seher DEMİRER (Ankara)

Turgut DENİZ (Kırıkkale)

Adem İlkay DİKEN (Çorum)

Neslihan DİKMENOĞLU FALKMARKEN (Ankara)

Nermin DİNDAR BADEM (Kırıkkale)

Mete DOLAPÇI (Çorum)

Koray DURAL (Kırıkkale)

Can ERGİN (Ankara)

Salim ERKAYA (Ankara)

Burcu ERSÖZ ALAN (Kırıkkale)

Göktürk FİNDİK (Ankara)

Metin GÖRGÜ (Bolu)

Ümit GÖRKEM (Çorum)

Ülker GÜL (Antalya)

Osman GÜLER (Ankara)

Serdar GÜLER (Çorum)

Nesimi GÜNAL (Kırıkkale)

Yunus GÜRBÜZ (Ankara)

Meltem GÜLHAN HALİL (Ankara)

Selçuk HAZİNEDAROĞLU (Ankara)

Eyüp HORASANLI (Ankara)

Mehmet İBİŞ (Ankara)

Mehmet İLERİ (Ankara)

Erdem KARABULUT (Ankara)

Serdar KARACA (Ankara)

Asım KALKAN (Rize)

Esra Dilek KESKİN (Kırıkkale)

Göksal KESKİN (Ankara)

Orhan Murat KOÇAK (Kırıkkale)

Mitat KOZ (Ankara)

Turgut KÜLTÜR (Kırıkkale)

Suna OĞUZOĞLU (Ankara)

Mustafa ÖĞDEN (Kırıkkale)

Kürşat Murat ÖZCAN (Ankara)

Muhit ÖZCAN (Ankara)

Hacı Mustafa ÖZDEMİR (İstanbul)

Özden ÖZEN ALTUNDAĞ (Ankara)

Adem ÖZKARA (Çorum)

Mustafa ÖZŞAHİN (Düzce)

Oğuzhan ÖZŞAY (İzmir)

Mustafa ÖZTÜRK (Ankara)

Mustafa PAÇ (Ankara)

Cem Kaan PARSAK (Adana)

Faruk PEHLİVANLI (Kırıkkale)

Remzi SAĞLAM (Ankara)

Meral SAYGUN (Kırıkkale)

Hakan SEYİTHANOĞLU (İstanbul)

Mehmet ŞAHİN (Isparta)

Dilek ŞENEN (Antalya)

İbrahim Tayfun ŞAHİNER (Çorum)

Neriman ŞENGÜL (Bolu)

Gökçe ŞİMŞEK (Kırıkkale)

Özgür TATLI (Trabzon)

Selami Koçak TOPRAK (Ankara)

Mehmet TÜRKER (Sakarya)

Serhat ÜNAL (Ankara)

Ramazan Erkin ÜNLÜ (Ankara)

Özge VERGİLİ (Kırıkkale)

Aydın YAĞMURLU (Ankara)

Bülent YALÇIN (Ankara)

Soner YAVAŞ (Ankara)

Neziha YILMAZ (Yozgat)

Esra YÜRÜMEZ SOLMAZ (Ankara)

Sinan ZEHİR (Çorum)

Tevfik ZİYPAK (Erzurum)

İbrahim DOĞAN (Ankara)

# INDEX

## İÇİNDEKİLER

### ORJİNAL MAKALE/ ORIGINAL ARTICLE

- Alt solunum yolu örneklerinden izole edilen Streptococcus Pneumoniae, Haemophilus Influenzae ve ..... 277**  
**Moraxella Catarrhalis suşlarının antibiyotik duyarlılığının değerlendirilmesi**  
Evaluation Of Antibiotic Susceptibility Of Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae and Moraxella catarrhalis Isolated From Lower Respiratory Tract Specimens  
Yeliz TANRIVERDİ ÇAYCI, Tuğba AVAN, Kemal BİLGİN, Asuman BİRİNCİ
- Diyabetik hastalarda uyku kalitesi ile anksiyete ve depresyon durumlarının değerlendirilmesi.....283**  
Assessment of sleep quality and mental status in patients with diabetes  
Nilüfer EMRE
- El dominansı ve koroner dominans arası ilişki.....289**  
Relationship between hand dominance and coronary dominance  
Hatice TOLUNAY
- Evaluation of knowledge and behaviors of students in faculty of medicine towards rational drug use.....294**  
Tıp fakültesi öğrencilerinin akılcı ilaç kullanımına yönelik bilgi ve davranışlarının değerlendirilmesi  
Osman KUKULA
- Farklı kavite preparasyon yöntemi kullanılarak prepare edilen sınıf V kavitelerinin farklı cam iyonomer..... 301**  
**simanlarla restore edilerek mikrosızıntısının değerlendirilmesi**  
Evaluation of microleakage of class V cavities prepared by using different type cavite preparation method by restored with different glass ionomer cements  
H. Sevilay BAHADIR , Serdar BAĞLAR , Ali Can BULUT , Gökhan KARADAĞ
- Kolorektal kanserlerin senkron karaciğer metastazları: Kombine cerrahi prosedür deneyimimiz.....310**  
Synchronous liver metastases of colorectal cancers: Our experience of combined surgical procedure  
Muhammed Raşid AYKOTA, Sevda YILMAZ, Uğur SUNGURTEKİN
- Tokat ili kronik Hepatit B enfeksiyonlu hastalarda Tork Teno virüs ve Hepatit D virüs araştırılması.....314**  
Investigation of Torque Teno virus and Hepatitis D virüs in patients infected with chronic Hepatitis B in Tokat  
Yelda DAĞCIOĞLU, Zekeriya ALTUNER, Yunus BULUT, Hüseyin Şener BARUT
- Vankomisine dirençli enterokokların saptanmasında iki farklı kromojenik besiyerinin karşılaştırılması.....319**  
Comparison of two different chromogenic agar for isolation of vancomycin-resistant enterococci  
Sami KINIKLI, Salih CESUR, Çiğdem ATAMAN HATİPOĞLU, Kader ARSLAN, Taliha KARAKÖK, Şerife ALTIN DEMİRCAN, Esra KAYA KILIÇ, Ayşe BÜYÜKDEMİRÇİ
- Evaluation of arrhythmic effects of clarithromycin usage in patients with acute coronary syndrome via new ..... 324**  
**parameters of 12 lead electrocardiography**  
Akut koroner sendromlu hastalarda 12 ledli elektrokardiyografi yeni parametreleri kullanılarak klaritromisinin aritmik etkilerinin değerlendirilmesi  
Hakan GOCER, Erdem TURKYILMAZ, Ahmet UNLU, Ahmet Baris DURUKAN
- Medication adherence after myocardial infarction: A single center retrospective cohort study.....329**  
Miyokard infarktüsü sonrası ilaç uyumu: Tek merkezli retrospektif kohort çalışması  
Ufuk Tan BAYRAM, Kursat AKBUGA, Mustafa KARANFIL , Mehmet Akif DUZENLI
- Determination of serum YKL-40 levels in patients with brucellosis.....335**  
Bruselloz hastalarında serum YKL-40 düzeylerinin belirlenmesi  
Fikriye Milletli SEZGIN, Rukiye NAR
- Lipoprotein apheresis affects ventricular repolarization in patients with homozygous familial hypercholesterolemia.....340**  
Lipoprotein aferezi homozigot ailevi hiperkolesterolemi hastalarında ventriküler repolarizasyonu etkiler  
Firdevs Aysenur EKIZLER, Serkan CAY, Burak ACAR, Bahar Tekin TAK, Elif Hande Ozcan CETIN, Ahmet TEMIZHAN
- Platelet distribution width can be a useful marker of decreased platelet activity after percutaneous mitral.....348**  
**balloon valvuloplasty**  
Trombosit dağılım genişliği, perkütan mitral balon valvüloplasti sonrası azalmış trombosit aktivitesinin yararlı bir göstergesi olabilir  
Mujgan TEK, Mehmet Serkan CETIN

# INDEX

## İÇİNDEKİLER

- The relationship between leukocyte activation and apoptosis in venous insufficiency etiopathogenesis.....353**  
Varis etiopatogenezinde lökosit aktivasyonu ile apoptozisin ilişkisi  
Naim Boran TUMER, Erkan IRIZ, Ozlem GULBAHAR, Dilek ERER, Halim SONCUL, Elif COSKUN
- Tp-e interval and Tp-e/qt ratio in patients with non alcoholic fatty liver disease .....358**  
Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı olan bireylerde Tp-e intervali ve Tp-e/qt oranı  
Bahar Tekin TAK, Serkan CAY, Mahmut YUKSEL, Firdevs Aysenur EKIZLER, Meral Akdogan KAYHAN, Habibe KAFES, Cagri YAYLA, Ertugrul KAYACETIN
- Çocuk yoğun bakım ünitesinde akut hipoksi nedeniyle yatan hastaların yakın dönem nörolojik takibi.....364**  
Recent neurological outcomes of patients admitted to pediatric intensive care unit for acute hypoxia  
Mutlu Uysal YAZICI, Fatih Mehmet Akif ÖZDEMİR, Ülkühan ÖZTOPRAK, Ebru AZAPAĞASI, Ayşe Seçil EKŞİOĞLU, Ayşe AKSOY, Deniz YÜKSEL
- Novel prognostic markers associated with poor survival in stage III rectal cancers: Invasive growth pattern and Tumor necrosis...369**  
Evre III rektal kanserlerde kötü sağkalım ile ilişkili yeni prognostik belirteçler: İnvaziv büyüme paterni ve Tümör nekrozu  
Mehmet ZENGIN, Pinar ATASOY
- Sol ventrikül destek cihazı implantasyonu sonrası driveline ile ilişkili enfeksiyonlar: Tek merkez deneyimi.....377**  
Driveline-related infections after left ventricular assist device implantation: A single center experience  
Sinan Sabit KOCABEYOĞLU, Doğan EMRE SERT
- Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten E. coli izolatlarının çeşitli antibiyotiklere duyarlılıklarının belirlenmesi.....384**  
Determinating of susceptibilities to various antibiotic of the extended spectrum beta-lactamase producing E. coli isolates  
Fatih OCAK, Atilla ÇİFCİ, Salih CESUR, Sami KINIKLI
- Results of a hemostatic agent to potentiate ischemia-induced skin flap necrosis in an experimental rat model.....388**  
Deneysel sıçan modelinde iskemiye bağlı deri flep nekrozunda hemostatik ajan kullanımı  
Aylin AKBULUT, Koray GURSOY, Nihat YUMUSAK, Gökhan KOCA, Meliha KORKMAZ
- DERLEME/ REVIEW**
- Changes in the relationship between hepatitis B virus and liver transplantation in the last decades.....396**  
Hepatit B virus enfeksiyonu nedeni karaciğer nakillerde son yıllardaki değişim  
Akif ALTINBAS, Bernd KRONENBERGER, Ali CANBAY
- İnsan biyolojik materyalinin araştırma amaçlı olarak kullanılması ile ilgili araştırmacı ve araştırma etik kurul sorumluluğu.....405**  
Investigator and research ethics committee responsibility for the use of human biological material for research purposes  
Nüket BÜKEN
- Bee venom: A medical perspective.....414**  
Arı zehri: Tıbbi bakış  
Ali Korhan SIG, Mustafa GUNEY, Ozlem Oz SIG, Huseyin SARI
- Diyabetik hastalarda ayak problemlerinin yönetimi ve vasküler patolojilere yaklaşım.....422**  
Management of foot problems in diabetic patients and approach to vascular pathologies  
İrfan KARAHAN, Çağlar ALP, Aydın ÇİFCİ, Muhammed KARADENİZ
- OLGU SUNUMU/CASE REPORT**
- Beyin tümörü ile karışan intrakraniyal tüberküloz olgusu.....426**  
An intracranial tuberculoma case interfere with brain tumor  
Hatice KARACA, Salih CESUR, Çiğdem ATAMAN HATİPOĞLU, Sami KINIKLI, Güner MENEKŞE
- Lymphangiomyomatosis-associated spontaneous tension hemopneumothorax in multiple .....430**  
**organ involvement tuberculosis**  
Multi organ tutulumlu tüberosklerozda lenfanjiyoleiyomiyomatozise bağlı spontan tansiyon hemopnömotoraks olgusu  
Bayram METİN, Mustafa Fatih ERKOC, Sevinç SAHİN, Yavuz Selim INTEPE
- Morgagni-Steawart-Morel syndrome: Case report.....434**  
Morgagni-Steawart-Morel sendromu: Olgu sunumu  
Emrah DOĞAN, Marwa MOULINE

■ Orjinal Makale

## Alt solunum yolu örneklerinden izole edilen *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* ve *Moraxella catarrhalis* suşlarının antibiyotik duyarlılığının değerlendirilmesi

### *Evaluation Of Antibiotic Susceptibility Of Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae and Moraxella catarrhalis Isolated From Lower Respiratory Tract Specimens*

Yeliz TANRIVERDİ ÇAYCI\* , Tuğba AVAN , Kemal BİLGİN , Asuman BİRİNCİ 

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim dalı, Samsun/TÜRKİYE

#### Öz

**Amaç:** Bu çalışmada hastanemizin ayaktan ve yatarak takip edilen hastaların alt solunum yolu örneklerinden izole edilen ve solunum yolu enfeksiyonlarının en önemli enfeksiyon etkenleri olan Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis ve Streptococcus pneumoniae suşlarının antibiyotik duyarlılık oranlarının belirlenmesi ve ampirik antibiyotik tedavisine yol göstermesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntemler:** Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na 2015-2017 yıllarında çeşitli kliniklerden gönderilen alt solunum yolu örnekleri retrospektif olarak incelenmiştir. İzolatların tanımlanması Vitek MS (Biomerieux, Fransa) cihazı; antibiyotik duyarlılıkları Vitek 2 Compact (Biomerieux, Fransa) cihazı ve Mueller-Hinton Fastidious (Biomerieux, Fransa) agarda disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Elde edilen duyarlılık oranları EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) kriterlerine göre değerlendirilmiştir

**Bulgular:** Alt solunum yolları örneklerinden izole edilen 2427 adet suş retrospektif olarak incelendi. Streptococcus pneumoniae izolatlarına karşı %67 penisilin, %58 eritromisin direnci; Moraxella catarrhalis'e %9 eritromisin, %9 sefotaksim, %3 seftriakson direnci; Haemophilus influenzae'e %92 eritromisin %33 sefotaksim direnci saptanmıştır.

**Sonuç:** Alt solunum yolunun en sık izole edilen bu üç bakteriyel patojene karşı rutinde kullanılan antibiyotiklere karşı her geçen gün direnç artmaktadır. Etken belirlendikten sonra antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması tedavinin yönlendirilmesi açısından önemlidir.

**Anahtar kelimeler:** Haemophilus influenzae; Moraxella catarrhalis; Streptococcus pneumoniae; antibiyotik; direnç; alt solunum yolu enfeksiyonu

Sorumlu Yazar\*: Yeliz Tanrıverdi Çaycı, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim dalı, Samsun/TÜRKİYE

E-posta: yeliztanriverdi@gmail.com

ORCID: 0000-0002-9251-1953

Gönderim: 08.05.2018 Kabul: 12.08.2018

Doi: 10.18663/tjcl.421833

## Abstract

**Aim:** In this study, it was aimed to determine antibiotic susceptibility rates of *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* and *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from lower respiratory tract samples of hospitalized patients and to guide empirical antibiotic treatment of respiratory tract infections.

**Material and Methods:** The lower respiratory tract samples sent from various clinics to the Ondokuz Mayıs University Medical Faculty Hospital Medical Microbiology Laboratory in 2015-2017 were retrospectively examined. Identification of isolates Vitek MS (Biomerieux, France) device; antibiotic susceptibilities were determined by the Vitek 2 Compact (Biomerieux, France) instrument and disk diffusion method in Mueller-Hinton Fastidious (Biomerieux, France) agar. The sensitivity ratios obtained were evaluated according to EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) criteria

**Results:** A total of 2427 strains isolated from lower respiratory tract specimens were examined retrospectively. 67% penicillin, 58% erythromycin resistance against *Streptococcus pneumoniae* isolates; 9% erythromycin, 9% cefotaxime, 3% ceftriaxone resistance to *Moraxella catarrhalis*; *Haemophilus influenzae* had 92% erythromycin and 33% cefotaxime resistance.

**Conclusion:** Resistance is increasing day by day against antibiotics used in routine against these three bacterial pathogens most commonly isolated in lower respiratory tract. Antibiotic susceptibility tests should be performed after the agent has been identified in order to direct treatment.

**Keywords:** *Haemophilus influenzae*; *Moraxella catarrhalis*; *Streptococcus pneumoniae*; antibiotic resistance; lower respiratory tract infection

## Giriş

*Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae* insan üst solunum yolu florasında bulunmasına rağmen alt solunum yolu enfeksiyonlarından da sıklıkla izole edilen bakteriyel etkenlerdir [1].

*S. pneumoniae*, kapsüllü uzamış veya lanset şeklinde Gram pozitif koktur ve pnömoni, sinüzit, orta kulak iltihabı, menenjit ve bakteriyemiye neden olmaktadır. Antimikrobiyal direnç gittikçe yaygınlaşsada, duyarlı olan suşlarda penisilin ilk seçilecek ilaçtır. Penisilin grubu antibiyotiklerin uzun yıllar boyunca tedavi seçeneği olarak yaygın bir şekilde kullanılması sebebiyle, bakterilerin penisilinlere duyarlılık durumlarının takibi önem kazanmaktadır [2]. Penisilin bağlayan proteinlerde (PBP1A, PBP2X, PBP2B) meydana gelen yapısal değişiklikler nedeni ile penisiline karşı direnç gelişebilmektedir [3]. Ancak penisilin yanında diğer antibiyotiklere karşıda giderek artan direnç gelişimi görülebilmektedir. Özellikle solunum yolları enfeksiyonları tedavisinde tercih edilen makrolidlere karşı direnç gelişmesinde iki mekanizma bulunmaktadır; bunlardan biri erm genleri tarafından kodlanan ribozomal metilaz ve diğeri mef genleri tarafından kodlanan makrolid efluks pompalarıdır [4,5].

*H. influenzae* fakültatif anaerob, ufak pleomorfik Gram negatif basil ve kokobasil şeklindedir. Başlıca menenjit, epiglottit, pnömoniye neden olmaktadır [4]. Birçok köken ampisiline karşı

dirençlidir. Aminopenisilinlere karşı direnç  $\beta$ -laktamaz üretimi ve penisilin bağlayan proteinlerin (PBP3) aminoasitlerinde meydana gelen yapısal değişiklikler nedeni ile oluşmaktadır [6,7]. *M. catarrhalis* zorunlu aerob, oksidaz pozitif, Gram negatif diplokoktur. Bu organizma bronşit, bronkopnömoni, sinüzit ve orta kulak iltihabına neden olmaktadır. Ayrıca bu organizma immün sistemi baskılanmış hastalarda ciddi, hayatı tehdit eden sepsis, menenjit ve endokardit gibi enfeksiyonlara yol açabilen fırsatçı bir patojen olarak karşımıza çıkmaktadır [8]. 1970'li yılların başında *M. catarrhalis* izolatları penisilinler ve tetrasiklinler dahil olmak üzere, solunum sistemi hastalıklarında kullanılan tüm antibiyotiklere duyarlı iken günümüzde çeşitli antibiyotiklere karşı direnç tedavide sıkıntılara neden olmaktadır. *M. catarrhalis* izolatlarında en önemli direnç problemi BRO betalaktamazlarının varlığıdır. Bu betalaktamazlar BRO-1 ve BRO-2 olarak tanımlanan, fenotipi benzer iki enzimden oluşmuştur. BRO-1'in BRO-2'ye göre iki-üç kat fazla üretildiği gösterilmiştir. İzolatların çoğunda beta laktamaz üretimine bağlı penisiline direnci görülmekle beraber sefalosporinlere, eritromisine, tetrasikline, trimetoprim-sülfametaksazole, penisiline ve beta laktamaz kombinasyonlarına duyarlıdır [4,8].

Bu çalışmada hastanemizde alt solunum yolları örneklerinden izole edilen *S. pneumoniae*, *H. influenzae* ve *M. catarrhalis* suşlarının son üç yılda değişen direnç oranlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntemler

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi mikrobiyoloji laboratuvarına 2015-2017 yılları arasında çeşitli kliniklerden gönderilen 2427 adet alt solunum yolları örneklerinden (balgam, bronkoalveolar lavaj (BAL), protected brush specimen (PBS) ve trakeal aspirat) izole edilen toplam 333 adet (*S. pneumoniae* (n=72), *H. influenzae* (n=226) ve *M. catarrhalis* (n=35)) izolat çalışmaya dâhil edilmiştir. Çalışılan bakterilerin klinik örnekler göre dağılımı Tablo-1'de belirtilmiştir. Balgam örneklerinde gram boyalı preparatta >25 nötrofil ve <10 epitel hücre/saha olan örneklerde yoğun olan bakteri örnekleri değerlendirilmeye alınmıştır.

**Tablo 1.** Bakterilerin klinik örnekler göre dağılımı.

	H.influenzae	M.catarrhalis	S.pneumoniae	Toplam
BAL	6	1	4	11
Balgam	197	32	54	283
PBS	2	0	2	4
Trakeal Aspirat	21	2	12	35
Genel Toplam	226	35	72	333

Gelen örnekler %5'lik koyun kanlı agar, çikolata agar ve EMB (Eozin Metilen Blue) agar besiyerine ekilmiştir. Ekimi yapılan plaklar %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 35±1°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda üreyen örneklerin gram boyama, koloni morfolojisi, katalaz ve oksidaz test sonuçlarına göre ön değerlendirilmesi yapılmıştır. Sonrasında izolatların tanımlanmasında Vitek MS (Biomerieux, Fransa) cihazı kullanılmıştır. *S. pneumoniae*'nin ampisilin, eritromisin, levofloksasin, linezolid, penisilin, seftriakson, sefotaksim, teikoplanin, ve vankomisin duyarlılığı Vitek 2 Compact (Biomerieux, Fransa) cihazı ile tespit edilmiştir. *H. influenzae*'nin ampisilin, amoksisilin-klavulanat, eritromisin, seftriakson, sefotaksim ve siprofloksasin duyarlılığı Mueller-Hinton Fastidious (Biomerieux, Fransa) agarda disk difüzyon yöntemi ile çalışılmıştır. *M. catarrhalis*'in amoksisilin-klavulanat, eritromisin, meropenem, seftriakson, sefotaksim ve siprofloksasin %5 koyun kanlı Mueller-Hinton Fastidious (Biomerieux, Fransa) agarda disk difüzyon yöntemi ile çalışılmıştır. Elde edilen duyarlılık oranları EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) kriterlerine göre değerlendirilmiştir [9,10,11].

## Bulgular

### *S. pneumoniae*

Toplam 72 adet *S. pneumoniae* suşu ( 2015 yılında n=24, 2016

yılında n=23, 2017 yılında n=25) çalışmaya dahil edilmiştir. *S. pneumoniae* izolatlarının tüm antibiyotiklere direnç oranları Tablo-2 de yer almaktadır. En yüksek direnç oranı penisiline (%67) karşı saptanırken, linezolid, teikoplanin ve vankomisine karşı direnç tespit edilmemiştir. Yıllara göre değişim incelendiğinde linezolid, teikoplanin ve vankomisine karşı direnç saptanmamış olup yıllara göre antibiyotik dirençlilik oranları tablo-3 deki gibidir.

**Tablo 2.** *S. pneumoniae* izolatlarının antibiyotik direnç oranları [n(%)]

	DUYARLI	DİRENÇLİ	TOPLAM
Ampisilin	26(58)	19(42)	45
Eritomisin	29(42)	40(58)	69
Levofloksasin	66(93)	5(7)	71
Linezolid	70(100)	0	70
Penisilin	10(33)	20(67)	30
Seftriakson	56(82)	12(18)	68
Sefotaksim	55(77)	16(23)	71
Teikoplanin	10(100)	0	10
Vankomisin	72(100)	0	72

**Tablo 3.** *S. pneumoniae* izolatlarının antibiyotik dirençlerinin yıllara göre dağılımı [n (%)].

	2015	2016	2017
Ampisilin	1(2)	10(22)	8(18)
Eritomisin	11(16)	17(25)	12(17)
Levofloksasin	0	2(3)	3(4)
Linezolid	0	0	0
Penisilin	0	10(34)	10(34)
Seftriakson	2(3)	6(9)	4(6)
Sefotaksim	3(4)	8(12)	5(5)
Teikoplanin	0	0	0
Vankomisin	0	0	0

### *H.influenzae*

Toplam 226 adet *H. influenzae* suşu ( 2015 yılında n=82, 2016 yılında n=60, 2017 yılında n=84) çalışmaya dâhil edilmiştir. *H. influenzae* izolatlarının tüm antibiyotiklere direnç oranları tablo-4 de yer almaktadır. En çok direnç eritromisine (%92) karşı görülürken yıllara göre antibiyotik direnci incelendiğinde amoksisilin-klavulanat ve siprofloksasinde direnç artışı gözlenirken eritromisin de anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Buna karşın ampisilin ve seftriaksonda direnç oranlarında azalma gözlenmiştir. Yıllara göre ise antibiyotik dirençlilik oranları tablo-5 deki gibidir.



**Tablo 4.** H. influenzae izolatlarının antibiyotik direnç oranları [n(%)]

	DUYARLI	DİRENÇLİ	TOPLAM
Amoksisilin/klavulanik asit	35(97)	1(3)	36
Ampisilin	144(65)	78(35)	222
Eritromisin	14(8)	157(92)	171
Seftriakson	220(98)	4(2)	224
Sefotaksim	149(67)	74(33)	223
Siprofloksasin	164(96)	6(4)	170

**Tablo 5.** H. influenzae izolatlarının antibiyotik dirençlerinin yıllara göre dağılımı [n (%)].

	2015	2016	2017
Amoksisilin/klavulanik asit	0	0	1(3)
Ampisilin	37(17)	22(10)	19(9)
Eritromisin	25(15)	53(31)	79(46)
Seftriakson	2(1)	1(0.5)	1(0.5)
Sefotaksim	21(9)	27(12)	26(12)
Siprofloksasin	0	0	6(4)

### M.catarrhalis

Toplam 35 adet M. catarrhalis suşu ( 2015 yılında n=9, 2016 yılında n=12, 2017 yılında n=14 ) çalışmaya dâhil edilmiştir. M. catarrhalis izolatlarının tüm antibiyotiklere direnç oranları tablo-6 de yer almaktadır. En çok direnç eritromisin (%9) ve sefotaksime (%9) karşı görülürken birçok antibiyotiğe duyarlı olarak tespit edilmiştir. Yıllara göre direnç oranları incelendiğinde amoksisilin-klavulanik asit ve meropenemde hiç duyarlılık gelişmediği gözlenmiştir. Eritromisin, sefotaksim ve seftriaksonda direnç artışı gözlenmektedir. Yıllara göre ise antibiyotik dirençlilik oranları tablo-7'da verilmiştir.

**Tablo 6.** M. catarrhalis izolatlarının antibiyotik direnç oranları [n(%)]

	DUYARLI	DİRENÇLİ	TOPLAM
Amoksisilin/klavulanik asit	35(100)	0	35
Eritromisin	31(91)	3(9)	34
Meropenem	35(100)	0	35
Sefotaksim	30(91)	3(9)	33
Seftriakson	34(97)	1(3)	35
Siprofloksasin	34(97)	1(3)	35

**Tablo 7.** M. catarrhalis izolatlarının antibiyotik dirençlerinin yıllara göre dağılımı [n (%)].

	2015	2016	2017
Amoksisilin/klavulanik asit	0	0	0
Eritromisin	0	1(3)	2(6)
Meropenem	0	0	0
Sefotaksim	0	0	3(9)
Seftriakson	0	0	1(3)
Siprofloksasin	0	1(3)	0

### Tartışma

Son yıllarda S. pneumoniae, H. influenzae ve M. catarrhalis izolatlarının antibiyotiklere karşı gösterdiği direnç tüm dünyada hızla artmakta olduğu dikkat çekmektedir. S. pneumoniae için 2002-2003 yılları arasında izole edilen örneklerden yapılan çok uluslu bir çalışmada ülkeler arasında belirgin farklılıklar izlenmekle beraber penisilin direncinin %0-79,2 ve eritromisin direncinin %4-66 arasında değiştiği saptanmıştır [12]. Çin'de 2016 yılında yapılan çalışmaya göre ise aynı ülke sınırları içinde farklı şehirlerde direnç oranlarının değişebileceği belirtilmiştir. Yapılan bu çalışmada S. pneumoniae suşları; penisiline duyarlı S. pneumoniae (PSSP), penisiline orta duyarlı S. pneumoniae (PISP) ve penisiline dirençli S. pneumoniae (PRSP) olarak üç fenotipik kalıp olarak değerlendirilmiştir. Tüm  $\beta$ -laktamların MİK50 ve MİK90 değerleri, penisiline duyarlı olmayan S. pneumoniae izolatlarına karşı daha yüksek (PNSSP); PSSP izolatlarında ise daha düşük olarak bulunmuştur. PISP suşlarının çoğunluğu, %90 duyarlılık oranları ile amoksisilin-klavulanat, seftriakson, kinolonlar ve kloramfenikole duyarlı iken; buna karşın PRSP'nin seftriakson ve amoksisilin-klavulanata duyarlılık oranı sırasıyla %51,1 ve %34,4 olarak saptanmıştır. PRSP izolatları ile ilgili olarak, sefuroksim, sefaklor, SXT, makrolidler ve tetrasiklin düşük aktivite göstermiştir. PRSP izolatlarının çoğunda levofloksasin direnç oranı %1,2 olarak saptanmıştır. Farklı merkezlerde PNSSP oranlarının %25-72,2 arasında değiştiği belirtilmiştir [13]. İtalya'da 2017 yılında yapılan çalışmada 2014-2015 yılları arasında çocuk hastaların solunum yollarından izole edilen S. pneumoniae suşlarında ise penisilin G (%31,3) ve sefalosporinler (%18,7-3,13) dahil olmak üzere  $\beta$ -laktam antibiyotiklere karşı yüksek direnç oranları görülmüştür. Aynı çalışmada tüm izolatlar sülfametoksazol-trimetoprim'e (%100) dirençli iken izolatların sadece %50'si azitromisin'e duyarlı, tüm izolatlar ise fluorokinolon antibiyotiklerine (levofloksasin, ofloksasin) ve klindamisine (MIC 90 = 0,19 mg / L) duyarlı olduğu bulunmuştur [17]. Fransa'da S. pneumoniae'da EUCAST eşik değerlerine göre, penisilin direnç oranı 2004-2012 yılları arasında % 3,2 olarak bildirilmiştir [14]. Yunanistan'da 2009-2010 yıllarında solunum yolu enfeksiyonlarından izole edilen S. pneumoniae suşlarında %17,6 olan oral penisilin direncinin 2011-2012 yıllarında %6,4'e gerilediğini, orta duyarlı izolatların oranlarının ise yükseldiği görülmüştür (%24,3-%30,4) [15]. Mamishi ve ark. içinde Türkiye'nin de olduğu, Asya ülkelerinde S. pneumoniae izolatlarında penisilin direncini saptadıkları bir meta-analiz raporunda, penisilin direncinin tüm Asya ülkeleri için büyük bir

endişe kaynağı olabileceğini belirtmektedirler [16]. Ülkemizde ise Alışkan ve ark. yaptığı çalışmada 2012-2015 yılları arasında izole edilen *S. pneumoniae* suşlarını kapsayan 2016'da yayınlanan çalışmalarında oral penisilin direnç oranı %24,6, eritromisin direnci ise %36,2 olarak saptanmışlardır [17]. Beşli ve ark.'nın çalışmalarında 2012-2014 yılları arasında izole edilen *S. pneumoniae* suşlarındaki duyarlılık oranları ise penisilin için %92,4, eritromisin için %45,7 olarak bildirilmiştir [18].

*H.influenzae*, *S.pneumoniae*'dan sonra solunum yolunun önemli patojenlerinden biridir. Ampisilin duyarlılığı Fransa'da yapılan 2004-2012 yıllarını kapsayan çok merkezli çalışmada %75,6; ABD'de 2008-2010 yılları arasında yapılan çalışmada %73,7 olarak tespit edilmiştir [14]. İtalya'da 2017 yılında yapılan çalışmada 2014-2015 yılları arasında çocuk hastaların solunum yollarından izole edilen *H. influenzae* suşlarında ampisiline % 10,5, sefaklor %11,2, direnç oranları gözlenirken amoksisilin-klavulonat ve siprifloksasine direnç gelişimi gözlenmemiştir. Tüm ampisiline dirençli izolatlarında  $\beta$ -laktamaz üretimi gözlenmiştir [19]. 2002-2003 yılları arasında izole edilen örneklerden yapılan çok uluslu bir çalışmada  $\beta$ -laktamaz üretimi *H. influenzae* için %0-39 arasında saptanmıştır [12]. Çin'de 2016 yılında yapılan çalışmaya göre ampisilin için %35 direnç oranı saptanırken seftriakson, levofloksasin, moksifloksasin, azitromisin ve tetrasiklin için yüksek duyarlılık oranları saptanmıştır (>%90). Bu çalışmada, 294 *H. influenzae* izolatı arasında, 91 (%31) suşun  $\beta$ -laktamaz ürettiği saptanmıştır.  $\beta$ -laktamaz negatif ampisiline dirençli saptanan bazı suşlarda ampisilin, amoksisilin-klavulonat, sefaklor ve sefuroksime direnç %100 olarak bulunmuştur [13]. Ülkemizde bu konuda yapılan çalışmalar incelendiğinde Alışkan ve ark. ampisilin direncini %24,3 [17], İlki ve ark. %3,3 [21], Gür ve ark. %8,8 [20] olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızda ise ampisilin direnci %35 olup diğer çalışmalara göre yüksek; Çin'de yapılan çalışma ile aynı olduğu tespit edilmiştir.

*M. catarrhalis* suşlarında betalaktam antibiyotiklere karşı hızla artan direnç söz konusudur. *M. catarrhalis*  $\beta$ -laktamaz üretimi 2002-2003 yılları arasında izole edilen örneklerden yapılan çok uluslu bir çalışmada %80-100 arasında saptanmıştır [12]. 2016 yılında Çin'de yapılan çalışmaya göre antimikrobik ajanların çoğu, *M. catarrhalis* izolatlarına karşı >%90 duyarlılık oranları gösterirken; sefuroksim, sefaklor, SXT, kloramfenikol ve tetrasiklin, *M. catarrhalis*'e daha düşük duyarlılık oranları gözlenmiştir. Bu çalışmada *M. catarrhalis* izolatlarının % 87,1'inde  $\beta$ -laktamaz üretimi gözlenmiştir [13]. İtalya'da yapılan

çalışmada 2014-2015 yılları arasında çocuk hastaların solunum yollarından izole edilen *M. catarrhalis* izolatlarında test edilen florokinolonlar düşük Mik90 (0,094 mg / L) değerleri (sırasıyla levofloksasin ve siprofloksasin için duyarlılık %100 ve %95.2 ) saptanmıştır. Test edilen izolatlar arasında % 95,7 'si sefuroksim ve sefaklor duyarlı iken;  $\beta$ -laktamaz için pozitif *M. catarrhalis* izolatlarının %91,3'ü ampisiline dirençli bulunmuştur [19]. Bu konuda yapılan çalışmalarda Şener ve ark. *M. catarrhalis* eritromisin direncini %8 saptarken amoksisilin-klavulanik asit, sefotaksim ve siprofloksasinde hiç direnç saptamadıklarını bildirmişlerdir [22]. Şenol ve arkadaşları ise siprofloksasin direncini %9 bildirirken seftriaksonda hiç direnç olmadığını bildirmişlerdir [1]. Çalışmamızda ise eritromisin direnci %9 tespit edilmiş olup diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur. Siprofloksasin ise %3 oranında direnç olup diğer çalışmalara göre daha yüksek gözlenmiştir. Sefotaksim direnç oranı %9, seftriakson direnç oranı ise %3 tespit edilmiştir.

## Sonuç

Alt solunum yolunun en sık izole edilen bu üç bakteriyel patojene karşı rutinde kullanılan antibiyotiklere karşı her geçen gün direnç artmaktadır. Etken belirlendikten sonra antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması tedavinin yönlendirilmesi açısından önemlidir.

## Çıkar çatışması / finansal destek beyanı

Bu yazıdaki hiçbir yazarın herhangi bir çıkar çatışması yoktur. Yazının herhangi bir finansal desteği yoktur.

## Kaynaklar

1. Şenol G, Eriş F. Akciğer Enfeksiyonlarında *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* ve *Streptococcus pneumoniae* suşlarının izolasyon oranları ve antibiyotiklere Direnci. *Toraks Dergisi* 2000; 1: 46-49.
2. Golden AR, Rosenthal M, Fultz B, Nichol KA, Adam HJ, Gilmour MW et al. Characterization of MDR and XDR *Streptococcus pneumoniae* in Canada, 2007-13. *J Antimicrob Chemother* 2015; 70: 2199-202.
3. Ip M, Ang I, Liyanapathirana V, Ma H, Lai R. Genetic analyses of penicillin binding protein determinants in multidrug-resistant *streptococcus pneumoniae* serogroup 19 CC320/ 271 clone with high-level resistance to third-generation cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59: 4040-45.
4. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M: *Tıbbi Mikrobiyoloji kitabı*, Ankara 2014.

5. Hoban DJ, Doern GV, Fluit AC, Roussel-Delvallez M, Jones RN. Worldwide prevalence of antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* in the SENTRY antimicrobial surveillance program 1997-1999. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 81-83.
6. Fluit AC, Florijn A, Verhoef J, Milatovic D. Susceptibility of European beta-lactamase-positive and negative *Haemophilus influenzae* isolates from the periods 1997/1998 and 2002/2003. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 133-38.
7. García-Cobos S, Moscoso M, Pumarola F, Arroyo M, Lara N, Pérez-Vázquez M et al. Frequent carriage of resistance mechanisms to  $\beta$ -lactams and biofilm formation in *Haemophilus influenzae* causing treatment failure and recurrent otitis media in young children. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69: 2394-9.
8. Ustaçelebi Ş Temel ve Klinik Mikrobiyoloji kitabı, Güneş Kitapevi, 1999.
9. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 5.0, <http://www.eucast.org> (2015)
10. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0, [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_6.0\\_Breakpoint\\_table.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_6.0_Breakpoint_table.pdf) (2016)
11. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoints tables for interpretation of MICs and zone diameters, Version 7.1. <http://www.eucast.org> (2017)
12. Beekmann S, Heilmann K, Richtera S, Garcia-de-Lomasb J, Doerna G. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* and group A -haemolytic streptococci in 2002-2003. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2005; 25: 148-56.
13. Zhang Y, Zhang F, Wang H et al. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* isolated from community-acquired respiratory tract infections in China: Results from the CARTIPS Antimicrobial Surveillance Program. *J Glob Antimicrob Resist* 2016; 5: 36-41.
14. Cattoir V, Dowzicky MJ. A longitudinal assessment of antimicrobial susceptibility among important pathogens collected as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (T.E.S.T.) in France between 2004 and 2012. *Antimicrob Resist Infect Control* 2014; 3: 36.
15. Maraki S, Papadakis IS. Antimicrobial resistance trends among community-acquired respiratory tract pathogens in Greece, 2009-2012. *Scientific World Journal* 2014; 27: 941564.
16. Mamishi S, Moradkhani S, Mahmoudi S, Hosseinpour-Sadeghi R, Pourakbari B. Penicillin-Resistant trend of *Streptococcus pneumoniae* in Asia: a systematic review. *Iran J Microbiol* 2014; 6: 198-210.
17. Alışkan H, Çolakoğlu Ş, Göçmen J. Solunum yolu örneklerinden izole edilen *streptococcus pneumoniae* ve *haemophilus influenzae* suşlarının antibiyotiklere dirençlerinin belirlenmesi. *Cukurova Med J* 2016; 41: 201-7.
18. Beşli Y, Karatuna O, Akyar I. 2012-2014 Yıllarında Alt Solunum Yolu Örneklerinden İzole Edilen *Streptococcus pneumoniae* ve *Haemophilus influenzae* suşlarında antibiyotiklere Duyarlılığın Yıllara ve Yaş Gruplarına Göre Değerlendirilmesi. *ANKEM Derg* 2015; 29: 114-21.
19. Camara M, Dieng A, Diop A et al. Antibiotic resistance of bacteria responsible of acute respiratory tract infections in children. *Microbiologia Medica* 2017; 32: 6489 .
20. Gur D, Ozalp M, Sümerkan B et al. Prevalence of antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* and *Streptococcus pyogenes*: results of a multicentre study in Turkey. *Int J Antimicrob Agents* 2002; 19: 207-11.
21. İlki A, Sağıroğlu P, Elgörmüş N, Söyletir G. *Streptococcus pneumoniae* ve *Haemophilus influenzae* izolatlarının antibiyotik duyarlılık paternlerindeki değişim: dört yıllık izlem. *Mikrobiyol Bul* 2010; 44: 169-75.
22. Şener B, Gür D, Sümerkant B et al. *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* and *Streptococcus pyogenes*'in çeşitli antibiyotiklere karşı in-vitro duyarlılıkları. *Mikrobiyoloji Bült* 1996; 30: 129-37.

■ Orjinal Makale

## Diyabetik hastalarda uyku kalitesi ile anksiyete ve depresyon durumlarının değerlendirilmesi

### *Assessment of sleep quality and mental status in patients with diabetes*

Nilüfer EMRE\* 

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Aile Hekimliği Anabilim Dalı, Denizli/TÜRKİYE

#### Öz

**Amaç:** Diyabetes mellitus (DM) dünyada ve ülkemizde giderek artmakta olan morbidite ve mortalitesi yüksek kronik bir hastalıktır. Depresyon ve anksiyete gibi ruhsal hastalıklar ve uyku bozukluğu da bu hastalıkla birlikte sık görülmektedir. Bu çalışmada Tip 2 DM'li hastalarda uyku kalitesi ile anksiyete ve depresyon durumlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntemler:** Araştırma İlçe Devlet Hastanesi dahiliye polikliniğinde takipli tip 2 DM tanılı hastalara uygulanan uyku kalitesi ve ruhsal durum ölçeklerinin sonuçlarının ve hastaların sosyo-demografik verilerinin retrospektif olarak değerlendirilmesi ile yapıldı.

**Bulgular:** Çalışmaya dahil olan 49 kişiden 25'i erkek, 24'ü kadındı. Katılımcıların yaş ortalaması 62±9,9 idi. PUKİ puanları değerlendirildiğinde hastaların %59,2'sinde uyku kalitesi kötüydü. PUKİ puanları, sosyodemografik özellikler ile karşılaştırıldığında kadınların erkeklere göre uyku kalitesi daha kötüydü ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0,027). Ancak yaş, medeni durum ve eğitim açısından istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmadı. Katılımcıların HAD ölçeğine göre, anksiyete düzeyi %22,4 kişide, depresyon düzeyi %26,5 kişide eşik üstü değerde bulundu. HAD ölçeği açısından kadınların erkeklere göre anksiyete eşik üstü değeri anlamlı derecede yüksekti (p=0,013).

**Sonuç:** Sonuç olarak, uykunun hem beden hem de ruh sağlığını etkileyen bir kavram olduğu göz önünde alındığında, diyabet gibi kronik hastalıklarda medikal tedavilerin yanı sıra uyku kalitesi ve ruhsal durumların da detaylı değerlendirilmesi gerekmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Diyabetes mellitus, uyku kalitesi, anksiyete, depresyon

Sorumlu Yazar\*: Nilüfer Emre, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Aile Hekimliği Anabilim Dalı, Denizli/TÜRKİYE

E-posta: nilemre83@gmail.com

ORCID: 0000-0002-6519-0920

Gönderim:13.05.2019 Kabul: 29.07.2019

Doi: 10.18663/tjcl.563733

## Abstract

**Aim:** Diabetes mellitus (DM) is a chronic disease with increasing morbidity and mortality in the world and in our country. Psychiatric disorders such as depression and anxiety and sleep disorders are common with this disease. The aim of this study was to evaluate sleep quality and anxiety and depression in patients with type 2 DM.

**Material and Methods:** The study was performed retrospectively by evaluating the results of sleep quality and mental state scales and socio-demographic data of the patients with type 2 DM followed up in the internal medicine outpatient clinic of the District State Hospital.

**Results:** Of the 49 participants, 25 were male and 24 were female. The mean age of the participants was  $62 \pm 9.9$ . When PSQI scores were evaluated, sleep quality was poor in 59.2% of the patients. Compared with PSQI scores and sociodemographic characteristics, poor sleep quality was found to be in women compared with men and statistically significant ( $p = 0.027$ ). However, no statistically significant relationship was found between age, marital status and education. The prevalence of anxiety was found to be 22.4% in the participants and 26.5% in the depression prevalence. In terms of the HADS scale, the anxiety threshold value of women was significantly higher than that of men above the threshold ( $p = 0.013$ ).

**Conclusion:** In conclusion, when sleep is a concept that affects both physical and mental health, in addition to medical treatments in chronic diseases such as diabetes, sleep quality and mental status should be evaluated in detail.

**Keywords:** Diabetes mellitus; sleep quality; anxiety; depression

## Giriş

Diyabetes mellitus (DM), dünyada ve ülkemizde giderek artmakta olan morbidite ve mortalitesi yüksek kronik bir hastalıktır [1,2]. Uluslararası Diyabet Federasyonu verilerine göre, 2017 yılında dünya çapında 425 milyon diyabet hastası mevcutken, bu rakamın 2045 yılına kadar 629 milyona çıkacağı tahmin edilmektedir [1]. Türkiye'de Diyabet Epidemiyolojik Çalışması verilerine göre (TURDEP-I ve II), diyabet prevalansı % 7,2'den % 13,7'ye yükselmiştir [2].

Birinci basamağa başvuranların %46-69'unda uyku bozukluğu şikayeti bulunmaktadır. Uyku bozukluğu yaşam kalitesi ve iş verimini düşüren önemli bir problemdir. Birçok çalışmada hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıklar, obezite, insülin direnci, DM gibi kronik hastalıklarının uyku kalitesi ve düzenini düşürdüğü bildirilmiştir [3-5].

Tip 2 DM'de hipoglisemi ve hipergliseminin yanı sıra uyku bozuklukları da en sık karşılaşılan problemlerden biridir[6]. Barone ve Menna-Baretto, uyku bozukluğunun bozulmuş glukoz toleransı için risk faktörü olduğunu bildirmişlerdir[7]. Ayrıca tip 2 diyabetli hastalarda gözlenen uyku bozukluklarının metabolik kontrolü zorlaştırdığı bilinmektedir[8].

Yakın zamanda yapılan çalışmalarda Tip 2 DM'ye sıklıkla depresyon gibi komorbid duygudurum bozukluklarının eşlik ettiği gösterilmiştir. DM ve depresyon gibi kronik hastalıkların tek başına ciddi sonuçları olduğu gibi iki komorbid durumun

birlikteliğinin ise klinik durumu daha da kötüleştirdiği bilinmektedir[9].

Depresyon ve anksiyete gibi ruhsal hastalıklar ve uyku bozukluğu da bu hastalıkla birlikte sık görülmektedir. Ancak nasıl etkilediği ile ilgili literatürde yeterli veri yoktur.

Bu çalışmada Tip 2 DM'li hastalarda uyku kalitesi ile anksiyete ve depresyon durumlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntemler

Araştırma ilçe Devlet Hastanesi dahiliye polikliniğinde takipli tip 2 diyabet hastalarının verilerinden oluşmaktadır. Nisan-Haziran 2015 tarihleri arasında hastalara uygulanan uyku kalitesi ve ruhsal durum ölçeklerinin sonuçları ve hastaların sosyo-demografik verileri retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Çalışma için Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi girişimsel olmayan klinik araştırmalar etik kurulundan 16/07/2019 tarih ve 13 sayılı kurul kararı ve Kamu Hastaneler Birliğinden gerekli izinler alınmıştır. İletişim kurulamayan, Tip 1 DM, gestasyonel DM tanılı ve ruhsal hastalığı olan hastalar ve uyku kalitesini etkileyecek KOAH vb. hastalığı olanlar çalışmaya dışı bırakılmıştır. Takipli hastalarda uyku kalitesini değerlendirmek için Pittsburg Uyku Kalitesi İndeksi (PUKİ) ve ruhsal durumu değerlendirmek için Hastane Anksiyete Depresyon (HAD) Ölçeği kullanılmıştır.

## Pittsburg uyku kalitesi indeksi

PUKİ, son bir ay içerisindeki uyku kalitesi ve uyku bozukluğunun

tipi ve şiddeti konusunda bilgi sağlayan bir ölçektir. Buysa ve arkadaşları tarafından 1989 yılında geliştirilmiş olup, geçerlik ve güvenilirlik çalışmaları Ağargün ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. 7 ana başlıkta sorulan sorular ile uyku kalitesini değerlendirir. Ölçekteki her bir madde 0 (hiç sıkıntı olmaması)-3 (ciddi sıkıntı) puan arasında bir değer almaktadır. Yedi alt boyuta ilişkin puanların toplamı ise toplam PUKİ puanını vermektedir. Toplam puanı 5 ve altında olanların uyku kalitesi "iyi" olarak değerlendirilir [10,11].

### Hastane anksiyete depresyon ölçeği (HAD)

Hastada anksiyete ve depresyon yönünden riski belirlemek, düzeyini ve şiddet değişimini ölçmek amacıyla Zigmond ve Snaith tarafından geliştirilen, Aydemir ve arkadaşları tarafından Türkçe'ye uyarlanmış olan kendini değerlendirme ölçeğidir. Ölçek anksiyete ve depresyon alt ölçeklerini içeren 7'si depresyon (çift sayılar), 7'si anksiyete (tek sayılar) belirtilerini araştırılan toplam 14 maddeden oluşmaktadır. Yanıtlar dörtlü Likert biçiminde değerlendirilmektedir ve 0-3 arasında puanlanmaktadır. ROC analizi sonucunda HAD ölçeğinin Türkçe formunun kesme noktaları anksiyete alt ölçeği için 10 ve depresyon alt ölçeği için 7 olarak saptanmıştır[12].

### İstatistik

Veriler SPSS 18.0 (Statistical Package For Social Sciences) paket programıyla analiz edilmiştir. Sürekli değişkenler ortalama  $\pm$  standart sapma ve kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak verilmiştir. Parametrik test varsayımları sağlandığında bağımsız grup farklılıkların karşılaştırılmasında İki Ortalama Arasındaki Farkın Önemlilik Testi ve Varyans Analizi; parametrik test varsayımları sağlanmadığında ise bağımsız grup farklılıkların karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi ve Kruskal Wallis Varyans Analizi kullanılmıştır. Ayrıca sürekli değişkenlerin arasındaki ilişkiler Spearman ya da Pearson korelasyon analizleriyle ve kategorik değişkenler arasındaki farklılıklar ise Ki kare analizi ile incelenmiştir.

### Bulgular

Çalışmaya dahil edilen 49 kişiden 25'i erkek, 24'ü kadındı. Katılımcıların yaş ortalaması  $62 \pm 9,9$  idi (37-82). %81,6'sı (n: 40) evliydi, %81,6'sı (n: 40) ilköğretim mezunuydu. Hastalık süresi değerlendirildiğinde; %46,9'nun (n:23) 5 yıldan az, %28,6'sının (n:14) 10 yıl üzerinde DM tanısı olduğu tespit edildi. %42,9'u (n:21) sadece oral antidiyabetik ilaç kullanırken, %36,7'si (n:18) oral antidiyabetikler ile birlikte insülin kullanmaktaydı. %49'unda (n:24) DM ile birlikte hipertansiyon saptandı. %20,4'ünde (n:10) eşlik eden herhangi bir kronik hastalık yoktu. Hastaların

**Tablo 1.** Hastaların sosyodemografik ve klinik özellikleri

	n	%
Cinsiyet		
Kadın	24	49
Erkek	25	51
Medeni durum		
Bekar	9	18,4
Evli	40	81,6
Eğitim		
İlkokul	40	81,6
Ortaokul/Lise	8	16,3
Lisans/üniversite	1	2,0
Dm tanı yılı		
≤ 5 yıl	23	46,9
5 -10 yıl	12	24,5
> 10 yıl	14	28,6
DM tedavi		
OAD	21	42,9
İnsülin	10	20,4
OAD+insülin	18	36,7

OAD: Oral antidiyabetik

Hastaların PUKİ ortalama puanı  $7 \pm 3,8$  olarak bulundu ve %59,2'sinde uyku kalitesi kötüydü. PUKİ yedi ana başlıkta incelendiğinde ise öznel uyku kalitesi puanı %18,4'ünde kötü olarak bulundu. Hastalarımızın uykuya dalma süreleri incelendiğinde ise; %24,5'inde 15 dakikadan az, %26,5'inde 16 ile 30 dakika aralığında, %30,6'sında 31–60 dakika aralığında ve %18,4'ünde 60 dakikanın üzerinde olarak bulundu. Uyku süresine bakıldığında büyük bölümünün (%57,1) 7 saat ve üzerinde uyudukları bulundu. Hastaların PUKİ puanı ve komponentlerinden aldıkları puan dağılımı tablo 2'de sunulmuştur.

Çalışmaya katılan hastaların PUKİ puanları, sosyodemografik özellikleri ile karşılaştırıldığında kadınların erkeklere göre uyku kalitesi daha kötü olduğu tespit edildi. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p=0,027$ ). Ancak yaş, medeni durum ve eğitim açısından istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmadı.

Katılımcıların ruhsal durum açısından anksiyete ve depresyon risk düzeylerine bakıldığında HAD anksiyete alt ölçeğinden aldıkları puan ortalama  $7 \pm 5,0$  idi ve HAD ölçeğine göre, anksiyete düzeyi %22,4 kişide eşik üstü değerde bulundu. HAD depresyon alt ölçeğinden aldıkları puan ortalama  $4 \pm 4,4$ 'tü ve depresyon düzeyi %26,5 kişide eşik üstü değerde bulundu. HAD ölçeği ile demografik veriler arasındaki ilişki karşılaştırıldığında, kadınların erkeklere göre anksiyete alt ölçeği eşik üstü değeri anlamlı derecede yüksekti ( $p=0,013$ ), ancak depresyon alt ölçeğinde istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmadı.

HAD ölçeği ile PUKİ ölçekleri karşılaştırıldığında; HAD anksiyete düzeyi eşik üstü olanlardan 9 (%81,8) kişide uyku kalitesi kötüydü

ve HAD depresyon düzeyi eşik üstü olanlardan 9 (%69,2) kişide uyku kalitesi kötüydü ancak istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ( $p=0,083$ ;  $p=0,39$ ). Tablo 3'te HAD anksiyete ve depresyon ile PUKİ uyku kalitesi sonuçları sunulmuştur.

**Tablo 2.** PUKİ puanı ve komponentlerinden aldıkları puan dağılımı

	n	%
Puki toplam puanı		
≤ 5 iyi uyku kalitesi	20	40,8
> 5 kötü uyku kalitesi	29	59,2
Öznel uyku		
Çok iyi	9	18,4
İyi	30	61,2
Kötü	9	18,4
Çok kötü	1	2,0
Uyku latans		
15 dakikadan az	12	24,5
16-30 dakika	13	26,5
31- 60 dakika	15	30,6
60 dakika üzerinde	9	18,4
Uyku süresi		
7 saat ve üzeri	28	57,1
6- 6.9 saat	11	22,4
5- 5.9 saat	6	12,2
5'in altı	4	8,2
Uyku etkinliği		
%85'in üzerinde	33	67,3
%75- %85	9	18,4
%65- %74	1	2,0
65'in altı	6	12,2
Uyku bozukluğu		
Hiç yaşanmadı	3	6,1
Haftada birden az	19	38,8
Haftada bir iki kez	24	49,0
Haftada üç ve üzeri	3	6,1
Uyku ilacı kullanma		
Hiç kullanmıyor	40	81,6
Haftada birden az	1	2,0
Haftada bir iki kez	3	6,1
Haftada üç ve üzeri	5	10,2
Gündüz işlev bozukluğu		
Hiç yaşanmadı	28	57,1
Haftada birden az	14	28,6
Haftada bir iki kez	7	14,3
Haftada üç ve üzeri	-	-

PUKİ: Pittsburg Uyku Kalitesi İndeksi

**Tablo 3.** HAD anksiyete ve depresyon ile PUKİ sonuçları

	PUKİ	
	İyi uyku	Kötü uyku
HAD anksiyete		
Eşik altı N (%)	18 (47,4)	20 (56,2)
Eşik üstü N (%)	2 (18,2)	9 (81,8)
HAD depresyon		
Eşik altı N (%)	16 (44,4)	20 (55,6)
Eşik üstü N (%)	4 (30,8)	9 (69,2)

HAD: Hastane anksiyete depresyon ölçeği, PUKİ: Pittsburg Uyku Kalitesi İndeksi

## Tartışma

Yapılan çalışmalarda uyku kalitesi ve düzenindeki bozulmaların bireyleri olumsuz yönde etkilediği, dikkati toplayamama, anksiyete, depresyon, ağrıya karşı duyarlılığın artması, sinirlilik, halüsinasyon, iştahsızlık gibi sorunlara neden olduğu ortaya konulmuştur [13,14]. Çalışmamızda hastaların büyük bölümünün (%57,1) 7 saat ve üzerinde uyudukları bulunmuştur[15]. Bu da hastalarımızın toplam uyku saati ile toplumun genel uyku alışkanlığı süresinin uyum içinde olduğunu göstermektedir [16].

Çalışmamıza katılanlarda PUKİ'ye göre kötü uyku kalitesi %59,2 bulunurken, yurt dışında yapılan çalışmalarda bu oran %33,6-34,8 aralığında daha düşük oranda bildirilmiş, Türkiye'den yapılan çalışmalarda ise %34-86,3 aralığında bildirilmiştir [16-19].

Araştırma grubumuzda; kadınlarda erkeklere göre uyku kalite düzeylerinin daha kötü olduğu bulunmuştur. Tsai ve ark. tarafından yapılan uyku kalitesinin glisemik kontrol üzerine etkisi çalışmasında da kadınlarda erkeklere göre uyku kalite düzeylerinin daha kötü olduğu gözlenmektedir [16].

DM ve uyku kalitesi ile ilgili yapılmış çalışmalarda kandaki yüksek glukoz düzeyi ve yüksek HbA1c düzeyinin uyku süresini olumsuz etkilediği bildirilmiştir [20]. Uyku sırasında normal kişilerde insülin sekresyonunu ve glukoz düzeyleri arasında bir denge mevcutken, DM'li hastalarda bu denge yüksek kan şekeri ile bozulmaktadır [21]. Literatürde uykusuzluğun serebral korteks, limbik sistem ve hipotalamus üzerinden sempatik ganglion ve adrenal medulla aracılığıyla katekolamin sekresyonunu arttırdığı, hipofiz ve adrenalenden kortizol salınımı sonucunda tüm bunların kan şekerini yükselttiği bildirilmiştir [22-25]. Ayrıca DM ilişkili mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonların da uyku kalitesini bozduğu gösterilmiştir [25]. Çalışmamızda insülin direnci ve kortizol düzeyleri değerlendirilmemekle birlikte, birçok çalışmada uykusuzluğun insülin direnci ve kortizol düzeyi ile ilişkili olduğu bulunmuştur [7,17,20-22,26].

Çalışmamızda HAD anksiyete alt ölçeği puanı  $7\pm 5,0$  ve HAD depresyon alt ölçeğinden aldıkları puan  $4\pm 4,4$  iken benzer bir çalışmada HAD anksiyete alt ölçeği puanı  $7,98\pm 4,4$  olarak benzer iken HAD depresyon alt ölçeğinden aldıkları puan  $7,52\pm 4,6$  olarak çok daha yüksek bulunmuştur [27]. Bizim çalışmamızda HAD ölçeğine göre, anksiyete düzeyi %22,4 kişide eşik üstü değerde ve depresyon düzeyi %26,5 kişide eşik üstü değerde bulunurken bu oran benzer çalışmalarda anksiyete için eşik üstü değeri %21,8, depresyon için eşik üstü değeri %42 olarak bildirilmiştir [28]. Yurt dışında ve

ülkemizde yapılan çalışmalarda hem anksiyete hem de depresyon açısından kadınların daha yüksek riske sahip olduğu bildirilirken bizim çalışmamızda HAD ölçeğine göre kadınlar anksiyete açısından riskli bulunmuş, ancak depresyon açısından risk saptanmamıştır [28-32].

## Sonuç

Uykunun hem beden hem de ruh sağlığını etkileyen bir kavram olduğu göz önünde alındığında, diyabet gibi kronik hastalıklarda medikal tedavilerin yanı sıra uyku kalitesi ve ruhsal durumların da detaylı değerlendirilmesi gerekmektedir.

## Çıkar çatışması / finansal destek beyanı

Bu yazıdaki hiçbir yazarın herhangi bir çıkar çatışması yoktur. Yazının herhangi bir finansal desteği yoktur.

## Kaynaklar

1. IDF diabetes atlas - 2017 Atlas. <https://diabetesatlas.org/resources/2017-atlas.html>. Accessed May 9, 2019.
2. Satman I, Omer B, Tutuncu Y, et al. Twelve-year trends in the prevalence and risk factors of diabetes and prediabetes in Turkish adults. *Eur J Epidemiol* 2013;28: 169-80.
3. Aikens JE, Rouse ME. Help-seeking for insomnia among adult patients in primary care. *J Am Board Fam Pract* 2005;18: 257-61.
4. Shochat T, Umphress J, Israel AG, Ancoli-Israel S. Insomnia in primary care patients. *Sleep*. 1999;22 Suppl 2:S359-365.
5. Terzano MG, Parrino L, Cirignotta F et al. Studio Morfeo: insomnia in primary care, a survey conducted on the Italian population. *Sleep Med* 2004;5: 67-75.
6. Özdemir İ, Hocaoglu Ç, Koçak M, Ersöz HÖ. Quality of Life and Psychiatric Symptoms in The Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *Dusunen Adam J Psychiatry Neurol Sci* February 2011.
7. Barone MTU, Menna-Barreto L. Diabetes and sleep: a complex cause-and-effect relationship. *Diabetes Res Clin Pract* 2011; 91:129-37.
8. Cappuccio FP, D'Elia L, Strazzullo P, Miller MA. Quantity and quality of sleep and incidence of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care* 2010; 33: 414-420.
9. Chowdhury SH, Karim MN, Selim S, et al. Risk of depression among Bangladeshi type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab Syndr* 2017;11:1009-12.
10. Buysse DJ, Hall ML, Strollo PJ, et al. Relationships between the Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI), Epworth Sleepiness Scale (ESS), and clinical/polysomnographic measures in a community sample. *J Clin Sleep Med JCSM Off Publ Am Acad Sleep Med* 2008; 4: 563-571.

11. Agargün M.Y, Kara H, Anlar O. Pittsburgh Uyku Kalitesi İndeksinin geçerliliği ve güvenilirliği. *Türk Psikiyatri Derg* 1996; 7: 107-15.
12. Aydemir Ö, Güvenir T. Hastane Anksiyete ve Depresyon Ölçeği Türkçe Formunun Geçerlilik ve Güvenilirliği. *Türk Psikiyatri Derg* 1977; 8: 280-87.
13. Schnelle JF, Ouslander JG, Simmons SF, Alessi CA, Gravel MD. The nighttime environment, incontinence care, and sleep disruption in nursing homes. *J Am Geriatr Soc* 1993; 41: 910-14.
14. Fidan F, Ünlü M, , Sezer M, , Pala E, , Geçici Ö. Obstrüktif Uyku Apne Sendromu ile Anksiyete ve Depresyon Arasındaki İlişki. *Toraks Derg* 2006; 7: 125-29.
15. Uran G. Kırsal kesimde evde ve huzurevlerinde kalan 60 yaş üzeri yaşlılarda pittsburg uyku kalitesi indeksi ile uyku kalitelerinin karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi Gazi Üniversitesi Sağlık Bilim Enstitüsü Ank. 2001.
16. Tsai Y-W, Kann N-H, Tung T-H, et al. Impact of subjective sleep quality on glycemic control in type 2 diabetes mellitus. *Fam Pract* 2012;29:30-35.
17. Lou P, Qin Y, Zhang P, et al. Association of sleep quality and quality of life in type 2 diabetes mellitus: a cross-sectional study in China. *Diabetes Res Clin Pract* 2015;107: 69-76.
18. Z Güneş, Ö Körükcü, G Özdemir. Diyabetli hastalarda uyku kalitesinin belirlenmesi. *Anadolu Hemşire Ve Sağlık Bilim Derg.* 2009; 12 .
19. Akca D, Saritas SC. Relationship between symptoms observed in patients with type 2 diabetes and the sleep quality -. *Ann Med Res* 2019; 26: 579-83.
20. Nakajima H, Kaneita Y, Yokoyama E, et al. Association between sleep duration and hemoglobin A1c level. *Sleep Med* 2008; 9: 745-52.
21. Cunha MCB da, Zanetti ML, Hass VJ. Sleep quality in type 2 diabetics. *Rev Lat Am Enfermagem* 2008; 16: 850-55.
22. Spiegel K, Leproult R, Van Cauter E. Impact of sleep debt on metabolic and endocrine function. *Lancet Lond Engl* 1999; 354: 1435-39.
23. Hjemdahl P. Stress and the metabolic syndrome: an interesting but enigmatic association. *Circulation* 2002; 106: 2634-36.
24. Spiegel K, Knutson K, Leproult R, Tasali E, Van Cauter E. Sleep loss: a novel risk factor for insulin resistance and Type 2 diabetes. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2005;99: 2008-19.
25. Nathan DM, Genuth S et al. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329: 977-86.



26. Öztürk ZA, Yesil Y, Kuyumcu ME et al. Association of depression and sleep quality with complications of type 2 diabetes in geriatric patients. *Aging Clin Exp Res* 2015;27: 533-38.
27. Günalay S, Taşkiran E, Demir B, Erdem S, Mergen H, Akar H. Tip 2 diyabetes mellitus hastalarında tedavi yöntemleri, glisemik kontrol ve diyabet komplikasyonları ile depresyon ve anksiyete riski arasındaki ilişki. *FNG Bilim Tıp Derg* 2016;2:16-19.
28. Sönmez B, Kasım İ. Diabetes mellitus'lu hastaların anksiyete, depresyon durumları ve yaşam kalitesi düzeyleri. *Türkiye Aile Hekim Derg* 2013;17: 119-24.
29. Gülseren L, Hekimsoy Z, Gülseren Ş, Bodur Z, Kültür S. Diabetes mellituslu hastalarda depresyon anksiyete, yaşam kalitesi ve yetiyitimi. *Türk Psikiyatri Derg* 2001;12: 89-98
30. Collins MM, Corcoran P, Perry IJ. Anxiety and depression symptoms in patients with diabetes. *Diabet Med* 2009; 26: 153-61.
31. Sakamaki H, Ikeda S, Ikegami N et al. Measurement of HRQL using EQ-5D in patients with type 2 diabetes mellitus in Japan. *Value Health J Int Soc Pharmacoeconomics Outcomes Res* 2006; 9: 47-53.
32. Sun N, Lou P, Shang Y et al. Prevalence and determinants of depressive and anxiety symptoms in adults with type 2 diabetes in China: a cross-sectional study. *BMJ Open* 2016; 6: e012540.

■ Orjinal Makale

## El dominansı ve koroner dominans arası ilişki

### *Relationship between hand dominance and coronary dominance*

Hatice TOLUNAY\* 

Yenimahalle Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kardiyoloji Departmanı, Ankara /TÜRKİYE

#### Öz

**Amaç:** Koroner arter hastalığının bilinen risk faktörlerinin dışında, koroner dominans, ektazi, bifürkasyon açısı gibi anatomik risk faktörleride mevcuttur. Fonksiyonel bir serebral lateralizasyon olarak kabul edilen el dominansının bazı hastalıklarla ilişkisi daha önce tanımlanmıştır. Bu çalışmanın amacı genetik faktörler ile belirlenen el dominansı ve koroner dominans arası ilişkiyi tanımlamaktır.

**Gereç ve Yöntemler:** Polikliniğe başvuran, koroner anjiyografi uygulanmış 226 hastanın koroner anjiyografileri değerlendirildi. Hastalar sağ koroner dominant, sol dominant ve dengeli dominant olarak gruplandırıldı. Hastaların el tercihlerini belirlemek için "Oldfield Anketi" kullanıldı. Hastalar sağ el baskın, sol el baskın ve her iki elde baskınlık olarak üç gruba ayrıldı. Koroner dominans ve el dominansı arasındaki ilişki araştırıldı.

**Bulgular:** Anjiyografisi yapılan 226 hastanın 96'sı (%42,5) kadın, 130' u (%57,5) erkekti. 170 hasta (%75, 2) sağ el, 14 hasta sol el (%6,2) ve 42 hasta (%18,6) her iki el baskınlığına sahipti. 160 hastada sağ koroner dominans (%70, 8), 26 hastada sol koroner dominans (%11,5) ve 40 hastada (%17,7) dengeli koroner dominans belirlenmiştir. El dominansı ile cinsiyet arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır (p: 0,309). Koroner dominans ve cinsiyet arası anlamlı bir ilişki saptanamamıştır (p:0,114). Koroner arter dominansı ile serebral fonksiyonel dominans arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki vardır (p: 0,005).

**Sonuç:** Çalışmamızda koroner arter dominansı ve serebral fonksiyonel dominans arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır. Ancak serebral ve koroner dominansı anatomik düzeyde karşılaştırmak için dominant hemisferi daha net olarak gösteren invaziv bir test olan wada testi ile yapılacak ileri çalışmalara ve anatomik lateralizasyonu karşılaştıran kadavra çalışmalarına ihtiyaç vardır.

**Anahtar kelimeler:** el dominansı, koroner dominans, serebral lateralizasyon

Sorumlu Yazar\*: Hatice Tolunay, Yenimahalle Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kardiyoloji Departmanı, Ankara /TÜRKİYE

E-posta: drhaticearslan@gmail.com

ORCID: 0000-0002-9407-3395

Gönderim: 28.08.2018 Kabul: 19.11.2018

Doi: 10.18663/tjcl.455391

## Abstract

**Aim:** Coronary artery disease is present in anatomic risk factors such as dominance, ectasia, bifurcation angle other than standard risk factors. The association of cerebral lateralization and hand dominance with some diseases has been described previously. The aim of this study is to investigate the relationship between hand dominance and coronary dominance determined by genetic factors.

**Material and Methods:** Coronary angiograms of 226 patients who underwent coronary angiography were evaluated for coronary dominance. Patients were grouped as right, left and balanced dominance. The "Oldfield Survey" was used to determine patients' hand preferences. Patients were divided into three groups: left-hand, right-hand dominant and ambidextrous patients. The relationship between coronary dominance and hand dominance was investigated.

**Results:** Of the 226 patients who underwent angiography, 96 (42.5%) were female and 130 (57.5%) were male. 170 patients (75.2%) had right hand, 14 patients had left hand (6.2%), and 42 patients (18.6%) had both hand dominance. Right coronary artery dominance was found in 160 patients (70.8%), left coronary dominance in 26 patients (11.5%) and balanced coronary dominance in 40 patients (17.7%). There was no statistically significant difference between hand dominance and gender ( $p: 0.309$ ). There was a statistically significant relationship between coronary artery dominance and cerebral functional dominance ( $p: 0.005$ ).

**Conclusion:** In conclusion, there was a significant relationship between coronary artery and cerebral functional dominance. However, cadaver studies are needed to compare cerebral and coronary dominance with advanced studies and anatomical lateralization with the wada test, which is an invasive test that shows us more clearly the dominant hemisphere.

**Keywords:** hand dominance; coronary dominance; cerebral lateralization

## Giriş

Serebral dominans bazı nörolojik fonksiyonların performansı ve kontrolünde beyin hemisferlerinden birinin diğerine göre baskınlığını ifade eder. Bazı hastalık gruplarında sol el dominansı ve her iki ellilik oranlarının artmış olduğu görülmektedir (1).

Koroner arter hastalığının yaş, cinsiyet, diyabet varlığı ve aile öyküsü gibi risk faktörlerinin dışında koroner arterlerin vasküler geometrik özellikleri olan koroner dominans, ektazi, bifürkasyon açısı gibi anatomik risk faktörleride mevcuttur (2,3). Serebral lateralizasyonun ve el dominansının bazı hastalıklarla ilişkisi daha önce tanımlanmıştır.

Serebral lateralizasyon beyin iki hemisferi arasındaki anatomik veya fonksiyonel farklılıklar anlamına gelmektedir. Hemisferlerden birinin diğerine göre daha ağır olması anatomik bir serebral lateralizasyon olmakla birlikte, el tercihi fonksiyonel bir serebral lateralizasyon olarak kabul edilmektedir (4).

El dominansı ile hemisfer dominansı arasında, doğrudan ilişki bulunmaktadır. Böylelikle, baskın olarak kullanılan beyin bölgesi saptanmaktadır (5). El baskınlığı sağ el dominansı, sol el dominansı ve sağ el lehine az bir fark olmakla birlikte her

iki elin birden kullanılabilmesi ambidekstralite durumu olarak görülmektedir (6,7). Sağ elimizi sol beyin, sol elimizi de sağ beyin yönetmektedir.

Arnet'e göre insanların %90'ının sağ eli, %10'unun ise sol eli baskındır (8). Bir başka çalışmada da sağ el dominansı, genel olarak toplumun %85-90'ında görülmektedir. Ancak, her el dominansı olanlar da düşünüldüğünde, toplumda %66 sağ el, %30 her iki el, %4 ise sol el dominansı görülmektedir (9).

Lateralizasyonun belirlenebilmesi için pek çok ölçek geliştirilmiştir. Benzer mantıkla geliştirilmiş olan bu ölçekler, farklı alanlardaki lateralleşmeyi belirlemektedir (10). Bunlardan en çok kullanılanları; Oldfield anketi, Geschwind El Baskınlığını Belirleme Formu, Edinburg El Tercihi Envanteri ve Wada Testi'dir. Koroner arter dominansı tamamen anatomik bir tanımlama olup kalbin diyafragmatik yüzünü ve interventriküler septumun posterior diyafragmatik yüzünü besleyen damar dominant koroner arter olarak belirlenmiştir. Toplumun %85'inde sağ koroner arter dominansı mevcuttur. Sol koroner dominansı oranı %8 olup PDA (posterior descending artery) ve PLA (posterolateral artery) sirkümfleks arterden köken almaktadır. Kalan %7 lik kısım ise dengeli dominans olarak tanımlanır. PDA sağ koroner arterden, PLA ise sirkümfleks arterden köken alır.

El dominansı ve koroner dominans için sağ ve sol baskınlık oranlarının benzer olduğu aşikardır. Genetik faktörler ile belirlenen el dominansı ve koroner dominans arası ilişkiyi tanımlamak üzere literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Biz de bu çalışmada el dominansı ve koroner dominans arasındaki ilişkiyi tanımlamayı amaçladık.

## Gereç ve Yöntemler

Ocak 2017 ve Ekim 2017 tarihleri arası polikliniğe başvuran koroner anjiyografi uygulanmış 226 hastanın koroner anjiyografileri koroner dominans açısından rutin değerlendirildi. Sağ, sol ve dengeli dominans olarak hastalar gruplandırıldı. Aynı zamanda hastaların el tercihlerinin belirlenmesi amaçlı "Oldfield Anketi" kullanıldı (11). Bu ankette, yazı yazma, resim yapma, top veya taş fırlatma, makas tutma, diş fırçalama (fırçayı tutan el), bıçak tutma, çatal tutma (bıçaksız), çekiç tutan el (çivi çakarken), kibrit çakarken kibrit çöpünü tutan el, şişe açarken kapağı tutan el sorularak bu fonksiyonları yerine getirirken hangi elin tercih edildiği saptandı. El tercihi ile ilgili olarak "sol el", "her iki el", "sağ el" cevaplarına sırasıyla -10, 0, +10 puan verildi. Sonuç olarak ortaya çıkan toplam puan Geschwind skoruna göre değerlendirildi. (Geschwind skoru +100 ile -100 arasında değişmektedir). Skorunun negatif olması solaklık, pozitif olması sağlaklık lehindedir. Bu puanlamaya göre, +40 ile +100 arasında olanlar sağlak, -30 ile +30 arasındakiler iki eli, -100 ile -40 arasında bulunanlar solak olarak değerlendirildi. Koroner dominans ile fonksiyonel serebral lateralizasyonun göstergesi olan el dominansı arasındaki ilişki araştırıldı.

## İstatistiksel analiz

Veriler SPSS versiyon 18.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois) ile analiz edildi. Değişkenlerin ilişkisi Ki kare testi ve Kruskal Wallis testi ile değerlendirildi.  $P < 0,05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## Bulgular

Anjiyografisi incelenen 226 hastanın 96'sı kadın (%42,5), 130'u (%57,5) erkek olarak saptandı. Hastaların %74,3 ü hipertansif, %26,5 'i diyabetikti. Demografik veriler tablo 1' de ayrıntılı belirtildi. 170 hastada (%75,2) sağ el, 14 hastada sol el (%6,2), 42 hastada (%18,6) her iki el dominansı mevcuttu. Koroner anjiyografiler değerlendirildiğinde 160 hastada (%70,8) sağ koroner, 26 hastada (%11,5) sol koroner dominansı ve 40 (%17,7) hastada dengeli koroner dominans saptandı.

El dominansı ile cinsiyet arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ( $p > 0,309$ ). Cinsiyetlere göre dominant elin yüzdelik dağılımı Tablo 1' de verilmiştir.

**Tablo 1:** Hastaların demografik özellikleri

Özellik	Oran (%)
Yaş (Ortalama) *	60,95 ±10,31
Cinsiyet (Kadın)	%42,5
Hipertansiyon	%74,3
Diyabet	%26,5
Hiperlipidemi	%44,5
Sigara	%45,6

\*Ortalama±Standart sapma

Koroner dominans ile cinsiyet arası ilişki araştırılmış olup istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p > 0,114$ ). Cinsiyete göre el dominansı ve koroner dominansın yüzdelik dağılımları tablo 2 ve 3' te gösterilmiştir.

**Tablo 2:** Cinsiyete göre el dominansı yüzdelik dağılımları

El Dominansı	Kadın (%)	Erkek (%)
Sağ el dominant	%77	%73,8
Sol el dominant	%6,4	%6,2
Her iki el dominant	%16,6	%20

**Tablo 3:** Cinsiyete göre koroner dominans yüzdelik dağılımları

Koroner Dominans	Kadın (%)	Erkek (%)
Sağ koroner dominans	%70	%67
Sol koroner dominans	%14,5	%13
Dengeli dominans	%15,5	%20

Sağ elini baskın kullanan hastalarda %87,1 oranında sağ koroner dominans, sol elini baskın kullanan hastalarda %42,9 oranında sol koroner dominans, ve her iki elini baskın kullanan hastalarda %57,1 oranında dengeli koroner dominans saptanmıştır (Tablo 4). Koroner dominans ve el dominansı arası ilişki istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0,005$ ).

**Tablo 4:** Koroner dominans ve el dominansı ilişkisi

El Dominansı	Sağ koroner dominans	Sol koroner dominans	Dengeli dominans	Total
Sağ el dominans	148 (%87,1)	8(%4,7)	14(%8,2)	170
Sol el dominans	6(%42,9)	6(%42,9)	2(%14,3)	14
Her iki el dominans	6(%14,3)	12(%28,6)	24(%57,1)	42
	160(%70,8)	26(%11,5)	40(%17,7)	226

## Tartışma

Çalışmamızda sağ ellilik oranı %75,2, sol ellilik oranı %6,2 ve her iki elini baskın kullananların oranı %18,6'dır. Bazı sosyal faktörlerin el tercihini değiştirebildiği bilinmektedir (12). Solakların önemli bir bölümünün anne, baba, öğretmen gibi kişiler tarafından dini ve kültürel nedenlerle sağ ellerini kullanma konusunda baskı gördükleri saptanmıştır (13).

Bu bulgu çalışmamızdaki sağ el dominans ve her iki ellilik oranlarının yüksek olma durumunu açıklayabilir. Geschwind ve arkadaşları el tercihinin intrauterin testosteron seviyeleri ile ilişkili olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bu teoriye göre, yüksek testosteron seviyeleri sol hemisfer gelişmesini baskılayarak dominantlığın soldan sağa geçmesine sebep olmakta ve sonuç olarak sol el dominantlığı ortaya çıkmaktadır (1). Erkeklerde sol ellilik oranlarının yüksek olduğunu gösteren çalışmaların yanı sıra, cinsiyet ile ilişkisinin olmadığını savunan çalışmalarda mevcuttur (14,15). Bizim çalışmamızda cinsiyet ile el tercihi arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır. Koroner dominans ve cinsiyet arasında diğer çalışmalardakine benzer olarak bizim çalışmamızda da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki yoktur (16). Koroner dominans, sağ-sol baskınlık oranları ile toplumdaki el tercihi sağ ellilik ve sol ellilik oranları birbirine benzerdir. Anatomi ve fonksiyonel lateralizasyonlar arası ilişkiler daha önce gösterilmiştir. El tercihi ile ilişkili olarak beyin lateral ventrikül büyüklükleri arasında anlamlı farklılıklar olduğu bulunmuştur ve sağ ellilerde sol serebral ventrikül hacmi sağdakinden anlamlı olarak büyük bulunmuştur (17). Farklı bir kadavra çalışmasında sol koroner dominans ile posterior serebral sirkülasyon anomalileri arasında önemli bir ilişki saptanmıştır (18). Çalışmamızda koroner dominans ve el dominansı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır (p: 0,005).

Yine tiroid lobları arasındaki asimetri de el tercihi ile ilişkili bulunmuştur. Sağ ve sol eli kişilerde tiroid lob büyüklükleri ultrasonografi ile değerlendirildiğinde sağ ellilerde sol tiroid lobunun daha büyük olduğu gözlenmiştir (19,20). Adelson idiopatik skolyozda skolyoz konvex paterni ile dominant el arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmıştır (21). Burun deliklerinden gelen hava akışı baskınlığı nostril dominans olarak tanımlanmış ve el dominansı ile ilişkisi araştırılmış. Farklı çalışmalarda pozitif ve negatif yönde anlamlı ilişki belirlenmiştir (22,23).

Vertebral arter dominansı ile el dominansı arası ilişkiyi araştırılan çalışmada, baskın sol vertebral arter ile sağ elini kullanma arasındaki ilişkiyi araştırılmış. Vertebral arter dominansı ve el baskınlığı arasındaki ilişki bulunamamıştır (24).

El dominansı eğitim ve kültürel etkiler ile değişebilir. Çalışmamızda sol el dominans oranının beklenenden düşük olması, bazı bireylerin çevresel ya da kültürel nedenlerle sağ elliliğe yönlendirilmiş olduğunu düşündürmektedir. Türk toplumunda bazı kesimlerde solak çocuklara el tercihinin değiştirme konusunda sosyal baskı uygulanmakta ve bu

bireyle daha sonra her iki el dominansı olarak gelişmektedir. Bizim çalışmamızda da sol el dominans oranının diğer toplumlara göre düşük her iki el kullanımının yüksek olmasını buna bağlamaktayız. Çalışmamızda el dominansı ve koroner dominans arası ilişki p değeri açısından anlamlı görünmektedir. Fakat bu bilgilere göre çalışmamızda sol eli dominant olan hastalar tanı açısından en güvenilir grubu temsil etmekle birlikte, sol eli dominans olan hastalarda sol koroner dominans olma oranı %42,9 olup, sol elini baskın kullanan hastada sağ koroner dominant olma oranı (%42,9) ile aynıdır.

## Sonuç

Özellikle Türk toplumunda belirgin olan solaklığın davranışsal bir problem olarak yanlış değerlendirilmesi ve solakların sağ elini kullanmaya zorlanması nedeniyle gerçek solaklık oranı tam belli değildir. Bu da çalışma sonuçlarını etkilemiştir. Toplumsal baskının belirgin olmadığı toplumlarda, bu konuyla ilgili daha fazla hasta içeren araştırmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca serebral anatomik lateralizasyon ile koroner dominansı karşılaştıran kadavra çalışmaları yol gösterici olabilir.

Bu çalışmada koroner arter dominansı ile serebral fonksiyonel dominans arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir. Fakat serebral ve koroner dominansı anatomik düzeyde karşılaştırmak için dominant hemisferi bize daha net olarak gösteren invaziv bir test olan wada testi ile yapılacak ileri çalışmalara ve anatomik lateralizasyonu karşılaştıran kadavra çalışmalarına ihtiyaç vardır.

## Çıkar çatışması / finansal destek beyanı

Bu yazıdaki hiçbir yazarın herhangi bir çıkar çatışması yoktur. Yazının herhangi bir finansal desteği yoktur.

## Kaynaklar

1. Geschwind N, Galeburda AM. Cerebral lateralization biological mechanisms. Arch Neurological 1985; 42: 428-59.
2. Ghaffari S, Kazemi B, Dadashzadeh J, Sepehri B. The relation between left coronary dominancy and atherosclerotic involvement of left anterior descending artery origin. J Cardiovasc Thorac Res 2013; 5: 1-4.
3. Candır N, Ozan H, Kocabıyık N, Kusaklıgil H. Anatomical risk factors of coronary heart disease, Trakya Univ Tıp Fak Derg 2010; 27: 248-52.
4. Yıldırım S, Dane S. Cerebral lateralization and hand preference. The Eurasian Journal of Medicine 2007; 39: 45-48.
5. Rogers LJ. Factors influencing development of lateralization. Cortex 2006; 42: 107-09.



6. Subirana A. The relationship between handedness and language function. *Int J Neurol* 1964; 4: 215-34.
7. Kütükçüoğlu Y. El Baskınlığının Yönü ve Derecesinin Araştırılması. Ankara: Gata Nöroloji Anabilim Dalı 1993, Uzmanlık Tezi
8. Annett M. The distribution of manual asymmetry. *Br J Psychol* 1972; 63: 343- 58. (1972).
9. Özdemir B, Soysal A.Ş. Yaşama farklı bir açıdan bakış: sol elim. *Sted* 2004;13:131-133.
10. Lezak M. *Neuropsychological Assessment* 1995(3th edition). New York: Oxford University Press.
11. Oldfield RC. The assessment and analysis of handedness: the Edinburgh inventory. *Neuropsychologia*. 1971; 9: 97-113.
12. Gündoğan NÜ. El tercihi ve dominant göz. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi* 2007; 25: 35-7.
13. Sosyal AŞ, Arhan E, Aktürk A, Can H. El tercihi ve el tercihini belirleyen etkenler. *Türkiye Çocuk Hastalıkları Dergisi* 2007; 2: 60-8.
14. Bourassa DC, McManus IC, Bryden MP. Handedness and eye-dominance: a meta-analysis of their relationship. *Laterality* 1996; 1: 5-34.
15. Dane S, Bayirli M. Correlations between hand preference and durations of hearing for right and left ears in young healthy subjects. *Percept Mot Skills* 1998; 86: 667-72.
16. Makarovic Z, Makarovic S, Bilic-Curcic I. Sex-dependent association between coronary vessel dominance and cardiac syndrome X: a case-control study. *BMC Cardiovasc Disord* 2014; 14:142.
17. Erdogan AR, Dane S, Aydin MD, Ozdikici M, Diyarbakirli S. Sex and handedness differences in size of cerebral ventricles of normal subjects. *Int J Neurosci* 2004; 114: 67-73.
18. David GN, Aristeu CN, Rodrigo RG, Orlando FRJ. Posterior arterial circle of Willis anatomic variations and coronary artery dominance: is there a correlation? *Autopsy and Case Reports* 2011; 3: 3-8.
19. Kizilkaya E, Kantarci M, Cinar Basekim C ve ark. Asymmetry of the height of the ethmoid roof in relationship to handedness. *Laterality* 2006; 11: 297-303.
20. Yildirim M, Dane S, Seven B. Morphological asymmetry in thyroid lobes, and sex and handedness differences in healthy young subjects. *Int J Neurosci* 2006;116: 1173-79.
21. Goldberg C, Dowling FE. Handedness and scoliosis convexity: a reappraisal. *Spine* 1990; 15: 61-64.
22. Price A, Eccles R. Is there any relationship between right and left hand dominance and right and left nasal airflow dominance? *J Laryngol Otol* 2017;131: 846-852.
23. Searleman A, Hornung DE, Stein E, Brzuszkiewicz L. Nostril dominance: differences in nasal airflow and preferred handedness. *Laterality* 2005; 10: 111-20.
24. Cagnie B, Petrovic M, Voet D, Barbaix E, Cambier D. Vertebral artery dominance and hand preference: is there a correlation? *Man Ther* 2006; 11: 153-56.

## ■ Original Article

## Evaluation of knowledge and behaviors of students in faculty of medicine towards rational drug use

### *Tıp fakültesi öğrencilerinin akılcı ilaç kullanımına yönelik bilgi ve davranışlarının değerlendirilmesi*

Osman KUKULA\* 

Ondokuz Mayıs University Faculty of Medicine, Department of Pharmacology, Samsun/TURKEY

#### Abstract

**Aim:** The study was conducted to determine the knowledge, attitudes and behaviors of university students on rational drug use. In recent years, non-rational drug use has become a global problem.

**Material and Methods:** The developed questionnaire was applied to 640 medical school students, who agreed to participate in the study, with face-to-face interview technique. The questionnaire has items to question the knowledge, attitudes, behaviors of individuals regarding the rational drug use.

**Results:** Of the study group, 54.6% (n=350) uses medicines only prescribed by physicians, 87.5% (n=560) uses drugs in accordance with the prescription, and 27.5% (n=176) stated to store medications under appropriate conditions. Of the respondents, 16.0% (n=103) was taking antibiotics on their own on complaints such as influenza and common cold, 15.5% (n=101) was taking vitamin and mineral supplements every day regularly, and 57.5% (n=368) had never used vitamin-mineral supplements regularly.

**Conclusion:** Non-rational drug use leads to decrease in adherence to treatment, drug interactions, resistance to certain drugs, recurrence or prolongation of the diseases, increased frequency of adverse conditions and increased treatment costs for patients. Of the respondents, 27.66% stated that he/she did not waste any medication, but the remaining 72.34% was wasting drugs more or less. The 81.56% rate of "Yes" response to the question "Would you like to receive training on rational drug use?", despite the 19.22% "Yes" to the "Have you received training on rational drug use?" in our study suggests that there is a need for more education on rational drug use.

**Keywords:** rational drug use; knowledge; behavior

Corresponding author\*: Osman Kukula, Ondokuz Mayıs University Faculty of Medicine, Department of Pharmacology, Samsun/TURKEY

E-mail: okukula@gmail.com

ORCID: 0000-0001-5503-2462

Received: 10.10.2018 Accepted : 19.11.2018

Doi: 10.18663/tjcl.469300



## Öz

**Amaç:** Çalışma, üniversite öğrencilerinin akılcı ilaç kullanımı hakkındaki bilgi-tutum-davranışlarını belirlemek amacı ile yapıldı. Son yıllarda, rasyonel olmayan ilaç kullanımı küresel bir sorun haline gelmiştir.

**Gereçler ve Yöntemler:** Hazırlanan anket yüz-yüze görüşme tekniği ile çalışmaya katılmayı kabul eden 640 Tıp Fakültesi öğrencisinde uygulandı. Ankette kişilerin akılcı ilaç kullanımına yönelik bilgi-tutum-davranışlarını sorgulayan sorular yer aldı.

**Bulgular:** Çalışma grubunun %54.6'sı (n=350) sadece hekimin verdiği ilaçları, %87.5'u (n=560) reçeteye uygun kullandıkları, %27.5'i (n=176) ilaçları uygun koşullarda sakladıklarını bildirdi. Katılımcıların %16.0'ı (n= 103) grip, nezle, soğuk algınlığı gibi şikayetler üzerine muayene olmadan, kendi başına antibiyotik kullandıklarını, %15.7'si (n=101) her gün düzenli vitamin-mineral desteği kullandığını, %57.5'i (n=368) ise düzenli vitamin-mineral desteği hiç kullanmadıklarını bildirmişlerdir.

**Sonuç:** Akılcı olmayan ilaç kullanımı hastaların tedaviye uyuncunun azalmasına, ilaç etkileşimlerine, bazı ilaçlara karşı direnç gelişmesine, hastalıkların tekrarlamasına ya da uzamasına, advers olay görülme sıklığının artmasına, tedavi maliyetlerinin artmasına neden olur. %27,66 oranında kesim hiç ilaç atmadığını belirtmekte ancak kalan %72,34 gibi yüksek bir kesim az ya da çok ilaçları atmaktadır. Çalışmamızda bulunan eğitim sürecinde akılcı ilaç eğitim aldınız mı sorusuna verilen evet cevabının %19,22 olması ve akılcı ilaç konusunda eğitim almak ister misiniz sorusuna verilen evet cevabının %81,56 gibi yüksek çıkması akılcı ilaç eğitimlerinin daha sık yapılması gerektiğini ortaya koymaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** akılcı ilaç kullanımı; bilgi; davranış

## Introduction

As in the whole world, the use of wrong and unnecessary drugs in Turkey is a serious problem affecting public health [1,2]. Non-rational drug use leads to decrease in adherence to treatment, drug interactions, resistance to certain drugs, recurrence or prolongation of the diseases, increased frequency of adverse conditions and increased treatment costs for patients [3,4].

An appropriate drug for an indication can be selected rationally on the basis of efficacy, safety, appropriateness and cost criteria . Rational drug use, first, primarily looks after the public health interests of the community [3]. In order to ensure rational drug use, attention must be paid to the following: First, the problem of the patient must be identified, it must be correctly diagnosed by the physician [5]. In line with this, the definition of effective and safe treatment with or without medication, if appropriate, should be followed by the steps of selection of appropriate medications, the appropriate dose and duration of administration for each medication, and the appropriate prescribing [6,7]. At this stage, approved, current diagnostic and therapeutic guidelines should be utilized [8]. The drugs used, most recently used drugs, and the patient's allergic condition should be questioned and indicated by the patient [9,10]. The patient should be informed about how to use the drugs, in what dose, how often (2 times a day, 12 hours a day) and how long (how many days), and their storage conditions, and it should be ensured that these instructions are applied

completely by the patient/patient's relatives [11]. Patient/patient's relatives should be informed about potential side-effects of the drug, and drug and food interactions [12]. This should also be questioned by the patient/patient's relatives [13,14]. Drugs should be stored as specified in the instructions for use [15]. It should not be forgotten that, under inappropriate storage conditions, the chemical structures of the drugs may be deteriorated, that is to say, they may lose their effectiveness or even cause undesirable effects and intoxication [16]. Drugs that should be stored in the refrigerator should never be stored in the icebox and frozen [17]. Pregnant or breastfeeding women, children, the elderly, patients with renal and hepatic failure, those with chronic illness, and those with drug allergy history should paid more attention about the use of drugs [18]. The medication should not be used by chewing, breaking, breaking in half or dissolving in water except by the advice of the physician or pharmacist [19]. Remember that not every drug is produced accordingly. Drugs should be stored in their packaging, protected from light and moisture, in places where children cannot reach [20]. Drugs should be used only for the period recommended by your physician. Drug use should not be discontinued, and dose changes should not be made without consulting the physician [21]. Care should be taken to avoid skipping a dose and to take the medicine as recommended by the physician [22]. Unconscious use of other products intended for treatment, such as non-pharmaceutical



food supplements and herbal products should be avoided [23]. Drug boxes that have been cut or opened must not be purchased, and expired drugs should never be used [24].

In this study, priority recommendations for rational drug use were investigated.

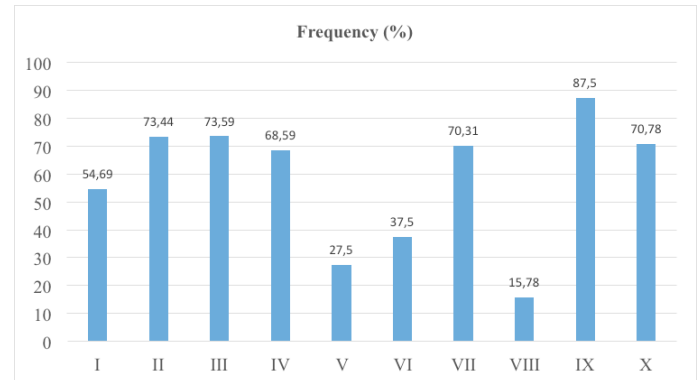
## Material and Methods

This descriptive study was conducted at Ondokuzmayis University in Samsun, Turkey, between September and December 2017. The developed questionnaire was applied to 640 medical school students, who agreed to participate in the study, with face-to-face interview technique. The questionnaire has 42 items to question the knowledge, attitudes and behaviors of individuals regarding the rational drug use. "Rational drug use" behavior is defined as the use of drugs in accordance with prescription, having no difficulty in drug availability, storing the drugs at appropriate conditions, choosing the inexpensive one among the drugs with the same effect, not using any medication other than the medicine prescribed by the physician, and using the drugs for periods specified by the physician. Approval of Ondokuzmayis University Clinical Research Ethics Committee (no 2017/229) was obtained to conduct the study. In the evaluation of the data, the SPSS software and descriptive statistics were used.

## Results

Of the study group, 54.69% (n=350) uses medicines only prescribed by physicians, 87.5% (n=560) uses drugs in accordance with the prescription, and 27.5% (n=176) stated to store medications under appropriate conditions. Of the respondents, 28.44% (n=182) was using a drug recommended by the physician until it runs out, 23.44% (n=150) was preferring an inexpensive drug with the same effect, 68.44% (n=438) had no difficulty in obtaining the drugs, 68.75% (n=440) was carrying out research on the drug to be used, and 70.78% (n=453) reported that the color, packaging and taste of the drug was important for use. Of the respondents, 73.44% (n=470) indicated to read the instructions for use before using the drug, and 73.59% (n=471) was performing research on the drugs to be used. Of the participants, 18.75% (n=120) had no training on rational drug use during their education in the Faculty of Medicine, and 68.59% (n=439) wants to receive training on rational drug use. Of them, 37.5% (n=240) stated that he/she learns information about the use of the drugs from the physician, and 70.31% (n=450) contacts a physician when confronted with the side-effects of the drug. Of the respondents, 16.09% (n=103) was taking antibiotics on

their own on complaints such as influenza and common cold, 15.78% (n=101) was taking vitamin and mineral supplements every day regularly, and 57.5% (n=368) had never used vitamin-mineral supplements regularly (Figure 1).



**Figure 1.** Answers to survey questions

- I. Using only medicines given by the physician
- II. Reading instructions for use before taking the medicine
- III. Conducting research on the medicines that will be taken
- IV. Asking to receive training on rational drug use
- V. Storage of medicines under appropriate conditions
- VI. Receiving the information from physicians regarding the use of the drug
- VII. Contacting a physician when confronted with the side effects of the drug
- VIII. Taking vitamin and mineral supplements every day regularly
- IX. Usage according to the prescription
- X. Importance of the color, packaging and taste of the drug for its use

Of the participants, 80.78% (n=517) had no training on rational drug use during their education, and 81.56% (n=522) wants to receive training on rational drug use (Table 1).

	Yes (%)	No (%)
Have you received training on the rational drug use during your education at the Faculty of Medicine?	19.22	80.78
Would you like to receive training on rational drug use?	81.56	18.44

According to the responses given, the rate of use of drugs of family members was 44.06% (n=282), the rate of using inexpensive drugs with the same effect was 31.88% (n=204), the rate of problems with drug availability was 4.22% (n=27), the rate of drug recommendation to others with similar complaints was 49.84% (n=319), the rate of proactively prescribing or buying drugs without any disease considering that it might be necessary was 32.97% (n=211), the rate of informing physician about the previously used drugs and

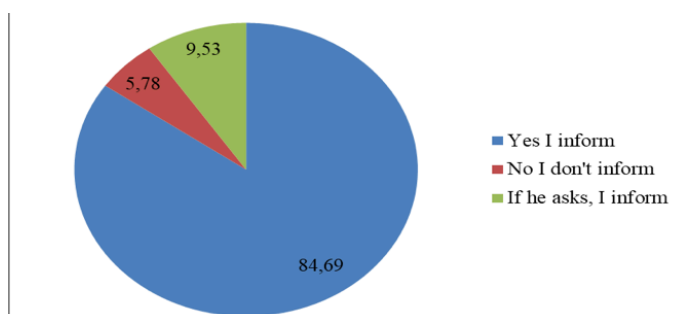
reports on chronic diseases was 91.56% (n=586), and the rate of checking the drugs given are whether the prescribed drugs in the prescription was 33.59% (n=215) (Table 2).

	Frequency (%)
Using family members' medications	44.06
Using inexpensive drugs with the same effect	31.88
Difficulties in drug supply	4.22
Drug recommendation for those with similar complaints	49.84
Getting prescription or buying drugs to store at home, considering that it may be necessary	32.97
Informing the physician about the previously used medicines and reports on chronic diseases	91.56
Checking whether the drug given is the prescribed drug when buying prescription medicines	33.59

The question "What are the medications you had prescribed/bought" was responded with "painkiller" by 62.66% (n = 401). Of the patients, 42.34% (n = 271) responded with "common cold medication", 30.63% (n = 196) with "antibiotics", and 22.66% with vitamins (Table 3).

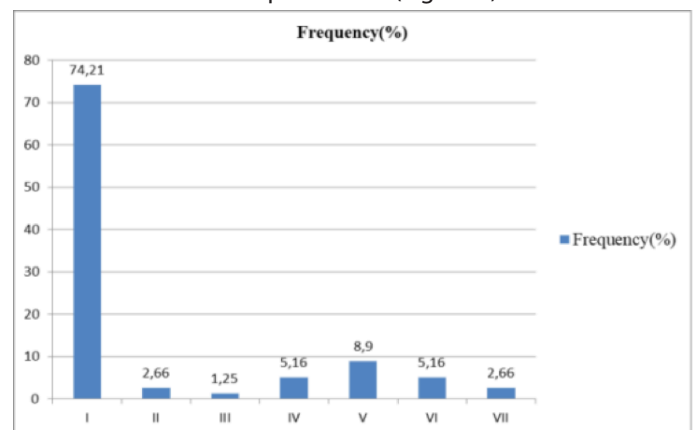
	Prescribed drug frequency (%)
Painkiller	62.66
Common cold medications	42.34
Antibiotics	30.63
Vitamins	22.66
Nasal spray	14.53
Stomach drugs	8.13
Eye drops	6.72
Allergy drugs	1.88
Other	5.47

The question, "If you have food or medicine allergies, will you inform the physician and the relevant health personnel during the examination?" was responded with "yes, I inform" by 84.69% (n=542), "no I don't inform" by 5.78 (n=37), and "I inform if asked" by 9.53 (n=61) (Figure 2).



**Figure 2.** If you have food or medicine allergies, will you inform the physician and the relevant health personnel during the examination?

The question "What do you do in case of an illness?" was responded with "I consult a physician" by 74.21% (n=475), "I try herbal treatment methods" by 8.9% (n=57), and "I consult friends, neighbors, relatives" by 5.16% (n=33). And, 5.6% (n=33) responded with "I try to be treated with medications at home", 2.66% (n=17) with "I consult a pharmacist", and again 2.66% (n=17) with "I ask those who had a similar illness before", and 1.25% (n=8) responded with "I consult nurses / health officers / health personnel" (Figure 3).



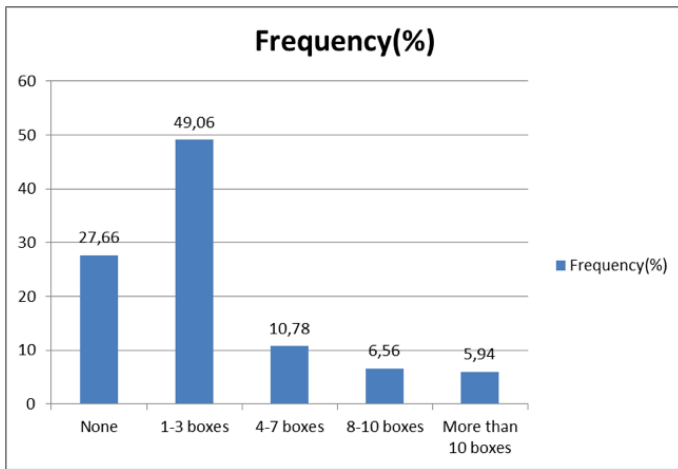
**Figure 3.** What do you do in case of illness?

- I: I consult a physician
- II: I consult a pharmacist
- III: I consult a nurse, medical officer or health care personnel
- IV: I consult friends/neighbors/relatives
- V: I try the herbal treatment methods
- VI: I try to be treated with the medicine at home
- VII: I ask those who have experienced a condition similar to my disease before

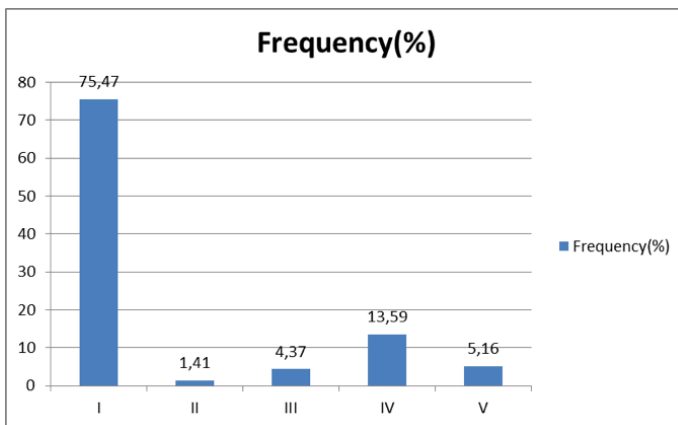
The question "How many boxes of drugs are wasted without opening its box in your home each year, due to its expiration date?" was responded with "none" by 27.66% (n=177). Of the participants, 49.06% wastes 1-3 boxes, 10.78% wastes 4-7 boxes, 6.56% 8-10 boxes, and 5.94% wastes more than 10 boxes (Figure 4).

The question "What do you do with family members' remaining medicine after a treatment?" was responded with "I keep them to use when needed" by 75.47% (n=483), "I give them to the pharmacy" by 1.41% (n=9), "I give them to the friends and relatives who want" by 3.37% (n=28), and "I throw them" by 13.59% (n=87) (Figure 5).

The question "How do you use the drugs prescribed by the physician?" was answered with "I use until runs out" by 28.44% (n=182), "I use until until my complaints relieve" by 45% (n=288), "I use as long as the period recommended by the physician or pharmacist" by 24.06% (n=154) (Figure 6).



**Figure 4.** How many boxes of drugs are wasted without opening its box in your home each year, due to its expiration date?



**Figure 5.** What do you do with family members' remaining medicine after a treatment?

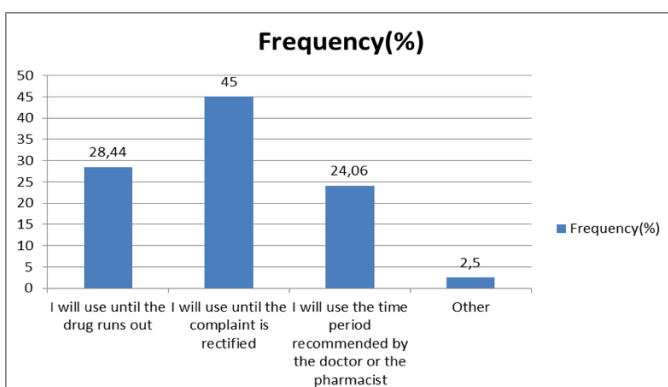
I: I keep them to use when needed

II: I give them to the pharmacy

III: I give them to the interested people I know

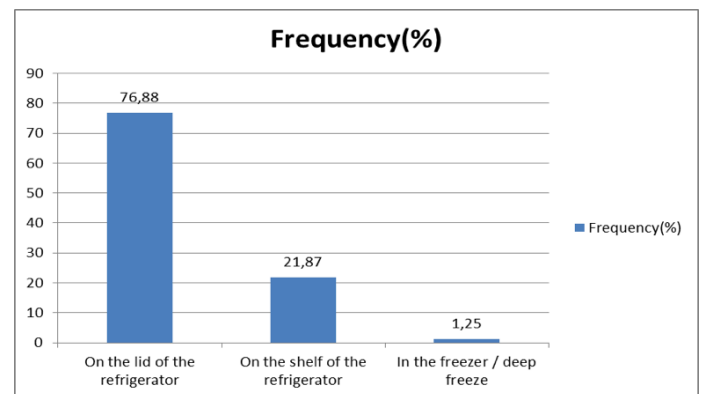
IV: I throw them in the trash

V: Other



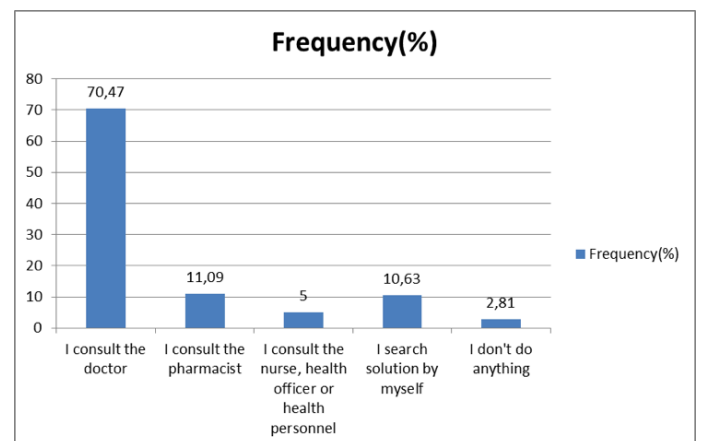
**Figure 6.** How do you use the drugs prescribed by the physician?

And, the question "In which part of the refrigerator do you store the medicines in your home if you need to keep them in the fridge?" was responded with "In the refrigerator lid" by 76.88% (n=492), "In the refrigerator shelves" by 21.87% (n=140), and "In the freezer/fridge" by 1.25% (n=8) (Figure 7).



**Figure 7.** In which part of the refrigerator do you store the medicines in your home if you need to keep them in the fridge?

The question "How do you behave if you encounter side-effects of the drug?" was responded with "I consult physician" by 70.47% (n=451), "I consult pharmacist" by 11.09% (n=71), "I consult nurses/health officers/healthcare personnel" by 5% (n=32), "I seek a solution" by 10.63% (n=68), and "I do nothing" by 2.81% (n=18) (Figure 8).



**Figure 8.** How do you behave if you encounter side effects of the drug?

## Discussion

In our study, pharmaceutical drug waste is particularly high. Of the respondents, 27.66% stated that he/she did not waste any medication, but the remaining 72.34% was wasting drugs more or less. Of the participants, 76.88% store the medicine, which must be kept fresh, in the refrigerator lid. However, since there may be temperature changes in the refrigerator lid, it must be stored on the refrigerator shelves. Only 21.87%



keeps the drugs on the shelves of the refrigerator. The ratio of those who use drugs as long as the period recommended by physician was only 24.06%.

The 81.56% rate of "Yes" response to the question "Would you like to receive training on rational drug use?", despite the 19.22% "Yes" to the "Have you received training on rational drug use?" in our study suggests that there is a need for more education on rational drug use.

The 31.88% rate of using the equivalent, but inexpensive drug may reflect trust in the company or there may be a different reason related to bioavailability. The 33.59% rate of "Checking whether the drug given is the prescribed drug when buying prescription medicines" can be attributed to inadequate training. It is seen that most of the medicines prescribed by physicians are painkillers, common cold medications and antibiotics. The rate of informing physicians about food or drug allergies was as high as 84.69%, but since it is a matter of concern, the remaining 15.31% needs an attention.

Another point is that 8.9% of the participants responded with "I try herbal treatment methods" to the question on what to do in case of an illness. Herbal treatments have become popular in recent years. However, since standards are not clear in this respect, it is necessary for physicians to pay attention to this issue. Herbal treatments can present highly toxic effects.

As in the whole world, the use of wrong and unnecessary drugs in Turkey is a serious problem affecting public health [25]. Non-rational drug use leads to decrease in adherence to treatment, drug interactions, resistance to certain drugs, recurrence or prolongation of the diseases, increased frequency of adverse conditions and increased treatment costs for patients [25]. In the rational drug use, it is a prerequisite to take medication in the time recommended by the physician. Especially during the antibiotic use, this issue is neglected and the drugs are taken less than the dose recommended by the physician, accelerating the development of drug resistance. It can be said that it is important and necessary to increase number of education programs towards rational drug use, and to raise awareness in this regard.

### **Declaration of conflict of interest**

The authors received no financial support for the research and/or authorship of this article. There is no conflict of interest.

### **References**

1. Ulupinar S, Akıcı A. Rational drug use in nursing practice. Turkey clinics pharmacol special topics 2015; 3: 84-93.
2. Ojo MA, Igwilo CI, Emedoh T. Prescribing patterns and perceptions of health care professionals about rational drug use in a specialist hospital clinic. J Public Health Afr 2014; 5: 242.
3. Aydın B, Gelal A. Rational drug use: its dissemination and role of medicine education. Dokuz Eylül University Faculty of Medicine Journal 2012; 26: 1: 57-63
4. Gülhan R. Yaşlılarda akılcı ilaç kullanımı. Okmeydani Tıp Dergisi 2013; 29: 99-105.
5. Tasdemir S. Rational drug use. İnönü University Vocational School of Health Services Journal 2013; 1: 1-5.
6. Yılmaztürk A. The rational use of drugs in the world and Turkey. Kastamonu University, Faculty of Economics and Administrative Sciences Journal 2013; 2: 42-49.
7. Altındış S. A Systematic Review of Rational Drug Use. Journal of biotechnology and strategic health research 2017; 1: 34-38.
8. Lal LS, Rosenau PV. Evaluation of rational use of medications in the United States. J Prim Care Community Health 2010; 1: 62-8.
9. Ekenler Ş, Koçoğlu D. Knowledge and practices of individuals on rational drug use. Hacettepe University Faculty Nursing Journal 2016; 3: 44-55.
10. Bian C, Xu S, Wang H et al. A study on the application of the information-motivation-behavioral skills (imb) model on rational drug use behavior among second-level hospital outpatients in anhui, China. PLoS One 2015; 10: e0135782.
11. Özçelikay G. A pilot study on the rational drug use. Ankara University Faculty Of Pharmacy Journal 2001; 30: 9-18.
12. Yılmaz M, Kırbıyıköğlü Fİ, Ariç Z, Kurşun B. Determination of rational drug use of individuals admitted to a faculty of dentistry hospital. ERÜ Faculty of Health Sciences Journal 2014; 2: 39-47.
13. Barutçu A, Tengilimoğlu D, Naldöken Ü. Evaluation of rational drug use, knowledge and attitudes of citizens: case of Ankara metropolitan districts. Gazi University Journal of the Faculty of Economics and Administrative Sciences 2017; 19:1062-78.
14. Pınar N. Determination of rational drug use patterns of students at Mustafa Kemal University Faculty of Medicine. Mustafa Kemal University Medicine Journal 2017; 8: 34-40.

15. Reddy MR. Advances in rational drug design. *Curr Pharm Des* 2013; 19: 4673.
16. Acar A, Yeğenoğlu S. Pharmacoeconomics and hospital formulas in respect to rational drug use. *Ankara University Faculty Of Pharmacy Journal*. 2005; 34: 207-218.
17. İlhan M, Aydemir Ö, Çakır M, Aycan S. Non-rational drug use behaviors: Case of three districts in Ankara. *Turkish Journal Of Public Health* 2017; 12: 188-200.
18. Kubat H. Physicians' knowledge and attitudes towards the rational drug use and pharmacovigilance. *Cukurova Medical Journal* 2018; 43: 286-294.
19. Mousavi S, Mansouri A, Jahangard-Rafsanjani Z, Sarayani A, Hadjibabaie M, Gholami K. Bibliographic search of publication patterns in rational use of drugs in Iran: a systematic approach. *Acta Med Iran* 2014; 52: 76-81.
20. Kiroğlu O, Berktaş F, Şahan E, Karataş Y. Knowledge and awareness of research assistants about rational drug use. *Cukurova Medical Journal* 2018; 43: 164-171.
21. Gözel M. Rational antibiotic use in adult patients followed-up and treated in outpatient clinic. *Cumhuriyet Medical Journal* 2012; 34: 527-33.
22. Ramírez D. Computational methods applied to rational drug design. *Open Med Chem J* 2016; 10: 7-20.
23. Baş FY, Cankara F, Yeşilot Ş. Evaluation of Prescription Drug Use among Medical School Students. *SDU Journal of Medical Sciences*. 2013; 4: 46-53.
24. Esin MN, Bulduk S, Dural Ç, Şenolan G, Temel E. Drug use behaviors of adult individuals. *Florence Nightingale Nursing Journal* 2007; 15: 139-45.
25. Özel Ç, Büyüktanır BÖ. Obligation of physicians and pharmacists in provision of information regarding the rational drug use. *Journal of Istanbul University Faculty of Law* 2008; 66: 327-44.

■ Orjinal Makale

## Farklı kavite preparasyon yöntemi kullanılarak prepare edilen sınıf V kavitelerinin farklı cam iyonomer simanlarla restore edilerek mikrosızıntısının değerlendirilmesi

### *Evaluation of microleakage of class V cavities prepared by using different type cavite preparation method by restorated with different glass ionomer cements*

H. Sevilay BAHADIR\*<sup>1</sup> , Serdar BAĞLAR<sup>1</sup> , Ali Can BULUT<sup>2</sup> , Gökhan KARADAĞ<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Kırıkkale Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Restoratif Diş Tedavisi ABD, Kırıkkale/TÜRKİYE

<sup>2</sup>Kırıkkale Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Protetik Diş Tedavisi ABD, Kırıkkale/TÜRKİYE

#### Öz

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı; farklı kavite preparasyon tekniği kullanılarak prepare edilen sınıf V kavitelerinin, cam iyonomer materyali ile restorasyonu sonrası okluzal ve gingival bölge de oluşan mikrosızıntı seviyelerini belirlemektir.

**Gereç ve Yöntemler:** Bu çalışmada; ortodontik veya periodontal sebeplerle çekilmiş ve herhangi bir çürük, restorasyon ya da yapısal bir bozulma olmayanlar molar dişler (n:90) kullanılmıştır. Her bir dişin bukkal yüzeyinde standart sınıf V kavite 3 mm genişliğinde, 2 mm yüksekliğinde ve 1,5 mm derinliğinde olacak şekilde açılmıştır. Kavite preparasyon tekniğine (Er:YAG lazer, Er,Cr:YSGG lazer ve konvansiyonel yöntem) göre 3 ana gruba (n:30) ayrılan dişler, kendi aralarında da 3 farklı ticari markalı konvansiyonel cam iyonomer siman ile restore edilerek 3 alt gruba (n:10) ayrılmıştır. Örnekler stereomikroskopta X16 büyütmede ve SEM de incelenmiştir. Veriler Kruskal-Wallis ve Wilcoxon testleri ile istatistiksel olarak 0.05 anlamlılık düzeyinde değerlendirilmiştir.

**Bulgular:** Hem SEM hem de mikroskop ile incelenen tüm gruplarda gingival kenar, okluzal kenara göre daha fazla sızıntı göstermiştir. Kavite preparasyon yöntemleri arasında hem SEM hem de mikroskop incelemelerinde istatistiksel olarak anlamlı fark (p<0.05) bulunmuştur.

**Sonuç:** Kavite preparasyonu ve kullanılan materyale göre mikrosızıntı görülme oranları değişse de en yoğun mikro sızıntı gingival bölgede görülmektedir. Çalışmamızda kullanılan Er:YAG lazer yönteminin konvansiyonel yöntemine alternatif olabileceği öngörülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Mikrosızıntı; Er:YAG lazer; Cam iyonomer siman

Sorumlu Yazar\*: H. Sevilay BAHADIR, Kırıkkale Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Restoratif Diş Tedavisi ABD, Kırıkkale/TÜRKİYE

E-posta: sevilay.bahadir@hotmail.com

ORCID: org/ 0000-0001-8577-4408

Gönderim 09.10.2017 kabul: 30.11.2017

Doi: 10.18663/tjcl.342496

## Abstract

**Aim:** The aim of study to evaluate both occlusal and gingival microleakage levels of class V cavities prepared by using different type cavite preparation method and by restored with different glass ionomer cements.

**Material and Methods:** In this study were used molar teeth (n = 90) which were planned to for extraction due to orthodontic or periodontal and which did not contain any caries, restorations and cracks. Standard class V-cavities were prepared at the buccal surface of each tooth to be 3 mm wide, 2 mm high and 1.5 mm deep. Teeth were divided into 3 main groups (n = 30) according to cavitation preparation method (Er:YAG laser, Er,Cr:YSGG laser and conventional method) and these groups were divided into 3 subgroups (n = 10) according to the restorative material. Samples were examined in stereomicroscopy at X16 magnification and SEM. Datas were analyzed using with statistically evaluated by Kruskal-Wallis and Wilcoxon tests at 5% significiant level.

**Results:** In both SEM and microscopy groups, the gingival margin showed more leakage than the occlusal margin. There was a statistically significant difference (p <0.05) between the cavity preparation methods in both SEM and microscope.

**Conclusion:** Although the rate of microleakage of the cavity preparation and the material used the most dense microleakage is seen in the gingival region. The Er:YAG laser method is predicted to be an alternative to the conventional method.

**Keywords:** Mikroleakage; Er:YAG laser; glass ionomer cement

## Giriş

Mikrosızıntı; kavite duvarı ve restoratif materyal arasındaki boşluktan iyon, bakteri, yiyecek ve moleküllerin klinik olarak saptanamayan geçişi olarak tanımlanır. Bu sızıntı; restore edilmiş dişte hassasiyet, dişlerde renk değişikliği, pulpal enfeksiyon ve bazı materyallerin hızlı bir şekilde bozulmasına neden olabilir [1].

Kavitenin tipi, boyutu, lazer enerjisinin seviyesi, restoratif materyalin tipi, mikrosızıntı değerlendirme metodu, mikrosızıntı ölçümünde kullanılan boya tipi, çalışma tasarımı ve kaviteyi hazırlayan kişi gibi faktörler, mikrosızıntı miktarını etkileyebilir [2].

Restoratif diş hekimliğinde en önemli tedavilerden biri de dişleri restore etmektir. Günümüz diş hekimliğinde estetik beklentilerin yükselmesi nedeni ile geleneksel olarak kullanılan amalgam restorasyonlar yerine kompozit rezin ve cam iyonomer restorasyonlar önem kazanmıştır [3].

Günümüzde kullanılan cam iyonomer simanların temeli: Wilson ve Kent tarafından 1972 yılında bulunan ve asit baz reaksiyonu ile sertleşen cam yapıdaki materyal olmuştur. Asit-baz reaksiyonun gerçekleşebilmesi için toz ve likitin belirli oranlarda karıştırılması gerekmektedir; bu reaksiyon sonucunda iyon salınımı (Ca ve Al) olmaktadır. Polialkelenik asitle çapraz bağ yapan bu iyonlar, metal iyonların çapraz bağlanmasına ve polialkanoat moleküllerinin nötralizasyonu sonucu sertleşme reaksiyonu oluşmaktadır. Bu materyaller diş yapısına kimyasal

olarak bağlanabilen, diş renginde, doku uyumlu, radyopak, fluorür salan ve demineralizasyonu inhibe eden yapıdadırlar [4].

Cam iyonomer simanların bu avantajları nedeni ile uzun yıllardır kullanılmasına rağmen; uzun sertleşme süresi (24 saat), ilk sertleşme sırasında neme hassasiyeti, dehidratasyon, kaba yüzey dokusu, matlık, düşük kırılma direnci ve zayıf aşınma direnci gibi birçok dezavantaja sahiptir. Özellikle materyalin boşluk boyutu ve mikrosızıntı arasında pozitif bir korelasyon olduğunu belirten bir çok araştırmacı bulunmaktadır [5].

Mikrosızıntıyı etkileyebilecek diğer faktörlerden biri de kavite preparasyon yöntemleridir. Adeziv materyallerdeki gelişmeler sonucunda minimal invaziv teknik ortaya çıkmıştır. Atravmatik restoratif tedavi, lazer ve kinetik kavite preparasyon metotları minimal invaziv tekniklerdir [6].

Lazer; hem tıpta hem de kavite preparasyonu ve çürüğü uzaklaştırmak amacı ile diş hekimliği uygulamalarında kullanılmaktadır [7]. Erbium-doped yttrium aluminium garnet (Er:YAG) lazer 2.94 µm'de ve erbium, chromium: yttrium-scandium-gallium-garnet (Er,Cr:YSGG) lazer 2.78 µm'de yüksek su absorpsiyonuna sahiptir ve kavite preparasyonunu hidroksiapatite etki ederek oluşturmaktadır [8]. Bu iki lazerin temel tasarım ve karakteristik özelliği birbirine çok benzemektedir. Lazer sistemleri: minimal vibrasyon, kavite preparasyonu boyunca gürültü oluşturmaması ve lokal anestezi

ihtiyacını azaltması gibi avantajları bulunmaktadır[9]. Aynı zamanda lazer sistemleri smear tabakasını uzaklaştırmasından dolayı cam iyonomer simanların kimyasal yapısına ve pH'ına bağlı olarak sızdırmazlık kapasitesini etkileyebilmektedir [10].

Er:YAG ve Er,Cr:YSGG lazer sistemleri ile ilgili ayrı ayrı araştırmalar yapılmış olup birlikte kullanıldığı araştırma yapılmamıştır. Çalışmamızın amacı; daimi molar dişlerde farklı kavite preparasyon tekniği (Er:YAG lazer, Er,Cr:YSGG lazer ve konvansiyonel yöntem) kullanılarak elde edilen sınıf V kavitelelerin, farklı cam iyonomer simanla (3M Ketac Molar, Cavex ve Riva Self cure) restorasyonu sonucu okluzal ve gingival bölgede mikrosızıntı seviyelerini belirlemektir. H0 hipotezimiz; farklı preparasyon tekniklerinin mikrosızıntı üzerinde herhangi bir fark yaratmayacağı; H1 hipotezimiz ise farklı ticari markalı cam iyonomer simanların mikrosızıntı miktarlarının farklı olmayacağı şeklindedir.

## Gereç ve Yöntemler

Bu çalışma Kırıkkale Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Restoratif Diş Tedavisi bölümünde yapılması planlanmıştır. Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulunda 21.02.2017 tarihli 05/06 karar no'lu etik kurul onayı alınmıştır. Çalışmaya dahil olmayı kabul eden hastalara bilgilendirilmiş onam formu imzalatılmıştır. Bu çalışmada; ortodontik veya periodantal sebeplerle çekilmesi planlanan, dişlerde herhangi bir çürük, restorasyon, rezorbsiyon ve çatlak olmayan daimi molar (n=90) dişler kullanılmıştır. Bu kriterlere sahip olan 18 yaş ve üzeri hastaların dişleri çalışmaya dahil edilmiştir. Seçilen dişler üzerindeki yumuşak doku artıkları el aletleriyle temizlenmiş ve dişlere pomza ile polisaj yapılmıştır. Bu işlemlerden sonra dişler %0,1'lik timol çözeltisi içerisinde muhafaza edilmiştir.

Standart sınıf V kaviteleler her dişin bukkal yüzeyine şablon kullanılarak açılmıştır. Bu şablon; 3 mm genişliğinde, 2 mm yüksekliğinde ve 1,5 mm derinliğinde olacak şekildedir ve bu ölçümler periodontal sond yardımıyla yapılmıştır. Kavitelelerin okluzal marjini mine üzerinde, gingival marjini ise mine-sement birleşiminin yaklaşık 1 mm aşağısında olacak şekilde ayarlanmıştır. Başlangıçta dişler kavite preparasyon yöntemine göre 3 ana gruba (n=30) ayrılmış ve bu grupların da her biri kendi içerisinde 3 alt gruba ayrılarak dişler restore edilmiştir (Tablo 1).

**Tablo 1:** Bu çalışmada kullanılan restoratif materyalin markası, tipi, üretici ve kimyasal içeriğini göstermektedir.

MARKA	ÜRETİCİ	TİPİ	İÇERİĞİ
3M KETAC MOLAR	3M ESPE, St. Paul, MN, USA	Konvansiyonel Cam İyonomer Siman	Toz: Al-Ca-La fluorosilikat cam, %5 L/119169, (3M ESPE, St Paul, MN, USA) kopolimer asit ( akrilik ve maleik asit) Likit: Polialkenoik asit, tartarik asit, su
RİVA SELF CURE	SDI, Bayswater, VIC, AU	Konvansiyonel Cam İyonomer Siman	Toz: Flouroalimüna silikat Likit: Poliakrilik asit, tartarik asit
CAVEX	Cavex Holland B.V. of Haarlem, The Netherlands	Konvansiyonel ve yapıştırma Cam İyonomer Siman	Toz: Flouroalimüna silikat Likit: Poliakrilik asit, paraben

**I. GRUP:** Dişlerin üçte birine (n=30) elmas frez (ISO 001/018 BR-31 Dia-Burs, Japan) kullanılarak yüksek hızlı döner el aletiyle su soğutması altında hazırlanan konvansiyonel kavite preparasyonu yöntemiyle sınıf 5 kaviteleler açılmıştır. Kavitelelerin boyutu ve konumu hazırlanan şablon ile belirlenmiştir. Her 10 kavitede bir frezler değiştirilmiştir. Hazırlanan dişler restoratif işlemler yapılanaya kadar 24 saat süreyle 6 °C'de distile suda saklanmıştır.

Kaviteleler hazırlandıktan sonra 1. grup üç alt gruba ayrılmıştır. Bunlar; IA(n=10), IB(n=10) ve IC(n=10) şeklindedir. Gruplar ayrıldıktan sonra her bir grup farklı konvansiyonel cam iyonomer simanla restore edilmiştir.

**IA (n=10):** Konvansiyonel yöntemle prepare edilen kaviteleler 3M KETAC MOLAR (3M ESPE, USA) cam iyonomer siman uygulanmadan önce üretici firmanın önerisi doğrultusunda Ketac™ Conditioner 10 saniye kaviteye uygulanmıştır. Daha sonra 2-3 saniye kavite suyla yıkanıp kurutulmuştur. Cam iyonomer simanın bulunduğu kapsül; yüksek frekanslı döner bir karıştırıcıya yerleştirilip 10 saniye karıştırıldıktan sonra kaviteye uygulanmıştır.

**IB (n=10):** Konvansiyonel yöntemle prepare edilen kaviteleler CAVEX (Cavex, Holland, The Netherlands) cam iyonomer siman üretici firmanın önerisi doğrultusunda bir ölçü toz için bir damla likit olacak şekilde uygun bir karıştırma kağıdında 30 saniye karıştırılıp kaviteye uygulanmıştır.



**IC (n=10):** Konvansiyonel yöntemle prepare edilen kaviteler RİVA SELFCURE (SDI, Bayswater, AU) cam iyonomer siman üretici firmanın önerisi doğrultusunda Riva Conditioner 10 sn kaviteye uygulanmıştır. Daha sonra kavite yıkanıp kurutulmuştur. Cam iyonomer simanın bulunduğu kapsül; yüksek frekanslı döner bir karıştırıcıya yerleştirilip 10 sn karıştırıldıktan sonra kaviteye uygulanmıştır.

**II. GRUP:** Dişlerin üçte birine (n=30) 2,94 nm dalga boyuna sahip olan Er:YAG lazerle (Fotona Medical Lasers, Slovenia) minede 6 W ( 300 mJ ve 20 Hz) dentinde 3W ( 150 Mj ve 20 Hz) güçte, non-kontakt, 100 µs'lik bir darbe süresinde sürekli su spreyinin altında üretici firmanın önerisine göre kavite preparasyonu yapılmıştır. Hazırlanan kaviteler I. grup ile aynı olacak şekilde hazırlanmıştır ve aynı koşullarda saklanmıştır.

Kaviteler hazırlandıktan sonra I. gruptaki gibi 3 alt gruba ayrılmıştır. Bunlar; IIA (n=10), IIB (n=10), IIC (n=10) şeklindedir. Gruplar ayrıldıktan sonra her bir grup farklı konvansiyonel cam iyonomer simanla restore edilmiştir.

**IIA (n=10):** Er:YAG lazerle (Fotona, Medical Lasers, Slovenia) prepare edilen kaviteler 3M KETAC MOLAR (3M, ESPE, USA) cam iyonomer siman IA grubundaki gibi üretici firmanın önerisi doğrultusunda restore edilmiştir.

**IIB (n=10):** Er:YAG lazerle (Fotona, Medical Lasers, Slovenia) prepare edilen kaviteler CAVEX (Cavex Holland, The Netherlands) cam iyonomer siman IB grubundaki gibi üretici firmanın önerisi doğrultusunda restore edilmiştir.

**IIC (n=10):** Er:YAG lazerle (Fotona, Medical Lasers, Slovenia) prepare edilen kaviteler RİVA SELFCURE (SDI, Bayswater, AU) cam iyonomer siman IC grubundaki gibi üretici firmanın önerisi doğrultusunda restore edilmiştir.

**III. GRUP:** Dişlerin üçte birine (n=30) 2,78 nm dalga boyuna sahip olan Er,Cr:YSGG lazerle (Waterlase, MD, ABD) mine de 6 W (25 Hz) dentinde 5 W (25 Hz) güçte, %30 su ve %70 hava soğutması altında üretici firmanın önerisine göre kavite preparasyonu yapılmıştır. Hazırlanan kaviteler I. ve II. gruplar ile aynı olacak şekilde hazırlanmış ve aynı koşullarda saklanmıştır.

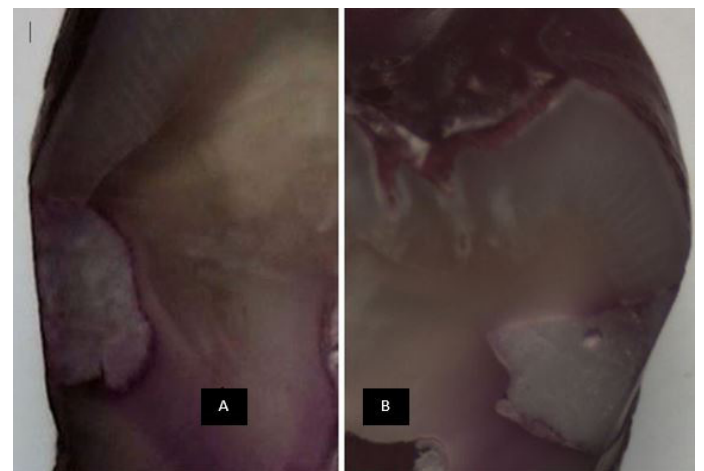
Kaviteler hazırlandıktan sonra I. ve II. gruptaki gibi 3 alt gruba ayrılmıştır. Bunlar; IIIA (n=10), IIIB (n=10), IIIC (n=10) şeklindedir. Gruplar ayrıldıktan sonra her bir grup farklı konvansiyonel cam iyonomer simanla restore edilmiştir.

**IIIA (n=10) :** Er,Cr:YSGG lazer yöntemiyle (Waterlase, MD, ABD) prepare edilen kaviteler 3M KETAC MOLAR (3M, ESPE, USA) cam iyonomer siman IA grubundaki gibi üretici firmanın önerisi doğrultusunda restore edilmiştir.

**IIIB (n=10):** Er,Cr:YSGG lazer yöntemiyle (Waterlase, MD, ABD) prepare edilen kaviteler CAVEX (Cavex, Holland, The Netherlands) cam iyonomer siman IB grubundaki gibi üretici firmanın önerisi doğrultusunda restore edilmiştir.

**IIIC (n=10):** Er,Cr:YSGG lazer yöntemiyle (Waterlase, MD, ABD) prepare edilen kaviteler RİVA SELFCURE (SDI, Bayswater, AU) cam iyonomer siman IC grubundaki gibi üretici firmanın önerisi doğrultusunda restore edilmiştir.

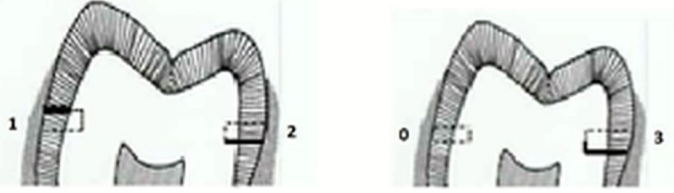
Bütün dişler restore edildikten sonra 37 °C'de deiyonize suda 24 saat bekletilmiştir. Sonra 5 ± 2 °C ve 55 ± 2 °C arası ısı banyolarında her birinde bekleme süreleri 30 sn transfer süreleri 3 sn olacak şekilde 1000 kez termal siklus işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra tüm örneklerin kök uçları akrilik rezinle kapatılmış ve 2 kat tırnak cilası ile restorasyon marjinlerinin 1 mm dışında kalacak şekilde kaplanmıştır. Tüm örneklerin yarısı gümüş nitrat solüsyonuna ile diğer yarısı da %0,5'lik bazik fuksin solüsyonuna daldırılarak 37 °C'de 24 saat boyunca bekletilmiştir. Ardından dişler bukkolingual yönde restoratif materyalin merkezinden olacak şekilde yavaş hızda elmas separe cihazıyla (Isomed 1000 Precision saw, Buehler Ltd, Lake Bluff, IL), su soğutması altında kesitlere ayrılmıştır. Gümüş nitrate daldırılan örnekler SEM (scanning electron mikroskope) mikroskopu ile değerlendirip skorlanmıştır. Bazik fuksine daldırılan örnekler ise stereomikroskopu ile değerlendirip skorlanmıştır (Resim 1). Bu skorlama Tablo 2'ye göre yapılmış olup; Şekil 1 ve 2'de şematize edilmiştir.



**Resim 1A;** Konvansiyonel kavite preparasyonu yöntemi kullanılarak açılmış ve 3M KETAC MOLAR cam iyonomer siman ile restore edilmiş restorasyonun stereomikroskopunda incelenmesi. Okluzal kenarda 0 skoru; gingival kenarda 3 skoru almıştır **Resim 1B;** Er:YAG lazer yöntemiyle (Fotona Medical Lasers, Slovenia) açılmış ve CAVEX (Cavex Holland The Netherlands) MOLAR cam iyonomer siman ile restore edilmiş restorasyonun stereomikroskopunda incelenmesi. Okluzal kenarda 2 skoru; gingival kenarda 3 skoru almıştır.

**Tablo2:** Diş ile restorasyon ara yüzündeki mikrosızıntı skorları için değerler aşağıda gösterilmiştir.

SKOR	KRİTER
0	Boya sızıntısı yok
1	Boya sızıntısı restorasyon ile sadece mine arasında var
2	Boya sızıntısı restorasyon ile hem mine hem de dentin arasında var
3	Boya sızıntısı restorasyon ile pulpa duvarı arasında var



**Şekil A ve B:** Mikrosızıntı değerlendirilmesinin şematize edilmesi. 0 rakamı ile belirtilen şekil: boya sızıntı yoktur. 1 rakamı ile belirtilen şekil: boya sızıntı restorasyon ile mine arasında vardır. 2 rakamı ile belirtilen şekil: boya sızıntısı restorasyon ile hem dentin de hem de mine arasında vardır. 3 ile belirtilen şekil rakamı: boya sızıntı restorasyon ile pulpa duvarı arasında vardır.

Farklı skorlanan örnekleri iki araştırmacı bir araya gelerek tekrar değerlendirilmiştir ve her örneğe ait en yüksek sızıntı skoru kaydedilmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar Kruskal-Wallis ve Wilcoxon testleri ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir ( $p < 0.05$ ).

## Bulgular

Mikrosızıntı için verilen değerler Tablo 3'de gösterilmiştir. SEM ve stereomikroskopuyla incelenen gruplar arasında gingival ve okluzal kenarlar arasında mikrosızıntı değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (Tablo 4 ve 5). Her iki incelenen yöntemde de gingival kenar okluzal kenara göre daha fazla sızıntı göstermiştir.

**Tablo 3:**

GRUP	KENAR	SKOR:0	SKOR:1	SKOR:2	SKOR:3
IA	OKLÜZAL	2(%20)	0(%0)	3(%30)	5(%50)
IA	GINGİVAL	0(%0)	0(%0)	2(%20)	8(%80)
IB	OKLÜZAL	7(%70)	0(%0)	0(%0)	3(%30)
IB	GINGİVAL	0(%0)	0(%0)	0(%0)	10(%100)
IC	OKLÜZAL	2(%20)	0(%0)	3(%30)	5(%50)
IC	GINGİVAL	0(%0)	0(%0)	0(%0)	10(%100)
IIA	OKLÜZAL	4(%40)	1(%10)	0(%0)	5(%50)
IIA	GINGİVAL	0(%0)	0(%0)	0(%0)	10(%100)
IIB	OKLÜZAL	2(%20)	1(%10)	0(%0)	7(%70)
IIB	GINGİVAL	0(%0)	0(%0)	0(%0)	10(%100)
IIC	OKLÜZAL	4(%40)	0(%0)	3(%30)	3(%30)
IIC	GINGİVAL	0(%0)	0(%0)	1(%10)	9(%90)
IIIA	OKLÜZAL	1(%10)	1(%10)	0(%0)	8(%80)
IIIA	GINGİVAL	0(%0)	0(%0)	0(%0)	10(%100)
IIIB	OKLÜZAL	2(%20)	0(%0)	0(%0)	8(%80)
IIIB	GINGİVAL	0(%0)	0(%0)	0(%0)	10(%100)
IIIC	OKLÜZAL	2(%20)	0(%0)	0(%0)	8(%80)
IIIC	GINGİVAL	0(%0)	0(%0)	0(%0)	10(%100)

**Tablo 4:** Okluzal ve gingival kenardaki steromikroskopu ile incelenen örneklerin mikrosızıntı skorlarının karşılaştırıldığı Kruskal Walls Testi tablosu

DEĞER	MİKROSIZINTI	N	Mean Rank	Sum of Ranks	Wilcoxon W	P değeri
	Okluzal	45	72,52	6526,50	6526,500	,000
	Gingiva	45	108,48	9763,50		
	Total	90				

**Tablo 5:** Okluzal ve gingival kenardaki SEM ile incelenen örneklerin mikrosızıntı skorlarının karşılaştırıldığı Kruskal Walls Testi tablosu

DEĞER	MİKROSIZINTI	N	Mean Rank	Sum of Ranks	Wilcoxon W	P değeri
	Okluzal	45	71,46	6489,50	6489,500	,000
	Gingiva	45	106,45	9763,50		
	Total	90				

Kavite preparasyon yöntemleri arasında hem SEM hem de mikroskopta istatistiksel olarak anlamlı fark ( $p < 0.05$ ) bulunmuş olup en az mikro sızıntı gösteren yöntem yüksek hızlı döner el aleti ile açılan kavitede görülmüştür. Kavite preparasyonu yöntemlerinden en yüksek mikrosızıntı değeri Er,Cr:YSGG lazer ile prepare edilen kavitelere görülmüştür (Tablo 6 ve 7).

**Tablo 6:** Yöntemler arasında steromikroskopu ile incelenen örneklerin mikrosızıntı skorlarının karşılaştırılması

DEĞER	KAVİTE PREPARASYON YÖNTEMİ	N	Mean Rank	P değeri
	Fotona	15	86,95	,020
	Waterlase	15	101,49	
	Aerotör	15	83,06	
	Total	45		

**Tablo 7:** Yöntemler arasında SEM ile incelenen örneklerin mikrosızıntı skorlarının karşılaştırılması

DEĞER	KAVİTE PREPARASYON YÖNTEMİ	N	Mean Rank	P değeri
	Fotona	15	89,76	,025
	Waterlase	15	118,50	
	Aerotör	15	81,69	
	Total	45		

Kullanılan materyaller arasında hem SEM'de hem de mikroskopta istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Tablo 8 ve 9).

**Tablo 8:** Materyaller arasında steromikroskopu ile incelenen örneklerin mikrosızıntı skorlarının karşılaştırılması

DEĞER	MATERYAL	N	Mean Rank	P değeri
	Ketac molar	15	90,57	,935
	Riva	15	89,19	
	Cavex	15	91,74	
	Total	45		

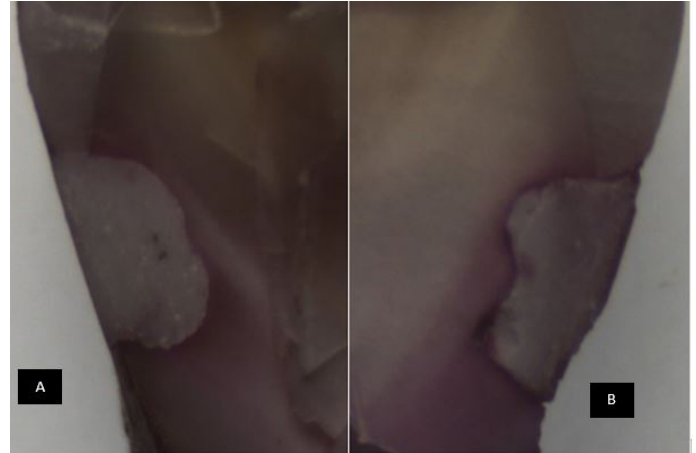
**Tablo 9:** Materyaller arasında SEM ile incelenen örneklerin mikrosızıntı skorlarının karşılaştırılması

	MATERYAL	N	Mean Rank	P değeri
DEĞER	Ketac molar	15	92,35	,926
	Riva	15	89,23	
	Cavex	15	90,74	
	Total	45		

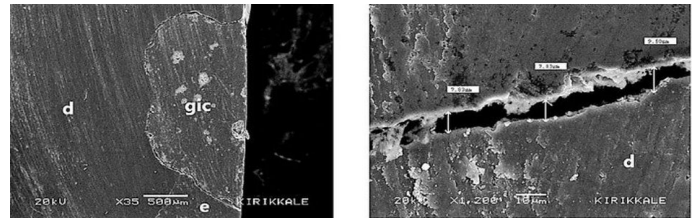
## Tartışma

Çalışmamızda özellikle Sınıf V kavitelere sıklıkla karşılaştığımız mikrosızıntı problemlerinde, kavite preparasyon yöntemleri (Er:YAG lazer, Er,Cr:YSGG lazer ve konvansiyonel yöntem) ve kullanılan geçici restoratif materyallerinin (cam iyonomer siman) okluzal ve gingival bölgelerdeki mikrosızıntıya etkisi araştırılmıştır. Çalışmamızın sonuçlarına göre; H1 hipotezimiz kabul edilmiş olup H0 hipotezimiz reddedilmiştir.

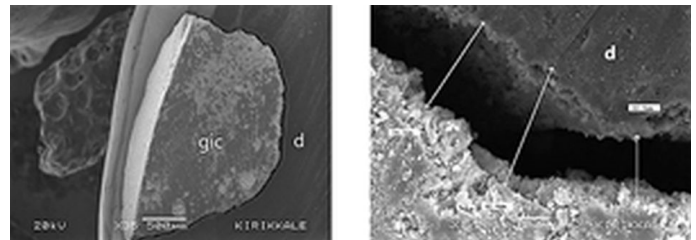
Mikrosızıntı, restoratif materyaller için en yaygın başarısızlık nedeni olup klinik çalışmalarda da en büyük problemlerden biri olmaktadır. Mikrosızıntı olayındaki diş-materyal arasındaki boşluk oluşumu (gap formasyonu); boyut değişiklikleri, sıcaklık değişiklikleri ve mekanik stres ya da restoratif materyalin adaptasyon eksikliği nedeniyle oluşabilmektedir [11]. Restorasyon ile materyaller arasındaki mikrosızıntıyı değerlendiren birçok klinik ve laboratuvar çalışmaları yapılmıştır [12]. Laboratuvar çalışmaları; daha kısa sürede yapıp, daha kolay sonuç alınması nedeniyle mikrosızıntıyla ilgili laboratuvar çalışması yapmaya karar verilmiştir. Mikrosızıntıyı değerlendirmek için birçok yöntem mevcuttur. Bunlar; boyalar, radyoaktif ve kimyasal ajanlar, taramalı elektron mikroskopu, nötron aktivasyon analizi, bakteri, hava basıncı ve sıvı infiltrasyonudur. Bu yöntemler arasında basit, ucuz, hızlı, ekipman kullanılmasını gerektirmeyen boya penetrasyonu ölçümü en çok kullanılan tekniktir [13]. Bu nedenle bu çalışmamızda da örneklerin yarısı bazik fuksin boyama yöntemiyle ışık mikroskopunda (Resim 2), diğer yarısını da mikrosızıntının sebeplerinden biri olan boşluk oluşumunun (gap formasyonu) daha iyi görülebilmesi için gümüş nitrat boyama yöntemiyle taramalı elektron mikroskopunda incelenmiştir (Resim 3-5).



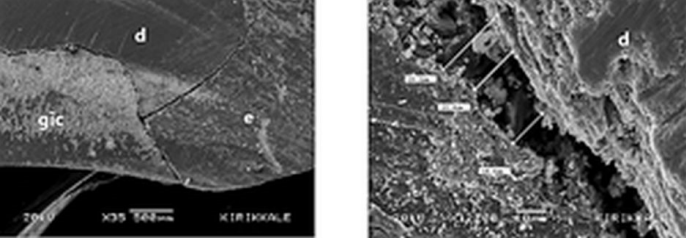
**RESİM 2: Resim A;** Konvansiyonel kavite preparasyon yöntemi kullanılarak açılmış ve CAVEX (Cavex Holland, The Netherlands) MOLAR cam iyonomer siman ile restore edilmiş restorasyonun stereomikroskopunda incelenmesi. Okluzal kenarda 0 skoru; gingival kenarda 3 skoru almıştır. **Resim B;** Er, Cr: YSGG lazer yöntemiyle (Waterlase MD, ABD) açılmış ve RİVA SELFCURE (SDI, Bayswater, AU) cam iyonomer siman ile restore edilmiş restorasyonun stereomikroskopunda incelenmesi. Okluzal kenarda 3 skoru; gingival kenarda 3 skoru almıştır.



**RESİM 3:** Er: YAG lazer yöntemiyle (Fotona Medical Lasers, Slovenia) açılmış ve RİVA SELFCURE (SDI ,Bayswater, VIC, AU) cam iyonomer siman ile restore edilmiş restorasyonun SEM de incelenmesi. Okluzal kenarda 3 skoru; gingival kenarda 3 skoru almış ve gingival de görülen boşlukların boyutu. (d= dentin, e= mine, gic= cam iyonomer siman)



**RESİM 4:** Er:YAG lazer yöntemiyle (Fotona Medical Lasers, Slovenia) açılmış ve RİVA SELFCURE (SDI ,Bayswater, VIC, AU) cam iyonomer siman ile restore edilmiş restorasyonun SEM de incelenmesi. Okluzal kenarda 3 skoru; gingival kenarda 3 skoru almış ve gingival de görülen boşlukların boyutu. (d= dentin, gic= cam iyonomer siman)



**RESİM 5:** Konvansiyonel kavite preparasyon yöntemi kullanılarak açılmış ve CAVEX (Cavex Holland B.V. of Haarlem, The Netherlands) MOLAR cam iyonomer siman ile restore edilmiş restorasyonun SEM de incelenmesi. Okluzal kenarda 3 skoru almış ve Okluzal de görülen boşlukların boyutu. (d= dentin, e= mine, gic= cam iyonomer siman)

Termalsiklus; restoratif literatürde, materyallerin değerlendirildiği ve bu materyallerin sıcak ve soğuk sıcaklıklara maruz bırakılarak in vivo yaşlandırmayı taklit eden ve diş ile restoratif materyal arasındaki termal genişlemenin ilişki katsayısını gösteren standart bir protokoldür [11]. Bu çalışmamızda mikrosızıntı değerlendirilmesi termalsiklus uygulanarak incelenmiştir.

Birçok araştırmacı [5,12,14] cam iyonomer simanların mikrosızıntısı ile ilgili çalışmalar yapmışlardır. Varma ve arkadaşları [5], Singla ve arkadaşları [15], konvansiyonel cam iyonomer siman, rezin modifiye cam iyonomer siman gibi restoratif materyallerin mikrosızıntısını araştırdıkları çalışmada; en fazla sızıntıyı konvansiyonel cam iyonomer siman göstermiş ve gingival kenardaki sızıntı değerlerinin okluzal kenardan daha fazla olduğu görülmüştür. Pavuluri ve arkadaşlarının [14] yaptıkları çalışmada ise konvansiyonel ve rezin modifiye cam iyonomer simanların mikrosızıntı değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Çalışmamız sonucunda, kullandığımız farklı ticari markalı konvansiyonel cam iyonomer simanların mikrosızıntı değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır; ( $p>0.935$ ) bununla birlikte, kullanılan materyallerin tümünde gingival bölgedeki sızıntı değerleri okluzal bölgedekine göre istatistiksel olarak fazladır ( $p<0.000$ ). Çalışmamızda cam iyonomer simanların mikrosızıntı sonuçları diğer çalışmalarla benzer bulunmuştur.

Er:YAG ve Er,Cr:YSGG lazerler diş hekimliğinde 1992 yılından itibaren mine ve dentinin yüzey özelliklerini değiştirmek ve kavite preparasyonu yapmak için kullanılmışlardır [16]. Er:YAG lazerin diş yüzeyi üzerinde meydana getirdiği değişiklikler; konvansiyonel tekniğe göre farklıdır. Er:YAG lazerle hazırlanmış

yüzey; pürüzlü, temiz ve debristen yoksundur ayrıca dentin tübüllerinin, lazer uygulaması sonrasında açıldığı bildirilmiştir. Bu sayede de pürüzlülük ve mikro tutunma paterni artmıştır [17]. Bu özellik dentinde restoratif materyalin tutuculuğunu arttırmıştır. Lazerlerin bu özelliği cam iyonomerler gibi diş dokularına daha zayıf bağlanan restoratif materyaller için daha da önem kazanmaktadır [10]. Kullanılan lazerlerin bu özelliğinden dolayı; bu çalışmada cam iyonomer simanın mikrosızıntısının değerlendirilmesinde kavite preparasyon tipinin öneminin olup olmadığını araştırılmıştır. Birçok araştırmacı [18-20] lazerin farklı restoratif materyaller üzerinde mikrosızıntıya etkisini araştırmışlardır.

Er:YAG lazer ve konvansiyonel kavite preparasyonu ile açılan kaviteyi farklı materyallerle restore ederek mikrosızıntılarını karşılaştıran bazı çalışmalar, gingival bölgede konvansiyonel kavite preparasyonunu Er:YAG lazerden daha başarılı bulmuşlardır [21,22]. Er,Cr:YSGG lazer ve konvansiyonel kavite preparasyonu ile açılan kaviteyi mikrosızıntılarını karşılaştıran bazı çalışmalarda, konvansiyonel kavite preparasyonunu Er,Cr:YSGG lazerden daha başarılı bulmuşlardır [20]. Bazı çalışmalar ise Er:YAG lazer ve konvansiyonel kavite preparasyon tekniği ile açılan kaviteyi mikrosızıntılarının istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermediğini rapor etmişlerdir [19,23].

Çalışmamızda Er:YAG (Fotona, Medical Lasers, Slovenia) ve Er,Cr:YSGG (Waterlase, MD, Biolase, Kaliforniya, ABD) lazer ve konvansiyonel kavite preparasyon yöntemleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ( $p<0.020$ ). En başarılı metot konvansiyonel yöntem ile açılan kavite preparasyonu iken en başarısız yöntem ise Er,Cr:YSGG lazer olarak bulunmuştur. Gingival kenarda mikrosızıntı okluzal kenara göre daha fazla bulunmuştur. Çalışmamız bu konuda yapılan çoğu çalışmayla [21-23] benzer sonuçlar vermesine rağmen; bazı çalışmalara göre de zıt sonuçlar vermiştir [10,18]. Bunun sebebinin de araştırmacıların çalışmalarında kullandığı restoratif materyallerin yapılarının farklı olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Aynı zamanda bizim çalışmamızda lazer, konvansiyonel metoda göre daha düşük başarı göstermiştir. Bunun nedenini; lazerin kollajen bakımından zengin intertübüler dentinde organik madde kaybına ve kollajen liflerinin erimesine neden olmasına, bunun sonucu olarak da dentin tübüllerinin tıkanmasına [21]

bağlamaktayız. Dentindeki bu morfolojik özelliklerin hepsinin mikrosızıntı miktarını etkilediğini düşünmekteyiz. Aynı zamanda lazerin fototermal etkisiyle oluşan dehidratasyonun cam iyonomer simanın sertleşme reaksiyonunu da olumsuz etkilediğini düşünmekteyiz.

Günümüzde mikrosızıntı hala restoratif işlemler için büyük bir sorun oluşturmaktadır. Mikrosızıntıyı engellemek için yeni materyaller ve yeni kavite preparasyon teknikleri geliştirilmektedir. Cam iyonomer simanın mikrosızıntısına hem Er:YAG lazerin hem de Er,Cr:YSGG lazerin etkisini aynı çalışmada inceleyen araştırma yapılmamıştır. Lazerler hakkında daha geniş bilgiye sahip olmamız için daha çok in-vitro ve in-vivo çalışmalara ihtiyacımız vardır ve bu tür çalışmalar yenilikçi cihazların avantajlarını kullanmakta fayda sağlayacaktır.

## Sonuç

Bu çalışmanın sonuçlarına göre; farklı ticari markalı cam iyonomer simanlar arasında herhangi bir fark bulunmamıştır. Konvansiyonel yöntem en az sızıntı gösterirken, en yüksek sızıntı Er,Cr:YSGG lazer sisteminde bulunmuştur. Kavite preparasyonu ve kullanılan materyalin şekline göre mikrosızıntı görülme oranları değişse de en yoğun mikrosızıntı gingival bölgede görülmektedir. Kavite preparasyonu şeklinde oluşan anatomik form değişiklikleri ve mine ile dentin yapısında oluşan mikron düzeyinde farklılıklar ve mikrosızıntı miktarını etkilemektedir. Çalışmamızda kullanılan Er: YAG lazer yönteminin konvansiyonel yöntemle alternatif olabileceği öngörülmektedir.

## Çıkar çatışması / finansal destek beyanı

Bu yazıdaki hiçbir yazarın herhangi bir çıkar çatışması yoktur. Yazının herhangi bir finansal desteği yoktur.

## Yazar katkı beyanı

Her yazarın katkısını belirten bir yazıda sorumluluk beyanı eklemelidir. Ayrıntı seviyesi değişir; bazı disiplinler, ayrıntılı çalışmalarda ayrıntılı olarak ifade edilen farklı çabalardan oluşan el yazmaları üretirken, diğer alanlar her aşamada grup çabası gösterir. 2. Yazar olan Serdar BAĞLAR sorumlu yazara her aşama da katkı sağlamıştır.

## Kaynaklar

1. Morabito A, Defabianis P. The marginal seal of various restorative materials in primary molars. *J Clin Pediatr Dent* 1996 ; 22: 51-54.
2. Bahrololoomi Z, Razavi F, Soleymani AA. Comparison of microleakage from resin-modified glass ionomer restorations in cavities prepared by Er: YAG (erbium-doped yttrium aluminum garnet) laser and conventional method in primary teeth. *J Lasers Med Sci* 2014; 5: 183-87.
3. Dunne S, Gainsford I, Wilson N. Current materials and techniques for direct restorations in posterior teeth: Part 1: silver amalgam. *Int Dent J* 1997; 47: 123-36.
4. Nicholson JW. Chemistry of glass-ionomer cements: a review. *Biomaterials* 1998; 19: 485-94.
5. Rekha CV, Balagopal Varma J. Comparative evaluation of tensile bond strength and microleakage of conventional glass ionomer cement, resin modified glass ionomer cement and compomer: An in vitro study. *Contemp Clin Dent* 2012; 3: 282-87.
6. Horowitz AM. Introduction to the symposium on minimal intervention techniques for caries. *J Public Health Dent* 1996; 56: 133-34.
7. Yip H, Samaranayake L. Caries removal techniques and instrumentation: a review. *Clin Oral Investig* 1998; 2: 148-54.
8. Hibst R, Keller U. Experimental studies of the application of the Er: YAG laser on dental hard substances: I. Measurement of the ablation rate. *Lasers Surg Med* 1989; 9: 338-44.
9. Keller U, Hibst R, Geurtsen W et al. Erbium: YAG laser application in caries therapy. Evaluation of patient perception and acceptance. *J Dent* 1998; 26: 649-56.
10. Peker S, Giray FE, Durmus B, Bekiroglu N, Kargül B, Özcan M. Microleakage in class V cavities prepared using conventional method versus Er: YAG laser restored with glass ionomer cement or resin composite. *J Adhes Sci Technol* 2017; 31: 509-19.
11. Shruthi A, Nagaveni N, Poornima P, Selvamani M, Madhushankari G, Reddy VS. Comparative evaluation of microleakage of conventional and modifications of glass ionomer cement in primary teeth: An in vitro study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 2015; 33: 279-84.






1. AbdElHalim S, Zaki D. Comparative evaluation of microleakage among three different glass ionomer types. *Oper Dent* 2011; 36: 36-42.
2. Alani AH, Toh CG. Detection of microleakage around dental restorations: a review. *Oper Dent* 1997; 22: 173-85.
3. Pavuluri C, Nuvvula S, Kamatham RL, Nirmala S. Comparative Evaluation of Microleakage in Conventional and RMGIC Restorations following Conventional and Chemomechanical Caries Removal: An in vitro Study. *Int J Clin Pediatr Dent* 2014; 7: 172-175.
4. Singla T, Pandit I, Srivastava N, Gugnani N, Gupta M. An evaluation of microleakage of various glass ionomer based restorative materials in deciduous and permanent teeth: An in vitro study. *Saudi Dent J* 2012; 24: 35-42.
5. Bader C, Krejci I. Indications and limitations of Er: YAG laser applications in dentistry. *Am J Dent* 2006; 19: 178-86.
6. De Moor RJG, Ilse Maria Delmé K. Laser-assisted cavity preparation and adhesion to erbium-lased tooth structure: part 2. present-day adhesion to erbium-lased tooth structure in permanent teeth. *J Adhes Dent* 2010; 12: 91-102.
7. Shahabi S, Ebrahimpour L, Walsh L. Microleakage of composite resin restorations in cervical cavities prepared by Er, Cr: YSGG laser radiation. *Aust Dent J* 2008; 53: 172-75.
8. Ghandehari M, Mighani G, Shahabi S, Chiniforush N, Shirmohammadi Z. Comparison of microleakage of glass ionomer restoration in primary teeth prepared by Er: YAG laser and the conventional method. *J Dent (Tehran, Iran)* 2012; 9: 215-20.
9. Gutknecht N, Apel C, Schäfer C, Lampert F. Microleakage of composite fillings in Er, Cr: YSGG laser-prepared class II cavities. *Lasers Surg Med* 2001; 28: 371-74.
10. Baghalian A, Nakhjavani YB, Hooshmand T, Motahhary P, Bahramian H. Microleakage of Er: YAG laser and dental bur prepared cavities in primary teeth restored with different adhesive restorative materials. *Lasers Med Sci* 2013; 28: 1453-60.
11. Corona S, Borsatto M, Pecora J et al. Assessing microleakage of different class V restorations after Er: YAG laser and bur preparation. *J Oral Rehabil* 2003; 30: 1008-14.
12. Quo BC, Drummond JL, Koerber A, Fadavi S, Punwani I. Glass ionomer microleakage from preparations by an Er/YAG laser or a high-speed handpiece. *J Dent* 2002; 30: 141-6.

To cite this article: Aykota MR, Yılmaz S, Sungurtekin S. Kolorektal kanserlerin senkron karaciğer metastazları:Kombine cerrahi prosedür deneyimimiz. Turk J Clin Lab 2019; 10: 310-313.

## ■ Orjinal Makale

# Kolorektal kanserlerin senkron karaciğer metastazları: Kombine cerrahi prosedür deneyimimiz

## *Synchronous liver metastases of colorectal cancers: Our experience of combined surgical procedure*

Muhammed Raşid AYKOTA\* , Sevda YILMAZ , Uğur SUNGURTEKİN 

Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Denizli/TÜRKİYE

### Öz

**Amaç:** Kolorektal kanserlerin (KRK) en sık metastaz yaptığı organ karaciğerdir ve tanı anında hastaların yaklaşık %25'inde senkron karaciğer metastazı bulunur. Karaciğer metastazı olan KRK hastalarında cerrahi yaklaşım hala tartışma konusudur. Her hasta için tedavi stratejisi, hastanın performans durumuna, komorbiditelerine ve tümör aşamasına bağlı olarak kişiselleştirilmelidir. Bu çalışmanın amacı kliniğimizde senkron karaciğer metastazlı KRK hastalarına yönelik tedavi yaklaşımımızı ortaya koymak ve literatürle karşılaştırmaktır.

**Gereç ve Yöntemler:** Ocak 2016 ile Aralık 2018 yılları arasında senkron karaciğer metastazlı KRK tanılı, kombine cerrahi prosedür olarak adlandırılan eş seanslı kolorektal kanser ameliyatı ve hepatik rezeksiyon yapıldığı sekiz hasta çalışmaya dahil edildi.

**Bulgular:** İki hastaya sağ hepatektomi yapılırken, altı hastaya metastezektomi yapıldı. TNM evresine göre bir hastada (%12) T1/2, yedi hastada (%88) T3/4 tümör saptandı. Hastaların dördünde (%50) lenf nodu metastazı saptandı. Bir hasta post operatif 3. günde MODS nedeniyle kaybedildi.

**Sonuç:** Bizim çalışmamızın sonuçlarında da olduğu gibi literatürde senkronize yaklaşım için hasta seçiminde en önemli kriterler; hasta yaşı ve yapılan hepatik rezeksiyonun hacmi olarak bildirilmiştir. Sonuç olarak cerrahi tedavi yaklaşım tercihinde, her merkez kendi protokollerini hasta özelliklerini dikkate alarak multidisipliner bir şekilde belirlemelidir.

**Anahtar kelimeler:** kolorektal kanser; karaciğer metastazı; cerrahi

Sorumlu Yazar\*: Muhammed Raşid Aykota, Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Denizli/TÜRKİYE

E-posta: muhammedaykota@hotmail.com

ORCID: 0000-0003-1862-6186

Gönderim: 07.05.2019 Kabul: 28.06.2019

Doi: 10.18663/tjcl.555703

## Abstract

**Aim:** The most common metastasis of colorectal cancer (CRC) is the liver and approximately 25% of patients have synchronous liver metastases at the time of diagnosis. Surgical management of CRC patients with liver metastasis is still controversial. The treatment strategy for each patient should be personalized depending on the patient's performance status, comorbidities and tumor stage. The aim of this study was to determine our treatment approach for CRC patients with synchronous liver metastasis in our clinic and to compare them with the literature.

**Material and Methods:** Between January 2016 and December 2018, eight patients with synchronous liver metastatic CRC, combined surgical procedure called co-operated colorectal cancer surgery and hepatic resection were included in the study.

**Results:** Two patients underwent right hepatectomy and six patients underwent metastasectomy. T1 / 2 tumor was detected in one patient (12%) and T3 / 4 tumor in seven patients (88%) according to TNM stage. Four of the patients (50%) had lymph node metastasis. One patient died on the 3rd postoperative day due to MODS.

**Conclusion:** As in the results of our study, the most important criteria in patient selection for synchronous approach in literature are; The age of the patient and the volume of hepatic resection performed were reported. As a result, in the choice of surgical treatment approach, each center should determine its protocols in a multidisciplinary way considering the patient characteristics.

**Keywords:** colorectal cancer; liver metastasis; surgery

## Giriş

Tüm dünyada her yıl 1.4 milyon yeni kolorektal kanser (KRK) tanısı konulmaktadır ve bunların 694000'i ölümlerle sonuçlanmaktadır [1]. Kolorektal kanserlerin en sık metastaz yaptığı organ karaciğerdir ve tanı anında hastaların yaklaşık %25'i senkron karaciğer metastazı bulunur. KRK hastalarının en sık ölüm sebebi karaciğer metastazlarıdır [2]. Ne yazık ki karaciğer metastazı olan KRK'lerin yaklaşık % 20'si operasyona uygundur [3,4]. Bu hastaların 5 yıllık beklenen yaşam süresi cerrahi ve neoadjuvan tedaviler ile %50 arttırılmış olmasına rağmen rezeksiyon yapılan karaciğer metastazı olan KRK hastalarında %70 oranında nüks görülmektedir. Bu yüzden karaciğer metastazı olan kolorektal kanser hastalarında cerrahi yaklaşım tartışma konusudur. Günümüzde pek çok tedavi yaklaşımı olsa da senkron karaciğer metastazlı KRK'de küratif tedavi potansiyeli olan girişim hepatik rezeksiyondur ve uzun dönem sağ kalımda makul bir artış sağlar [5]. Senkron karaciğer metastazlı KRK hastalarında multimodal yaklaşım tedavi alternatiflerini artırmıştır (kolorektal rezeksiyon, hepatik rezeksiyon, kemoterapi, radyoterapi). İlk girişimin primer kaynağa yönelik yapılması primer tümörün lokal tümör progresyonu (tıkanma, perforasyon, kolorektal kanama) ile ilişkili semptomların yanı sıra sonraki metastazların ana kaynağı olduğu düşünüldüğü için kullanılan geleneksel stratejidir. Geleneksel stratejilerin uzun vadeli sonuçları, ters stratejilerin (karaciğere ilk yaklaşım ve öncelikle hepatektomi yaklaşımı)

önerilmesine yol açmıştır. Ters stratejilerin ardındaki fikir, kolorektal rezeksiyon yerine karaciğer rezeksiyonunu tercih etmektir (evre IV kolorektal kanserli hastaların prognozu, esas olarak karaciğer metastazlarının iyileştirilebilirliği ile belirlenir). Mevcut literatüre göre, ters stratejiler asemptomatik primer tümörü olan hastalar için uygundur. Her hasta için tedavi stratejisi, hastanın performans durumuna, komorbiditelerine ve tümör aşamasına bağlı olarak kişiselleştirilmelidir [6]. Bu çalışmanın amacı kliniğimizde senkron karaciğer metastazlı KRK hastalarına yönelik tedavi yaklaşımımızı ortaya koymak ve literatürle karşılaştırmaktır.

## Gereç ve Yöntemler

Ocak 2016 ile Aralık 2018 yılları arasında senkron karaciğer metastazlı KRK için kliniğimizde hepatik rezeksiyon yapılan toplam sekiz hasta çalışmaya dahil edildi. Tüm hastalara kombine cerrahi prosedür olarak adlandırılan eş seanslı kolorektal kanser ameliyatı ve hepatik rezeksiyon yapıldı. Hasta bilgileri prospektif olarak toplandı. Yaş, cinsiyet, komorbidite vb. demografik hasta bilgileri, intraoperatif parametreler ve primer tümör lokalizasyonu, tümör (TNM) evresi, lenfovasküler invazyon gibi patolojik veriler ayrıca takip süresince morbidite ve mortaliteye etki edebilecek faktörler analiz edilerek literatürdeki benzer çalışma sonuçları ile karşılaştırıldı. Verilerin istatistiksel analizi SPSS 15.0 programı kullanılarak yapıldı. Standart deviasyon, ortalama, median, frekans ve yüzdeleri hesaplandı.



## Bulgular

Çalışmaya dahil edilen hastaların üçü (%37) erkek, beşi (%63) kadındı. Hastaların yaş ortalaması  $60.6 \pm 2,5$  (36-75) idi. Hastaların ortalama takip süresi 14 aydı. Toplam beş hastada (%62) hipertansiyon, diabetes mellitus vb komorbiditeler mevcuttu. Primer tümör lokalizasyonları değerlendirildiğinde; bir hastada sağ kolon, bir hastada sol kolon, üç hastada rektum, iki hastada sigmoid kolon, bir hastada ise hem sağ hem sol kolon yerleşimi saptandı. Hastaların dördünde (%50) karaciğerde dörtten fazla metastaz mevcuttu. Major damar invazyonu hiçbir hastada yoktu. Hastaların yarısına neoadjuvan kemoradyoterapi verildi. TNM evresine göre bir hastada (%12) T1/2, yedi hastada (%88) T3/4 tümör saptandı. Hastaların dördünde (%50) lenf nodu metastazı saptandı. İki hastaya sağ hepatektomi yapılırken altı hastaya metastazektomi yapıldı. Pringle manevrası, intestinal konjesyon ve tüm karaciğerde iskemiye sebep olduğundan dolayı hem intestinal anastomoz güvenliği hemde remnant karaciğer fonksiyonunu korumak için hiçbir hastaya yapılmadı. Karaciğer rezeksiyonu sonrası intraoperatif ultrason ile geride kalan karaciğer tümör odakları açısından değerlendirildi. Hiçbir hastaya peroperatif kan transfüzyonu yapılmadı. Tüm hastalara aynı seansta önce kolorektal cerrahi ekibi tarafından primer tümör rezeksiyonu sonrasında anastomoz güvenliği açısından, hepatobilier cerrahi ekip tarafından yapılan hepatik rezeksiyon sonrası aynı kolorektal cerrahi ekip tarafından anastomoz yapıldı. Hastaların ortalama yatış süresi 12 gün olarak bulundu. Hastaların yedisinde hiçbir major komplikasyon gelişmezken, bir hasta post operatif 3. günde MODS nedeniyle kaybedildi.

## Tartışma

Senkron karaciğer metastazı olan kolorektal kanserli hastalarda uygun cerrahi strateji halen tartışmalıdır ve pek çok çalışmanın konusudur [7]. Senkron karaciğer metastazı bulunan KRK hastaların cerrahi tedavisinde üç ana yaklaşım mevcuttur. Bunların ilki klasik yaklaşım olarak bilinen öncelikle primer KRK'nın çıkartılması daha sonra kemoterapi uygulanması ve yaklaşık 3-6 ay sonra karaciğer metastazının çıkartılmasıdır. İkincisi ise bizim çalışmamızda da olduğu gibi kombine yaklaşım olarak bilinen karaciğer metastazının ve primer tümörün aynı seansta çıkartıldığı cerrahi prosedürdür. Üçüncü yaklaşım, ilk önce karaciğer metastazının çıkartılması, daha sonra kemoradyoterapi uygulanması ve son aşama olarak primer tümörün çıkartıldığı ters strateji olarak bilinen prosedürdür [8].

2018 yılında İngiltere'de 1830 hastanın değerlendirildiği bir çalışmada hastaların %71,1'i klasik yaklaşım ile, %14,8'i kombine

yaklaşım ile, %14,2'si ters strateji ile tedavi edilmiştir. Klasik yaklaşımın barsak ilişkili komplikasyonların önlenmesinde ve primer tümörün progresyonundan kaynaklı komplikasyonların önlenmesinde etkili olduğu bildirilmiştir. Ters yaklaşım stratejisi ise primer tümörün çıkartılmadığı lokal ileri KRK hastalarında, postoperatif karaciğer yetmezliğinin önlenmesinde ve kemoradyoterapiye dirençli karaciğer metastazlarının tedavisinde belirgin olarak avantajlı bulunmuştur [8]. Ayrıca literatürde iki aşamalı cerrahi yaklaşımların postoperatif komplikasyon ve tümör progresyonu açısından daha yüksek riskli olduğu bildirilmiştir [8,9].

Aynı seansta hem kolorektal kanser rezeksiyonunun hem de karaciğer metastaz rezeksiyonunun yapıldığı diğer çalışmalarda da çalışmamızda olduğu gibi tedavi başarısında hasta seçiminin önemli olduğu, bu prosedür ile hastanede yatış süresinin ve maliyetin azaltıldığı ve klinik sonuçlarının diğer prosedürlere göre daha başarılı olduğu bildirilmiştir [10]. 1430 hastanın değerlendirildiği senkron ve kombine yaklaşımların karşılaştırıldığı bir çalışmada 5 yıllık beklenen sağkalım süresi oranlarında anlamlı farklılık saptanmamıştır [11]. Bizim çalışmamızın sonuçlarında da olduğu gibi literatürde senkronize yaklaşım için hasta seçiminde en önemli kriterler; hasta yaşı ve yapılan hepatik rezeksiyonun hacmi olarak bildirilmiştir [12,13].

## Sonuç

Cerrahi tedavi yaklaşım tercihinde, her merkez kendi protokollerini hasta bazlı özellikleri dikkate alarak multidisipliner bir şekilde belirlemelidir.

## Çıkar çatışması / finansal destek beyanı

Bu yazıdaki hiçbir yazarın herhangi bir çıkar çatışması yoktur. Yazının herhangi bir finansal desteği yoktur.

## Kaynaklar

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; 136: 359-86.
2. McMillan DC, McArdle CS. Epidemiology of colorectal liver metastases. *Surg Oncol* 2007; 16: 3-5.
3. Xu F, Tang B, Jin T-Q, Dai C-L. Current status of surgical treatment of colorectal liver metastases. *World J Clin Cases* 2018;6: 716-34.
4. Line P-D, Hagness M, Dueland S. The Potential Role of Liver Transplantation as a Treatment Option in Colorectal Liver Metastases. *Can J Gastroenterol Hepatol* 2018; 2018: 8547940.



5. Tsai M-S, Su Y-H, Ho M-C, Liang J-T, Chen T-P, Lai H-S, et al. Clinicopathological features and prognosis in resectable synchronous and metachronous colorectal liver metastasis. *Ann Surg Oncol* 2007;14: 786–94.
6. Ihnát P, Ostruszka P, Vávra P, Peteja M, Zonča P. Treatment strategies for patients with colorectal carcinoma and synchronous liver metastases. *Rozhl V Chir Mesicnik Ceskoslovenske Chir Spolecnosti* 2018;97: 451–54.
7. Thelen A, Jonas S, Benckert C, Spinelli A, Lopez-Hänninen E, Rudolph B, et al. Simultaneous versus staged liver resection of synchronous liver metastases from colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2007; 22: 1269–76.
8. Stureson C, Valdimarsson VT, Blomstrand E, Eriksson S, Nilsson JH, Syk I, et al. Liver-first strategy for synchronous colorectal liver metastases - an intention-to-treat analysis. *HPB* 2017;19: 52–8.
9. Propensity score-matched outcomes analysis of the liver-first approach for synchronous colorectal liver metastases. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2019 Apr 18]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26864820>
10. Le Souder EB, Azin A, Hirpara DH, Walker R, Cleary S, Queresby F. Considering the cost of a simultaneous versus staged approach to resection of colorectal cancer with synchronous liver metastases in a publicly funded healthcare model. *J Surg Oncol* 2018 ;117:1376–85.
11. Silberhumer GR, Paty PB, Denton B, Guillem J, Gonen M, Araujo RLC, et al. Long-term oncologic outcomes for simultaneous resection of synchronous metastatic liver and primary colorectal cancer. *Surgery*. 2016;160(1):67–73.
12. Nanji S, Mackillop WJ, Wei X, Booth CM. Simultaneous resection of primary colorectal cancer and synchronous liver metastases: a population-based study. *Can J Surg J Can Chir* 2017;60: 122–28.
13. Yin Z, Liu C, Chen Y, Bai Y, Shang C, Yin R et al. Timing of hepatectomy in resectable synchronous colorectal liver metastases (SCRLM): Simultaneous or delayed? *Hepatol Baltim Md* 2013;57: 2346–57.

To cite this article: Dağcıoğlu Y, Altuner Z, Bulut Y, Barut HŞ. Tokat ili kronik Hepatit B enfeksiyonlu hastalarda Tork Teno virüs ve Hepatit D virüs araştırılması. Turk J Clin Lab 2019; 10: 314-318.

## ■ Orjinal Makale

# Tokat ili kronik Hepatit B enfeksiyonlu hastalarda Tork Teno virüs ve Hepatit D virüs araştırılması

## *Investigation of Torque Teno virus and Hepatitis D virus in patients infected with chronic Hepatitis B in Tokat*

Yelda DAĞCIOĞLU\*<sup>1</sup> , Zekeriya ALTUNER<sup>2</sup> , Yunus BULUT<sup>3</sup> , Hüseyin Şener BARUT<sup>4</sup> 

<sup>1</sup>Gaziosmanpaşa Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Tokat/TÜRKİYE

<sup>2</sup>Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı, Tokat/TÜRKİYE

<sup>3</sup>Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tokat/TÜRKİYE

<sup>4</sup>Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Tokat/TÜRKİYE

### Öz

**Amaç:** Tokat ilinde kronik hepatit B tanılı hastalarda Hepatit Delta Virüs (HDV) ve Tork Teno Virüs (TTV) araştırması yapıldı.

**Gereç ve Yöntemler:** Çalışma Ocak 2015-Temmuz 2015 tarihleri arasında Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında gerçekleştirildi. Çalışmaya Kronik HBV'li 110 hasta (58'i kadın, 52'si erkek) ve 90 sağlıklı birey dahil edildi. Hasta kanlarından izole edilen TTV-DNA ve HDV-RNA'ların polimeraz zincir reaksiyonları (PZR) yapıldı. Ayrıca hastalarda aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT) değerleri de çalışıldı.

**Bulgular:** Hasta numunelerinin 108'i HDV-RNA negatif, 2'si (%1,81) HDV-RNA pozitif olarak tespit edildi. Sağlıklı bireylerin tümünde HDV-RNA negatif bulundu. TTV çalışmasında ise 110 numunenin 106'sı (%96,4) TTV-DNA pozitif olarak bulunurken, 4'ü TTV-DNA negatif olarak tespit edildi. Sağlıklı bireylerde ise 90 numunenin 86'sinin (%95,35) TTV-DNA pozitif, 4'ünün (%4,65) TTV-DNA negatif olduğu tespit edildi. HDV-RNA pozitif olan hastalarda ALT ve AST değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilirken ( $p<0,05$ ), TTV pozitif olan hastalarda ise anlamlı bir ilişki yoktu ( $p>0,05$ ).

**Sonuç:** Tokat ilinin, HDV enfeksiyon oranı, Türkiye ortalamasının oldukça altında, dünya genelinde ise, çok düşük endemite grubuna dahil bölgeler arasında olduğu görüldü. Tokat'ta ilk defa araştırılan TorkTenovirüs ise %96 oranı ile dünya ve Türkiye ortalamasının oldukça üzerindedir. Kronik hepatit B enfeksiyonlu hasta grubunda araştırılan TorkTenovirüs ve hepatit deltavirüs enfeksiyonları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

**Anahtar kelimeler:** kronik hepatit B; HDV-RNA; TTV-DNA; PCR; prevalans

Sorumlu Yazar\*: Yelda Dağcıoğlu, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Tokat/TÜRKİYE

E-posta: yelda.dagcioglu@gop.edu.tr

ORCID: 0000-0001-5169-9702

Gönderim: 25.02.2018 Kabul : 02.06.2018

Doi: 10.18663/tjcl.398474

## Abstract

**Aim:** The aim of this study was to investigate the detection, rates and correlations of Torque Teno Virus (TTV) and Hepatitis Delta Virus (HDV) which cause superinfection and coinfection in patients with chronic hepatitis B in Tokat.

**Material and Methods:** A total of 110 patients with chronic HBV infection (58 women, 52 men) and 90 healthy subjects were included in the study. Polymerase chain reactions (PCR) of all blood samples were performed with TTV-DNA and HDV-RNA isolations. Aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) values of patients were also studied.

**Results:** 108 samples of the patients were HDV-RNA negative and 2 were (1.81%) HDV-RNA positive. HDV-RNA were negative in all healthy subjects. In the TTV study, 106 of the 110 samples (96.4%) were found to be TTV-DNA positive while 4 were found to be TTV-DNA negative. In healthy subjects, 86 of 90 samples (95.35%) were TTV-DNA positive and 4 (4.65%) were TTV-DNA negative. A statistically significant relationship was found between ALT and AST values in HDV-RNA positive patients ( $p < 0.05$ ). There was no significant relationship between TTV positive patients ( $p > 0.05$ ).

**Conclusion:** It has been seen that the rate of HDV infection in Tokat province is considerably lower than the average of Turkey and in the World. Torque Teno Virus, which was investigated for the first time in Tokat, is higher than the average of Turkey and World. There was no statistically significant relationship between the infections of Torque Tenovirus and hepatitis delta virus in patients with chronic hepatitis B infections.

**Keywords:** chronic hepatitis B; HDV-RNA; TTV-DNA; PCR; prevalence

## Giriş

Dünya genelinde 2 milyar insanın (dünya nüfusunun yaklaşık 1/3'ünün) Hepatit B ile enfekte olduğu ve bu kişilerin 400 milyonunda enfeksiyonun kronik Hepatit B hastalığına dönüştüğü bilinmektedir. Hastaların %75-80'inde herhangi bir belirti vermeksizin gelişir, taramalarda ve kan bağışlarında yapılan tetkiklerde rastlantı sonucu tespit edilebilir [1]. Hepatit B virüsü, akut ve kronik hepatitler, karaciğer sirozu ve hepatosellüler karsinomun başlıca nedenlerindedir.

Hepatit D virüsü ise, Hepatit B virüsü ile birlikte olduğunda enfeksiyona neden olabilen bir defektif virüstür. HBV'nin varlığında vücuda giren virüs, şiddetli enfeksiyonlara sebep olarak ani başlayan fulminan hepatit, kanser ve mortaliteye neden olmaktadır[2].

Torque Teno virüsü, 1997 yılında Japon bilimadamı Nishizawa tarafından, kan transfüzyon sonrası A-G dışı hepatit gelişen beş hastanın serumunda, klonlama-sekanslama yöntemiyle bir DNA dizisi şeklinde izole edilmiştir. TTV'nin kan transfüzyonuyla geçtiği düşünülmesi sebebiyle Transfusion Transmitted Virüs olarak da anıldığı yayınlar bulunmaktadır [3].

Bu çalışmada, Tokat ilinde oldukça yoğun olarak gözlenen kronik hepatit B hastalarında süperenfeksiyon ve koenfeksiyona sebep olan HDV ve TTV varlığını tespit etmek amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntemler

Çalışmaya en az 6 ay süre ile HbsAg ve HBV-DNA kantitatif pozitifliği tespit edilmiş olan 110 kronik Hepatit B hasta kan numunesi ve kontrol grubu olarak da her biri serolojik olarak

HbsAg negatif olarak belirlenen 90 sağlıklı birey kanı olmak üzere 200 numune dahil edildi. Hasta ve kontrol gruplarından alınan 5 ml. kandan serumları 15 dakika 3500 RPM'de santrifüj edilerek ayrıldı. HBV-DNA pozitif 110 hastanın 400 µl serumunda HDV-RNA ve TTV-DNA izolasyonları, izolasyon cihazı (Magnesia 16 Anatolia Genework, Türkiye) ile yapıldı. Polimeraz zincir reaksiyonları, HDV ve TTV PZR kitlerinin (Anatolia, Bosphore, İstanbul, Türkiye) prosedürüne uygun şekilde PZR cihazında (Montania 483, Anatolia, Türkiye) gerçekleştirildi.

TTV PZR'ı ilk denatürasyon 95°C'de 14:30 dakika, denatürasyon 95°C'de 00:30 dakika, bağlanma 53°C'de 00:45 dakika, sentez 72°C'de 00:45 dakika olmak üzere toplam 45 döngü üzerinden gerçekleştirilmiştir. HDV ise öncelikle reverse transkripsiyon işlemi 50°C'de 30:00 dakika yapıldıktan sonra, ilk denatürasyon 95°C'de 14:30 dakika, denatürasyon 97°C'de 00:30 dakika, bağlanma 54°C'de 01:20 dakika, sentez 72°C'de 00:45 dakika olmak üzere toplam 50 döngü üzerinden gerçekleştirildi. 22°C'de 05:00 dakika inkübasyon süresi ve toplam döngü sonrasında PZR işlemi tamamlandı. Amplifikasyon sonrası sonuçların grafikleri ve kantitatif verileri cihazdan elde edildi.

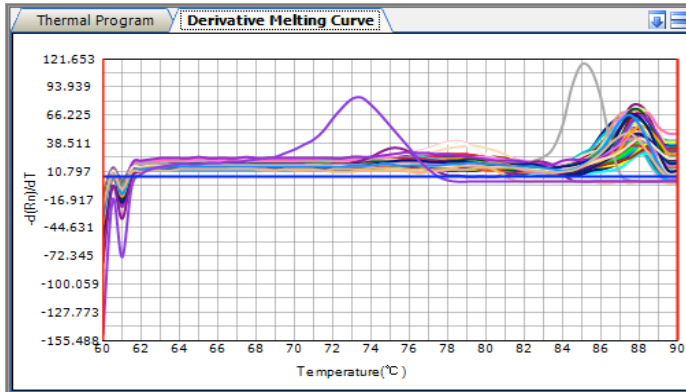
Ayrıca hastaların karaciğer fonksiyon testleri olan AST, ALT, (Roche Cobas INTEGRA/cobas c system, Roche Diagnostic Türkiye) test kit ve Roche Cobas 501 cihazı kullanılarak çalışıldı. Çalışma Gaziosmanpaşa Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından Ocak 2015'te 14-KAEK-219 numaralı proje

olarak onaylanmıştır. Çalışmaya dahil edilen tüm insanlar bilgilendirilmiş onam formunu imzalamıştır.

Çalışmada lineer regresyon ve Spearman's Rho korelasyon testleri yapıldı. Sonuçlarda  $p < 0,05$  değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

## Bulgular

Kronik Hepatit B'li 110 hastadan alınan numunelerin 106'sında TTV-DNA pozitif, 4'ünde ise negatif olarak tespit edilmiştir. TTV taraması yapılan 90 sağlıklı bireyin 86'sı pozitif ve 4'ü negatif olarak saptanmıştır (Şekil 1). HDV-RNA çalışmasında ise 110 Kronik Hepatit B'li hasta numunesinin 108'inde HDV-RNA negatif, 2'sinde ise pozitif olarak (%1,8) tespit edilmiştir (Şekil 1,2). Bu iki olgunun da süperenfeksiyon olduğu belirlenmiştir. HDV-RNA düzeyi sağlıklı bireylerde tüm numuneler negatif olarak saptanmıştır. TTV ile HDV arasında herhangi bir ilişki olup olmadığı Spearman's Rho korelasyon testi ile araştırılmıştır. Test sonucunda TTV ile HDV arasında herhangi bir ilişki olmadığına karar verilmiştir ( $p > 0,05$ ) (Tablo 1).

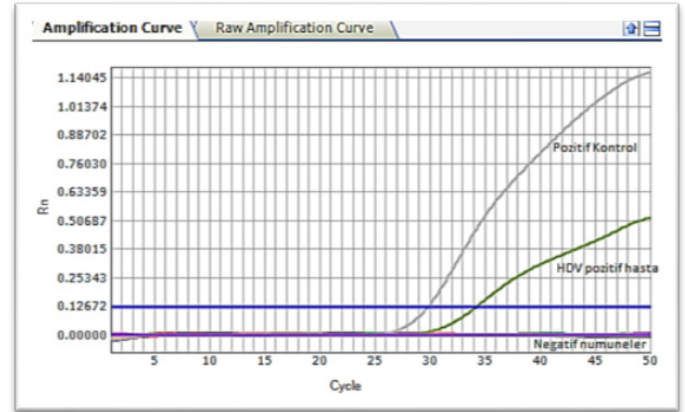


Şekil 1. TTV-DNA çalışma sonuçları

HBV-DNA(+)'lerde	TTV-DNA(+) (n=106)	HDV-RNA(+) (n=2)	TTV-DNA/HDV-RNA(+) (n=2)
Yaş (ortalama+standart sapma)	45,25±14,11 ( $p < 0,05$ )	59,5±1,5 ( $p > 0,05$ )	59,5±1,5 ( $p > 0,05$ )
Kadın	56	2	2
Erkek	50	0	0
ALT	28,55±32,31 ( $p > 0,05$ )	79,8±59,1 ( $p < 0,05$ )	79,8±59,1 ( $p < 0,05$ )
AST	23,75±14,64 ( $p > 0,05$ )	58,8±39,3 ( $p < 0,05$ )	58,8±39,3 ( $p < 0,05$ )

## Tartışma

Kronik Hepatit B enfeksiyonu, Hepatit D Virüsünün eklenmesiyle çok daha hızlı ilerleyen, tehlikeli bir forma dönüşebilir. HDV enfeksiyonu genellikle düşük endemite olarak rastlanılmasına rağmen, HBV enfeksiyonunun sebep olduğu karaciğer hasarını ağırlaştırarak tedavide güçlük ve komplikasyonlara neden olabilmektedir [2].



Şekil 2. HDV-RNA çalışma sonuçları

Tablo 1. Kronik Hepatit B'li hastalarda tespit edilen TTV-DNA ve HDV-RNA oranları

HBV-DNA Pozitif hastalarda	TTV-DNA (%) - frekans	HDV-RNA (%) - frekans	( $p > 0,05$ )
Negatif	3,6	4	98,2
Pozitif	96,4	106	1,8
Toplam	100	110	100

HDV-RNA pozitif olan hastalarda ALT değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ). Ayrıca diğer bir karaciğer fonksiyon testi olan AST değerleri ile HDV-RNA pozitif olanlar arasında da anlamlı bir ilişki gözlenmiştir ( $p < 0,05$ ). TTV-DNA pozitif olan hastaların ise karaciğer fonksiyon testleri arasında anlamlı bir ilişki olmadığı ( $p > 0,05$ ), fakat TTV-DNA pozitif olan hastaların viral yükleri ile yaşları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur ( $p < 0,05$ ) (Tablo 2).

Yurtdışında yapılan çalışmalarda; Kuzey İtalya'da kronik hepatit B hastalarında %6,3 anti-HDV pozitif saptanmıştır. Olguların birinin (%0,2) serumunda HDAg tespit edilmiştir [4].

İran'da yapılan iki farklı çalışmada; kronik hepatit B hastalarında anti-HDV pozitiflik oranı %3,5-17,3 olarak bildirilmiştir [5,6]. İran Kan Transfüzyon Organizasyonunun yaptığı bir çalışmada 2014 yılı itibariyle HBV pozitif hastaların %2'sinin HDV enfeksiyonuna sahip olduğu, bu oranın da dünya HDV ortalamasının altında olduğu belirtilmiştir [7].

Türkiye’de yapılan kronik hepatit B’li hastaların Hepatit D Virüs prevalans çalışmasında, Batı Anadolu’da %14-16,5; Orta Anadolu’da %28; Doğu ve Güneydoğu Anadolu’da %33-38 olarak tespit ederken, 1980-90 yılları arasında %31 olan HDV pozitiflik oranının 2000-2005 yılları arasında %11’e kadar düştüğünü belirtmişlerdir [8]. 1998 yılından itibaren ulusal aşı takvimine eklenen Hepatit B aşılmasının, bu düşüşe etkisi olduğu açıkça görülmektedir.

2011’de İstanbul’da yapılan çalışmada kronik HBV hastalarının %4,4’ünde anti-HDV pozitif saptanmıştır [9]. Yine İstanbul’da yapılan bir çalışmada bu oran %7 olarak bildirilmiştir [10].

Eskişehir’de saptanan %0,9 HDV RNA pozitifliği ülkemiz geneliyle uyumlu olarak yıllar içerisinde azalma gösterdiği halde [11], 2016 yılı itibariyle Tokat’ta HDV-RNA oranının %1,81 ile Eskişehir’den biraz daha yüksek oranda olduğu tespit edilmiştir.

Gürkan ve ark.[12] ile Niro ve ark. [13]’nin yaptığı çalışmalarda, HDV pozitif olan hastaların karaciğer enzim değerlerinin yüksek olduğu ve ALT-AST değerleri arasında anlamlı bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. Yaptığımız çalışmada, bu çalışmalara benzer olarak, HDV-RNA pozitif olan hastalarda ALT-AST değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir.

2014 yılında Katar’da yapılan bir çalışmaya göre TTV oranı HBV’de %90,75 iken ilimizde bu değere yakın oranda TTV pozitifliği belirlenmiştir [14].

TTV ile ilgili yapılan diğer çalışmalarda, sağlıklı kan donörlerinde TTV-DNA pozitifliği Fransa’da %2, A.B.D’de %13, Gambiya’da %83, Japonya’da %17-93 olarak saptanmıştır. Ülkemizde kan donörlerinde yapılan çalışmalarda TTV-DNA pozitiflikleri ise İzmir’de %51,6, İstanbul’da %4,5 ve %31, Bursa’da %9,6, Ankara’da %0,5 oranlarında bildirilmiştir. Ayrıca Türkiye’de hemodiyaliz hastalarında %7,5, fulminan hepatit olgularında %80, kronik B hepatitinde %13,6, kronik C hepatitinde %7,2, kriptojenik kronik aktif hepatitde %38, kriptojenik karaciğer sirozunda %20,5, talasemilerde %79,6 gibi farklı oranlarda TTV-DNA pozitiflikleri saptanmıştır [15]. İlimizde ilk defa yapılan bu çalışmada Kronik Hepatit B’li hastalarda % 96 ve sağlıklı bireylerde % 95,5 olmak üzere benzer oranda TTV pozitifliği saptanmıştır. Bu oranların, ülkemizde ve dünyada yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında, oldukça yüksek olduğu görülmektedir [15].

TTV Enfeksiyonu ile karaciğer enzimleri olan ALT ve AST arasındaki ilişkinin değerlendirildiği çalışmalarda önemli bir farkın olmadığı saptanmıştır [3,16,17]. Bu çalışmada da TTV pozitif örneklerin aynı dönemdeki karaciğer enzim değerleri

arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (Tablo 2.). Tork Teno Virüs yıllar boyunca, mutlaka bir hastalık etkeni olması yönünde araştırılmıştır. Fakat TTV’nin, sağlıklı bireylerde karşılaşılan sonuçları değerlendirildiğinde oldukça yüksek oranlarda bulunduğu belirlenmiştir. Bu virüsün bireylerdeki varlığı daha geniş çapta araştırılmalı, hangi şartlarda hastalık yaptığı üzerinde durulup, bu konuda farklı incelemelerin yapılması zorunluluğu açığa çıkmaktadır.

HDV-RNA pozitif olan hastalarda ALT değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilirken, AST değerleri ile HDV-RNA pozitif olanlar arasında da anlamlı bir ilişki gözlenmiştir ( $p<0,05$ ).

TTV-DNA pozitif olan hastalar ile karaciğer fonksiyon testleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmazken ( $p>0,05$ ), TTV-DNA pozitif olan hastalar ile yaşları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur ( $p<0,05$ ). İleri yaş hastalardaki pozitifliğin genç yaş hastalara göre daha fazla olduğu saptanmıştır.

## Sonuç

Tokat ilinin, HDV enfeksiyon oranı, Türkiye ortalamasının oldukça altında, dünya genelinde ise, çok düşük endemite grubuna dahil bölgeler arasında olduğu görüldü. Tokat’ta ilk defa araştırılan TorkTenovirüs ise %96 oranı ile dünya ve Türkiye ortalamasının oldukça üzerindedir. Kronik hepatit B enfeksiyonlu hasta grubunda araştırılan TorkTenovirüs ve hepatit deltavirüs enfeksiyonları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Tokat ilimizde kronik hepatit B hastalarında, HDV sıklığı düşük saptanırken, Kronik hepatit B ile birlikte TTV sıklığının oldukça yüksek olduğu ve özellikle de ileri yaş hastalarda, genç hastalara göre daha fazla oranda gözlemlendiği saptanmıştır. TTV pozitifliğinin fazla olduğu belirlenmiştir.

## Çıkar çatışması / finansal destek beyanı

Bu yazıdaki hiçbir yazarın herhangi bir çıkar çatışması yoktur. Yazının herhangi bir finansal desteği yoktur.

## Kaynaklar

1. Hou J, Liu Z, Gu F. Epidemiology and Prevention of Hepatitis B Virus Infection. *Int J Med Sci* 2005; 2; 50-57.
2. Çelen MK. HDV enfeksiyonunun doğal seyri. *Viral Hepatit 2009*, Editörler: Balık, İ, Tabak F. *Viral Hepatit Savaşım Derneği Express Matbaası* 2009; 181-86.
3. Abdalla, N.M., Galal, A., Fatouh, A.A., Eid, K., Salama, E.E.E., Gomma, H.E. Transfusion Transmitted Virus (TTV) Infection in Polytransfused Egyptian Thalassaemic Children. *J of Med Sci* 2006, 6; 833-37.

4. De Paschale M, Manco MT, Belvisi L, Epidemiology of hepatitis D virus (HDV) infection in an urban area of Northern Italy. *Infection* 2012; 40: 485-91.
5. Ataei B, Yazdani MR, Kalantari H. Hepatitis D virüs infection in Isfahan, central Iran: prevalence and risk factors among chronic HBV infection cases. *Hepatology* 2011; 11; 269-72.
6. Mohammad AH, Ranjbar M, Tehrani AS. Seroprevalence of hepatitis D virus and its risk factors in the west of Iran. *J Microbiol Immunol Infect* 2010; 43; 519-23.
7. Keshvari M. Seroepidemiology and clinical features of hepatitis delta among HBsAg carriers: a study from Hepatitis Clinic of Iranian Blood Transfusion Organization. *Transfus Med* 2014; 24: 411-17.
8. Değertekin H, Yalçın K, Yakut M, Yurdaydın C. Seropositivity for delta hepatitis in patients with chronic hepatitis B and liver cirrhosis in Turkey: a meta-analysis. *Liver Int* 2008; 28; 494-98.
9. İzmirli S, Çelik DG, Güngördü Z. Hepatit delta virüsü enfeksiyonu seroprevalansı: retrospektif temelli seroepidemiolojik bir değerlendirme. *Flora* 2011; 16; 120-26.
10. Yaşar K, Pehlivanoğlu F, Şengöz G. Sekiz aylık dönemde laboratuvarımızda saptanan hepatit B ve hepatit D seroprevalansı. *Viral Hepatit Dergisi* 2011;17; 22- 26.
11. Korkmaz P, Aykın N, Çevik FÇ, Güldüren HM, Alpay, Y. Seropositivity of Delta Hepatitis in HBsAg Positive Patients in Eskişehir Province Turkey. *Viral Hepatitis J* 2014; 20: 72-74.
12. Gürkan Y, Toyran A, Aksoy A, Coşkun FA, Çetin F. Ankara Numune Eğitim Araştırma Hastanesine 2010-2013 Yılları Arasında Başvuran Hastaların HBsag ve Anti-HDV Seroprevalanslarının Değerlendirilmesi. *Viral Hepatit J* 2013; 19; 148-151.
13. Niro GA, Smedile A, Ippolito AM et al Outcome of chronic delta hepatitis in Italy: A long-term cohort study. *Journal of Hepatology* 2010;53: 834-40.
14. AbuOdeh R, Al-Mawlawi N, Al-Qahtani AA. et al Detection and genotyping of torque teno virus (TTV) in healthy blood donors and patients infected with HBV or HCV in Qatar. *J Med Virol* 2015; Feb 9.
15. Kaya O, Akçam FZ. Yeni Hepatit Virusları. *Sted* 2005; 14: 179-81.
16. Heo WB, Lee NY, Jeong KY, Lee WK. TT Virus (TTV) İnfection in General Population, Chronic Liver Diseases, Hemodialysis, and Transfused Patients. *Korean J Clin Microbiol* 2006; 9:7-12.
17. De Oliveira JC, Nasser TF, Oda JM. et al Detection of TTV in peripheral blood cells from patients with altered ALT and AST levels. *New Microbiol* 2008; 31; 195-201.

■ Orjinal Makale

## Vankomisine dirençli enterokokların saptanmasında iki farklı kromojenik besiyerinin karşılaştırılması

### *Comparison of two different chromogenic agar for isolation of vancomycin-resistant enterococci*

Sami KINIKLI\*<sup>ORCID</sup>, Salih CESUR<sup>ORCID</sup>, Çiğdem ATAMAN HATİPOĞLU<sup>ORCID</sup>, Kader ARSLAN<sup>ORCID</sup>, Taliha KARAKÖK<sup>ORCID</sup>, Şerife ALTIN DEMİRCAN<sup>ORCID</sup>, Esra KAYA KILIÇ<sup>ORCID</sup>, Ayşe BÜYÜKDEMİRCİ<sup>ORCID</sup>

Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara/TÜRKİYE

#### Öz

**Amaç:** Bu çalışmada yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların rektal sürüntü örneklerinden vankomisin dirençli enterokokların saptanmasında Enterococcosel agar ve ChromID VRE besiyerinin performanslarının karşılaştırılması amaçlandı.

**Gereç ve Yöntemler:** Yoğun Bakım ünitesinde yatan hastalardan aktif vankomisine dirençli enterokok (VRE) sürveyansı kapsamında alınan rektal sürüntü örnekleri eş zamanlı olarak Enterococcosel agar ve Chrom ID VRE agar besiyerlerine ekildikten sonra besiyerleri 37 °C'de etüvde 24-48 saat süreyle inkübe edildi. Enterococcosel agar besiyerinde siyah renkte üreyen koloniler olası VRE olarak değerlendirilmeye alındı, bu suşlar kanlı agar besiyerine pasajlandı. Chrom ID VRE agar besiyerinde menekşe rengi üreyen koloniler olası vankomisine dirençli Enterococcus faecium, yeşil renkte üreyen koloniler ise olası Enterococcus faecalis suşları olarak değerlendirmeye alındı. Her iki kromojenik besiyerinde üreyen olası VRE suşlarının doğrulanması E-test yöntemiyle ve otomatize antibiyotik duyarlılık sistemiyle MİK değeri belirlenerek saptandı. Besiyerlerinin duyarlılık, özgüllük, pozitif belirleyicilik değeri (PBD) ve negatif belirleyicilik değeri (NBD)'leri; vankomisin E-test yöntemi ve otomatize antimikrobiyal duyarlılık yöntemiyle saptanan değerler göz önüne alınarak hesaplandı. Vankomisin direncini saptamakta E-test yöntemi ve otomatize sistem birbiriyle %100 uyumluydu.

**Bulgular:** Çalışmaya yoğun bakım ünitesinde yatan hastalardan alınan 159 rektal sürüntü örneği dahil edildi. Rektal sürüntü örneklerinden E-test yöntemiyle ve otomatize antimikrobiyal duyarlılık test yöntemiyle doğrulanmış 21 (%13) VRE saptanırken, 138 (%87) örnekte VRE saptanmadı. Enterococcosel agar besiyerinin 24 ve 48. saatlerdeki duyarlılık, özgüllük, PBD ve NBD'leri sırasıyla; %95.4, %99.2, %99.2 ve %98.7 idi. Chrom ID VRE agar besiyerinin 24 ve 48. saatlerdeki duyarlılık, özgüllük, PBD ve NBD'leri sırasıyla; %95.4, %81.7, %45.6 ve %99.1 idi. Her iki besiyerininin de 24. ve 48. saatlerdeki duyarlılık ve özgüllük oranları farklılık göstermedi. Enterococcosel agar besiyerinin duyarlılığı ve PBD'i ChromID VRE agar besiyerinden daha yüksekti. Chrom ID VRE agar besiyerinde yalnızca pozitiflik oranının (25/159,%16) daha fazla olduğu saptandı. Enterococcosel agar besiyerinde yalnızca pozitiflik oranı % 0.6 (1/159) idi.

**Sonuç:** Rektal sürüntü örneklerinde VRE suşlarının saptanmasında Enterococcosel agar besiyerinin özgüllük oranının Chrom ID VRE agar besiyerinden daha iyi olduğu saptandı. Ayrıca, Chrom ID VRE agar besiyerinde Gram negatif bakterilere bağlı yalnızca pozitifliklerin fazla olması nedeniyle bu besiyerine Gram negatif etkinlikli antibiyotik eklenmesinin yararlı olacağı sonucuna varıldı.

**Anahtar kelimeler:** vankomisine dirençli enterokok; kromojenik besiyeri; enterococcosel agar; chrom ID VRE agar

Sorumlu Yazar\*: Sami Kınıklı, Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara/TÜRKİYE

E-posta: dr\_sami\_kinikli@hotmail.com

ORCID: 0000-0001-5169-9702

Gönderim: 23.09.2017 Kabul: 03.11.2017

Doi: 10.18663/tjcl.339592



## Abstract

**Aim:** The aim of this study is to compare performances of Enterococcosel Agar and ChromIDVRE on detecting vancomycin-resistant enterococci from rectal swab specimens of the patients in intensive care unit.

**Material and Methods:** Rectal swab specimens taken from the patients in intensive care unit were simultaneously plated in both Enterococcosel agar and ChromID VRE agar, and then, they were incubated in incubator at 37°C for 24-48 hours. Black colonies on Enterococcosel agar were identified as possible VRE. Purple and pink colonies on ChromID VRE agar were identified as possible vancomycin resistant *Enterococcus faecium*. Green colonies on ChromID VRE agar were identified as possible vancomycin resistant *Enterococcus faecalis*. Vancomycin resistance were confirmed by vancomycin E-test and automated antimicrobial susceptibility test through the MIC values. The sensitivity, specificity, positive predictive value (PBD) and negative predictive value (NBD) of the agars were calculated by taking into account the values determined by the vancomycin E-test method and the automated antimicrobial susceptibility method. In detecting vancomycin resistance, the E-test method and the automated antimicrobial susceptibility method were found to be 100% compatible.

**Results:** For the study, 159 rectal swabs taken from patients in intensive care unit were analyzed. 21 (13%) VRE, which are confirmed by E-test and automated antimicrobial susceptibility test, were detected in rectal swab specimens, but VRE was not detected in 138 (87%) specimens. Sensitivity, specificity, PBD and NBD of enterococcal agar at 24 and 48 hours were; 95.4%, 99.2%, 99.2% and 98.7%, respectively. Sensitivity, specificity, PBD and NBD of Chrom ID VRE agar at 24 and 48 hours were; 95.4%, 81.7%, 45.6% and 99.1%, respectively. Sensitivity and specificity rates at 24th and 48th hours of both agars did not differ. Sensitivity and PBD of Enterococcosel agar were higher than ChromID VRE agar. It was found that the false positive rate (25/159, 16%) was greater in Chrom ID VRE agar. The false positive rate on Enterococcosel agar was 0.6% (1/159).

**Conclusion :** In conclusion, this study revealed that the specificity rate of Enterococcosel agar in detecting VRE from rectal swabs was higher than ChromID agar. However, it is recommended that an antibiotic for gram negative bacteria should be included in ChromID agar in order to prevent false positive results.

**Keywords:** vancomycin-resistant enterococcus; chromogenic media; enterococcosel agar; chrom ID VRE agar

## Giriş

Enterokoklar gastrointestinal florada yer alan önemli bir hastane kaynaklı infeksiyon etkenidir. Son zamanlarda vankomisine dirençli enterokok (VRE)'lar yoğun bakım ünitesinde hastane kaynaklı infeksiyonlara ve salgınlara neden olmaktadır [1]. VRE suşları çoğu antibiyotik grubuna dirençlidir ve vankomisin direncini oldukça virülen olan metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarına aktarabilir. VRE bağlı olarak gelişen nozokomiyal infeksiyonların morbidite ve mortalite oranları yüksektir. Ayrıca, hastalarda tedavi seçenekleri kısıtlı olduğundan hasta bakım maliyetlerinde artışa da neden olur [2].

Vankomisine dirençli enterokoklara bağlı salgınları ve infeksiyonları önlemek için VRE ile infekte veya kolonize olan hastaların erkenden saptanıp, sıkı temas izolasyon önlemlerinin uygulanması gerekir [1,3]. Bu amaçla, riskli ünitelerde (yoğun bakım ünitesi, hematoloji-onkoloji servisi, yenidoğan ünitesi vb.) yatan hastalarda VRE kolonizasyonunun seçici veya ayırd edici besiyerleri ile rektal sürüntü veya dışkı örneklerinde taranarak aktif surveyansının yapılması önerilmektedir [1,2,4-6].

Bu amaçla, kromojenik substratların kullanıldığı, duyarlılık oranı yüksek selektif kromojenik besiyerleri geliştirilmiştir. Bu besiyerleri VRE suşlarının erken tanımlanmasına ve etkili infeksiyon kontrol önlemlerinin alınarak nozokomiyal bulaşın engellenmesine imkan sağlar. Bu amaçla geliştirilmiş çeşitli besiyerleri mevcuttur. Bu besiyerlerinden bazıları; Enterococcosel agar, Chrom ID VRE agar ve Brilliance VRE agar besiyeridir [7-9].

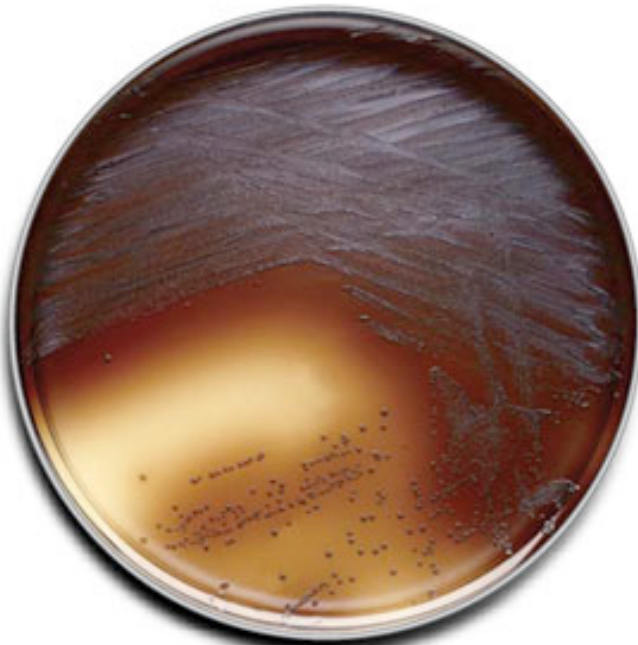
Bu çalışmanın amacı, yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların rektal sürüntü örneklerinden vankomisin dirençli enterokokların saptanmasında Enterococcosel agar ve ChromID VRE besiyerinin duyarlılık, özgüllük, pozitif belirleyici değer ve negatif belirleyici değerlerinin birbirleriyle karşılaştırılması idi.

## Gereç ve Yöntemler

Çalışmaya Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Anestezi, Beyin Cerrahisi ve Kalp Damar Cerrahisi ünitelerinde yatan hastalar dahil edildi. Hastalardan rutin VRE surveyansı kapsamında alınan toplam 159 rektal sürüntü örneği aynı

anda vankomisin ve seftazidim içeren Enterococcosel agar (Becton dickinson, USA) ve 8 mg/L vankomisin içeren ChromID VRE agar (Biomerioux,France) besiyerine ekilerek 37 °C de 24-48 saat süreyle inkübe edildi ve besiyerleri 24. ve 48.saatlerde üreme yönünden kontrol edildi. Enterococcosel agar besiyerinde siyah renkte üreyen koloniler olası VRE olarak değerlendirilmeye alındı.

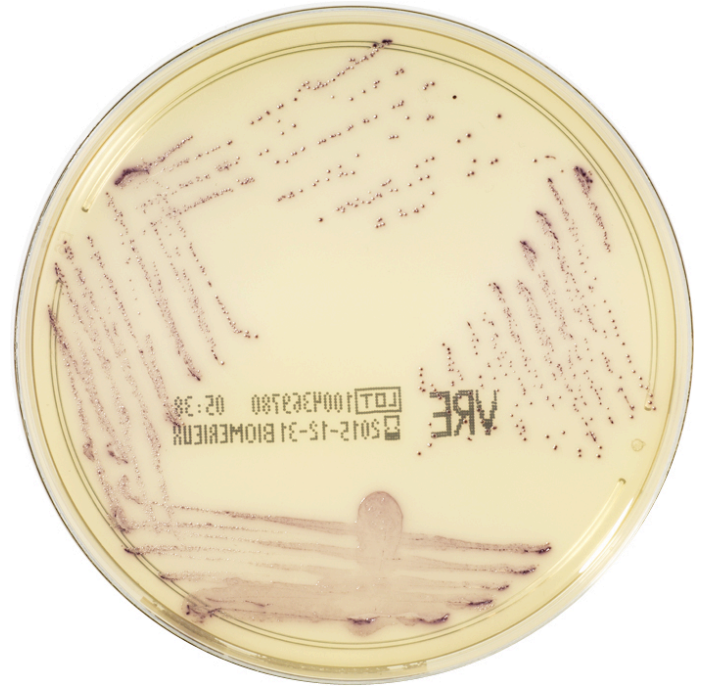
Resim 1'de enterococcosel agar besiyerinde üreyen olası VRE kolonilerinin siyah renkte görünmektedir. Bu suşlardan tek koloni alınarak koyun kanlı agar besiyerine pasajlandı. Üreyen kolonilerden katalaz testi, eskülin hidrolizi, %6.5 NaCl'de üreme testleri yapıldı. Katalaz testi negatif, eskülünü hidrolize eden, %6.5 NaCl'de üreyen kolonilerden Mueller Hinton agar besiyerinde E-test yöntemiyle (Biomerioux,France) ve BD Phoenix otomatize mikrobiyolojik tanımlama ve antimikrobiyal duyarlılık sistemi (Becton-Dickinson,USA) kullanılarak vankomisin için minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri belirlendi. E-test yöntemi için, 0.5 Mc Farland ayarlanan bakteri süspansiyonu steril eküvyonla Mueller- Hinton agar besiyerine yayıldı. E-test sribi içten MİK değerleri okunacak şekilde yerleştirildi. Besiyeri etüvde 37 °C de 24 saat süreyle inkübe edildi. Vankomisin için üremenin olmadığı elipsin stripe keşistiği en alt kısım MİK değeri olarak belirlendi.



**Resim 1.** Enterococcosel agar besiyerinde üreyen olası VRE kolonilerinin siyah renkte görünümü

Chrom ID VRE agar besiyerinde menekşe rengi üreyen koloniler olası vankomisine dirençli *Enterococcus faecium*,

yeşil renkte üreyen koloniler ise olası *Enterococcus faecalis* suşları olarak değerlendirmeye alındı. Resim 2'de chrom ID VRE agar besiyerinde üreyen olası vankomisine dirençli *Enterococcus faecium* kolonilerinin menekşe renkte görünümü görülmektedir. Benzer şekilde suşların VRE yönünden doğrulanması vankomisin için E-test yöntemi ve otomatize antimikrobiyal duyarlılık sistemiyle MİK değeri belirlenerek saptandı. Her iki kromojenik besiyerinin duyarlılık, özgüllük, PBD ve NBD'leri, E-test yöntemi ve BD Phoenix otomatize antimikrobiyal duyarlılık sistemi referans alınarak hesaplandı.



**Resim 2.** Chrom ID VRE agar besiyerinde üreyen olası vankomisine dirençli *Enterococcus faecium* kolonilerinin menekşe renkte görünümü

## Bulgular

Toplam 159 dışkı sürüntü örneğinden, E-test yöntemiyle doğrulanmış 21 (%13.2)VRE izole edildi. İzole edilen VRE suşlarının tamamı *Enterococcus faecium* idi. Kromojenik besiyerlerinin duyarlılık, özgüllük, PBD ve NBD'leri E-test ve BD Phoenix otomatize sistemiyle belirlenen MİK değerleri esas alınarak hesaplandı. Vankomisin direncini belirlemede E-test yöntemi ve BD Phoenix otomatize sistemi birbiriyle %100 uyumlu idi.

Her iki besiyerinde de 24. ile 48. saatler arasındaki duyarlılık, özgüllük ,PBD ve NBD'ler değişmezken, inkübasyon süresi uzadığında özellikle ChromID VRE besiyerinde yalancı pozitif saptanan kolonilerinin sayısının arttığı saptandı.

Tablo 1'de her iki besiyerinin 24 ve 48. saatlerde VRE saptama oranları, duyarlılık, özgüllük, PBD ve NBD'leri gösterildi.

**Tablo 1.** Enterococcosel agar ve ChromID VRE agar besiyerlerinin 159 örnekte VRE saptama oranları ile duyarlılık, özgüllük, PBD ,NBD'leri

Besiyeri	Gerçek pozitif	Yalancı Pozitif	Gerçek negatif	Yalancı negatif	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	PBD* (%)	NBD** (%)
	21	1	136	1	95.4	99.2	99.2	98.7
Chrom ID VRE Agar	21	25	112	1	95.4	81.7	45.6	99.1

PBD\*:Pozitif belirleyici değer NBD\*\*:Negatif belirleyici değer

Enterococcosel agar besiyerinin duyarlılığı ve PBD'i ChromID VRE agar besiyerinden daha yüksekti. Chrom ID VRE agar besiyerinde Gram negatif bakterilere (E.coli, Klebsiella spp ve Pseudomonas aeruginosa vb.) ve daha az oranda Staphylococcus aureus'a bağlı yalancı pozitifliklerin olduğu gözlemlendi.

### Tartışma

Vankomisine dirençli enterokok suşları ile infekte veya kolonize olan hastaların erken tanısı bu bakteriye bağlı olarak gelişebilecek nozokomiyal infeksiyonların önlenmesi ve infeksiyon kontrol önlemlerinin alınması için gereklidir [2]. Günümüzde VRE suşlarının saptanmasında kromojenik besiyerleri gibi selektif kültür yöntemleri ve /veya kültürle birlikte vankomisin direncinden sorumlu genlerin (van A, van B, van C) moleküler yöntemlerle (polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), real-time PZR vb.) saptanması sıklıkla kullanılmaktadır [2,3]

Kromojenik besiyerleri hem aranan çoklu dirençli patojenin seicilmesini sağlayan hem de icerdikleri diğer ayraclar sayesinde farklı koloni renkleri oluşturarak tür ayırımına olanak veren besiyerleridir. Bu besiyerlerinde kromojenik enzimatik substratlar ve çeşitli antimikrobiyal ajanlar bulunur [7-9] . VRE'ları saptamakta Chrom ID VRE agar, Enterococcosel agar, Brilliance VRE agar, Chromagar VRE gibi çeşitli kromojenik besiyerleri kullanılabilir. Chrom ID VRE agar besiyeri klinik örneklerde farklı renk oluşumuna neden olduğundan vankomisine dirençli Enterococcus faecium ve Enterococcus faecalis ayırımına olanak sağlar. Bu besiyerinde vankomisine dirençli Enterococcus faecalis kolonileri mavimsiyel, Enterococcus faecium kolonileri ise menekşe rengi görülür [1,7,8]. Kuch ve ark.[8] 96 iyi tanımlanmış vankomisine duyarlı ve dirençli enterokok izolatında ve 30 dışkı örneğinde (15 VRE hastası, 15 sağlıklı kişiden alınan) ChromID VRE agar ile vankomisin içeren bile eskülin agar (BEV) besiyerini karşılaştırmışlardır. Çalışmada suşlar Rapid ID32 strep test ve konvansiyonel yöntemlerle tanımlanmış, suşların vankomisin MİK değerleri E-test yöntemiyle belirlenmiştir. Çalışmada dışkı örneklerinde her iki besiyerinde VRE saptama duyarlılığı 48 saat inkübasyondan sonra anlamlı oranda

değişmezken, zenginleştirilmiş besiyerine ekim sonrasında kromojen besiyerlerinin duyarlılık oranının belirgin arttığı saptanmıştır. Çalışmada ChromID VRE agarın direk kültür örneklerinde spesifitesi BEV besiyerine göre daha yüksek saptanmıştır (sırasıyla; %100 ve %60), ancak inkübasyon süresi 24 saatten fazla uzatıldığında özellikle Gram negatif bakteri ve Candida türlerine bağlı kontaminasyon sonucu yanlış pozitif sonuçların arttığı gözlenmiştir. Sunduğumuz çalışmada rektal sürüntü örneklerinde 24.saatten sonraki inkübasyonda (48. saatteki inkübasyonda) ChromID VRE agar besiyerinde Gram negatif bakterilere bağlı üreme sonucunda yanlış pozitiflik oranlarının arttığı (159 örneğin 25'inde) saptandı. Kuch ve ark. [8] çalışmasında dışkı örneklerinde Chrom ID VRE agar besiyerinin 24. saatteki duyarlılığı %80, özgüllüğü %100, PBD (%100 ), NBD (%98) olarak saptanmışken, BEV'nin duyarlılığı %100; özgüllüğü %46, PBD %17, %100 olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmada Chrom ID VRE besiyerinin 48.saatteki duyarlılığı %93.3, özgüllüğü %60, PBD %21, NBD %99 iken aynı değerler BEV için sırasıya; %86.6, %40, %16 ve %96 olarak belirlenmiştir. Sunduğumuz çalışmada 159 rektal sürüntü örneğinde E-test yöntemiyle doğrulanmış 21'inde (%13) VRE saptanırken, 138 (%87 ) örnekte VRE saptanmadı. Enterococcosel agar besiyerinin 24 ve 48. saatlerdeki duyarlılık, özgüllük, PBD ve NBD'leri sırasıyla; %95.4, %99.2, %99.2 ve %98.7 idi. Chrom ID VRE agar besiyerinin 24 ve 48. saatlerdeki duyarlılık, özgüllük, PBD ve NBD'leri sırasıyla; %95.4, %81.7, %45.6 ve %99.1 idi. Enterococcosel agar besiyerinin duyarlılığı ve PBD'i ChromID VRE agar besiyerinden daha yüksekti.

ChromID VRE besiyerinin, vankomisin içeren safra eskülin azid (BEAV) ile kıyaslandığı bir çalışmada, 24 saatlik inkübasyon sonrasında duyarlılığı % 96.4, özgüllüğü % 96.6, pozitif belirleyici değeri % 89.8 olarak bildirilmiştir [10].Çalışmamızda elde ettiğimiz duyarlılık oranı bu çalışma ile benzerken, özgüllük ve PBD oranımız daha düşük saptanmıştır.

Suwantarat ve ark. [7 ] 396 dışkı örneğinde enterococcosel agar ve Chrom ID VRE agar besiyerinin performansını değerlendirdikleri çalışmada, enterococcosel agar besiyerinin duyarlılık , özgüllük, PPD ve NPD'lerini sırasıyla; 84.8, 100, 100

ve 95.2 olarak saptanırken, Chrom ID VRE agarın aynı değerleri sırasıyla; 94.9, 99.7, 98.9 ve 98.3 olarak belirlenmiştir.

Sunduğumuz çalışmada, bu çalışmanın aksine enterococcosel agar besiyerinin özgüllük ve PPD'nin ChromID VRE agardan daha iyi olduğu belirlendi.

Çalışmamızın sınırlandırıcı yönü, VRE suşlarının maliyetinin yüksek olması nedeniyle moleküler yöntemlerle (PZR, hibridizasyon yöntemi vb.) doğrulanamaması idi.

Kromojenik besiyerlerinde yalancı pozitiflik saptanabilmesi nedeniyle pozitif saptanan suşların başka bir yöntemle (E-test, otomatize antimikrobiyal duyarlılık sistemi veya moleküler yöntemler vb.) doğrulanması gereksiz izolasyon önlemleri alınmasını engelleyecektir.

### **Sonuç**

Chrom ID VRE agar besiyerinde Gram negatif bakterilere bağlı üreme sonucunda yalancı pozitiflik oranının fazla olması nedeniyle bu besiyerine Gram negatif etkinlikli antibiyotik eklenmesinin yararlı olabileceği görüşünderiz.

### **Çıkar çatışması / finansal destek beyanı**

Bu yazıdaki hiçbir yazarın herhangi bir çıkar çatışması yoktur. Yazının herhangi bir finansal desteği yoktur.

### **Kaynaklar**

1. Cuzon G, Naas T, Fortineau N and Nordmann P. Novel Chromogenic Medium for Detection of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; 46: 2442-44.
2. Seo JY, Kim PW, Lee JH, Song JH, Peck KR, Chung DR et al. Evaluation of PCR-based screening for vancomycin-resistant enterococci compared with a chromogenic agar-based culture method. *J Med Microbiol* 2011; 60: 945-49.
3. Zabicka D, Strzelecki J, Wozniak A, Strzelecki P, Sadowy E, Kuch A et al. Efficiency of the Cepheid Xpert vanA/vanB assay for screening of colonization with vancomycin-resistant enterococci during hospital outbreak. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2012; 101: 671-75.
4. Emameini M, Hosseinkhani F, Jabalameli F, Nasiri MJ, Dadashi M, Pouriran R et al. Prevalence of vancomycin-resistant enterococcus in Iran: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2016; 35: 1387-92.
5. Almyroudis NG, Osawa R, Samonis G, Wetzler M, Wang ES, McCarthy PL et al. Discontinuation of systematic surveillance and contact precautions for vancomycin-resistant enterococcus (VRE) and its impact on the incidence of VRE *E. faecium* bacteremia in patients with hematologic malignancies. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2016; 37: 398-403.
6. Cekin Y, Erman Daloğlu A, Oğünç D, Ozhak Baysan B, Dağlar D, Inan D et al. Evaluation of vancomycin resistance 3 multiplexed PCR assay for detection of vancomycin-resistant enterococci from rectal swabs. *Ann Lab Med* 2013; 33: 326-30.
7. Suwantarat N, Roberts A, Prestridge J, Seeley R, Speser S, Harmon C et al. Comparison of Five Chromogenic Media for Recovery of Vancomycin-Resistant Enterococci from Fecal Samples. *Journal of Clinical Microbiology* 2014; 52: 4039-42.
8. Kuch A, Stefaniuk E, Ozorowski T, Hryniewicz W. New selective and differential chromogenic agar medium, chromID VRE, for screening vancomycin-resistant *Enterococcus* species. *J Microbiol Methods* 2009; 77: 124-26.
9. Gülay Z. Çoklu dirençli hastane enfeksiyonu etkenlerinin kontrolünde hızlı tanı testleri. *ANKEM Derg* 2009; 23: 193-200
10. Ledebøer NA, Das K, Eveland M et al: Evaluation of a novel chromogenic agar medium for isolation and differentiation of vancomycin resistant *Enterococcus*, *J Clin Microbiol* 2007; 45: 556-60.

To cite this article: Gocer H, Turkyilmaz E, Unlu A, Durukan AB. Evaluation of arrhythmic effects of clarithromycin usage in patients with acute coronary syndrome via new parameters of 12 lead electrocardiography. Turk J Clin Lab 2019; 10: 324-328.

## ■ Original Article

# Evaluation of arrhythmic effects of clarithromycin usage in patients with acute coronary syndrome via new parameters of 12 lead electrocardiography

## *Akut koroner sendromlu hastalarda 12 ledli elektrokardiyografi yeni parametreleri kullanılarak klaritromisinin aritmik etkilerinin değerlendirilmesi*

Hakan GOCER\*<sup>1</sup> , Erdem TURKYILMAZ<sup>1</sup> , Ahmet UNLU<sup>2</sup> , Ahmet Baris DURUKAN<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Medical Park Usak Hospital, Department of Cardiology, Usak/TURKEY

<sup>2</sup>Medical Park Usak Hospital, Department of Cardiovascular Surgery, Usak/TURKEY

### Abstract

**Aim:** Clarithromycin is a widely used macrolide antibiotic with arrhythmic effects causing torsade de pointes by elongating QT interval. Clarithromycin was used to treat acute coronary syndrome. we aimed to determine the acute effects of short-term clarithromycin treatment on novel ECG parameters in patients with acute coronary syndrome.

**Material and Methods:** The study we conducted in 2002 evaluated the effects of clarithromycin on endothelial functions and QTdispersion. We recently analyzed these patients' ECGs performed before and one week after of 1000 mg/day clarithromycin treatment. We analyzed newly recognized parameters; Tp-e interval, Tp-e/QTc ratio, maximum QTc, minimum QTc, QTc dispersion values, P-maximum, P-minimum and P-wave dispersion to indicate the risk of atrial and ventricular arrhythmias.

**Results:** There were 40 patients included where 20 were treated with clarithromycin and 20 not. In the clarithromycin group, mean age of the patients was 53.2±8.0 and in control group 58.9±11.6. Demographic characteristics of patients were similar. All ECG parameters were comparable prior to clarithromycin treatment. However, following therapy, all parameters including max QTc, min QTc, QTc dispersion, Tp-e interval, TP-e/QTc, Pmax, Pmin, and P-wave dispersion were statistically significantly higher in clarithromycin treated group (p<0.05 for each).

**Conclusion:** Clarithromycin treatment not only affects QT parameters but also novel ECG parameters Tp-e interval and Tp-e/QTc ratio showing the risk of ventricular arrhythmias. It also affects P-wave parameters and dispersion that shows risk of atrial arrhythmias. We may conclude that clarithromycin treatment increases both ventricular and atrial arrhythmic risk during acute coronary syndromes.

**Key words:** clarithromycin; arrhythmias; cardiac; acute coronary syndrome

Corresponding author\*: Hakan Göçer, Medical Park Usak Hospital, Department of Cardiology, Usak/TURKEY

E-mail: hgocer@gmail.com

ORCID: 0000-0002-9644-9579

Received: 30.04.2019 accepted: 19.08.2019

Doi: 10.18663/tjcl.559313

## Öz

**Amaç:** Klaritromisin yaygın olarak kullanılan kardiyak aritmik etkileri olan, QT uzaması ile torsade de point'e sebep olan mikrolit antibiyotiktir. Eskiden akut koroner sendrom tedavisinde de kullanılmıştır. Bu çalışmanın amacı akut koroner sendromlu hastalarda kısa dönem klaritromisin kullanımının aritmik riski gösteren yeni EKG parametreleri üzerine olan etkisinin gösterilmesidir.

**Gereç ve Yöntemler:** 2002 yılında yürütülen akut koroner sendromu hastalarda 1000 mg/gün bir hafta klaritromisin tedavisinin endotel disfonksiyonu ve QT dispersiyonu üzerine olan etkilerinin gösterildiği çalışmanın EKG'leri geriye dönük olarak yeniden yeni EKG parametreleri için analiz edilmiştir. Atriyal ve ventriküler artmış aritmi riskini gösteren bu yeni EKG parametreleri; Tp-e interval, Tp-e/QTc oranı, maximum QTc, minimum QTc, QTc dispersionu, P-maximum, P-minimum ve P dalga dispersiyonu incelenmiştir.

**Bulgular:** 40 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. 20 hasta klaritromisin tedavisi almış yirmisi almamıştır. Klaritromisin tedavisi alan gurupta ortalama yaş  $53,2 \pm 8,0$ 'dır. Kontrol gurubunda  $58,9 \pm 11,6$ 'dır. Demografik karakterler ve tedavi öncesi EKG parametreleri her iki grup için benzerdir ve karşılaştırılabilir. Fakat tedavi sonrası max QTc, min QTc, QTc dispersiyonu, Tp-e interval, TP-e/QTc, Pmax, Pmin ve P dalga dispersiyonu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde klaritromisin ile tedavi edilen gurupta kontrol gurubuna göre yüksektir ( $p < 0.05$ , her bir parametre için).

**Sonuç:** Klaritromisin tedavisi QT parametreleri yanı sıra yeni EKG parametreleri olan ve artmış ventriküler aritmi riskini gösteren Tp-e interval ve Tp-e/QTc oranını etkiler. Bununla birlikte atrial fibrilasyon artmış risk faktörü olan P-dalga parametreleri ve dispersiyonunu da etkiler. Tüm bu sonuçlardan akut koroner sendromlarda klaritromisin tedavisinin ventriküler ve atriyal aritmik riski arttırdığı çıkarılabilir.

**Anahtar kelimeler:** klaritromisin; aritmiler, kardiyak; akut koroner sendrom

## Introduction

Avast number of drugs including some antibiotics causes prolongation of the QT interval and are associated with increased risk of ventricular arrhythmias like torsades de pointes (TdP) [1]. They play role in inhibition of the cardiac rapid delayed rectifier potassium current (IKr), which has major role in ventricular electrical repolarization. A well-known feature of these drugs correlated with acquired long QT syndrome and TdP is their ability to produce pharmacological inhibition of the activity of the "human Ether-a-go-go Related Gene"(hERG) potassium ion channel and its native cardiac equivalent IKr [2]. Macrolide antibiotics including clarithromycin have also been demonstrated to inhibit the hERG channel current (IhERG) [3, 4]. Chlamydia pneumonia infections are believed to play role in the pathogenesis of atherosclerosis via inflammatory pathways. Chlamydia pneumonia seropositive patients had four-fold higher risk than seronegative patients in occurrence of cardiovascular events Antibiotics like clarithromycin are used in treatment of acute coronary syndromes, because the cytokines and proteolytic enzymes can trigger inflammation. However, the results are not conclusive [5]. Clarithromycin is a commonly used macrolide antibiotic also in treatment of chlamydia

infections [6-8]. It may affect QT parameters such as Tp-e interval, Tp-e/QTc and P wave dispersion. The predisposition to ventricular arrhythmias in macrolide treatment has been demonstrated just via QT parameters. But the changes in other electrocardiographic parameters (Pmax, Pmin and P-wave dispersion) related to atrial arrhythmia risk are unknown[9]. We aimed to demonstrate of the predisposition of atrial and ventricular arrhythmia risk in clarithromycin treatment via these new and old parameters of ECG.

## Material and Methods

In 2002, Gocer H. et al. conducted a study named " acute effect of short term clarithromycin treatment on endothelial function in patients with acute coronary syndrome" (5). Forty patients with acute coronary syndrome was studied then for documenting the effects of clarithromycin treatment where 20 were treated and 20 not. In clarithromycin group, patients received 1000 mg/day (2x500 mg) po in addition to standard  $\beta$ -blocker, conventional heparin, nitrate and statin therapy. A 12 lead ECG (AT-102, Schiller AG, and Baar, Switzerland) was recorded for every patient at admission to hospital and after one week of acute coronary syndrome treatment. Recordings were acquired at a paper speed of 50 mm/s, with

1 mV/cm standardization. We retrospectively re-analyzed the ECGs of patients and documented Tp-e interval, Tp-e/QTc ratio, maximum QTc, minimum QTc, QTc dispersion values, P-maximum, P-minimum and P wave dispersion. We improved our accuracy using calipers and magnifying lenses. The onset of the P wave was defined as the first atrial deflection from the isoelectric line, and the offset was the return of the atrial signal to the baseline. The maximum and minimum P wave duration were measured and their differences were defined as the P dispersion [10,11]. The QT interval was measured from the beginning of the QRS complex to the end of the T wave and corrected for the heart rate using the Bazett formula:  $cQT = QT \sqrt{(R-R \text{ interval})}$  [12]. The Tp-e interval was defined as the interval between the peak and end of the T wave, measurements of the Tp-e interval were performed from precordial leads, and the Tp-e/QTc ratio was calculated from these measurements [13,14].

The study was conducted according to the latest version of Helsinki Declaration. The study protocol was approved by local ethics committee in 2002 and due to retrospective nature of the study and since same ECGs on that study were restudied, informed consent was waived.

### Statistical Analysis

All results are expressed as the mean ± SD. Univariate analysis was performed using Student t-test. Categorical data were compared against a chi-squared distribution. Linear regression analysis was used to determine the relationship between continuous variables. A p value <0.05 was regarded as significant.

### Results

In the clarithromycin group, the mean age of the patients was  $53.2 \pm 8.0$  and in control group  $58.9 \pm 11.6$ . The male/female ratio was 9:11 in treated group and 12:8 in control. All demographic characteristics are depicted in Table 1 and all were comparable between groups. The Tp-e interval, Tp-e/QTc ratio, maximum QTc, minimum QTc, QTc dispersion values, P-maximum, P-minimum and P wave dispersion values prior to treatment are designated in Table 2 and were comparable. All the ECG measurements following treatment are shown in Table 3 where the Tp-e interval, Tp-e/QTc ratio, maximum QTc, minimum QTc, QTc dispersion, P wave dispersion, P-max and P-min were statistically significantly higher in clarithromycin treatment group-1 compared to standard therapy group ( $p < 0.05$  for each).

**Table 1.** Demographic Characteristics of Patients

	Treatment Group (n:20)	Control Group (n:20)	p-value*
Age (year)	53.2 ± 8	58.9 ± 11.6	0.37
Male/Female	9:11	12:8	0.39
Smoker	15 (75%)	16 (80%)	0.40
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	25 ± 4	26 ± 5	0.48
History of CAD	5 (25%)	7 (35%)	0.39
Previous Arrhythmia	3 (15%)	4 (20%)	0.36
*chi-square			
BMI: Body mass index		CAD: Coronary artery disease	

**Table 2.** Comparison of the electrocardiographic parameters prior to therapy

	Treatment Group (n:20)	Control Group (n:20)	p-value*
Maximum QTc interval (ms)	199.7 ± 18.8	193.3 ± 14.6	0.260
Minimum QTc interval (ms)	95.8 ± 12.7	96.8 ± 11.2	0.340
QTc dispersion (ms)	72.0 ± 31.0	73.0 ± 30.0	0.420
Tp-e interval (ms)	70.65 ± 11.28	69.00 ± 11.26	0.646
Tp-e/QTc ratio	0.19 ± 0.04	0.24 ± 0.22	0.375
Pmax	197.25 ± 13.75	193.45 ± 27.81	0.587
Pmin	96.90 ± 7.71	93.65 ± 7.65	0.189
Pd	100.35 ± 18.23	99.80 ± 29.42	0.944
*Independent Samples t-test			

**Table 3.** Comparison of the electrocardiographic parameters following clarithromycin therapy

	Treatment Group (n:20)	Control Group (n:20)	p-value*
Maximum QTc interval (ms)	299.7 ± 18.8	198.3 ± 14.6	<0.001
Minimum QTc interval (ms)	293.8 ± 13.7	108.0 ± 13.2	<0.001
QTc dispersion (ms)	96.0 ± 49.0	76.0 ± 41.0	<0.001
Tp-e interval (ms)	91.35 ± 11.08	72.20 ± 10.26	0.000
Tp-e/QTc ratio	0.40 ± 0.15	0.22 ± 0.08	0.000
Pmax	297.50 ± 28.97	204.80 ± 21.29	0.000
Pmin	153.70 ± 39.62	95.80 ± 9.05	0.000
Pd	143.80 ± 36.55	109.00 ± 23.95	0.001
*Independent samples t-test			

### Discussion

Macrolide antibiotics prolong QT interval and increase QT dispersion via pharmacological inhibition of the activity of the I<sub>h</sub>ERG and its native cardiac equivalent, the delayed rectifier I<sub>Kr</sub>. Ventricular repolarization harmony is disturbed which leads to prolongation of repolarization phase of cardiac cycle and finally risk of ventricular arrhythmia increases [15,16]. However, multiple large retrospective clinical studies investigating the arrhythmic risk of the macrolides in practice have yielded conflicting results [17,18].



The surface 12 lead electrocardiogram is a common, practical medical tool used for predicting atrial and ventricular arrhythmogenic risk in daily clinical practice. The QT interval and its correction by heart rate (QTc), QT interval dispersion, and recently documented and published markers such as the Tp-e interval and Tp-e/QTc ratio have been proposed as markers for predicting the development of malign cardiac ventricular arrhythmias and recommended as alternatives for the risk stratification of sudden cardiac death in patients with several medical conditions [19,20]. One of these is the acute coronary syndromes and has been demonstrated to change the duration of the QT interval, increase repolarization heterogeneity as an increase in QT dispersion and prolong the duration of the maximum electrocardiographic QT interval. Several pathologic reasons have been proposed to be related with the prolongation of the QT interval secondary to acute myocardial ischemia: changes in the myocardial response to catecholamine and cholinergic stimulation, perturbation of calcium or potassium ion channels, or induction of changes in the intracellular hydrogen concentration.[19,20].

One of the most important of these parameters is Tp-e/QTc which is a measure of spatial dispersion of ventricular repolarization [20, 21].

Prolonged P wave duration and increased P-dispersion have been showed as a marker for increased risk for atrial fibrillation characterized by inhomogeneous and discontinuous atrial conduction [22].

In this study, we tried to demonstrate the risk of atrial and ventricular arrhythmias in patients using clarithromycin during acute coronary syndromes with these new repolarization parameters in our study. We found that QTc, QT interval dispersion, P wave dispersion, Tp-e interval and T-e/QTc ratio can be used all together in clarithromycin using patients with acute coronary syndromes to define arrhythmia risk. We showed that, besides of old ECG parameters for indicating ventricular arrhythmia risk, newly described parameters like Tp-e interval and Tp-e/QTc have additional value. We also found that P dispersion is increased in the clarithromycin treatment group and it shows the increased risk for atrial fibrillation. But it should be taken into consideration that we did not observe any atrial or ventricular arrhythmia after clarithromycin treatment. We didn't try to evaluate clarithromycin's effect on acute coronary syndrome, because the role of antibiotics in acute coronary syndromes is debatable [23-25]. Also Clarithromycin has an inhibitor effect

on cytochrome CYP3A4 and so should not be used with statins that are extensively metabolized by that enzyme. Besides clarithromycin can interact with acute coronary syndrome treatment and can increase some arrhythmic effect of some drugs (15,16).

## Conclusion

Antibiotherapy especially with macrolides requires close observation of ECG in acute coronary syndrome in the setting if the use of antibiotics are obliged. Other antibiotics rather than clarithromycin must be preferred. If the use of macrolides is mandatory, the close observation of the surface ECG with new parameters for atrial and ventricular arrhythmia (Tp-e interval and Tp-e/QTc, P-dispersion) must be performed during acute coronary syndromes.

## Declaration of conflict of interest

The authors received no financial support for the research and/or authorship of this article. There is no conflict of interest.

## References

1. Gysel M, Vieweg W, Hasnain M, Hancox J, Kunanithy V, Baranchuk A. Torsades de pointes following clarithromycin treatment. *Expert Rev Cardiovascular Ther* 2013; 11: 1485-93.
2. Kaab S, Crawford D, Sinner M et al. A large candidate gene survey identifies the KCNE1 D85N polymorphism as a possible modulator of drug-induced torsades de pointes. *Circ Cardiovasc Genet* 2012; 5: 91-99.
3. Hancox J, McPate M, El Harchi A, Zhang Y. The hERG potassium channel and hERG screening for drug-induced torsades de pointes. *Pharmacol Ther* 2008; 119: 118-32.
4. Abbott G, Sesti F, Splawski I et al. MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* 1999; 97: 175-87.
5. Göçer H, Şekuri, C, Bayturan Ö al. Akut Koroner Sendromlarda Kısa Süreli Klaritromisin Tedavisinin Akıma Bağlı Vazodilatasyon ve QT Dispersiyonu Üzerine Ektisi. *Hipokrat Kardiyoloji Dergisi* 2004; 31: 113-17.
6. Vieweg W, Hancox J, Hasnain M, Koneru J, Gysel M, Baranchuk A. Clarithromycin, QTc interval prolongation and torsades de pointes: the need to study case reports. *Ther Adv Infect Dis* 2013; 1: 121-38.
7. Brill F, Gonzalez C, Di Girolamo G. Antimicrobial agents-associated with QT interval prolongation. *Curr Drug Saf* 2010; 5: 85-92.
8. Kirbas A, Kirbas O, Daglar K et al. Novel indexes of arrhythmogenesis in preeclampsia: QT dispersion, Tp-e interval, and Tp-e/QT ratio. *Pregnancy Hypertens* 2016; 6: 38-41.



9. Tukek T, Yildiz P, Akkaya V et al. Factors associated with the development of atrial fibrillation in COPD patients: the role of P-wave dispersion. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 2002; 7: 222–27.
10. Kose S, Aytemir K, Sade E et al. Detection of patients with hypertrophic cardiomyopathy at risk for paroxysmal atrial fibrillation during sinus rhythm by P-wave dispersion. *Clin Cardiol* 2003; 26: 431- 34.
11. Malik M, Batchvarov VN. Measurement, interpretation and clinical potential of QT dispersion. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 1749-66.
12. Castro Hevia J, Antzelevitch C, Tornes Barzaga F et al. Tpeak-Tend and Tpeak-Tend dispersion as risk factors for ventricular tachycardia/ventricular fibrillation in patients with the Brugada syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47: 1828-34.
13. Braschi A, Abrignani MG, Francavilla VC, Abrignani V, Francavilla G. Age- and sex-based reference ranges for non-invasive ventricular repolarisation parameters. *Int J Clin Pract* 2017; 71: 12949.
14. Lin L, Horigome H, Nishigami N, Ohno S, Horie M, Sumazaki R. Drug-induced QT-interval prolongation and recurrent torsade de pointes in a child with heterotaxy syndrome and KCNE1 D85N polymorphism. *J Electrocardiol* 2012; 45: 770-73.
15. Li DQ, Kim R, McArthur E et al. Risk of adverse events among older adults following co-prescription of clarithromycin and statins not metabolized by cytochrome P450 3A4. *CMAJ* 2015; 187: 174-80.
16. Wong AYS, Root A, Douglas IJ, Chui CS, Chan EW, Ghebremichael-Weldeselassie Y et al. Cardiovascular outcomes associated with use of clarithromycin: population based study. *BMJ* 2016; 352.
17. Chou HW, Wang JL, Chang CH, Lai CL, Lai MS, Chan KA. Risks of cardiac arrhythmia and mortality among patients using new-generation macrolides, fluoroquinolones, and beta-lactam/beta-lactamase inhibitors: a Taiwanese nationwide study. *Clin Infect Dis* 2015; 60: 566-77.
18. Trac MH, McArthur E, Jandoc R et al. Macrolide antibiotics and the risk of ventricular arrhythmia in older adults. *Can Med Assoc J* 2016; 188: 120–29.
19. Elming H, Holm E, Jun L et al. The prognostic value of the QT interval and QT interval dispersion in all-cause and cardiac mortality and morbidity in a population of Danish citizens. *Eur Heart J* 1998; 19: 1391-400.
20. Castro Hevia J, Antzelevitch C, Tornes Barzaga F et al. TpeakTend and Tpeak-Tend dispersion as risk factors for ventricular tachycardia/ventricular fibrillation in patients with the Brugada syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47: 1828-34.
21. Castro-Torres Y, Carmona-Puerta R, Katholi RE. Ventricular repolarization markers for predicting malignant arrhythmias in clinical practice. *World J Clin Cases* 2015; 3: 705-20.
22. Dilaveris PE, Gialafos JE. P-wave dispersion: a novel predictor of paroxysmal atrial fibrillation. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 2001; 6: 159-65.
23. Cercek B, Shah PK, Noc M et al. Effect of short-term treatment with azithromycin on recurrent ischaemic events in patients with acute coronary syndrome in the Azithromycin in Acute Coronary Syndrome (AZACS) trial: a randomised controlled trial. *Lancet* 2003; 361: 809-13.
24. Kutlin A, Roblin MP, Hammerschla, Dunne M et al. Azithromycin for the secondary prevention of coronary heart disease events. The WIZARD study: A randomized controlled trial. *JAMA* 2003; 290: 1459-66.
25. Gurfinkel E, Bozovich G, Beck E, Testa E, Livellara B, Mautner B. Treatment with the antibiotic roxithromycin in patients with acute non-Q-wave coronary syndromes. The final report of the ROXIS study. *Eur Heart J* 1999; 20: 121-27.

Original Article

## Medication adherence after myocardial infarction: A single center retrospective cohort study

### *Miyokard infarktüsü sonrası ilaç uyumu: Tek merkezli retrospektif kohort çalışması*

Ufuk Tan BAYRAM<sup>1</sup> , Kursat AKBUGA<sup>2\*</sup> , Mustafa KARANFIL<sup>3</sup> , Mehmet Akif DUZENLİ<sup>4</sup> 

<sup>1</sup>Yozgat City Hospital, Cardiology Clinic, Yozgat/TURKEY

<sup>2</sup>Ufuk University, Faculty of Medicine, Department of Cardiology, Ankara/TURKEY

<sup>3</sup>Ankara City Hospital, Department of Cardiology, Ankara/TURKEY

<sup>4</sup>Necmettin Erbakan University, Meram Faculty Of Medicine, Department of Cardiology, Konya/TURKEY

#### Abstract

**Aim:** The study is designed to compare the discharge prescriptions of ST-elevated (STEMI) and non ST-elevated (NSTEMI) myocardial infarction patients and the medications used end of first year and also to investigate the relationship between MI type, gender, age groups and drug adherence.

**Material and Methods:** In retrospect, data from 413 patients were collected via epicrisis and phone visits. Discharge and the outpatient medications end of one year were compared.

**Results:** Of the 413 patients included in the study, 312 (75%) were male. MI type distribution was NSTEMI with a ratio of 38.5% (n = 159) and STEMI with a ratio of 61.5% (n = 254). Only 2 (0.5%) patients did not receive acetylsalicylic acid (ASA) at discharge. The rate of beta-blocker, statin, clopidogrel users were %94.4, %97.1 and %97.8, respectively. The rate of patients who used five drugs (ASA, beta blocker, ACEI/ARB, statin, clopidogrel) at discharge was 78.7% (n = 325). At the end of first year, the rate of ASA, statin, beta blocker, angiotensin converting enzyme inhibitors/aldosterone receptor blocker(ACEI/ARB) and clopidogrel users dropped down to 88.1% (n = 364), 66% (n = 273), 80.9% (n = 334), 69.7% (n = 288) and 81.3% (n = 336), respectively(p<0.05 for all parameters). After one year, the number of patients using five drugs dropped to %45(p<0.05). Beta-blocker target dose was achieved in 68(16.5%) patients and ACEI / ARB target dose was achieved in 74(17.9%) patients. Patients with renal failure were not able to reach the target doses of ACEI/ARB at the end of first year (p: 0,033). And also renal failure is considered as an impediment to proper drug use at discharge and end of the first year (p <0.01 and p<0.01 respectively).

**Conclusion:** It was determined that treatment compliance was impaired at the end of one year in a significant proportion of patients with acute coronary syndrome. One year later, compliance with treatment was higher in females than in males and was inversely related to age and renal failure. It is observed that follow-up training programs are needed to succeed in drug adherence.

**Keywords:** acute coronary syndrome; therapeutic adherence; maximal tolerated dose

Corresponding author\*: Kürşat Akbuğa, Ufuk University, Faculty of Medicine, Department of Cardiology, Ankara/TURKEY

E-mail: akbuga\_1453@hotmail.com

ORCID: 0000-0002-7716-6143

Received: 24.04.2019 accepted: 16.08.2019

Doi: 10.18663/tjcl.557476

## Öz

**Amaç:** Çalışma, ST yükselmeli (STEMI) ve ST yükselmez (NSTEMI) miyokard infarktüsü hastaların taburculuk reçetelerini ve birinci yıl sonundaki kullanılan ilaçlarını karşılaştırmak ve ayrıca bunların MI tipi ile cinsiyet, yaş arasındaki ilişkisini araştırmak için tasarlanmıştır.

**Gereç ve Yöntemler:** Retrospektif olarak 413 hastanın verileri epikriz ve telefon ziyaretleri yoluyla toplandı. Taburculuk ve bir yıl sonunda kullanılan ilaçları karşılaştırıldı.

**Bulgular:** Çalışmaya dahil edilen 413 hastanın 312'si (% 75) erkekti. MI tipi dağılımı % 38.5 (n=159) NSTEMI, % 61.5 (n=254) STEMI'di. Sadece 2 (% 0.5) hasta taburcu olduklarında asetilsalisilik asit (ASA) almadı. Beta-bloker, statin, klopidogrel kullanıcılarının oranı sırasıyla % 94.4, % 97.1 ve % 97.8'di. Taburculukta beşli ilaç (ASA, beta bloker, ADEİ / ARB, statin, klopidogrel) kullanan hastaların oranı % 78.7'di (n=325). İlk yılın sonunda, ASA, statin, beta bloker, anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri / aldosteron reseptör bloker (ADEİ / ARB) ve klopidogrel kullananların oranı sırasıyla; % 88.1'e (n=364), % 66'ya (n=273), % 80.9'a (n = 334), % 69.7'ye (n=288) ve % 81.3'e düştü (n=336) (tüm parametreler için p <0.05). Bir yıl sonra, beşli ilaç kullanan hasta sayısı % 45'e düştü (p <0.05). 68 hastada (% 16.5) beta blokör hedef dozu, 74 hastada (% 17.9) ADEİ / ARB hedef dozu sağlandı. Böbrek yetmezliği olan hastalar birinci yıl sonunda ADEİ / ARB hedef dozlarına ulaşamadı (p: 0,033). Ayrıca böbrek yetmezliğinin taburculuk sırasında ve ilk yılın sonunda uygun ilaç kullanımına engel olduğu gözlemlendi (sırasıyla p <0.01 ve p <0.01).

**Sonuç:** Akut koroner sendromlu hastaların önemli bir bölümünde tedavi uyumu bir yıl sonunda bozulmuş bulundu. Bir yıl sonra, tedaviye uyum kadınlarda erkeklere göre daha yüksekti, yaş ve böbrek yetmezliği ile ters orantılıydı. İlaç uyumunda başarılı olmak için takip eğitim programlarına ihtiyaç duyulduğu gözlemlendi.

**Anahtar kelimeler:** akut koroner sendrom; terapötik uyum; maksimal tolere edilen doz

## Introduction

In patients with CAD (coronary artery disease), patients with medications such as aspirin, angiotensin converting enzyme inhibitors (ACEI), beta-blockers, and statins were found to have a significant increase in survival. Data indicate that the success of compliance to these drugs is low. Discharge prescriptions and content of these prescriptions are considered as the main criteria of success in patients with acute coronary syndrome[1]. A limited number of data indicate that these prescriptions are written appropriately, but in time patients' compliance with these prescriptions is reduced[2-5]. After acute MI (myocardial infarction), 24% of the patients do not take all of their medications during the first week of discharge and 1/3 of them leave at least 1 drug in one month[6-7]. In this study, we compared the patients' discharge medications and the medications used at the end of one year in our clinic and evaluated whether the appropriate drug was prescribed and the patient's compliance.

## Material and Methods

### Study Population

Patients aged between 18 and 100, who were diagnosed with STEMI and NSTEMI, hospitalized in intensive care unit were included in the study. Patients who were not followed for one

year, those unable to access their records, those who were diagnosed myopericarditis or etc later on, those who were not in the age range of 18-100 and on vitamin K antagonist or new generation oral anticoagulants were excluded. In retrospect, 450 patients were screened from the hospital data system, and data from epicrisis and telephone visits and 413 patients were included in the study. Records of 37 patients could not be reached via registry system or phone visits. Discharge prescriptions and 1 year outpatient control medications were compared. Phone visits were made for ones who did not come to the control visits.

Our study was carried out with the approval of NEU Meram Faculty of Medicine, Non- drug and Non-device Research Ethics Committee dated 18/09/2015 and numbered 2015/322. Informed constants were obtained from all patients.

We have defined the evidence based target doses according to the heart failure guidelines[8].

### Statistical Analysis

If the descriptive measures of the variables were categorical, the frequency and percentage ratios were used; If the descriptive measurements of the variables were numerical, mean  $\pm$  ss (median, min, max) were used. All discrete and continuous variables were analyzed by Kolmogorov-Smirnov test method.

Since two main groups of patients were identified, Student's



t-test was used for group comparisons where normal distribution was appropriate, and nonparametric Mann-Whitney U test was used for variables not normally distributed. In order to determine the relationship between categorical variables, Monte Carlo corrected chi-square analysis was used. In order to determine whether the change between the categorical variables of repetitive measurements was significant, a cross-table was prepared and the McNemar test statistic was calculated.

To determine the direction and magnitude of the relationship between continuous variables, Pearson Correlation was used,

Spearman's Rho Correlation analyzes were performed for variables that did not meet normal distribution. Type-I error level was taken as 5% and  $p < 0.05$  was accepted as statistically significant. All analyzes were performed using SPSS 20.0 package program.

### Results

Of the 413 patients included in the study, 25% (n = 101) were female. The diagnoses were NSTEMI with a rate of 38.5% (n = 159) and STEMI with a rate of 61.5% (n = 254). Patients characteristics and drug usage according to MI type were shown in table 1.

**Table 1.** Patient information, morbidities and one-year follow-up drug use of MI types

		NSTEMI (n=159)	STEMI(n=254)	p
Age	mean±sd	63,98±12,79	62,99±12,29	0,341
Follow-up	mean±sd	12,38±0,99	12,46±1,03	0,447
Gender	Male (%)	107 (%67,3)	205 (%80,7)	0,002*
	Female (%)	52 (%32,7)	49 (%19,3)	
Morbidity	Family History	19 (11,9)	21 (%8,3)	0,219
	Hypertension	94 (%59,1)	105 (%41,3)	<0,001*
	CAD	55 (%34,6)	73 (%28,7)	0,211
	Dislipidemia	48 (%30,2)	76 (%29,9)	0,954
	DM	52 (%32,7)	65 (%25,6)	0,119
	Smoker	47 (%29,6)	72 (%28,5)	0,810
	CRF	15 (%9,4)	31 (%12,2)	0,384
Treatment	Medical	27 (%17)	14 (%5,5)	0,200
	PCI	111 (%69,8)	221 (%87)	
	CABGO	21 (%13,2)	19 (%7,5)	
Drugs Used	ASA (discharge)	157 (%98,7)	254 (%100)	0,074
	Beta bloker (discharge)	147 (%92,5)	243 (%95,7)	0,166
	ACEI/ARB. (discharge)	136 (%85,5)	222 (%87,4)	0,587
	Statin (discharge)	154 (%96,9)	247 (%97,2)	0,819
	Clopidogrel (discharge)	153 (%96,2)	251 (%98,8)	0,079
	Five Drugs (discharge)	118 (%74,2)	207 (%81,5)	0,079
	ASA (end of 1 year)	138 (%86,8)	226 (%89)	0,505
	Statin (end of 1 year)	100 (%63,3)	172 (%67,7)	0,357
	Beta bloker (end of 1 year)	131 (%82,4)	203 (%79,9)	0,535
	ACEI/ARB. (end of 1 year)	116 (%73)	172 (%67,7)	0,260
	Clopidogrel (end of 1 year)	131 (%82,4)	203 (%80,6)	0,643
Five drugs (end of 1 year)	73 (%45,9)	113 (%44,5)	0,777	

The rate of patients who used all five drugs (ASA, beta blocker, ACEI / ARB, statin, clopidogrel) on discharge was 78.7% (n = 325). Rates of those using beta-blocker, ADEI / ARB, statin and Clopidogrel (including those using Ticagrelor and prasugrel) were %94.4 (n = 390) %86.7 (n = 358), %97.8 (n = 401) and %97.8 (n = 404), respectively.

The percentage of those who continued to use ASA after one year dropped to 88.1% (n = 364), the percentage of those who continued to use statin decreased to 66% (n = 273), while the proportion of those who continued to use beta-blockers to 80.9% (n = 334). The percentage of those who continued to

use ACEI / ARB dropped to 69.7% (n = 288). The percentage of those who continued to use clopidogrel decreased significantly (81.3%; n = 336). After one year, the number of patients using five drugs fell to 45% (n = 186).

When the patients were evaluated according to MI types at discharge and one year follow-up; drug use rates decreased in all MI types after one year. There was a significant decrease in the use of all drugs separately and 5 drugs together ( $p < 0.01$ ).

All patients in the STEMI group continued to use ASA. The highest decrease in NSTEMI type patients was seen in the use

of five drugs (40%) and the least decrease was observed in beta blocker use (18%). In the STEMI type, the highest decrease was still in the use of five drugs (34%) and the lowest proportional decrease was in patients using clopidogrel (17%) (Table 1).

In Table 2, the relationship between the drug use and the morbidity of the patients was examined. There was a significant

relationship between the five-drug ratio and CRF and type of treatment when patients were discharged. The rate of CRF was higher in patients who did not use 5 drugs (%30.7) than those discharged with five drugs(%5.8;  $p < 0.001$ ). The ratio of patients who used five drugs (% 83,7) was higher in the PCI group ( $p = 0,004$ ) compared to those treated medically or with CABGO(%14.8 and %17 respectively) ( $p=0.004$ ).

**Table 2.** The relationship between the drug use and the morbidity of the patients

	Discharged with 5 drugs (413)			5 drugs at the end of 1 year (413)		
	No(%)	Yes(%)	p	No(%)	Yes(%)	p
HT	50 (%56,8)	149 (%45,8)	0,068	101 (%44,5)	98 (%52,7)	0,098
CAD	22 (%25)	106 (%32,6)	0,171	63 (%27,8)	65 (%34,9)	0,116
HL	20 (%22,7)	104 (%32,0)	0,093	51 (%22,5)	73 (%39,2)	<0,001*
DM	27 (%30,7)	90 (%27,7)	0,581	70 (%30,8)	47 (%25,3)	0,212
Family History	5 (%5,7)	35 (%10,8)	0,153	17 (%7,5)	23 (%12,4)	0,096
Smoke	24 (%27,3)	95 (%29,3)	0,707	65 (%28,8)	54 (%29,0)	0,952
CRF	27 (%30,7)	19 (%5,8)	<0,001*	37 (%16,3)	9 (%4,8)	<0,001*
Treatment						
Medical	13 (%14,8)	28 (%8,6)	0,004*	26 (%11,5)	15 (%8,1)	0,010*
PCI	60 (%68,2)	272 (%83,7)		171 (%75,3)	161 (%86,6)	
CABGO	15 (%17,0)	25 (%7,7)		30 (%13,2)	10 (%5,4)	

In the study, it was seen that the target dose of beta-blocker was reached in 68 patients (16.5%) and 74 (17.9%) patients reached to ACEI / ARB target dose. The mean age difference of patients with beta-blocker target dose was statistically significant in NSTEMI ( $p = 0.015$ ). The mean age was 58 years in the target dose group and 65 in the group who could not

reach the target dose. The use of beta-blockers was lower in the elderly.

The rate of patients who had reached ACEI / ARB target dose was significantly higher in patients with HT ( $p < 0.001$ ) (Table 3). Patients with CRF, the rate of those who reached the ACEI / ARB target dose was significantly lower ( $p = 0.033$ ).

**Table 3.** The relationship between beta blocker and ACEI / ARB target dose rates and morbidity

	Beta-blocker target dose (413)			ACEI/ARB target dose (413)		
	No (%)	Yes (%)	p	No (%)	Yes (%)	p
HT	162 (%47)	37 (%54,4)	0,261	139 (%41)	60 (%81,1)	<0,001*
CAD	106 (%30,7)	22 (%32,4)	0,791	103 (%30,4)	25 (%33,8)	0,567
HL	98 (%28,4)	26 (%38,2)	0,106	99 (%29,2)	25 (%33,8)	0,437
DM	95 (%27,5)	22 (%32,4)	0,421	97 (%28,6)	20 (%27,0)	0,784
Family History	33 (%9,6)	7 (%10,3)	0,853	35 (%10,3)	5 (%6,8)	0,348
Smoker	103 (%29,9)	16 (%23,5)	0,287	104 (%30,8)	15 (%20,3)	0,071
CRF	41 (%11,9)	5 (%7,4)	0,278	43 (%12,7)	3 (%4,1)	0,033*
Treatment						
-Medical	33 (%9,6)	8 (%11,8)	0,238	34 (%10)	7 (%9,5)	0,959
-PCI	282 (%81,7)	50 (%73,5)		272 (%80,2)	60 (%81,1)	
-CABGO	30 (%8,7)	10 (%14,7)		33 (%9,7)	7 (%9,5)	

## Discussion

In this study, discharge prescriptions and drugs used at the end of 1 year were compared in 413 patients who were hospitalized with NSTEMI and STEMI diagnoses. Data on continuity of treatment were obtained.

In our study, the rate of ASA, beta blocker, ACEI/ARB, statin and

clopidogrel use was %99.5 %94.4, %86.7, %97.1 and %97.8, respectively. Six-month follow-up of CAD patients admitted to the Internal Medicine and Cardiology Clinic, while ASA was the most used medication, less than a third of patients were found to use beta-blocker, ACEI / ARB and statin, which is according to our patient group, drug compliance was less in this study[9].



Patients who has been prescribed aspirin in a study conducted in the UK on 2153 patients diagnosed with acute MI, the rates were %88 for males, %82 for females and beta blocker prescription was %47 for males and %33 for females and also lower than our study population[10]. In the EUROASPIRE III study, the compliance of discharge prescription with guideline in CAD patients was examined; Turkey and European data were compared. Beta-blockers (82.5% in Europe, 83.1% in Turkey), ACEI / ARB (69.0% in Europe, 73.6% in Turkey) and statin (79.7% in Europe, 82.3% in Turkey) prescribing rates were slightly lower, according to our results[11]. In a university hospital, 84% of patients with acute MI were prescribed beta blockers, %90 of them were prescribed statins, %61 of them were prescribed ACEI / ARB, and %95 of them were prescribed aspirin. These rates were also lower than our study [12]. In one study including acute MI patients, the rates of drug use after 1 year were 72% for beta blockers and 68% for ACEI/ARB. It was lower than our study[13].

In a study conducted in France, drug use rates of acute MI patients after 30 months were found to be %90.5 for beta blockers %85.6 for ACEI/ARB %84.7 for ASA and %95.3 for clopidogrel. The rate of those who used 4 group medication was %71.1[14]. It was higher than our study.

In the patient population, the ACEI / ARB target dose may not be reached, especially in the patient group with CRF, which may be related to the increase in creatine. Optimal treatment in patients undergoing PCI may be due to the fact that patients undergoing CABGO are discharged from the cardiovascular surgery department and followed up for a while in this department and may be subject to different applications. The fact that the target beta-blocker dose in elderly patients could not be reached can be explained by the more symptomatic course of bradycardia episodes of this patient group and the clinician's concern about this

There were various limitations in our study. Although our study is performed in a local area, it may not reflect the use and compliance of the whole society, but it should be kept in mind that where percutaneous and surgical interventions are performed 7/24. The patients whose data were not reached may have continued their follow-up in different centers but the patients whose data were not reached were excluded from the study. With more comprehensive studies, follow-up treatment recipes can be reviewed from the social security institution.

## Conclusion

In this study, in our country where access to drugs and health services has become easier due to changes in health policies in recent years; We evaluated the effect of this condition on treatments in patients with ACS (acute coronary syndrome). More effective doses can be achieved with frequent controls for ADEI / ARB use, especially in the CRF group.

According to the data obtained from the study; a decrease was observed in the rates of drug use in ACS patients after one year.

In order to reduce the mortality due to CAD, patients should be treated according to the guidelines at discharge and hospital settings.

## Declaration of conflict of interest

The authors received no financial support for the research and/or authorship of this article. There is no conflict of interest.

## References

1. Smith Jr SC, Benjamin EJ, BonowRO et al. AHA/ACCF secondary prevention and risk reduction therapy for patients with coronary and other atherosclerotic vascular disease: 2011 update: a guideline from the American Heart Association and American College of Cardiology Foundation endorsed by the World Heart Federation and the Preventive Cardiovascular Nurses Association. *J Am Coll Cardiol* 2011; 58: 2432-46
2. Butler J, Arbogast PG, BeLue R et al. Outpatient adherence to beta-blocker therapy after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40:1589-95.
3. Mitra S, Findley K, Frohnapple D, Mehta JL. Trends in long-term management of survivors of acute myocardial infarction by cardiologists in a government university-affiliated teaching hospital. *Clin Cardiol* 2002; 25: 16-18.
4. Simpson E, Beck C, Richard H, Eisenberg MJ, Pilote L. Drug prescriptions after acute myocardial infarction: dosage, compliance, and persistence. *Am Heart J* 2003; 145: 438-44.
5. Wei L, Flynn R, Murray GD, MacDonald TM. Use and adherence to beta-blockers for secondary prevention of myocardial infarction: who is not getting the treatment? *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2004; 13: 761-66.
6. Grégoire JP, Moisan J, Guibert Ret al. Determinants of discontinuation of new courses of antihypertensive medications. *J Clin Epidemiol* 2002; 55: 728-35.
7. Newby LK, LaPointe NM, Chen AY et al. Long-term adherence to evidence-based secondary prevention therapies in coronary artery disease. *Circulation* 2006; 113: 203-12.

8. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* 2012; 33: 1787-847.
9. Akgün G, Onat A, Enar R, Alp N. Türkiye'de koroner kalp hastalığı tedavisi kalıpları çalışması. *Türk Kardiyol Dern Ars* 2000; 28: 274-81
10. Hanratty B, Lawlor DA, Robinson MB, Sapsford RJ, Greenwood D, Hall A. Sex differences in risk factors, treatment and mortality after acute myocardial infarction: an observational study. *J Epidemiol Community Health* 2000; 54: 912-16.
11. Tokgözoğlu L, Kaya E. B, Erol Ç, Ergene O. EUROASPIRE III: Türkiye ile Avrupa'nın karşılaştırılması. *Türk Kardiyol Dern Ars* 2010; 38: 164-72
12. Şimşek H, Demiral Y, Aslan Ö, Toğrul BÜ. Bir Üniversite Hastanesinde Koroner Kalp Hastalarına Uygulanan Tedavi Oranları. *DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 2012; 2: 111-17
13. Akincigil A, Bowblis JR, Levin C, Jan S, Patel M, Crystal S. Long-term adherence to evidence based secondary prevention therapies after acute myocardial infarction. *J Gen Intern Med* 2008; 23:115-21.
14. Tuppin P, Neumann A, Danchin N et al. Evidence-based pharmacotherapy after myocardial infarction in France: adherence-associated factors and relationship with 30-month mortality and rehospitalization. *Arch Cardiovasc Dis* 2010; 103: 363-75

Original Article

## Determination of serum YKL-40 levels in patients with brucellosis

### *Bruselloz hastalarında serum YKL-40 düzeylerinin belirlenmesi*

Fikriye Milletli SEZGIN\*<sup>1</sup> , Rukiye NAR<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Ahi Evran University School of Medicine, Department of Medical Microbiology, Kirsehir/TURKEY

<sup>2</sup>Pamukkale University School of Medicine, Department of Biochemistry, Denizli/TURKEY

#### Abstract

**Aim:** To determine serum YKL-40 levels in patients diagnosed with brucellosis.

**Material and Methods:** This study included 40 Brucellosis patients with positive serum agglutination tests and 41 healthy control subjects. The two groups were compared with regard to their serum YKL-40, hematological parameters, and C-reactive protein (CRP) values.

**Results:** The brucellosis patient group presented YKL-40 values of  $15.0 \pm 8.8$  ng/mL, CRP values of  $0.2 \pm 0.1$  mg/dL, a Neutrophil/Lymphocyte ratio (NLR) of  $1.5 \pm 1.0$ , and a Platelet/Lymphocyte ratio (PLR) of  $109.3 \pm 46.4$ . The control group presented YKL-40 values of  $12.7 \pm 6.1$  ng/mL, CRP values of  $1.48 \pm 2.1$  mg/dL, a Neutrophil/Lymphocyte ratio (NLR) of  $2.1 \pm 0.7$ , and a Platelet/Lymphocyte ratio (PLR) of  $147.8 \pm 59.0$ .

**Conclusion:** No significant differences were determined between the YKL-40 levels of the patient and control groups. The patient group manifested significantly higher levels of CRP compared to the control group, and YKL-40 was determined to be positively correlated with CRP, PLT, PLR, NLR and age. However, further studies are needed for the role of YKL-40 in infectious diseases to be understood more clearly.

**Keywords:** brucellosis; YKL-40; diagnostic value

#### Öz

**Amaç:** Bruselloz tanılı hastalarda serum YKL-40 düzeylerini belirlemek.

**Gereç ve Yöntemler:** Bu çalışmaya serum aglütinasyon testi pozitif 40 Bruselloz hastası ve 41 sağlıklı kontrol grubu dahil edilmiştir. İki grup arasında serum YKL-40, hematolojik parametreler ve C reaktif protein (CRP) değerleri karşılaştırılmıştır.

**Bulgular:** Bruselloz hasta grubunda, YKL-40 değeri  $15.0 \pm 8.8$  ng/mL, CRP  $0.2 \pm 0.1$  mg/dL, Nötrofil/ Lenfosit oranı (NLR)  $1.5 \pm 1.0$  ve Platelet/Lenfosit oranı (PLR)  $109.3 \pm 46.4$  idi. Kontrol grubunda, YKL-40 değeri  $12.7 \pm 6.1$  ng/mL, CRP  $1.48 \pm 2.1$  mg/dL, Nötrofil/ Lenfosit oranı (NLR)  $2.1 \pm 0.7$  ve Platelet/Lenfosit oranı (PLR)  $147.8 \pm 59.0$  idi.

**Sonuç:** YKL-40 düzeylerinde hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Hasta grubunda kontrol grubuna göre CRP anlamlı olarak yüksek, bunun yanında YKL-40 ile CRP, PLT, PLR, NLR ve yaş arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. Ancak YKL-40'ın enfeksiyon hastalıklarında rolünün daha iyi anlaşılabilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar kelimeler:** bruselloz; YKL-40; tanısal değeri

Corresponding author\*: Fikriye MİLLETLİ SEZGİN, Ahi Evran University School of Medicine, Department of Medical Microbiology, Kirsehir/TURKEY

E-posta: fikriyemilletli@hotmail.com

ORCID: 0000-0002-8317-2312

Received: 20.10.2018 accepted : 19.11.2018

Doi: 10.18663/tjcl.472868



## Introduction

Brucellosis is an endemic zoonosis that is commonly encountered in humans and animals in developing countries. It is transmitted by the intake of food contaminated with the gram-negative coccobacilli *Brusella spp.*, through breaks in the skin and mucosa during direct contact with infected animals or by the inhalation of infective material. The disease may manifest as a septicemic inflammatory disease or could affect bones, tissues, and other organs in a localized region [1-3].

Brucellosis may present various clinical symptoms including fever, chills, sweats, fatigue, arthralgia, back pain and headache [4]. The clinical diagnosis of brucellosis is made complicated by the variability of the symptoms, lack of differentiating physical symptoms, and the manifestation of subclinical and atypical forms of the disease during both acute and chronic stages. The gold standard test for the diagnosis of brucellosis is bacterial growth in culture [5]. However, serological methods such as the Rose Bengal test, standard tube agglutination (STA) test, STA with Coombs, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) are used more frequently as *Brucella* cultures are difficult, risky, and associated with low bacterial isolation rates [6, 7]. The patients may present laboratory findings such as leukocytosis/leukopenia, relative lymphocytopenia, anemia, thrombocytopenia, high C-reactive protein (CRP), and high erythrocyte sedimentation rate (ESR); however, these do not make a direct contribution to the diagnosis [8].

YKL-40 is a 40 kDa chitinase-like protein. It can be secreted by numerous cells including macrophages, fibroblasts, epithelial cells, vascular endothelial and smooth muscle cells [9, 10]. Its functions in physiological and pathological phenomena are not yet clear; however, it is believed to be involved in certain processes such as inflammation, cell proliferation, apoptosis prevention, extracellular tissue remodelling, and stimulation of angiogenesis [9]. It was also reported to be active in inflammatory situations such as malign diseases, autoimmune disorders, and infections [9, 11, 12].

Brucellosis is a chronic inflammatory disease, and for this reason, it is important that the molecules involved in the inflammatory and immunological cascades are investigated and understood better. We thought that the YKL-40 molecule could contribute to the diagnosis of brucellosis patients due to its role in the inflammatory process. To our knowledge, no

studies exist that have investigated the relationship between Brucellosis and YKL-40. The aim of this study is to compare the serum YKL-40 levels of Brucellosis patients to those of control subjects of similar age and gender.

## Material and Methods

### Study Population

A total of 40 patients with brucellosis aged between 18-70 years and 41 healthy gender-matched controls were enrolled in the study. The diagnosis of brucellosis was established according to a serology test result equal to or higher than a titre of 1:160, using the standard tube agglutination test (STA). The STA test was performed to give a final dilution of 1/40-1/5120. The tubes that did not present agglutination in the end of a 24-hr incubation period were assessed with the Coombs test.

Patients with inflammatory diseases, malignancies, diabetes mellitus, cardiovascular diseases, acute-chronic kidney or liver diseases were excluded from the study. The common clinical finding across patients was knee arthritis. The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki's Good Clinical Practice guidelines and approved by the local ethical committee (2017-18/212). All subjects provided written informed consent before participation in the study.

### Biochemical measurements

Blood samples were obtained following overnight fasting. Hematologic parameters were obtained using a Sysmex XN-1000 (Sysmex Corporation™, Hyogo, Japan) analyser. NLR and PLR were calculated as the ratio of neutrophils to lymphocytes and platelets to lymphocytes, respectively. For CRP and YKL-40 parameters, collected blood samples were centrifuged at 1500 rpm for 10 minutes to separate the serum. CRP was measured by the immunoturbidimetric method with a commercially available kit using an (Roche Diagnostic Corp., Mannheim, Germany) autoanalyzer. Serum was stored at -80°C until the analysis of YKL-40 ELISA test.

We used an enzyme-linked immunosorbent assay kit (Boster Biological Technology, Catalog #:EK0974, USA) in accordance with the manufacturers' instructions to measure serum YKL-40 levels. The measuring range of the YKL-40 ELISA kit was 62,5-4000 pg/mL. Serum samples were diluted 10-fold with a dilution buffer and two wells were used per sample. We read the absorbance at 450 nm with the SPECTRO star Nano microplate reader (BMG Labtech). The data were processed

with the MARS software (BMG Labtech). Standard curves were generated using a four-parameter curve fitting equation, and YKL-40 levels were calculated according to this curve, with values given as ng/ml.

### Statistical analysis

Analyses were performed using the SPSS software (version 16.0, SPSS, Chicago, IL). The Kolmogorov–Smirnov test was used to evaluate the normality of the distributions of variables. The independent samples t-test was used for normally distributed parameters and the Mann-Whitney U test was used for parameters of non-normal distribution. Parametric data were expressed as mean ± standard deviation (SD). Correlations between two variables were assessed by using the Pearson correlation coefficient. P values of less than 0.05 were considered statistically significant.

### Results

The mean ages of the patients (23 male, 57.5%) and control subjects (26 male, 63.4%) were  $44.8 \pm 13.2$  years and  $46.9 \pm 15.5$  years, respectively. There were no significant differences between the patient and the control group in terms of their mean ages ( $p = 0.467$ ) and gender distributions ( $p = 0.753$ ).

In the brucellosis group, YKL-40 levels were  $15.0 \pm 8.8$  ng/mL, CRP was  $1.48 \pm 2.1$  mg/dL, WBC was  $7.2 \pm 2.3 \times 10^9/L$ , NEU was  $3.7 \pm 2.1 \times 10^9/L$ , LYM was  $2.7 \pm 0.8 \times 10^9/L$ , PLT was  $274.4 \pm 80.2 \times 10^9/L$ , MPV was  $9.8 \pm 1.1$  fL, NLR was  $1.5 \pm 1.0$ , and PLR was  $109.3 \pm 46.4$ . Also, patients were divided into four groups according to standart tube agglutination test titres levels and all demographic and biochemical parameters were compared across these groups. However, no statistically significant differences were found ( $p > 0.05$ ).

In the control group, YKL-40 levels were  $12.7 \pm 6.1$  ng/mL, CRP was  $0.2 \pm 0.1$  mg/dL, WBC was  $6.7 \pm 1.5 \times 10^9/L$ , NEU was  $4.0 \pm 1.1 \times 10^9/L$ , LYM was  $1.9 \pm 0.6 \times 10^9/L$ , PLT was  $272.6 \pm 84.7 \times 10^9/L$ , MPV was  $9.4 \pm 1.0$  fL, NLR was  $2.1 \pm 0.7$ , and PLR was  $147.8 \pm 59.0$ .

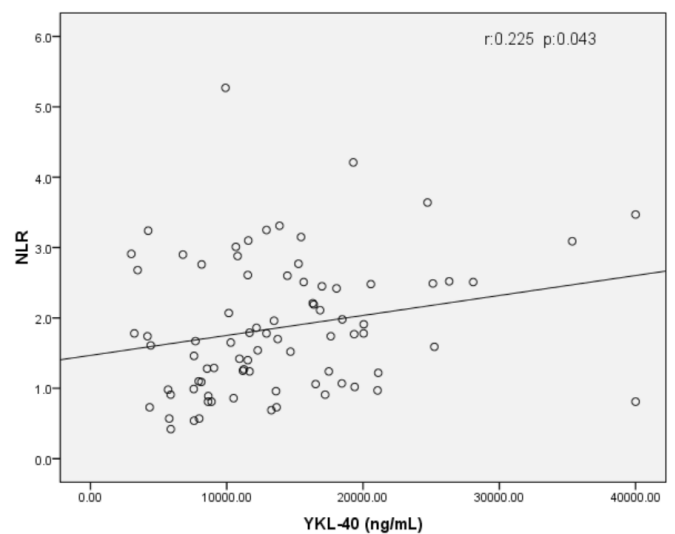
CRP levels ( $P < 0.001$ ) were significantly higher, and NEU ( $P = 0.023$ ) and PLR ( $P < 0.001$ ) were significantly lower in patients with brucellosis compared to the controls. There were no statistically significant differences between the two groups

with regard to the other parameters ( $p > 0.05$ ) (Table I). The demographic characteristics and the biochemical parameters of the patients have been shown in Table I in detail.

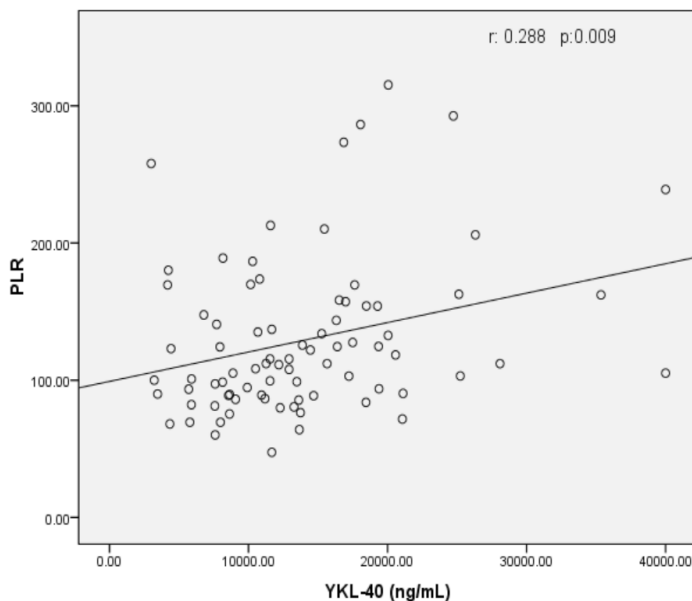
**Table I.** Demographic features and laboratory findings of the study population.

Variable	Patient (n=40)	Control (n=41)	p value
Age (years)	$44.8 \pm 13.2$	$46.9 \pm 15.5$	0.467
Gender (M/F)	23/17	26/15	0.753
YKL-40 (ng/mL)	$15.0 \pm 8.8$	$12.7 \pm 6.1$	0.106
CRP (mg/dL)	$1.48 \pm 2.1$	$0.2 \pm 0.1$	<0.001*
Hemoglobin (g/dL)	$14.2 \pm 1.5$	$13.8 \pm 1.8$	0.072
RDW	$13.7 \pm 1.5$	$14.5 \pm 2.1$	0.334
WBC ( $\times 10^9/L$ )	$7.2 \pm 2.3$	$6.7 \pm 1.5$	0.186
Neutrophil ( $\times 10^9/L$ )	$3.7 \pm 2.1$	$4.0 \pm 1.1$	0.023*
Lymphocyte ( $\times 10^9/L$ )	$2.7 \pm 0.8$	$1.9 \pm 0.6$	0.085
Platelet ( $\times 10^9/L$ )	$274.4 \pm 80.2$	$272.6 \pm 84.7$	0.891
MPV, fL	$9.8 \pm 1.1$	$9.4 \pm 1.0$	0.597
NLR	$1.5 \pm 1.0$	$2.1 \pm 0.7$	0.306
PLR	$109.3 \pm 46.4$	$147.8 \pm 59.0$	<0.001*

Pearson correlation analyses showed a positive correlation between YKL-40 and CRP ( $r = 0.291$ ,  $P = 0.008$ ), PLT ( $r = 0.312$ ,  $P = 0.005$ ), PLR ( $r = 0.288$ ,  $P = 0.009$ ), NLR ( $r = 0.225$ ,  $P = 0.043$ ), and age ( $r = 0.296$ ,  $P = 0.007$ ) (Figure 1 and 2). There was also a positive correlation between CRP and WBC ( $r = 0.255$ ,  $P = 0.021$ ) and NEU ( $r = 0.232$ ,  $P = 0.037$ ).



**Figure 1.** The correlation analysis of NLR and YKL-40.



**Figure II.** The correlation analysis of PLR and YKL-40.

## Discussion

Clinical symptoms and laboratory tests are not specific in brucellosis. A review of the literature reveals that YKL-40 levels are increased in cases of inflammatory disease [13-16]. Numerous studies have investigated YKL-40. However, fewer studies exist in association to infectious diseases. And as far as we now, it has never been studied in relation to brucellosis. Thus, we aimed to investigate YKL-40 levels in patients with brucellosis.

According to the results of our study, no significant differences exist between the patient and control groups in terms of their YKL-40 levels. The patient group manifested significantly higher CRP, and significantly lower PLR and Neu compared to the control group. In addition, YKL-40 was shown to be positively correlated with CRT, PLT, PLR, NLR, and age.

In the literature; Kronborg et al. have determined higher serum YKL-40 levels in patients with pneumococcus bacteremia [17]. Hattori et al. reported significantly higher levels of serum YKL-40 in patients diagnosed with sepsis. They also stated that it could be a biomarker of sepsis based on the proteomic analysis they had conducted but further studies were needed to clarify its clinical benefits [18]. Ostergaard et al. determined high YKL-40 levels in patients with purulent meningitis, suggesting that YKL-40 is produced by activated macrophages in the central nervous system [19].

It is important to consider that a significant aspect of brucella pathogenesis comprises the interaction with macrophages. Indeed, studies that investigate the Brucella/macrophage relationship in vitro are important to understand how Brucella survives inside the cell [20]. The permanence of Brucella while it creates chronic infection depends on macrophages

as the primary target cells and its interaction with the host immune system. In humans, *Brucella spp.* is characterized by high proinflammatory cytokine levels. Interestingly, the antiinflammatory cytokine IL-10 is induced and its levels are increased in Brucella infections [21, 22]. YKL-40 is secreted in vitro by human macrophages at the late stages of differentiation, however, is not expressed in monocytes. YKL-40 was shown to be secreted only by activated macrophages and at a specific stage [23, 24]. Based on the results of our study, we think that chronic brucella patients do not manifest high YKL-40 levels because of the inhibition of macrophage activation due to the the disease becoming chronic and the increase in IL-10.

YKL-40 is also synthesized by joint chondrocytes and synovial cells in patients with rheumatoid arthritis (RA) [25, 26]. In a study that investigated the relationship of YKL-40 with joint pathologies affecting the knee joints of patients with RA, YKL-40 was determined to be higher in RA patients with moderate/severe or none/mild synovitis of the knee joint compared to osteoarthritis patients with moderate/severe or none/mild synovitis of the knee joint. Moreover, RA patients demonstrated higher levels of YKL-40 in the synovial fluid than in the serum [13]. We did not obtain synovial fluid from the affected knee joints of patients with Brucella and we report this as a limitation of our study.

Earlier studies have investigated the neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) and platelet to lymphocyte ratio (PLR) in Brucella patients. Bozdemir et al. detected a significant difference in the NLR values of pediatric patients diagnosed with Brucella compared to arthritis-positive patients, whereas no significant differences were found in PLR values [27]. In another study conducted by Olt et al. on Brucella patients, the NLR was significantly correlated with Brucella, with no significant difference in the PLR [8]. In our study, we did not detect a significant difference in NLR values of Brucella patients, however, the PLR value was determined to be significantly lower. In addition, YKL-40 was found to be positively correlated with NLR and PLR values.

The primary limitations of our study include the small number of patients with brucella arthritis and use of single blood samples. Another limitation is that synovial samples were not tested for YKL-40.

## Conclusion

The physiological function of YKL-40 is not known, however, its secretion during normal and disease periods suggest that it could be involved in inflammation. We believe that more studies must be conducted at this time to investigate whether or not YKL-40 has a biological function in infectious diseases and reveal the pathophysiological importance of the YKL-40 protein.



## Declaration of conflict of interest

The authors received no financial support for the research and/or authorship of this article. There is no conflict of interest.

## References

1. EJ Y. Brucella species. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed. New York: Churchill Livingstone, 2005: 2669-72.
2. Hussein MZ, Abou-Elnoeman SA, Al-Fikky AA, El-Samadouny EI, Shaaban AAM. Evaluation of Rose Bengal Test, Standard Tube Agglutination Test and Nested PCR for the diagnosis of Human Brucellosis. *Egypt J Med Microbiol* 2006; 15: 249-56.
3. Seleem MN, Boyle SM, Sriranganathan N. Brucellosis: a re-emerging zoonosis. *Vet Microbiol* 2010; 140: 392-8.
4. Galinska EM, Zagorski J. Brucellosis in humans-etiology, diagnostics, clinical forms, *Ann Agric Environ Med* 2013; 20: 233-38.
5. Hekmatimoghaddam S, Sadeh M, Khalili MB, Mollaabedin M, Sazmand A. Comparison of PCR, Wright agglutination test and blood culture for diagnosis of brucellosis in suspected patients. *Pak J Biol Sci* 2013; 16: 1589-92.
6. Gomez MC, Nieto JA, Rosa C, Geijo P et al. Evaluation of seven tests for diagnosis of human brucellosis in an area where the disease is endemic. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15: 1031-33.
7. Asaad AM, Alqahtani JM. Serological and molecular diagnosis of human brucellosis in Najran, Southwestern Saudi Arabia. *J Infect Public Health* 2012; 5: 189-94.
8. Olt S, Ergenc H, Acikgoz SB. Predictive contribution of neutrophil/lymphocyte ratio in diagnosis of brucellosis. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 210502.
9. Łata E, Gisterek I, Matkowski R, Szelachowska J, Kornafel J. The importance of determining the prognostic marker YKL-40 in serum and tissues. *Pol Merkur Lekarski* 2010; 28: 505-8.
10. Roslind A, Johansen JS. YKL-40: a novel marker shared by chronic inflammation and oncogenic transformation. *Methods Mol Biol* 2009; 511: 159-84.
11. Libreros S, Iragavarapu-Charyulu V. YKL-40/CHI3L1 drives inflammation on the road of tumor progression. *J Leukoc Biol* 2015; 98: 931-36.
12. Faibish M, Francescone R, Bentley B, Yan W, Shao R. A YKL-40- neutralizing antibody blocks tumor angiogenesis and progression: a potential therapeutic agent in cancers. *Mol Cancer Ther* 2011; 10: 742-51.
13. Volck B, Johansen JS, Stoltenberg M et al. Studies on YKL-40 in knee joints of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Involvement of YKL-40 in the joint pathology. *Osteoarthritis Cartilage* 2001; 9: 203-14.
14. Matsumoto T, Tsurumoto T. Serum YKL-40 levels in rheumatoid arthritis: correlations between clinical and laboratory parameters. *Clin Exp Rheumatol* 2001; 19: 655-60.
15. Vind I, Johansen JS, Price PA, Munkholm P. Serum YKL-40, a potential new marker of disease activity in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 599-605.
16. Koutroubakis IE, Petinaki E, Dimoulis P, Vardas E, Roussomoustakaki M, Maniatis AN, et al. Increased serum levels of YKL-40 in patients with inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis* 2003; 18: 254-59.
17. Kronborg G, Ostergaard C, Weis N et al. Serum level of YKL-40 is elevated in patients with Streptococcus pneumoniae bacteremia and is associated with the outcome of the disease. *Scand J Infect Dis* 2002; 34: 323-26.
18. Hattori N, Oda S, Sadahiro T et al. YKL-40 identified by proteomic analysis as a biomarker of sepsis. *Shock* 2009; 32: 393-400.
19. Ostergaard C, Johansen JS, Benfield T, Pric PA, Lundgren JD. YKL-40 is elevated in cerebrospinal fluid from patients with purulent meningitis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9: 598-604.
20. Gorvel JP, Moreno E. Brucella intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol* 2002; 90: 281-97.
21. Fernandes DM, Baldwin CL. Interleukin-10 downregulates protective immunity to Brucella abortus. *Infect Immun* 1995; 63: 1130-33.
22. Xavier MN, Winter MG, Spees AM et al. CD4+ T cell-derived IL-10 promotes Brucella abortus persistence via modulation of macrophage function. *PLOS Pathog* 2013; 9: 1003454.
23. Volck B, Price PA, Johansen JS et al. YKL-40, a mammalian member of the chitinase family, is a matrix protein of specific granules in human neutrophils. *Proc Assoc Am Physicians* 1998; 110: 351-60.
24. Johansen JS, Møller S, Price PA et al. Plasma YKL-40: a new potential marker of fibrosis in patients with alcoholic cirrhosis? *Scand J Gastroenterol* 1997; 32: 582-90.
25. Hakala BE, White C, Recklies AD. Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family. *J Biol Chem* 1993; 268: 25803-10.
26. Kirkpatrick RB, Emery JG, Connor JR, Dodds R, Lysko PG, Rosenberg M. Induction and expression of human cartilage glycoprotein 39 in rheumatoid inflammatory and peripheral blood monocyte-derived macrophages. *Exp Cell Res* 1997; 237: 46-54.
27. Bozdemir ŞE, Altıntop YA, Uytun S, Aslaner H, Torun YA. Diagnostic role of mean platelet volume and neutrophil to lymphocyte ratio in childhood brucellosis. *Korean J Intern Med* 2017; 32: 1075-81.

To cite this article: Ekizler FA, Cay S, Acar B, Tak BT, Cetin EHO, Temizhan A. Lipoprotein apheresis affects ventricular repolarization in patients with homozygous familial hypercholesterolemia. Turk J Clin Lab 2019; 10: 340-347.

## ■ Original Article

# Lipoprotein apheresis affects ventricular repolarization in patients with homozygous familial hypercholesterolemia

## *Lipoprotein aferezi homozigot ailevi hiperkolesterolemi hastalarında ventriküler repolarizasyonu etkiler*

Firdevs Aysenur EKIZLER<sup>\*1</sup>, Serkan CAY<sup>1</sup>, Burak ACAR<sup>2</sup>, Bahar Tekin TAK<sup>1</sup>,  
Elif Hande Ozcan CETIN<sup>1</sup>, Ahmet TEMIZHAN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>University of Health Sciences, Ankara City Hospital, Department of Cardiology, Ankara/TURKEY

<sup>2</sup>Kocaeli University, Faculty of Medicine, Department of Cardiology, Kocaeli/TURKEY

### Abstract

**Aim:** Patients with Homozygous Familial Hypercholesterolemia (HoFH) prone to experience premature cardiovascular disease and often die from sudden cardiac death (SCD) at a young age. Lipoprotein apheresis (LA) is the treatment of choice to prolong survival. Several mechanisms has been suggested to be responsible for the known short and long-term clinical benefits of this procedure. This study was conducted to assess the effect of single LA on ventricular repolarization parameters in patients with HoFH.

**Material and Methods:** Eleven patients (mean age  $30.1 \pm 5.5$  years, male 63.6%) with HoFH on chronic LA treatment were enrolled in this preliminary study. Double filtration plasmapheresis (DFPP) was performed in all patients. To examine the effects of a single session of LA, on ventricular repolarization, the QT, QTc interval, the T peak-to-end (Tp-e) interval, Tp-e/QT and the Tp-e/QTc ratio were specifically calculated.

**Results:** The single session of LA reduced total LDL (from  $10.04 \pm 1.91$  to  $4.16 \pm 1.21$  mmol/L,  $P < 0.001$ ). The heart rate did not change significantly after LA session. Plasma levels of calcium and magnesium was significantly decreased after the procedure. The QTc decreased from  $443.8 \pm 23.3$  ms to  $412.3 \pm 20.0$  ms ( $P < 0.001$ ). The Tp-e interval and the Tp-e/QTc ratio decreased significantly [85 (70-89) ms vs. 63 (58-71)ms;  $P = 0.003$ , and 0.19 (0.16-0.20) vs 0.15 (0.13-0.16);  $P = 0.003$ , respectively].

**Conclusion:** Our data suggest that even a single session of LA improved electrocardiographic repolarization indexes.

**Keywords:** apheresis; arrhythmia; dispersion of repolarization; double filtration plasmapheresis; homozygous familial hypercholesterolemia

Corresponding author\*: Firdevs Ayşenur Ekizler, University of Health Sciences, Ankara City Hospital, Department of Cardiology, Ankara/TURKEY

E-posta: firdevs\_bsk@hotmail.com

ORCID: 0000-00023988-6828

Received: 21.05.2019 accepted: 29.07.2019

Doi: 10.18663/tjcl.568661

## Öz

**Amaç:** Homozigot ailevi hiperkolesterolemisi (HoAH) olan hastalar erken yaşlarda kardiyovasküler hastalığa yakalanma riski altındadırlar ve genellikle genç yaşta ani kardiyak ölüm (SCD) nedeniyle kaybedilirler. Bu hastalarda ömrü uzatmak amacı ile tercih edilen tedavi yöntemi lipoprotein aferezidir (LA). LA'nın kısa ve uzun dönem klinik faydalarından açıklamak için çeşitli mekanizmalar önerilmiştir. Bu çalışmada, HoAH'si olan hastalarda tek seans LA'nın, ventriküler repolarizasyon parametreleri üzerine olan etkisini araştırdık.

**Gereç ve Yöntemler:** LA uygulanan 11 HoAH hastası çalışmaya dahil edildi. Hastaların ortalama yaşı  $30.1 \pm 5,5$  yıl ve hastaların %63,6'sı erkek idi. Tüm hastalara double filtrasyon plazmaferez uygulandı. İşlem öncesi ve sonrasında hastaların ventriküler repolarizasyon parametrelerinden QT, QTc aralığı, Tp-e aralığı, Tp-e / QT ve Tp-e / QTc oranı incelendi.

**Bulgular:** Tek seans lipoprotein aferezi LDL'yi anlamlı bir şekilde düşürdü ( $10.04 \pm 1.91$ 'den  $4.16 \pm 1.21$  mmol / L,  $P < 0.001$ ). İşlem sonrası plazma kalsiyum ve magnezyum seviyeleri anlamlı derecede azaldı. QTc  $443.8 \pm 23.3$  ms'den  $412.3 \pm 20.0$  ms'ye ( $P < 0.001$ ) düştüğü saptandı. Tp-e aralığı ve Tp-e / QTc oranları önemli ölçüde azaldı [ $85 (70-89)$  ms ile  $63 (58-71)$  ms;  $P = 0.003$  ve  $0.19 (0.16-0.20) - 0.15 (0.13-0.16)$ ;  $P = 0,003$ , sırasıyla].

**Sonuç:** Verilerimiz, tek bir lipoprotein aferez seansının bile elektrokardiyografik repolarizasyon indekslerini iyileştirdiğini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Aferez, aritmi, çift filtrasyon plazmaferez, homozigot ailesel hiperlipidemi, repolarizasyon dispersiyonu

## Introduction

Homozygous Familial Hypercholesterolemia (HoFH) is a rare inherited disease characterized by lethally high levels of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) from birth [1]. Individuals with HoFH tend to experience accelerated atherosclerosis, premature development of cardiovascular disease (CVD) and often die from sudden cardiac death (SCD) at a young age [2]. Lipoprotein apheresis (LA) is currently the gold-standard treatment to prevent fatal early CVD [3] in patients with HoFH. Although, a significant benefit on morbidity and mortality induced by LA has been proven, the underlying pathophysiological mechanisms of action are still unclear. In addition to the lipid-lowering effect, soluble peptides and proteins modulating thrombosis, inflammation and hemostasis are also removed to some degree by LA [4]. Evidence has been published showing that LA has specific pleiotropic effects on coagulation system, blood viscosity, inflammation, oxidative stress, endothelial function, coronary perfusion, vascular tone, thereby modulating the individual cardiovascular risk [5-7].

Besides conventional risk factors of SCD in the general population, HoFH patients have apparent underlying pathologies which may predispose them to untoward events and they are characterized by a pro-arrhythmic substrate because of the high prevalence of ischaemic heart disease, left ventricular hypertrophy, autonomic neuropathy, inflammation, myocardial systolic and diastolic dysfunction [2,8]. Recently, several noninvasive methods have been employed to predict the occurrence of serious ventricular

arrhythmias and establish patients at high risk for SCD, including QT interval, QT dispersion (QTd) and transmural dispersion of repolarization [9-10].

In the literature, studies conducted on patients with HoFH on chronic LA therapy mainly focused on different LA therapies, acute and chronic pleiotropic effects, lipid and non-lipid effects of LA. Arrhythmic risk, the value of ECG parameters of ventricular repolarization and the effect of LA therapy on these parameters in HoFH patients were not evaluated. Thus, in the current investigation we sought to investigate for the first time the acute effect of LA on electrocardiographic indexes of repolarization, given that increased heterogeneity of repolarization is related to ventricular arrhythmias.

## Material and Methods

### Study population

Eleven subjects (mean age  $30.1 \pm 5.5$  years, Male 63.6%) with HoFH, attending a regular lipoprotein apheresis session, were recruited in this preliminary study. Familial hypercholesterolemia was diagnosed on the basis of family history, serum cholesterol level and thickness of the Achilles tendon in all patients. None of the patients had the exclusion criteria (previous pacemaker implantation, bundle branch block, persistent or permanent atrial fibrillation, unmeasurable T waves, using antiarrhythmic drugs that prolong the QT interval). All patients were in a stable clinical condition. All patients were non-smokers and have no diabetes. The data for each patient including the cumulative interval since the first LA treatment, the time interval between LA treatments,

the duration of the treatments, plasma volume that was filtered per treatment was collected. Informed constants were collected from all patients.

Before the apheresis session a standard 12-lead electrocardiogram (ECG) recorded. A second ECG was immediately recorded after LA treatment. Blood was taken before and after apheresis for measurement of plasma electrolytes, albumin, protein, hematocrit, C-reactive protein (CRP), fibrinogen and serum lipids to reveal LA- induced acute difference. Pretreatment LDL-C levels, defined as LDL-C level on maximal drug therapy before commencing LA, were obtained from medical records of patients. LDLmax was the pre-session LDL concentration before apheresis session, LDLmin was the post-session value. Time-averaged LDL-cholesterol levels were calculated with the following formula:  $LDLmin + 0.73 (LDLmax - LDLmin)$ , described by Kroon et al. [11].

### Lipoprotein apheresis

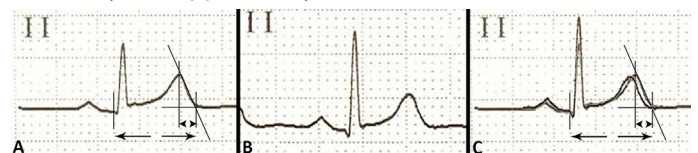
In all patients, LA was performed using double filtration plasmapheresis (DFPP) with the "Afer Smart", manufactured by MEDICA S.P.A., Medolla (Modena) Italia, a multifunctional device for therapeutic apheresis, which uses a hollow fiber plasma separator "PlasmaCure" with an effective surface area 0.6 m<sup>2</sup> and a priming volume of 55 ml and a plasma component separator "SelectiCure" with a surface area of 1.9 m<sup>2</sup>, both manufactured by 3M Deutschland GmbH, neuss, Germany. In this procedure, plasma was separated from blood cells by first fiber filter and then perfused through the second filter which selectively retains useful plasma components but discards larger molecular weight components including LDL-C. Anticoagulation was achieved with heparin. During each procedure, the plasma volume of patient was calculated according to the body weight. Duration of each LA apheresis was between 60 and 150 minutes, depending on the plasma volume treated.

### Laboratory parameters

Peripheral venous blood samples from each subject were obtained from the antecubital vein immediately before and immediately after apheresis session. Blood samples were taken into standardized tubes including dipotassium ethylenedinitrilotetraacetic acid for complete blood count (CBC). Coulter Counter LH Series (Beckman coulter Inc., Hialeah, Florida) was used for CBC. Plasma levels of LDL-C, triglyceride (TG), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), total cholesterol (TC), CRP, protein and albumine were evaluated using an automated chemistry analyzer (Aeroset, Abbott, USA) with commercially available kits (Abbott, USA). The LDL-C concentration was calculated using the Friedewald equation [12]. Fibrinogen was measured with a nephelometer (Behring, Vienna, Austria)

### Electrocardiographic analysis

The resting 12-lead surface ECG was recorded at a paper speed of 25 mm/s in the supine position in all study subjects. All ECGs were scanned and transferred to a personal computer and then magnified by 400% to avoid error in measurements. Two independent electrophysiologists blinded to clinical details measured the QT and Tp-e intervals. Three consecutive beats in selected leads were measured manually and a mean value of three readings was calculated. The QT interval was measured from the beginning of the QRS complex to the end of the T-wave where the T-wave returns the isoelectric line when available. In unavailable cases, the end of the T-wave was determined as the intercept between the isoelectric line and the tangential line drawn through the maximum slope of the T-wave. QTc was calculated from the QT, which is corrected for heart rate using the Bazett's formula:  $QTc = QT \sqrt{(R-R \text{ interval})}$ . The Tp-e interval was defined as the interval from the peak of T-wave to the end of the T-wave where the T-wave returns the isoelectric line when available. In unavailable cases, previously described same method was used (Figure 1). The Tp-e/QTc ratio was calculated from these measurements. Inter-observer and intraobserver variability were found to be less than 5%. This study was approved by the local ethics committee.



**Figure 1.** An ECG image shows measurement of repolarization parameters including QT (arrows) and Tp-e (arrow heads) intervals before LA (A). The second ECG image was obtained just after LA (B). In panel C, superimposed images from panel A and B are seen to demonstrate improved repolarization parameters related to LA.

### Statistical analysis

Data were analyzed with the software SPSS version 20.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Continuous variables were presented as mean  $\pm$  SD and median with interquartile ranges as appropriate and categorical variables as frequency and percentage. To test the normality of distribution, Kolmogorov-Smirnov test was used. The Wilcoxon signed rank test was used for variables without normal distribution and the paired- T test for normally distributed variables. Spearman's correlation analysis was performed to examine potential associations between ECG indexes and various clinical and laboratory parameters. A two-tailed p-value of  $<0.05$  was considered significant.

### Results

The mean age of the patients in this study was  $30.1 \pm 5.5$  years. Table 1 gives basal clinical characteristics and status of



major cardiovascular risk factors in the eleven HoFH patients involved in this study. Mean age at diagnosis was  $10.1 \pm 6.5$  years. Cutaneous or tendinous lipid depositions were the first presenting symptom in seven patients and one patient was diagnosed during the screening for HoFH. All patients were on maximally-tolerated doses of statins (rosuvastatin: 40 mg/day, n :8) and ezetimibe (10 mg/day; n :8).

Early onset coronary artery disease (CAD) was present in 54.5% (six patients) of patients. The mean age at the time of the first coronary event was  $21.5 \pm 1.9$  years. None of them reported stroke or transient ischemic attacks. In all patients a noninvasive measurement of transvalvular aortic gradient was performed by a doppler method. In most of the cases (81.8%), the aortic valve was also affected; 9.1% had severe aortic stenosis (AS), 27.3% moderate and 45.5% mild AS. One patient had a history of aortic valve replacement. Doppler ultrasound of the carotid arteries revealed flow-reducing carotid stenoses in 5 patients. Lower extremity periferic artery disease was reported to be present in 6 (50%) patients. All of the patients had aortic atheroma plaques.

Information about therapeutic LA are listed in Table 1. All patients were on chronic LA treatment (mean  $52.6 \pm 28.3$  months). Mean age at first LA was  $25.4 \pm 6.0$  years. All of the patients were receiving LA treatment via vascular access (forearm arteriovenous fistulas in all). Mean frequency of apheresis sessions was every  $19.0 \pm 5.4$  days. Mean LDL-cholesterol level was  $13.6 \pm 2.6$  mmol/L on maximal drug therapy before starting LA.

Table 2 illustrates the changes that occurred in basic laboratory parameters after one LA procedure. A single LA therapy reduced circulating levels of total cholesterol, LDL-C, triglycerides, HDL-C by 59.1, 58.5, 48.7 and 42%, respectively ( $P < 0.05$ ). There were significant decreases in fibrinogen, CRP, protein, albumin, ionized plasma calcium concentration and the level of plasma magnesium after LA ( $P < 0.05$ , for all). There was no significant difference between plasma hematocrit, potassium and WBC before and after LA ( $p > 0.05$ ).

The results of the changes in measured ECG variables are shown on Table 2. During apheresis session the heart rate did not change significantly (pre LA; 79.4 vs post-LA; 75.5 bpm,  $p > 0.05$ ). The QTc decreased from  $443.8 \pm 23.3$  ms before LA to  $412.3 \pm 20.0$  after LA ( $P < 0.001$ ). The median value of Tp-e was 85 (70-89) ms before the beginning of LA, decreased to 63 (58-71) ms after LA treatment ( $P = 0.003$ ). The Tp-e/QTc decreased from 0.19 (0.16-0.20) before LA to 0.15 (0.13-0.16) after LA ( $P = 0.003$ ) (Figure 2). The correlation analysis failed to show any association between the baseline parameters and the baseline values of QTc, Tp-e and Tp-e/QTc or between the change of the laboratory parameters during LA and the corresponding change of the QTc, Tp-e and the Tp-e/QTc values.

**Table 1.** Baseline Characteristics of the study subjects

Characteristic	
Age, years $\pm$ SD	$30.1 \pm 5.5$
Male, n (%)	7 (63.6)
Hypertension, n (%)	1 (9.1)
Smoking, n (%)	0 (0)
Diabetes, n (%)	0 (0)
BMI (kg/m <sup>2</sup> ) $\pm$ SD	$25.3 \pm 2.1$
Consanguineous marriage, n (%)	5 (45.5)
Age at diagnosis, years $\pm$ SD	$10.1 \pm 6.5$
Age at first coronary event, years $\pm$ SD	$21.5 \pm 1.9$
First symptom, n (%)	
Lipid deposition	10 (90.9)
Screening for family history of FH	1 (9.1)
Coronary artery disease, n (%)	6 (54.5)
Aortic valve stenosis, n (%)	
Mild	5 (45.5)
Moderate	3 (27.3)
Severe	1 (9.1)
Carotid artery disease, n (%)	5 (45.5)
Stroke, n (%)	1 (9.1)
Peripheral artery disease, n (%)	6 (54.5)
Serum lipid profile, mmol/L $\pm$ SD	
Pretreatment on maximal drug therapy, before starting (LA)	
LDL-C	$13.6 \pm 2.6$
Total cholesterol	$15.9 \pm 3.1$
Triglyceride	$3.5 \pm 1.0$
HDL-C	$1.6 \pm 0.6$
Total Cholesterol/HDL-C	$15.9 \pm 3.1$
Time-averaged LDL-c, mg/dl $\pm$ SD	$8.4 \pm 1.5$
Age at first LA, years $\pm$ SD	$25.4 \pm 6.0$
Frequency of apheresis sessions, days $\pm$ SD	$19.0 \pm 5.4$
Cumulative duration of apheresis treatment, months $\pm$ SD	$52.6 \pm 28.3$
Procedural duration, minutes $\pm$ SD	$123.6 \pm 13.6$
Plasma volume per treatment, mL $\pm$ SD	$2.781 \pm 147$

BMI=body mass index; FH= familial hypercholesterolemia; HDL-C=high-density lipoprotein cholesterol; LA=lipoprotein apheresis; LDL-C=low-density lipoprotein cholesterol; SD=standard deviation

Note: Categorical data are presented as absolute and relative frequencies, while continuous variables are presented as means  $\pm$  standard deviations or as median values (25th–75th percentile).



**Table 2.** Laboratory data and repolarization parameters of the studied population

Parameter	Before session	End of session	P value
LDL-C, mmol/L	10.04 ± 1.91	4.16 ± 1.21	<0.001
HDL-C, mmol/L	0.7 (0.6-0.8)	0.4 (0.3-0.5)	0.001
Total cholesterol, mmol/L	11.5 ± 1.9	4.7 ± 0.9	<0.001
Triglyceride, mmol/L	3.9 ± 1.8	2.0 ± 0.8	0.008
Total cholesterol/HDL-C	15.5 ± 3.0	10.4 ± 1.9	0.001
Fibrinogen, mg/dl	2.4 ± 0.6	1.1 ± 0.4	<0.001
Hematocrit, %	44.1 ± 4.1	45.5 ± 4.7	0.073
CRP, mg/L	1.1 (0.4-1.4)	0.5 (0.2-0.7)	0.003
Protein, gr/dl	7.1 ± 0.3	5.3 ± 0.1	<0.001
Albumin, gr/dl	4.3 ± 0.1	3.6 ± 0.1	<0.001
Platelet, ×10 <sup>3</sup>	261.2 ± 81.2	232.2 ± 73.6	0.001
WBC, ×10 <sup>3</sup>	7.0 ± 1.5	7.7 ± 1.9	0.065
Creatinine, mg/dl	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.003
Potassium, mmol/L	4.0 ± 0.2	4.1 ± 0.1	0.647
Magnesium, mmol/L	0.8 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.006
Calcium, mmol/L	2.2 ± 0.1	1.9 ± 0.0	<0.001
Ionized Calcium, mmol/L	2.2 ± 0.0	2.0 ± 0.0	<0.001
Heart rate (bpm)	79.4 ± 11.8	75.5 ± 7.2	0.145
QT, ms	387 (378-400)	367 (362-373)	0.008
QTc, ms	443.8 ± 23.3	412.3 ± 20.0	<0.001
Tp-e, ms	85 (70-89)	63 (58-71)	0.003
Tp-e/QT	0.21 ± 0.0	0.17 ± 0.0	<0.001
Tp-e/QTc	0.19 (0.16-0.20)	0.15 (0.13-0.16)	0.003

CRP=c-reactive protein; HDL-C=high-density lipoprotein-cholesterol; LDL-C=low-density lipoprotein-cholesterol; SD=standard deviation; WBC=white blood cell  
 Note: Significant changes are shown in bold

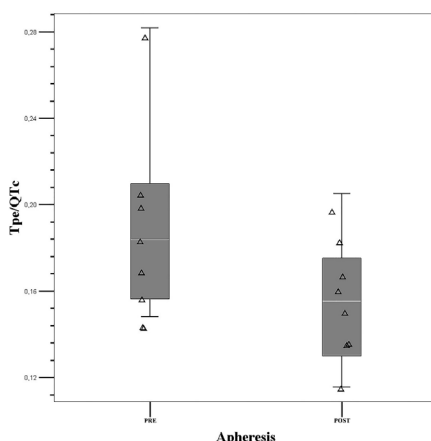
## Discussion

In this study, we firstly demonstrated that a single session of LA significantly decreased ECG measures of ventricular repolarization including QT, QTc, Tp-e interval, Tp-e/QT and Tp-e/QTc ratio in HoFH patients.

Currently, there is a growing evidence to support the use of electrocardiographic repolarization markers to evaluate the risk of ventricular arrhythmias. The QT interval displays the sum of both ventricular depolarization (QRS) and repolarization (ST-T). The peak of the T wave (Tp) is thought to coincide with the end of repolarization of the ventricular subepicardium, while the end of the T wave (Te) is thought to correspond to the end of repolarization of the midmyocardium (M fibers). It is considered that the temporal difference between repolarization of mid-myocardium and sub-epicardium (Tp-e) represents, generally, heterogeneity of ventricular repolarization [9,10]. A prolonged QT interval has been shown to be closely associated with increased SCD risk in multiple medical conditions [13]. Recent studies indicated that the Tp-e interval, can be used as an index of the total (transmural, apico-basal, global) dispersion of repolarization. Also, increased Tp-e may be used as a predictor of ventricular tachyarrhythmias and cardiovascular mortality [14]. However, Tp-e/QT ratio appears to be a more sensitive arrhythmogenic index as it remains constant regardless of the dynamic variations in the heart rate and body weight. Taking into account the aforementioned considerations we aimed the measurement of the novel parameters QTc, Tp-e and Tp-e/QTc to evaluate the effects of LA on the dispersion of ventricular repolarization in patients with HoFH.

The mechanisms by which LA could exert beneficial effects on ventricular repolarization are not clear. Multiple benefits of LDL apheresis extend beyond the removal of LDL-C have been reported including improvements of blood viscosity, rheology, vascular tonus, endothelium function as well as reduction of thrombosis, oxidative stress and inflammation [15]. Several studies have demonstrated that simultaneous reduction of proinflammatory and prothrombotic factors together with atherogenic lipoproteins by long-term LA decreases lipid deposition on the arterial wall and stabilizes lipid-rich plaque [15,16]. Longitudinal trials demonstrated a significant reduction of cardiovascular risk and event rate and improvement of central, peripheral and cerebral perfusion under regular chronic lipoprotein apheresis treatment [16].

In contrast to such therapeutic benefits associated with long-term LA therapy, Tamai et al. demonstrated that even a single session of LA apheresis in 7 patients improved endothelium-dependent vasodilatory response in forearm blood flow associated with increased production of nitric oxide (NO)



**Figure 2.** Box plot overlaid with dot plot showing patient level (small triangles) and median (whitelines) values of Tp-e/QTc before and after apheresis.



metabolites [17]. Similarly, Igarashi et al. demonstrated a significant immediate increase in acetylcholine-induced coronary endothelium-dependent vasodilation in both the epicardial artery and microcirculation after LA therapy [18]. In addition, single LDL apheresis improved coronary microcirculation in patients with coronary artery disease and hypercholesterolemia [19]. Furthermore, LA acutely decreases plasma viscosity and erythrocyte aggregation which contribute to decrease myocardial infarction and sudden cardiac death [7].

It has been proposed that this potentially useful electrocardiographic acute alterations regarding ventricular repolarization is due to an acute improvement of the rheological properties and viscosity of blood, endothelial function, coronary perfusion and systolic function after the apheresis procedure. Alternative mechanisms involving inflammation and oxidative stress have also been suggested. Several studies have shown that electrocardiographic ventricular repolarization indexes are correlated with systemic inflammation [9]. On the other hand, LA therapy provides simultaneous reduction of proinflammatory and oxidative factors together with lipoproteins [5,7].

One of the possible mechanisms explaining the association between hypercholesterolemia and ventricular repolarization is "lipotoxic cardiomyopathy". In this theory, accumulated lipids in cardiomyocytes and lipid metabolites (eg ceramides, free fatty acids, lipid peroxides) lead to toxic effects via mitochondrial damage and sarcoplasmic reticulum stress [20-21]. Lin et al supported this hypothesis by showing that hypercholesterolemia reduces the level of connexin-43 protein, which is the major gap junction component; lowers myocardial conduction velocity thus impairs ventricular contractile function [22]. In patients with HoFH, this cardiac structural and functional changes can alter the repolarization and are at least partially an explanation for the improvement of repolarization parameters after LA therapy.

Our data also indicate that, although plasma levels of calcium and magnesium significantly decreased after LA therapy, ECG measures of ventricular repolarization including QTc shortened. The most commonly recognized effect of hypocalcemia on the ECG is prolongation of the QTc interval. Also, a decreased level of magnesium in plasma can also display itself as prolongation of the QTc interval on ECG [23]. This unexpected shortening in our study has mainly been attributed to changes in membrane fluidity, due to high plasma cholesterol levels in HoFH patients. Hypercholesterolemia may influence the multiple plasma membrane functions which culminate in several pathophysiological patterns at cardiac and metabolic level [24]. Also, it has been shown to affect the structural and

functional properties of myocardium. Particularly, it has been reported that differences in membrane cholesterol content may change the activities of cardiac sarcolemmal enzymes (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase and Ca<sup>2+</sup>-stimulated ATPase and the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Exchange) [25]. Such biophysical change can affect the permeability of different cations and to alter the enzyme activities of different membrane proteins [26].

An alternative explanation for the shortening of repolarization parameters is that apheresis removes the inhibition of endothelium-dependent relaxation caused by high LDL-C concentration in HoFH patients. Currently, there is a growing evidence to support that NO has a key role in mediating changes in QT interval and action potential duration (APD). In vitro [27] and in vivo [28] animal studies demonstrated that the rise in the NO activity is accompanied by the APD and QT interval shortening. The mechanisms responsible for the shortened APD were not clear. LA therapy cause to a significant reduction in oxidized LDL, which stimulate endothelial nitric oxide synthase activity, consequently rising production of NO. However, this interpretative theory remains to be assessed.

Though, increased ECG measures of repolarization are related to arrhythmic deaths, their prognostication in HoFH patients needs to be verified. We think that both metabolic and electrochemical alterations being frequently seen in HoFH patients influence action potentials causing repolarization anomalies represented by QT, Tp-e, and Tp-e/QT. Nevertheless, there are no prospective randomized studies examining the significance of these ECG parameters, and the true incidence of arrhythmic events is unclear. Further studies are needed to confirm whether these potentially beneficial effects, observed after single lipoprotein apheresis could also be achieved with currently available lipid-lowering treatments especially with pro-protein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) inhibitors in large amount of patients and for longer periods of time.

#### **Limitations of the study**

There are some potential limitations of this preliminary study. First, the study population was small in size due to the paucity of HoFH. The small sample size precluded us from making stratified analysis for gender and other subgroups. The effects of different treatment intervals, durations, the treated plasma volume and the different lipoprotein apheresis systems on ventricular repolarization parameters were not addressed. It has been demonstrated that LA modalities differ in their pleiotropic effects which may be relevant for outcome parameters not directly related to LDL removal. For ethical reasons, we could not justify performing LDL apheresis in healthy control subjects since there are substantial differences in a plenty of clinical and laboratory variables between healthy subjects and HoFH patients. Thus, we cannot say whether

LA also produces hemodynamic effects in the absence of hypercholesterolemia. Hence, all our patients were receiving LDL apheresis for several years, our study may not represent the effects of early single apheresis sessions nor indicate longer term changes. Finally, we do not have long-term data with respect to clinical events and mortality to investigate the predictive value of the QTc, Tp-e interval and Tp-e/QTc ratio in patients with HoFH. Therefore, multicenter studies where greater numbers of patients on different apheresis modalities with long-term follow-up are needed to overcome all these limitations.

### Conclusion

This study has been the first study searching the acute effects of LA procedure on electrocardiographic indexes which reflect heterogeneity of ventricular repolarization and ventricular arrhythmias among patients with HoFH. Our findings revealed that even a single session of LA improved electrocardiographic repolarization indexes significantly. These results suggest that LA therapy may represent a protective effect on myocardium of these patient and it could therefore be speculated that the diminished heterogeneity of repolarization contributes to the lower incidence of malignant ventricular arrhythmias and SCD in HoFH patients on LA treatment

### Declaration of conflict of interest

The authors received no financial support for the research and/or authorship of this article. There is no conflict of interest.

### References

1. Cuchel M, Bruckert E, Ginsberg HN et al. Homozygous familial hypercholesterolemia: new insights and guidance for clinicians to improve detection and clinical management. A position paper from the Consensus Panel on Familial Hypercholesterolemia of the European Atherosclerosis Society. *European Heart Journal* 2014; 35: 2146-57.
2. Goldberg AC, Hopkins PN, Toth PP et al. Familial hypercholesterolemia: screening, diagnosis and management of pediatric and adult patients: clinical guidance from the National Lipid Association Expert Panel on Familial Hypercholesterolemia. *Journal of Clinical Lipidology* 2011; 5:133-40.
3. Julius U, Frind A, Tselmin S, Kopprasch S, Poberschin I, Siegert G. Comparison of different LDL apheresis methods. *Expert Review of Cardiovascular Therapy* 2008; 6: 629-39.
4. Thompson J, Thompson PD. A systematic review of LDL apheresis in the treatment of cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2006; 189: 31-38.
5. Kopprasch S, Graessler J, Bornstein SR et al. Beyond lowering circulating LDL: apheresis-induced changes of systemic oxidative stress markers by four different techniques. *Atherosclerosis Supplements* 2009; 10: 34-38.
6. Kopprasch S, Julius U, Gromeier S, Kuhne H, Graessler J. Distinct effects of LDL apheresis by hemoperfusion (DALI) and heparin-induced extracorporeal precipitation (HELP) on leukocyte respiratory burst activity of patients with familial hypercholesterolemia. *Journal of Clinical Apheresis* 2000; 15: 249-55.
7. Ramunni A, Burzo M, Verno L, Brescia P. Pleiotropic effects of LDL apheresis. *Atherosclerosis Supplements* 2009; 10: 53-55.
8. Reimann M, Julius U, Haink K et al. LDL apheresis improves deranged cardiovagal modulation in hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis* 2010; 213: 212-17.
9. Antzelevitch C. T peak-Tend interval as an index of transmural dispersion of repolarization. *European Journal of Clinical Investigation*. 2001; 31: 555-57.
10. Antzelevitch C. Role of spatial dispersion of repolarization in inherited and acquired sudden cardiac death syndromes. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory* 2007; 293: 2024-38
11. Kroon AA, van't Hof MA, Demacker PN, Stalenhoef AF. The rebound of lipoproteins after LDL-apheresis. Kinetics and estimation of mean lipoprotein levels. *Atherosclerosis*. 2000; 152: 519-26.
12. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry* 1972; 18: 499-502.
13. Yan GX, Antzelevitch C. Cellular basis for the normal T wave and the electrocardiographic manifestations of the long-QT syndrome. *Circulation* 1998; 98: 1928-36.
14. Watanabe N, Kobayashi Y, Tanno K et al. Transmural dispersion of repolarization and ventricular tachyarrhythmias. *Journal of Electrocardiology* 2004; 37: 191-200.
15. Wang Y, Lammi-Keefe CJ, Hou L, Hu G. Impact of low-density lipoprotein cholesterol on cardiovascular outcomes in people with type 2 diabetes: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2013; 102: 65-75.
16. Mabuchi H, Koizumi J, Shimizu M et al. Long-term efficacy of low-density lipoprotein apheresis on coronary heart disease in familial hypercholesterolemia. Hokuriku-FH-LDL-Apheresis Study Group. *The American Journal of Cardiology*. 1998; 82: 1489-95.



17. Tamai O, Matsuoka H, Itabe H, Wada Y, Kohno K, Imaizumi T. Single LDL apheresis improves endothelium-dependent vasodilatation in hypercholesterolemic humans. *Circulation* 1997; 95: 76-82.
18. Igarashi K, Tsuji M, Nishimura M, Horimoto M. Improvement of endothelium-dependent coronary vasodilation after a single LDL apheresis in patients with hypercholesterolemia. *Journal of Clinical Apheresis* 2004; 19: 11-16.
19. Mellwig KP, Baller D, Gleichmann U et al. Improvement of coronary vasodilatation capacity through single LDL apheresis. *Atherosclerosis*. 1998; 139: 173-78.
20. Chiu HC, Kovacs A, Blanton R et al. Transgenic expression of fatty acid transport protein 1 in the heart causes lipotoxic cardiomyopathy. *Circulation Research*. 2005; 96: 225-33.
21. Park TS, Hu Y, Noh HL et al. Ceramide is a cardiotoxin in lipotoxic cardiomyopathy. *Journal of Lipid Research* 2008; 49: 2101-12.
22. Lin LC, Wu CC, Yeh HI et al. Downregulated myocardial connexin 43 and suppressed contractility in rabbits subjected to a cholesterol-enriched diet. *Lab Invest* 2005; 85: 1224-37.
23. Meenagh C, Mulholland C, Ryan MF. Magnesium homeostasis and antipsychotic-induced QTc prolongation. *Journal of Psychopharmacology* 2004; 18: 438-39.
24. Vemuri R, Philipson KD. Influence of sterols and phospholipids on sarcolemmal and sarcoplasmic reticular cation transporters. *The Journal of biological chemistry*. 1989; 264: 8680-85.
25. Ortega A, Mas-Oliva J. Cholesterol effect on enzyme activity of the sarcolemmal (Ca<sup>2+</sup> + Mg<sup>2+</sup>)-ATPase from cardiac muscle. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1984; 773: 231-36.
26. Moffat MP, Dhalla NS. Heart sarcolemmal ATPase and calcium binding activities in rats fed a high cholesterol diet. *The Canadian Journal of Cardiology*. 1985; 1: 194-200.
27. Chen CC, Lin YC, Chen SA et al. Shortening of cardiac action potentials in endotoxic shock in guinea pigs is caused by an increase in nitric oxide activity and activation of the adenosine triphosphate-sensitive potassium channel. *Critical Care Medicine* 2000; 28: 1713-20.
28. Kulmatycki KM, Abouchehade K, Sattari S, Jamali F. Drug-disease interactions: reduced beta-adrenergic and potassium channel antagonist activities of sotalol in the presence of acute and chronic inflammatory conditions in the rat. *British Journal of Pharmacology* 2001; 133: 286-94.

To cite this article: Tek M, Cetin S. Platelet distribution width can be a useful marker of decreased platelet activity after percutaneous mitral balloon valvuloplasty. Turk J Clin Lab 2019; 10: 348-352.

## ■ Original Article

# Platelet distribution width can be a useful marker of decreased platelet activity after percutaneous mitral balloon valvuloplasty

*Trombosit dağılım genişliği, perkütan mitral balon valvüloplasti sonrası azalmış trombosit aktivitesinin yararlı bir göstergesi olabilir*

Mujgan TEK\* , Mehmet Serkan CETIN 

TOBB Economy and Technology University, Department of Cardiology, Ankara/TURKEY

### Abstract

**Aim:** Increased platelet activity and elevated mean platelet volume (MPV) has been demonstrated in patients with rheumatic mitral stenosis (RMS). However, platelet distribution width (PDW) and the impact of percutaneous mitral balloon valvuloplasty (PMBV) on PDW has never been studied. Therefore, we aimed to investigate whether PMBV decreases PDW in patients with RMS.

**Material and Methods:** Symptomatic patients with severe RMS undergoing PMBV were included. Echocardiographic characteristics and hematologic parameters was measured just before and 1 month after the PMBV procedure.

**Results:** A total of 30 patients (24 female, mean age: 49.8±13.2 years) were included the study. Mean transmitral pressure gradient, pulmonary artery pressures and left atrium diameter decreased but mitral valve area increased significantly after PMBV. PMBV procedure significantly decreased PDW in patients with RMS (13.5±2.3 vs 12.4±1.9 fL, before and after procedure, respectively; p<0.0001). MPV was decreased after PMBV but it was not statistically significant (10.9±0.8 vs 10.6±0.9 fL, p=0.056). Platelet count was significantly increased after procedure (250±62.6 vs 273.5±78.6 x10<sup>3</sup>/ul, p=0.035). In linear regression analysis, an independent relationship was found in magnitude of PDW decrease and magnitude of increase in mitral valve area ( :0.491, p=0.046).

**Conclusion:** PMBV is associated with a significant decrease in PDW 1 month after the procedure. There was a significant correlation between the magnitude of decrease in PDW and magnitude of increase in mitral valve area after PMBV.

**Keywords:** platelet distribution width; platelet activity; percutaneous mitral balloon valvuloplasty

Corresponding author\*: Müjgan Tek, TOBB Economy and Technology University, Department of Cardiology, Ankara/TURKEY

E-mail: drmujgantek@hotmail.com

ORCID: 0000-0002-1718-1843

Received: 21.03.2019 accepted : 08.04.2019

Doi: 10.18663/tjcl.542806

## Öz

**Amaç:** Romatizmal mitral darlığı (RMD) olan hastalarda artmış trombosit aktivitesi ve yüksek ortalama trombosit hacmi (MPV) gösterilmiştir. Bununla birlikte, trombosit dağılım genişliği (PDW) ve perkütan mitral balon valvüloplasti'nin (PMBV) PDW üzerindeki etkisi hiç çalışılmamıştır. Bu nedenle, RMD'lı hastalarda PMBV işleminin PDW üzerine etkisini araştırmayı amaçladık.

**Gereç ve Yöntemler:** PMBV uygulanan ciddi RMD'lı semptomatik hastalar dahil edildi. Ekokardiyografik özellikler ve hematolojik parametreler PMBV işleminden hemen önce ve bir ay sonra ölçüldü.

**Bulgular:** Çalışmaya toplam 30 hasta (24 kadın, ortalama yaş:  $49,8 \pm 13,2$  yıl) dahil edildi. Ortalama transmitral basınç gradyanı, pulmoner arter basınçları ve sol atriyum çapı azaldı, ancak mitral kapak alanı PMBV'den sonra anlamlı olarak arttı. PMBV prosedürü RMD'lı hastalarda PDW'yi anlamlı şekilde azalttı (sırasıyla  $13.5 \pm 2.3$  vs  $12.4 \pm 1.9$  fL, prosedürden önce ve sonra;  $p < 0.0001$ ). MPV, PMBV'den sonra azaldı, ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $10.9 \pm 0.8$ 'e karşılık  $10.6 \pm 0.9$  fL,  $p = 0.056$ ). Trombosit sayısı işlem sonrası anlamlı olarak arttı ( $250 \pm 62.6$  vs  $273.5 \pm 78.6 \times 10^3 / \mu\text{l}$ ,  $p = 0.035$ ). Lineer regresyon analizinde, PDW azalmasının büyüklüğü ile mitral kapak alanındaki artışın büyüklüğü arasında bağımsız bir ilişki bulundu ( $r = 0.491$ ,  $p = 0.046$ ).

**Sonuç:** PMBV, işlemden 1 ay sonra PDW'de belirgin bir azalma ile ilişkilidir. PMBV'den sonra PDW'deki düşüşün büyüklüğü ile mitral kapak alanındaki artışın büyüklüğü arasında anlamlı bir ilişki vardır.

**Anahtar kelimeler:** trombosit dağılım genişliği; trombosit aktivitesi; perkütan mitral balon valvüloplasti

## Introduction

Rheumatic mitral stenosis (RMS) is still a serious cause of mortality and morbidity in developing countries and systemic thromboembolism is a major complication of RMS [1]. Increased platelet activity that has been demonstrated in rheumatic mitral stenosis significantly contributes to prothrombotic state [2-3]. Previous studies have shown that percutaneous mitral balloon valvuloplasty (PMBV) decreases the risk of systemic embolism and platelet activity in patients with RMS [4-7]. Although the mechanism of reduced platelet activity by PMBV remains unclear, alterations in the hemodynamic and echocardiographic factors such as increased mitral valve area (MVA), reduced left atrial area, left atrial pressure, and pulmonary artery systolic pressure after PMBV might have a role in reduced platelet, thrombin, and fibrinolytic activities after PMV [4-7].

Platelet activity can be measured by using different laboratory tests. Platelet indices are frequently used and easy available markers to measure platelet activity [8] but only a few studies in the literature have measured platelet indices in RMS [9-11]. These studies showed increased mean platelet volume (MPV) in patients with RMS [9-10] and decreased MPV after PMBV [11]. However, platelet distribution width (PDW) which is known as more specific marker of platelet activation than MPV has not

been evaluated in RMS yet. Therefore, the aim of our study is to evaluate the effect of PMBV on PDW in patients with RMS.

## Material and Methods

### Study population

This retrospective study included thirty patients who underwent successful PMBV due to symptomatic RMS. Patients included in the study were carefully checked for conditions that might increase platelet activity from their medical records (hypertension, diabetes mellitus, renal failure, hepatic failure, other valve diseases, acute or chronic infection, malignancy, etc.). The patients with incomplete information and patients who were not followed up after the procedure were excluded from the study. PMBV had been performed by the transseptal approach using INOUE balloon catheter. Written consent was obtained from all patients and the study protocol was approved by the local ethic committee

### Echocardiography

The echocardiographic examinations were performed with System V and a Vivid T8 from GE Ultrasound (GE Medical Systems, Wisconsin, USA) with a 1.7/3.4 MHz harmonic transducer and a multiplane 6.7 MHz transesophageal probe. Measurements of MVA, transmitral pressure gradient, pulmonary artery pressure, left atrial diameter were recorded from echocardiographic

reports of the studied patients that has performed before and one month after procedure. MVA had been calculated using Doppler pressure half-time method. Two dimensional examination was done to assess Wilkins score [12].

All patients had been underwent transesophageal echocardiography (TEE) examination to confirm absence of left atrial thrombus before valvuloplasty. For TEE, all patients were studied in the fasting state beginning five hours before examination. The oropharynx was anaesthetised by topical application of lidocaine spray. When needed light sedation with 2.5–5.0 mg midazolam was given intravenously. After introduction of the multiplane transducer probe and adjustment of gain and compression settings a standardised examination was performed. The left atrium and the left atrial appendage were closely inspected for the presence of thrombi.

**Blood sample analysis**

Platelet activity has been measured by using MPV, PDW and platelet count derived from whole blood count of the patients that were done just before and one month after procedure. The same sampling method was used before and after procedure.

**Statistical analysis**

All statistical analyses were performed using the SPSS 20 (SPSS INC, Chicago, Illinois, USA). Continuous variables are presented as mean ± Standard deviation. Categorical data were presented as number (%). Variables, before and after the procedure, were compared using paired t-test. The relationships between PDW and MVA, pulmonary artery systolic pressure, left atrial diameter, mean transmitral pressure gradient were performed using the Pearson correlation analysis. Linear regression analysis was used for evaluating independent association between PDW decrease and change in echocardiographic parameters. A calculated difference of p<0.05 was considered to be statistically significant.

**Results**

Thirty patients with symptomatic RMS undergoing PMBV were included. The baseline characteristics of the study group are summarized in Table 1. The mean age of the patients included in this study were 49.8±13.2 years and 24 of the 30 patients (80%) were female. All patients presented with severe RMS with mitral valve area of 1.02 ±0.3 cm<sup>2</sup> and echocardiographic score of 6.9 + 1.2. At entry into the study, 8 patients (26.7%) were in atrial fibrillation. The medications most frequently used were beta-blockers (80% of cases) followed by aspirin (73%) and diuretics (60%).

**Table 1:** Demographic characteristics and medication of the study group.

Variables	Values
Patients, n	30
Age, years	49.8±13.2
Male/female, n (%)	6/24 (20/80)
Rhythm (Sinus/AF)	22/8
Hemoglobin (g/dl)	13.3±1.8
Hematocrit (%)	40.7±4.9
Platelet count (x103/ul)	251.7±64.8
Mean platelet volume (fL)	10.9±0.8
Platelet distribution width (fL)	13.5±2.31
Medications, n (%)	
Aspirin	22 (73.3)
Warfarin	8 (26.6)
Beta Blockers	24 (80)
Diuretics	18 (60)

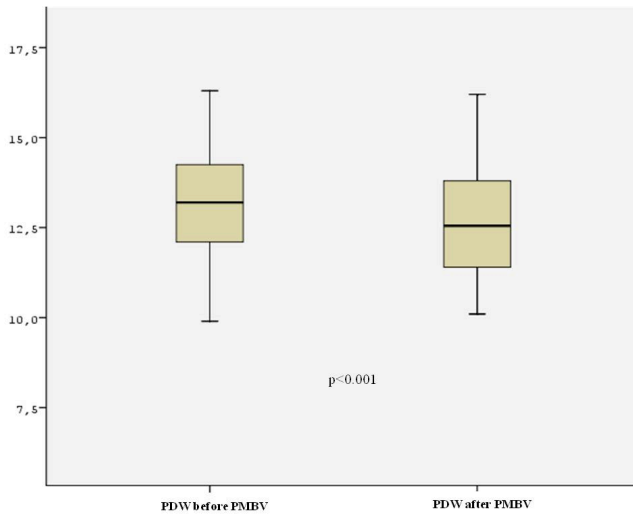
AF, atrial fibrillation

**Changes after percutaneous mitral balloon valvotomy**

Changes in echocardiographic characteristics and hematologic parameters of the overall patients before and after PMBV procedure are summarized in Table 2. Mean transmitral pressure gradient, pulmonary artery pressures and left atrium diameter decreased significantly after PMBV. Mitral valve area increased significantly after PMBV. PMBV procedure significantly decreased PDW in patients with RMS (13.5±2.3 vs 12.4±1.9 fL, before and after procedure, respectively; p<0.001) (Figure 1). MPV was decreased after PMBV but it was not statistically significant (10.9±0.8 vs 10.6±0.9 fL, p=0.056). Platelet count was significantly increased after procedure (250±62.6 vs 273.5±78.6 x103/ul, p=0.035).

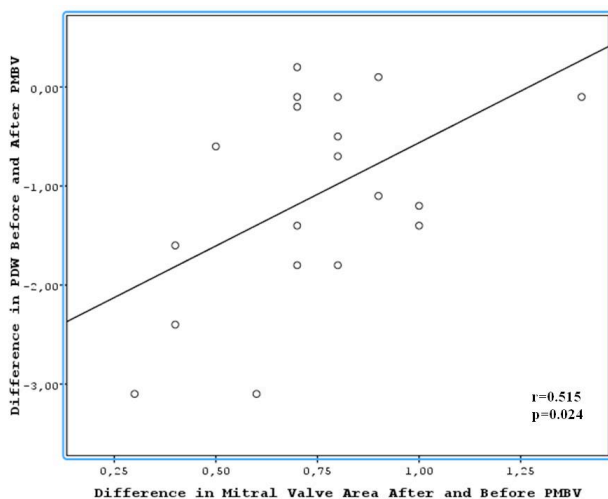
**Table 2:** Comparison of echocardiographic findings and hematologic parameters before and after mitral balloon valvuloplasty.

	Before PMBV	After PMBV	P
Mitral valve area (cm <sup>2</sup> )	1.2±0.14	2.0±0.2	<0.001
Mean transmitral pressure gradient (mmHg)	10.5±3.7	4.8±2.5	<0.001
Left atrium diameter (cm)	4.7±0.61	4.5±0.65	0.003
Pulmonary artery systolic pressure (mmHg)	39.1±14.4	28.1±7.6	<0.001
Mean platelet volume (fL)	10.9±0.87	10.6±0.95	0.056
Platelet distribution width (fL)	13.5±2.3	12.4±1.9	<0.001
Platelet count (x103/ul)	250±62.6	273.5±78.6	0.035



**Fig 1.** Platelet distribution width (PDW) before and after percutaneous mitral balloon valvuloplasty (PMBV).

Pearson correlation analysis demonstrated that there was a significant correlation between the magnitude of decrease in PDW and magnitude of increase in MVA after PMBV ( $r=0.515$ ,  $p=0.024$ ) (Figure 2). However, there was no significant correlation among the magnitude of decrease in PDW and magnitude of decrease in the left atrium diameter ( $r=0.228$ ,  $p=0.380$ ), magnitude of decrease in mean transmitral pressure gradient ( $r=0.92$ ,  $p=0.701$ ) and magnitude of decrease in pulmonary artery pressure ( $r=0.346$ ,  $p=0.206$ ). In linear regression analysis, an independent relationship was found in magnitude of PDW decrease and magnitude of increase in MVA ( $r=0.491$ ,  $p=0.046$ ). There was no relationship between magnitude of PDW decrease and change in other echocardiographic parameters. Results of the regression analysis are showed in Table 3.



**Fig 2.** Correlations between the change in mitral valve area (MVA) and platelet distribution width (PDW).

**Table 3:** Relation between magnitude of PDW decrease and echocardiographic parameters in linear regression analysis.

Variables	B coefficient	SE	T-value	P
$\Delta$ PASP ( mmHg)	0.351	0.029	1.464	0.174
$\Delta$ LA diameter (cm)	0.303	1.071	1.357	0.205
$\Delta$ MVA (cm <sup>2</sup> )	0.491	1.096	2.162	0.046
$\Delta$ Mean gradient (mmHg)	0.249	0.105	1.052	0.318

Abbreviations:  $\Delta$ , change before and after PMBV

### Discussion

The main finding of our study is that PDW was significantly decreased after PMBV, reflecting platelet activity in patients with RMS. In our study, we found that the mechanism of PDW decrease after PMBV was increase in MVA.

Platelets participate the process of coagulation, inflammation and thrombosis. Several laboratory tests including platelet number and size, secretory substances of platelets (PF4 and beta-thromboglobulin), surface P-selectin are used to estimate platelet activity [13]. However, MPV and PDW are simple platelet indices, which are increased during platelet activation. Platelet activation causes morphologic changes of platelets and PDW represents the heterogeneity of platelet size [8]. Clinical use of MPV is more extensive but PDW is a more direct marker to represent platelet reactivity than MPV [14, 15].

RMS is associated with embolic complications and increased platelet activity [2,3]. Previous studies demonstrated that platelet activation occurs in peripheral blood of patients with RMS both in atrial fibrillation and sinus rhythm [16, 17]. The mechanism of platelet activation in RMS could be explained by increased shear stress against turbulent flow in and around the stenotic mitral valve [18,19]. Another factor is blood stasis in the left atrium.

PBMV is a successful intervention in patients with MS that provides hemodynamic and symptomatic improvement [20]. Chiang et al. [7] reported that patients with previous PMBV had a lower incidence of thromboembolism. Several studies demonstrated that platelet activity significantly decreased after optimal PMBV [11]. In our study we demonstrated a significant decrease in PDW levels 1 month after PMBV revealing decreased platelet activity after PMBV. Chen et al.[4] described the mechanism of reducing platelet activity after PMBV due to increase in MVA by PMBV instead of hemodynamic and echocardiographic factors. In contrast to Chen, Hasan-ali et al. [21] found a significant improvement in left atrium diameter and pulmonary arterial systolic pressure after PMBV which significantly predict the decrease in the platelet activity. In our study, we found a positive correlation between the increase of MVA and decrease of PDW levels. However, in our study we could not find any relationship between PDW decrease and other echocardiographic parameters after PMBV similar to Chen and colleagues [21].



MPV decrease after PMBV has been assessed by Erdoğan et al.[11] and they found a significant decrease in MPV 1 month after the procedure. In our study we found a decrease in MPV but it was not statistically significant. Our study showed that MPV and PDW were both decreased after PMBV, but PDW was more sensitive and useful test reflecting decreased platelet activity after PMBV.

### Study limitations

Several limitations of our study should be noted. As this was a retrospective, single-center study, which included a relatively small sample of patients, potential cause-effect relationship could not be determined. The use of another assays such as soluble p-selectin or soluble CD40L would provide a more sensitive and accurate evaluation of the platelet activation status before after PMBV.

### Conclusion

Larger platelets are haemostatically more active and a risk factor for developing thromboembolic events and patients with increased MPV and PDW, could be easily identified during routine haematological analysis. RMS is associated with increased platelet activities that decrease after PMBV. Altered hemodynamics play a possible role in these changes. PDW is more sensitive and specific than MPV for the detection of reduced platelet activities after PMBV.

### Declaration of conflict of interest

The authors received no financial support for the research and/or authorship of this article. There is no conflict of interest.

### References

1. Harb SC, Griffin BP. Mitral Valve Disease: a Comprehensive Review. *Curr Cardiol Rep* 2017; 19: 73.
2. Tengiz I, Ercan E, Sahin F et al. Presence of factors that activate platelet aggregation in mitral stenotic patients' plasma. *Curr Control Trials Cardiovasc Med* 2005; 6: 2.
3. Chen MC, Wu CJ, Yip HK et al. Left atrial platelet activity with rheumatic mitral stenosis: correlation study of severity and platelet p-selectin expression by flow cytometry. *Chest* 2003; 124: 1663-69.
4. Chen MC, Wu CJ, Chang HW et al. Mechanism of reducing platelet activity by percutaneous transluminal mitral valvuloplasty in patients with rheumatic mitral stenosis. *Chest*. 2004; 125: 1629-34.
5. Kataoka H, Yano S, Tamura A, Mikuriya Y. Hemostatic changes induced by percutaneous mitral valvuloplasty. *Am Heart J* 1993; 125: 777-82.
6. Zaki A, Salama M, El Masry M et al. Immediate effect of balloon valvuloplasty on hemostatic changes in mitral stenosis. *Am J Cardiol*. 2000;85 (3):370-375.
7. Chiang CW, Lo SK, Cheng NJ, Lin PJ, Chang CH. Predictors of systemic embolism in patients with mitral stenosis. A prospective study. *Ann Intern Med* 1998; 128: 885-89.
8. Vagdatli E, Gounari E, Lazaridou E, et al. Platelet distribution width: a simple, practical and specific marker of activation of coagulation. *Hipokratia* 2010; 14: 28-32.
9. Varol E, Ozaydin M, Turker Y, Alaca S. Mean platelet volume, an indicator of platelet activation, is increased in patients with mitral stenosis and sinus rhythm. *Scand J Clin Lab Invest* 2009; 69: 708-12.
10. Boyacı A, Topaloğlu S, Yılmaz S, et al. Regional left atrial coagulation and fibrinolytic activities in patients with mitral stenosis. *Jpn Heart J* 2004; 45: 779-88.
11. Erdoğan D, İçli A, Aksoy F, Yücel H et al. Percutaneous mitral balloon valvuloplasty reduces mean platelet volume in patients with rheumatic mitral stenosis. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 2012; 72: 452-58.
12. Wilkins GT, Weyman AE, Abascal VM, Block PC, Palacios IF. Percutaneous balloon dilatation of the mitral valve: an analysis of echocardiographic variables related to outcome and the mechanism of dilatation. *Br Heart J* 1988; 60: 299-308.
13. Golebiewska EM, Poole AW. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev*. 2015; 29: 153–62.
14. Yılmaz F, Koklu E, Kızılırmak Yılmaz F et al. Evaluation of mean platelet volume and platelet distribution width in patients with asymptomatic intermediate carotid artery plaque. *Kardiol POL* 2017; 75: 35-41.
15. Cetin M, Bakırcı EM, Baysal E, et al. Increased platelet distribution width is associated with ST-segment elevation myocardial infarction and thrombolysis failure. *Angiology*. 2014; 65: 737-43.
16. Chen MC, Chang HW, Juang SS, Yip HK, Wu CJ. Increased plasma levels of soluble P-selectin in rheumatic mitral stenosis. *Chest* 2004; 126: 54-58.
17. Topaloğlu S, Boyacı A, Ayaz S et al. Coagulation, fibrinolytic system activation and endothelial dysfunction in patients with mitral stenosis and sinus rhythm. *Angiology* 2007; 58: 85-91.
18. Stein PD, Sabbah HN. Turbulence blood flow in the ascending aorta of humans with normal and diseased aortic valves. *Circ Res* 1976; 39: 58-65.
19. Yu SK, Latour JG, Marchandise B et al. Shear stress-induced changes in platelet reactivity. *Thromb Haemost* 1978; 40: 551-560.
20. Block PC, Palacios IF, Block EH, Tuzcu EM, Griffin B. Late follow up after percutaneous balloon mitral valvotomy. *Am J Cardiol* 1992; 69: 537-41.
21. Hasan-Ali H, Mosad E. Changes in platelet, coagulation, and fibrinolytic activities in mitral stenosis after percutaneous mitral valvotomy: role of hemodynamic changes and systemic inflammation. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2015; 21: 339-47.

■ Original Article

## The relationship between leukocyte activation and apoptosis in venous insufficiency etiopathogenesis

### *Varis etiopatogenezinde lökosit aktivasyonu ile apoptozisin ilişkisi*

Naim Boran TUMER<sup>\*1</sup> , Erkan IRIZ<sup>2</sup> , Ozlem GULBAHAR<sup>3</sup> , Dilek ERER<sup>2</sup> , Halim SONCUL<sup>2</sup> , Elif COSKUN<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Ankara City Hospital, Department of Cardiovascular Surgery, Ankara/TURKEY

<sup>2</sup>Gazi University, School of Medicine, Department of Cardiovascular Surgery, Ankara/TURKEY

<sup>3</sup>Gazi University, School of Medicine, Department of Clinical Biochemistry, Ankara/TURKEY

#### Abstract

**Aim:** Varicose veins are the most common disorders of the lower extremities. The purpose of this study is to investigate the effect of leukocyte activation in the vein wall and apoptosis in the etiopathogenesis of varicose veins.

**Material and Methods:** Forty-six patients with varicose veins were included in the study. High ligation with stripping with or without additional individual ligation and excision was performed for symptoms, complications or cosmetic needs. ELISA was used to measure the serum concentration of caspase-8 and caspase-9.

**Results:** There was a statistically significant difference between the cephalic vein and saphenous vein groups ( $p=0.04$  and  $p<0.0001$  respectively).

**Conclusion:** As a conclusion, the complex pathophysiology underlying varicose veins has yet to be fully defined. It is suggested that both leukocyte activation and dysregulation of apoptosis are associated with susceptibility for varicose vein formation however this argument needs further research.

**Keywords:** apoptosis; venous insufficiency; leukocyte activation; caspase

Corresponding author\*: Naim Boran TUMER, Ankara City Hospital, Department of Cardiovascular Surgery, Ankara/TURKEY

E-posta: naimborantumer@hotmail.com

ORCID: 0000-0002-4775-2053

Received: 15.07.2019 accepted: 11.08.2019

Doi: 10.18663/tjcl.592106

## Öz

**Amaç:** Variköz venler alt ekstremitelerin en sık görülen rahatsızlıklarıdır. Bu çalışmanın amacı, lökosit aktivasyonunun ven duvarındaki apoptozis ve variköz venlerin patogenezindeki etkisini araştırmaktır.

**Gereç ve Yöntemler:** Çalışmaya variköz venleri olan 46 hasta dahil edildi. Hastalara semptomları, komplikasyonları veya kozmetik sebeplerle strippingle yüksek ligasyon, ve eksizyon yapıldı. Serum kaspaz-8 ve kaspaz-9 ölçümleri ELISA kullanılarak yapıldı.

**Bulgular:** Sağlıklı sefalik ven ile variköz safen ven gruplarının sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edildi ( $p=0.04$  and  $p<0.0001$ ).

**Sonuç:** Variköz ven oluşumunun altındaki karmaşık patofizyoloji henüz yeterince açıklanamamıştır. Hem lökosit aktivasyonunun hemde apoptozisdeki bozulmanın variköz ven oluşumuna katkısı olduğunu düşünmekteyiz.

**Anahtar kelimeler:** apoptozis; venöz yetmezlik; lökosit aktivasyonu; kaspaz

## Introduction

Varicose veins are the most common disorders of the lower extremities. It affects nearly half of female and one-quarter of the male population in general [1]. Veins have different wall structure than arteries, and they work in lower pressure environment and function against gravity as a result of their structural valves and musculovenous pumps [3]. The known major risk factors of varicose veins are increased age, prolonged standing, pregnancy, ligamentous laxity, obesity, leg trauma and previous venous thromboses [4-7]. It is suggested that venous thrombosis increases the inflammatory process in the vein wall and thus results in fibrosis and destruction of venous valves leading to chronic venous insufficiency [8,9].

Family history and genetic predisposition are other important risk factors of varicose vein formation however there is still ongoing debate about the genetic factors that cause varicose veins and also chronic venous insufficiency [10].

Vein wall has three layers which are; tunica intima, tunica media and tunica adventitia. In the inner layer of tunica media, the smooth muscle cells are arranged longitudinally whereas they are arranged circularly in the outer layer. Usually these smooth muscle cells in the tunica media are located regularly and side-by-side, however, in the varicose veins this usual manner of smooth muscle cells are destroyed, and collagen deposits are seen. Although the exact mechanism of this destruction is unknown, failure or down-regulation of programmed cell death, apoptosis, is suggested to be one of the essential factors [11, 12].

More recently, the role of inflammation and leukocyte activation resulting in localised endothelial activation/dysfunction is suggested to be an essential factor in the aetiology of varicose veins [13]. Shear stress reduction due to venous reflux and consequent venous hypertension triggers activation of leukocytes and endothelial cells. These cells express chemokines, cytokines, growth factors, proteases, that further all result in inflammation [14].

The purpose of this study is to investigate the effect of leukocyte activation in the vein wall and apoptosis in the etiopathogenesis of varicose veins.

## Material and Methods

### Patients:

Forty-six patients with varicose veins were included in the study. The study protocol and informed consent were approved by the Gazi University Ethics Committee (Approval number 2009/0.9-2.6), and all patients gave informed consent. The patients were classified according to clinical, etiological, anatomical and pathophysiological (CEAP) classifications (20) (Table 1). High ligation with stripping with or without additional individual ligation and excision was performed for symptoms, complications or cosmetic needs. After written informed consent was given, 10 ml of blood was drawn from the greater saphenous vein (GSV), and at the same time, 10 ml of blood was pulled from the cephalic vein of upper extremity for the control group in the same patient. The blood samples were put into EDTA and serum separation tubes for analyses.



**Table 1.** Clinical, etiological, anatomical and pathophysiological (CEAP) classification (20).

Clinical classification (C0-C6)	Etiologic classification	Anatomic classification	Pathophysiologic classification
C0: No visible or palpable signs of venous disease	Ec: Congenital	As: Superficial veins	Pr: Reflux
C1: Telangiectasies or reticular veins	Ep: Primary	Ap: Perforator veins	Po: Obstruction
C2: Varicose veins	Es: Secondary (post-thrombotic)	Ad: Deep veins	Pr,o: Reflux and obstruction
C3: Edema	En: No venous cause identified	An: No venous location identified	Pn: No venous pathophysiology identifiable
C4a: Pigmentation or eczema			
C4b: Lipodermatosclerosis or atrophie blanche			
C5: Healed venous ulcer			
C6: Active venous ulcer			

**Biochemical and haematological analyses:**

Samples used for serum collection were allowed to clot at room temperature before centrifugation, and the supernatants were stored at -80°C until further use. ELISA was used to measure the serum concentration of caspase-8 and caspase-9 (Bender MedSystems GmbH, Austria). The samples in the EDTA tubes were sent for complete blood count and measured by routine laboratory methods.

Statistical analysis: All statistics were performed using SPSS version 12.0 for Windows (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Continuous variables were expressed as the mean±SD and were compared by unpaired Student's t-test or Mann Whitney U-test. All the data for the normality of distribution using the Kolmogorov-Smirnov test were analysed. Statistical significance was assumed if the p-value was less than 0.05.

**Results**

**Demographic Parameters:**

Forty-six patients enrolled in this study. The demographic data is shown in table 2. Venous pressures of lower and upper extremities were measured in both upright and recumbent positions. Mean lower extremity venous pressures were 79.17±5.28 and 39.5±6.36 mm Hg respectively and mean upper extremity venous pressures were 64.13±4.29 and 28.33±5.22 respectively in upright and supine positions.

**Biochemical and haematological results:**

Caspase 8 was measured 0.47±0.04 ng/ml in cephalic vein group and 0.49±0.02 ng/ml in saphenous vein group. Caspase 9 was measured 1.40±0.22 ng/ml in cephalic vein group and 1.58±0.23 ng/ml in saphenous vein group. There was a statistically significant difference between the cephalic vein and saphenous vein groups (p=0.04 and p<0.0001 respectively) as shown in table 3.

**Table 2:** Demographic properties of the study group

Clinical characteristic	Study Group (n=46)
Mean age ± SD, (years)	47.63±8.12
Mean body mass index ±SD, kg/m2	27.25±2.67
Female gender, n	21
CEAP stage	
CEAP 3, n (%)	14 (30.4)
CEAP 4a, n (%)	13 (28.3)
CEAP 4b, n (%)	12 (26.1)
CEAP 5, n (%)	4 (8.7)
CEAP 6, n (%)	3 (6.5)

CEAP: Clinical, Etiological, Anatomical and Pathophysiological classification.

**Table 3:** Caspase values in study groups

Apoptotic enzymes	Cephalic vein group (n=46)	Saphenous vein group (n=46)	P
Caspase 8 (mean±SD), ng/ml	0.47±0.04	0.49±0.02	0.040*
Caspase 9 (mean±SD), ng/ml	1.40±0.22	1.58±0.23	<0.0001*

\*p value <0.05, statistically significant

The mean values of haemoglobin, hematocrit, red blood cells, MVC, MCH, MCHC, RDW data are shown in Table 4. There was no statistically significant difference between the cephalic and saphenous groups. Platelet, MPW, Pct, PDW values are also evaluated in table 5. The mean values were found similar in cephalic vein and saphenous vein groups. The mean values of leukocytes, lymphocyte, monocytes, neutrophil, eosinophils and basophils are shown in Table 6. There was a statistically significant difference between the mean values of leukocyte, lymphocyte (%), monocyte, neutrophil, neutrophil (%) and eosinophil (%) when compared between cephalic and saphenous vein groups (p <0.05).

**Table 4.** The mean values of hemoglobin, hematocrit, red blood cells, MVC, MCH, MCHC, RDW in study groups

	<b>Cephalic vein group (n=46)</b>	<b>Saphenous vein group (n=46)</b>	<b>P</b>
Red blood cells (106/ $\mu$ l)	4.06 $\pm$ 0.47	4.09 $\pm$ 0.51	0.786
Hemoglobin (g/dl)	12.26 $\pm$ 1.48	12.61 $\pm$ 1.52	0.266
Hematocrit (%)	36.30 $\pm$ 4.12	37.14 $\pm$ 4.10	0.334
MVC (fL)	86.50 $\pm$ 3.49	86.82 $\pm$ 3.35	0.660
MCH (pg)	29.30 $\pm$ 1.63	29.50 $\pm$ 1.47	0.547
MCHC (g/dl)	33.80 $\pm$ 1.38	34.09 $\pm$ 1.20	0.287
RDW (%)	13.26 $\pm$ 1.12	13.48 $\pm$ 1.19	0.366

**Table 5:** The mean values of platelet, MPW, PCT ve PCT in study groups

	<b>Cephalic vein group (n=46)</b>	<b>Saphenous vein group (n=46)</b>	<b>P</b>
Platelets (103/ $\mu$ l)	197.09 $\pm$ 43.09	208.11 $\pm$ 48.14	0.250
MPW (fL)	8.76 $\pm$ 1.24	9.05 $\pm$ 1.39	0.290
Pct (%)	0.17 $\pm$ 0.06	0.18 $\pm$ 0.07	0.534
PDW (%)	16.01 $\pm$ 0.93	16.34 $\pm$ 0.90	0.088

**Table 6:** The mean values of Leukocytes, Lymphocytes, Monocytes, Neutrophils, Eosinophils and Basophilic cells in the study groups

	<b>Cephalic vein group (n=46)</b>	<b>Saphenous vein group (n=46)</b>	<b>P</b>
White Blood Cells (103/ $\mu$ l)	7.70 $\pm$ 1.76	6.67 $\pm$ 1.93	0.009*
Lymphocytes (%)	28.52 $\pm$ 7.47	32.90 $\pm$ 6.42	0.003*
Lymphocytes ((103/ $\mu$ l)	1.69 $\pm$ 0.52	1.80 $\pm$ 0.58	0.363
Monocytes (%)	7.83 $\pm$ 2.29	7.38 $\pm$ 1.94	0.305
Monocytes(103/ $\mu$ l)	0.58 $\pm$ 0.22	0.49 $\pm$ 0.18	0.030*
Neutrophils (%)	61.73 $\pm$ 7.85	57.44 $\pm$ 6.40	0.005*
Neutrophils (103/ $\mu$ l)	4.16 $\pm$ 1.85	3.40 $\pm$ 1.53	0.035*
Eosinophils (%)	1.49 $\pm$ 0.85	1.89 $\pm$ 1.02	0.047*
Eosinophils (103/ $\mu$ l)	0.11 $\pm$ 0.08	0.14 $\pm$ 0.12	0.135
Basophils (%)	0.54 $\pm$ 0.34	0.52 $\pm$ 0.31	0.726
Basophils (103/ $\mu$ l)	0.03 $\pm$ 0.06	0.03 $\pm$ 0.10	0.896

\*p value <0.05, statistically significant

## Discussion

Varicose veins, although mostly considered a cosmetic problem, usually result in a poor quality of life and even severe morbidity due to ulcers of the lower extremity as a result of chronic venous insufficiency. There are many theories in the literature regarding the pathophysiology and aetiology of varicose veins however there is no consensus on the issue.

Our study showed that apoptotic dysregulation was present in patients with varicose veins. The serum levels of caspase-8

and caspase-9 that were withdrawn from the GSV were higher than the cephalic vein. This result suggests that there is an increase in apoptotic activity.

Apoptosis, programmed cell death, is a biological process necessary for the continuity and homeostasis of the organism. Dysregulated apoptosis is suggested to be an essential factor in the pathogenesis of cancer, ischemic heart disease, autoimmune diseases, inflammation and stroke [15, 16]. It is reported that increased apoptotic activity was present in the endarterectomy and atherectomy specimens from renal, coronary and carotid arteries [17]. In contrast, this increased activity was not present in the varicose veins in some studies and additionally it was reported that apoptosis was downregulated in these cohorts [11,18,19].

Caspases are a family of cysteine proteases, which are involved in the extrinsic phase of apoptosis [20]. In the present study, we observed a significant difference in serum levels of both caspase-8 and caspase-9 in the GSV than the cephalic vein of the same patient as a control. We demonstrated that the serum levels of both caspase-8 and caspase-9 were increased in the saphenous veins of the patients meaning that the apoptosis was up-regulated. This result seems to contradict with the literature as in the research most of the studies reported a decreased apoptosis in varicose veins. However, in all these studies, the authors dealt with the tissue expressions of the apoptotic proteins, not the serum levels. We think that this is the limitation of our research that we did not study the tissue expression of apoptosis.

One of the many theories about the pathophysiology of venous insufficiency is the leukocyte entrapment theory and local hypoxia [21]. According to the entrapment theory, inflammation is activated in the vessels due to venous hypertension and reflux. Inflammation results in the activation of leukocytes, and they release cytokines such as transforming growth factor [TGF]-b1, interleukin-1 and tumour necrosis factor-  $\alpha$ , as well as oxygen free radicals. It is also reported that the expression of matrix metalloproteinases is increased which are neutral endopeptidases that catalyse the degradation of the proteins of the extracellular matrix (ECM) [22]. Due to his entrapment of leukocytes in the vein wall and valves, the number of circulating neutrophils decreases in the serum. In our study, the numbers of leukocytes were significantly reduced in the serum drawn from the GSV.

Local hypoxia due to venous hypertension, dilatation of vein and blood pooling is another problem in varicose veins. It is demonstrated that there is upregulation of hypoxia-



inducible factors and their target genes in a varicose vein [23]. Dysregulation of hypoxia-inducible factor pathways may also affect apoptosis in the cell wall and abnormality of the ECM [19, 24]. The cytokines released from the leukocytes are suggested to be related with the dysregulation of the apoptosis.

As a conclusion, the complex pathophysiology underlying varicose veins has yet to be fully defined. It is suggested that both leukocyte activation and dysregulation of apoptosis are associated with susceptibility for varicose vein formation however this argument needs further research.

### Declaration of conflict of interest

The authors received no financial support for the research and/or authorship of this article. There is no conflict of interest.

### References

1. Beebe-Dimmer JL, Pfeifer JR, Engle JS, Schottenfeld D. The epidemiology of chronic venous insufficiency and varicose veins. *Ann Epidemiol* 2005; 15: 175-84.
2. Baker SR, Stacey MC, Jopp-McKay AG, Hoskin SE, Thompson PJ. Epidemiology of chronic venous ulcers. *Br J Surg* 1991; 78: 864-67.
3. Lurie F: Venous haemodynamics: what we know and don't know. *Phlebology* 2009; 24: 3-7
4. Criqui MH, Denenberg JO, Bergan J, Langer RD, Fronck A. Risk factors for chronic venous disease: the San Diego Population Study. *J Vasc Surg* 2007; 46: 331-37.
5. Scott TE, LaMorte WW, Gorin DR, Menzoian JO. Risk factors for chronic venous insufficiency: a dual case-control study. *J Vasc Surg* 1995; 22: 622-68.
6. Chiesa R, Marone EM, Limoni C, Volonte M and Petrini O. Chronic venous disorders: correlation between visible signs, symptoms, and presence of functional disease. *J Vasc Surg* 2007; 46: 322-30.
7. Stacey MC, Burnand KG, Lea Thomas M, Pattison M. Influence of phlebographic abnormalities on the natural history of venous ulceration. *Br J Surg* 1991; 78: 868-71.
8. Myers D, Wroblewski S, Londy F et al. New and effective treatment of experimentally induced venous thrombosis with anti-inflammatory rPSGL- Ig. *Thromb Haemost* 2002; 87: 374-82.
9. Henke PK, Varga A, De S et al. Deep vein thrombosis resolution is modulated by monocyte CXCR2 mediated activity in a mouse model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1130- 37.
10. Oklu R, Habito R, Mayr M et al. Pathogenesis of varicose veins. *J Vasc Interv Radiol.* 2012; 23: 33-39.
11. Ascher E, Jacob T, Hingorani A, Gunduz Y, Mazzariol F, Kallakuri S. Programmed cell death (Apoptosis) and its role in the pathogenesis of lower extremity varicose veins. *Ann Vasc Surg* 2000; 14: 24-30.
12. Yongbo X, Wei H, Lei W et al. Changes in levels of apoptosis in the walls of different segments of great saphenous varicose veins. *Phlebology* 2016; 31: 632-69.
13. Castro-Ferreira R, Cardoso R, Leite-Moreira A, Mansilha A. The Role of Endothelial Dysfunction and Inflammation in Chronic Venous Disease. *Ann Vasc Surg.* 2018 ; 46: 380-93.
14. Raffetto JD, Mannello F. Pathophysiology of chronic venous disease. *Int Angiol* 2014; 33: 212-21.
15. Reed JC, Miyashita T, Takayama S et al. Bcl-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy. *J Cell Biochem* 1996; 60: 23-32.
16. Fisher GH, Rosenberg FJ, Strauss SE et al. Dominant interfering fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 1995; 81: 935-46.
17. Saxena A, Mcmeekin JD, Thomson DJ. Expression of Bcl-x, Bcl-2, Bax and Bak in endarterectomy and atherectomy specimens. *J Pathol* 2002; 196: 335-42.
18. Diaz JL, Oltersdorf T, Horne W et al. A common binding site mediates heterodimerization and homodimerization of Bcl-2 family members. *J Biol Chem* 1997; 272: 11350-55.
19. Ducasse E, Giannakakis K, Speziale F et al. Association of Primary Varicose Veins with Dysregulated Vein Wall Apoptosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2008; 35: 224-29.
20. Shiozaki EN, Shi Y. Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. *Trends Biochem Sci* 2004; 29: 486-94.
21. Coleridge Smith PD, Thomas P, Scurr JH, Dormandy JA. Causes of venous ulceration: a new hypothesis. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1988; 296: 1726-27.
22. Castro-Ferreira R, Cardoso R, Leite-Moreira A, Mansilha A. The role of endothelial dysfunction and inflammation in chronic venous disease. *Ann Vasc Surg* 2018; 46: 380-93.
23. Lim CS, Kiriakidis S, Paleolog EM, Davies AH. Increased activation of the hypoxia-inducible factor pathway in varicose veins. *J Vasc Surg* 2012; 55: 1427-39.
24. Ascher E, Jacob T, Hingorani A, Tsemekhin B, Gunduz Y. Expression of molecular mediators of apoptosis and their role in the pathogenesis of lower-extremity varicose veins. *J Vasc Surg* 2001; 33: 1080-86.

To cite this article: Tak BT, Cay S, Yuksel M, Ekizler FA, Kayhan MA, Kafes H, Yayla C, Kayacetin E. Tp-e interval and Tp-e/qt ratio in patients with non alcoholic fatty liver disease. Turk J Clin Lab 2019; 10: 358-363

## ■ Original Article

# Tp-e interval and Tp-e/qt ratio in patients with non alcoholic fatty liver disease

## *Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı olan bireylerde Tp-e intervali ve Tp-e/qt oranı*

Bahar Tekin TAK<sup>\*1</sup> , Serkan CAY<sup>1</sup> , Mahmut YUKSEL<sup>2</sup> , Firdevs Aysenur EKIZLER<sup>1</sup> ,  
Meral Akdogan KAYHAN<sup>2</sup> , Habibe KAFES<sup>1</sup> , Cagri YAYLA<sup>1</sup> , Ertugrul KAYACETIN<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Ankara City Hospital, Department of Cardiology, Ankara/TURKEY

<sup>2</sup>Ankara City Hospital, Department of Gastroenterology, Ankara/TURKEY

### Abstract

**Aim:** Ventricular repolarization is assessed using the Tp-e interval and QT interval corrected by the heart rate (QTc) via an electrocardiogram (ECG). Prolonged Tp-e/QTc is related with an increased risk of arrhythmias and cardiac mortality. As there have been few reports regarding the effects of NAFLD on ventricular repolarization, we aimed to appraise the assessment of Tp-e interval and Tp-e/QT ratio in patients with NAFLD.

**Material and Methods:** Totally 97 patients with NAFLD and 77 control subjects were enrolled in our study. Tp-e interval, Tp-e/QT and Tp-e/QTc ratios were measured from the 12-lead electrocardiogram.

**Results:** Heart rate was similar between groups ( $74.8 \pm 10.1$  vs.  $75.7 \pm 11.7$ ;  $p=0.598$ ). QT interval ( $396.0 \pm 34.2$  vs.  $384.6 \pm 30.7$ ;  $p=0.023$ ) and QTc interval ( $403.6 \pm 34.8$  vs.  $399.9 \pm 36.3$ ;  $p=0.027$ ), Tp-e interval ( $100.4 \pm 13.6$  vs.  $91.4 \pm 13.4$ ;  $p<0.001$ ), Tp-e/QT ratio ( $0.25 \pm 0.03$  vs.  $0.23 \pm 0.03$ ;  $p=0.003$ ) and Tp-e/QTc ratio ( $0.23 \pm 0.03$  vs.  $0.21 \pm 0.03$ ;  $p=0.002$ ) were significantly different between groups. There was significant correlation between Tp-e interval ( $r= 0.328$ ,  $p<0.001$ ) and Tp-e/QTc ratio and hepatic steatosis grade ( $r= 0.237$ ,  $p=0.002$ ).

**Conclusion:** Tp-e interval, QT interval, QTc interval, Tp-e/QT and Tp-e/QTc ratios were prolonged in patients with NAFLD. NAFLD is found an independent factor for increased Tp-e/QT ratio. This is the first study that investigated the Tp-e interval and Tp-e/QT parameters in patients with NAFLD.

**Keywords:** NAFLD; Tp-e interval; Tp-e/QTc ratio; ventricular repolarization

Corresponding author\*: Bahar TEKİN TAK, Ankara City Hospital, Department of Cardiology, Ankara/TURKEY

E-posta: tekinbahar@yahoo.com

ORCID: 0000-0003-0971-597X

Received: 17.04.2019 accepted : 18.08.2019

Doi: 10.18663/tjcl.555313

## Öz

**Amaç:** Elektrokardiyografide (EKG) ventriküler repolarizasyon Tp-e intervali ve kalp hızına göre düzeltilmiş QT (QTc) aralığı kullanılarak değerlendirilir. Uzamış Tp-e/QTc oranı aritmiler ve kardiyak mortalite riskinde artışla ilişkilidir. NASH (nonalkolik steatohepatit)'in ventriküler repolarizasyon üzerine etkileriyle ilgili az sayıda çalışma olduğu için, NASH hastalarında Tp-e interval ölçümlerini ve Tp-e/QT oranını değerlendirmeyi amaçladık.

**Gereç ve Yöntemler:** Çalışmamıza toplam 97 NASH hastası ile 77 kişilik kontrol grubu dahil edildi. Tp-e intervali, Tp-e/QT ve Tp-e/QTc oranları 12-lead elektrokardiyogram ile ölçüldü.

**Bulgular:** Kalp hızı her iki grupta da benzerdi ( $74.8 \pm 10.1$  vs.  $75.7 \pm 11.7$ ;  $p=0.598$ ). QT interval ( $396.0 \pm 34.2$  vs.  $384.6 \pm 30.7$ ;  $p=0.023$ ) ve QTc interval ( $403.6 \pm 34.8$  vs.  $399.9 \pm 36.3$ ;  $p=0.027$ ), Tp-e interval ( $100.4 \pm 13.6$  vs.  $91.4 \pm 13.4$ ;  $p<0.001$ ), Tp-e/QT oranı ( $0.25 \pm 0.03$  vs.  $0.23 \pm 0.03$ ;  $p=0.003$ ) ve Tp-e/QTc oranı ( $0.23 \pm 0.03$  vs.  $0.21 \pm 0.03$ ;  $p=0.002$ ), gruplararası anlamlı olarak farklı saptandı. Tp-e interval ( $r= 0.328$ ,  $p<0.001$ ) ve Tp-e/QTc oranı ile hepatik steatoz derecesi ( $r= 0.237$ ,  $p=0.002$ ) arasında anlamlı bir ilişki mevcuttu.

**Sonuç:** NASH hastalarında Tp-e interval, QT interval, QTc interval, Tp-e/QT ve Tp-e/QTc oranları uzamıştı. NASH 'in artmış Tp-e/QT oranı için bağımsız bir faktör olduğu bulundu. Bu çalışma NASH hastalarında Tp-e intervali ve Tp-e/QT parametrelerinin araştırıldığı ilk çalışmadır.

**Anahtar kelimeler:** NASH; Tp-e interval; Tp-e/QTc oranı; ventriküler repolarizasyon

## Introduction

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a pathologic condition frequently observed in clinical practice. The prevalence of NAFLD is approximately 25–30% among adults of the general population in Western countries but increases to approximately 70–75% among patients with type 2 diabetes mellitus[1]. It has become increasingly clear that NAFLD is not only associated with an increased liver-related morbidity and mortality but that coronary heart disease is the primary cause of death in patients with NAFLD[2]. Recent studies have also demonstrated that patients with NAFLD have an increased risk of cardiac arrhythmias, including atrial fibrillation (AF), heart rate-corrected QT (QTc) interval prolongation and ventricular arrhythmias[3].

Ventricular repolarization is evaluated with QT interval corrected by heart rate (QTc) in electrocardiogram (ECG). A prolonged QTc is related to an increased risk of sudden cardiac death according to the arrhythmias. It is known that hypothyroidism was related with QTc prolongation [4, 5]. Besides, a study showed that hyperthyroidism was associated with QTc prolongation. Recently, the T-peak to T-end (Tp-e) interval on 12 lead electrocardiogram (ECG) has been shown to correlate with ventricular repolarization abnormalities. Both QT and the Tp-e intervals are heart rate dependent and this dependence has also been associated with risk of ventricular arrhythmias [6]. For this reason, it has been claimed that Tp-e/QT ratio might be

an important and useful indicator of ventricular repolarization [7-9]. Currently, there is no study available on Tp-e interval and Tp-e/QT ratio in patients with hepatosteatosis. In this study, we aimed to appraise the assessment of Tp-e interval and Tp-e/QT ratio in patients with hepatosteatosis.

## Material and Methods

### Study design

This was a cross-sectional study that was conducted at a single center. Ninety-seven consecutive patients and 77 control subjects with January 2013 and March 2018, were enrolled to study. All subjects who investigated in this study were in sinus rhythm. All participants had no cardiac sign or symptom. Patients with coronary artery disease, chronic kidney disease, cirrhosis, viral hepatitis, drug induced liver disease or other chronic liver disease, left ventricular dysfunction, mild or severe valvular disorder, malignancy, advanced pulmonary disease, atrial fibrillation, any type of bundle branch block, cardiac device, those who were taking any drugs known to affect QT interval and those with excessive alcohol consumption (i.e. >30 g/day for men and >20 g/day for women) were excluded. Body mass index (BMI) was calculated by dividing weight in kilograms by the square of height in meters. Patients were considered to have hypertension if their blood pressure was  $\geq 140/90$  mmHg or if they were taking any anti-hypertensive drugs[10]. Diabetes mellitus was defined as fasting blood



glucose of 126 mg/dL or greater and treatment with antidiabetic drugs. Peripheral venous blood was drawn from antecubital vein and was obtained in the morning after a 12-hour fast. All biochemical analyses were determined by Standard methods. All patients underwent two-dimensional transthoracic echocardiography with the Vivid 7 system (GE Healthcare, Wauwatosa, Wisconsin). Ejection fraction was calculated by using modified Simpson method. The Institutional Research Ethics Committee approved the study and informed consent was obtained from each patient.

Abdominal ultrasonography (Toshiba-SSA-250A) was performed by an independent radiologists for all of the study population. Right kidney echogenicity was referenced for the determination of liver parenchyma echogenicity. If the kidney cortex and liver parenchyma echogenicity were the same, it was assumed as normal, i.e., no hepatosteatosis was present (Grade 0). Fat infiltration in liver is described in three sonographic stages. Grade 1 is defined as minimal-diffuse increase in hepatic echogenicity wherein the diaphragm and intrahepatic vessel contours seem normal. Grade 2 is defined as moderate-diffuse increase in hepatic echogenicity in which mild deterioration in the image of the diaphragm and intrahepatic vessels is observed. Grade 3 is defined as apparent increase in echogenicity is observed [11]. This study was approved by the local ethics committee. Informed constants were collected from all patients.

### Electrocardiography

The 12-lead ECG of the all participants were documented at amplitude of 20mm/mV and a velocity of 50mm/s (Hewlett Packard, Page-writer, USA) when the patients in supine position. The patients' ECG examples were scanned. After that, ECGs transferred to a personal computer to minimize the error measurements, and then used for x400% magnification by software. Two specialists who were blinded to the subjects' information evaluated the intervals. Patients with U waves were excluded. Mean value of three measurements was obtained for each lead. The QT interval was defined as from the origin of the QRS complex to the termination of the T wave. Bazett formula [ $QTc = QT\sqrt{(R-R \text{ interval})}$ ] was used to assess corrected QT interval (QTc). Tp-e interval was defined as the interval between the peak and the end of T wave. Precordial leads were used to calculate Tp-e intervals [12]. The Tp-e/QT ratio was calculated after the result of these measurements.

### Statistical Analysis

For statistical analysis, SPSS 20.0 Statistical Package Program for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used. In order to test normality of distribution Kolmogorov-Smirnov test was used. Quantitative variables with a normal distribution were specified as the mean  $\pm$  standard deviation and variables with non-normal distribution were shown as median (interquartile range), categorical variables were shown as number and percentage values. Categorical variables were compared with Chi-square test. Spearman correlation analysis was performed to examine the relationship between Tp-e interval, Tp-e/QTc and hepatic steatosis grade. Multivariable linear regression analyses were performed to examine the relationship between Tp-e/QTc and predictors. The significant predictors were adjusted in the later multivariate logistic regression analyses and subsequent sensitivity analyses. A p value of  $<0.05$  was accepted as statistically significant.

### Results

A total of 97 with patients with NAFLD and 77 control subjects were enrolled in our study. Baseline characteristics of study population are shown in Table 1. The mean age of the study population was  $55.2 \pm 11.2$  years and 43.7 % of participants were male and 36.5% of patients had hypertension and 23.7% of patients had diabetes mellitus. The mean age of NAFLD group was younger than control subjects ( $53.2 \pm 11.3$  vs.  $57.6 \pm 10.7$ ;  $p=0.009$ ). There were significant differences between groups in terms of albumin, alanine transaminase, aspartate aminotransferase, high-density lipoprotein cholesterol, and triglyceride values ( $p<0.05$ ).

The electrocardiographic findings of the study groups were shown in Table 2. Heart rate was similar between groups ( $74.8 \pm 10.1$  vs.  $75.7 \pm 11.7$ ;  $p=0.598$ ). QT interval ( $396.0 \pm 34.2$  vs.  $384.6 \pm 30.7$ ;  $p=0.023$ ) and QTc interval ( $403.6 \pm 34.8$  vs.  $399.9 \pm 36.3$ ;  $p=0.027$ ), Tp-e interval ( $100.4 \pm 13.6$  vs.  $91.4 \pm 13.4$ ;  $p<0.001$ ), Tp-e/QT ratio ( $0.25 \pm 0.03$  vs.  $0.23 \pm 0.03$ ;  $p=0.003$ ) and Tp-e/QTc ratio ( $0.23 \pm 0.03$  vs.  $0.21 \pm 0.03$ ;  $p=0.002$ ) were significantly different between groups. In correlation analysis, there was significant correlation between Tp-e interval ( $r=0.328$ ,  $p<0.001$ ) and Tp-e/QTc ratio and hepatic steatosis grade ( $r=0.237$ ,  $p=0.002$ ) (Table 3). In multivariate linear regression analysis, NAFLD is found an independent factor for increased Tp-e/QT ratio (Table 4).



**Table 1. Basal characteristics and laboratory parameters of the patients with NAFLD and control subjects.**

Parameters	NAFLD (n=97)	Controls (n=77)	p value
Age, years	53.2 ± 11.3	57.6 ± 10.7	0.009
Male, n (%)	45 (46.3)	31 (40.2)	0.418
Hypertension, n (%)	42 (43.3)	28 (36.3)	0.354
Diabetes Mellitus, n (%)	20 (20.6)	19 (24.6)	0.524
Smoking, n (%)	25 (25.7)	13 (16.8)	0.159
LVEF, %	60 (58-61)	60 (58-60)	0.109
Body mass index, kg/m <sup>2</sup>	28.9 (26.3-30.7)	27.6 (25.7-29.9)	0.088
Hemoglobin, g/dl	14.4 ± 1.5	14.2 ± 1.6	0.384
Platelets, 10 <sup>9</sup> /L	266.9 ± 73.0	271.5 ± 60.1	0.659
White blood cell, 10 <sup>9</sup> /L	7.3 ± 1.7	7.5 ± 1.7	0.601
Total protein, g/dL	7.4 ± 0.5	7.3 ± 0.4	0.076
Albumin, g/dL	4.5 ± 0.3	4.4 ± 0.3	0.037
AST, U/L	22 (17-28)	18 (15-25)	0.005
ALT, U/L	26 (20-41)	17 (14-24)	<0.001
Creatinine, mg/dl	0.78 (0.67-0.90)	0.76 (0.69-0.87)	0.701
Glucose, mg/dl	101 (89-112)	98 (91-112)	0.743
Total cholesterol, mg/dl	196.0 ± 38.9	184.6 ± 39.8	0.061
LDL cholesterol, mg/dl	111.8 ± 31.0	109.9 ± 33.7	0.705
HDL cholesterol, mg/dl	45.3 ± 10.8	49.4 ± 12.6	0.025
Triglyceride, mg/dl	1625(114.7-220.0)	1195(91.2-162.5)	<0.001
Sodium, mmol/l	141.2 ± 2.4	142.0 ± 2.6	0.053
Potassium, mmol/l	4.44 ± 0.32	4.43 ± 0.36	0.920
TSH, µIU/mL	1.83 (1.32-2.59)	1.81 (1.31-3.27)	0.973
Hepatic steatosis grade, n (%)			
Grade 1	39 (40.2)	-	-
Grade 2	45 (46.4)	-	-
Grade 3	13 (13.4)	-	-

Data are given as mean ± SD, median (interquartile range) or n (%); ALT, alanine transaminase; AST, aspartate aminotransferase; HDL, high-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein. LVEF, Left ventricular ejection fraction

**Table 2. Electrocardiographic and echocardiographic characteristics of the patients with NAFLD and control subjects.**

Parameters	NAFLD (n=97)	Controls (n=77)	p value
Heart rate, bpm	74.8 ± 10.1	75.7 ± 11.7	0.598
Tp-e interval, ms	100.4 ± 13.6	91.4 ± 13.4	<0.001
QT interval, ms	396.0 ± 34.2	384.6 ± 30.7	0.023
QTc interval, ms	403.6 ± 34.8	399.9 ± 36.3	0.027
Tp-e/QT ratio	0.25 ± 0.03	0.23 ± 0.03	0.003
Tp-e/QTc ratio	0.23 ± 0.03	0.21 ± 0.03	0.002

Data are given as mean ± SD. QTc, corrected QT interval.

**Table 3. Correlations between hepatic steatosis grade and Tp-e interval and Tp-e/QTc.**

Parameters	r	p value
Tp-e interval	0.328	<0.001
Tp-e/QTc	0.237	0.002

**Table 4. Association between Tp-e/QTc and Clinical Variables:Multivariable Linear Regression Model**

Variables	Univariable		Multivariable	
	OR* ( 95 % CI)	p value	OR* (95 % CI)	p value
Age	0.809 (0.664-0.985)	0.758	-	-
Body mass index	0.929 (0.743-0.965)	0.721	-	-
Total protein	0.005 (-0.006-0.017)	0.347	-	-
Albumin	-0.010 (-0.025-0.006)	0.232	-	-
AST	0.002 (0.000-0.003)	0.287	-	-
ALT	0.001 (0.000-0.003)	0.169	-	-
Hepatic steatosis grade	0.007 (0.003-0.012)	0.003	0.007(0.003-0.012)	0.003

ALT, alanine transaminase; AST, aspartate aminotransferase; CI, confidence interval;OR, odds ratio.

**Discussion**

In the present study, we demonstrated that Tp-e interval, QT interval, QTc interval, Tp-e/QT and Tp-e/QTc ratios were prolonged in patients with (NAFLD). This is the first study that investigated the Tp-e interval and Tp-e/QT parameters in patients with NAFLD.

Several studies showed the relationship between NAFLD

and QT interval. Hung et al. found the association of QTc prolongation and NAFLD [13]. They discussed that the potential mechanism that contributes to the association between NAFLD and the QTc interval can be inflammation. In their study, they observed association between high-sensitivity C-reactive protein and the QTc interval[13]. Also, they explained the association between NAFLD and the QTc interval with increased sympathetic activity according to the heart rate variability[13].

Targher et al. observed that the presence and severity of NAFLD on ultrasound was strongly associated with prolonged QTc interval in patients with type 2 diabetes, independently[14]. The pathophysiological mechanisms that link NAFLD to prolonged QTc interval are not clearly understood. According to the authors, NAFLD might be related with prolonged QTc interval simply as a consequence of shared cardiometabolic risk factors and co-morbidities or as a marker of coexisting ectopic fat accumulation in other organs. For instance, myocardial steatosis and increased pericardial fat volume might exert local adverse effects that result in functional and structural derangements of the myocardium[14]. Mantovani et al. examined the association between NAFLD and ventricular arrhythmias, defined as the presence of nonsustained ventricular tachycardia, 30 premature ventricular contractions/h, or both in a large sample of outpatients with type 2 diabetes referred for 24-h ambulatory Holter monitoring [15]. NAFLD is related with insulin resistance, lipid toxicity of myocardium, and the systemic release of a myriad of proinflammatory, procoagulant, pro-oxidant, and profibrogenic mediators that play major roles in the pathogenesis of the functional, structural, and arrhythmic abnormalities of the heart[15].

Prolonged ventricular repolarization parameters might cause mortality and sudden cardiac death by inducing malign arrhythmias[16]. QT dispersion and prolonged QT interval are important predictors of delayed heart repolarization on electrocardiography. In literature, there is inadequate data about electrocardiographic abnormalities and ventricular tachycardia in NAFLD.

Many studies have shown that increased dispersion of repolarization might predispose to ventricular arrhythmias. Tp-e interval, Tp-e/QT ratio and Tp-e/QTc ratio may be used as

electrocardiographic indexes of ventricular arrhythmogenesis and sudden cardiac death. Nowadays, the Tp-e interval and Tp-e/QT ratio have been studied as novel indicators of impaired ventricular repolarization dispersion [7, 8, 17]. Increased Tp-e interval was related higher mortality rate in the patients with long QT syndrome and Brugada syndrome[8]. The Heart rate does not affect the Tp-e/QT ratio that was accepted as more precise marker of the dispersion of ventricular repolarization, than QT dispersion, QTc dispersion and Tp-e intervals. [7, 18]. Tp-e/QT ratio is a potential significant index of arrhythmogenesis independent from the length of QT interval [8].

In our study, we showed that these markers were higher in patients with NAFLD. Also, we showed that NAFLD is an independent factor for increased Tp-e/QT ratio. However the mechanism which causes this condition is not clear. Liver fat and inflammation progresses and advanced fibrosis develops in NAFLD. Several modifications take place into the liver, such as increased in production of atherogenic lipoproteins and in an increased release into bloodstream of several pro-inflammatory (e.g., C-reactive protein, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and interleukin-6), pro-fibrinogen (e.g., transforming growth factor- $\beta$ ), pro-oxidant and thrombogenic (e.g., factor VIII, plasminogen activator inhibitor-1, and endothelin-1) mediators[1-3, 19, 20]. These molecules and proinflammatory alterations might have a negative role on the risk of cardiac complications, including arrhythmias[21, 22]. Especially, instability of the myocardium might potentially present cellular and ultrastructural changes in myocardium as well as modifications of the action potential duration (e.g., modifications of ion current and reduction of connexins), resulting in an increment the risk of arrhythmia[1].

Cross-sectional design and low number of patients are the main limitations. The study is single-center study and the patients' follow-up data is absent. Ventricular arrhythmias of the patients were not evaluated according to the repolarization parameters. Large sample sized randomized studies are needed to establish exact role of Tp-e interval and Tp-e/QT ratio in patients with NAFLD who suffering from the arrhythmias.

## Conclusion

In conclusion, this study demonstrated that Tp-e interval, Tp-e/QT and Tp-e/QTc ratios were prolonged in patients with NAFLD. Our study is considerable to display that NAFLD



may have a negative effect on cardiac conduction system, which potentially may induce formation of ventricular arrhythmias. Tp-e interval and Tp-e/QT ratio are simple, easily accessible, inexpensive and non-invasive methods that can be useful marker of predicting the ventricular arrhythmias in patients with NAFLD. Electrophysiological studies on human cardiomyocytes will be helpful in clarifying this issue.

### Declaration of conflict of interest

The authors received no financial support for the research and/or authorship of this article. There is no conflict of interest.

### References

1. Mantovani A. Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and Risk of Cardiac Arrhythmias: A New Aspect of the Liver-heart Axis. *Clin Transl Hepatol* 2017; 5: 134-41.
2. Targher G, Day CP, Bonora E. Risk of cardiovascular disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2010; 363: 1341-50.
3. Mantovani A, Ballestri S, Lonardo A, Targher G. Cardiovascular Disease and Myocardial Abnormalities in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Dig Dis Sci* 2016; 61: 1246-67.
4. Gurdal A, Eroglu H, Helvacı F et al. Evaluation of Tp-e interval, Tp-e/QT ratio and Tp-e/QTc ratio in patients with subclinical hypothyroidism. *Ther Adv Endocrinol Metab* 2017; 8: 25-32.
5. Bakiner O, Ertorer ME, Haydardedeoglu FE, Bozkirli E, Tutuncu NB, Demirag NG. Subclinical hypothyroidism is characterized by increased QT interval dispersion among women. *Med Princ Pract* 2008; 17: 390-94.
6. Kors JA, Ritsema van Eck HJ, van Herpen G. The meaning of the Tp-Te interval and its diagnostic value. *J Electrocardiol* 2008; 41: 575-80.
7. Zhao X, Xie Z, Chu Y et al. Association between Tp-e/QT ratio and prognosis in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention for ST-segment elevation myocardial infarction. *Clin Cardiol* 2012; 35: 559-64.
8. Gupta P, Patel C, Patel H et al. T(p-e)/QT ratio as an index of arrhythmogenesis. *J Electrocardiol* 2008; 41: 567-74.
9. Tasolar H, Ballı M, Bayramoglu A et al. Effect of smoking on Tp-e interval, Tp-e/QT and Tp-e/QTc ratios as indices of ventricular arrhythmogenesis. *Heart Lung Circ* 2014; 23: 827-32.
10. Williams B, Mancia G, Spiering W et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur Heart J* 2018; 39: 3021-104.
11. Needleman L, Kurtz AB, Rifkin MD, Cooper HS, Pasto ME, Goldberg BB. Sonography of diffuse benign liver disease: accuracy of pattern recognition and grading. *AJR Am J Roentgenol* 1986; 146: 1011-15.
12. Castro Hevia J, Antzelevitch C, Tornos Barzaga F et al. Tpeak-Tend and Tpeak-Tend dispersion as risk factors for ventricular tachycardia/ventricular fibrillation in patients with the Brugada syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47: 1828-34.
13. Hung CS, Tseng PH, Tu CH et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Is Associated With QT Prolongation in the General Population. *J Am Heart Assoc* 2015; 4.
14. Targher G, Valbusa F, Bonapace S et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease with QTc interval in patients with type 2 diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2014; 24: 663-69.
15. Mantovani A, Rigamonti A, Bonapace S et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Is Associated With Ventricular Arrhythmias in Patients With Type 2 Diabetes Referred for Clinically Indicated 24-Hour Holter Monitoring. *Diabetes Care* 2016; 39: 1416-23.
16. de Bruyne MC, Hoes AW, Kors JA, Hofman A, van Bommel JH, Grobbee DE. QTc dispersion predicts cardiac mortality in the elderly: the Rotterdam Study. *Circulation* 1998; 97: 467-72.
17. Yayla C, Bilgin M, Akboga MK et al. Evaluation of Tp-E Interval and Tp-E/QT Ratio in Patients with Aortic Stenosis. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 2016; 21: 287-93.
18. Antzelevitch C, Sicouri S, Di Diego JM et al. Does Tpeak-Tend provide an index of transmural dispersion of repolarization? *Heart Rhythm* 2007; 4: 1114-16; author reply 6-9.
19. Lonardo A, Ballestri S, Targher G, Loria P. Diagnosis and management of cardiovascular risk in nonalcoholic fatty liver disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2015; 9: 629-50.
20. Byrne CD, Targher G. Ectopic fat, insulin resistance, and nonalcoholic fatty liver disease: implications for cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014; 34: 1155-61.
21. Anstee QM, Targher G, Day CP. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; 10: 330-44.
22. Byrne CD, Targher G. NAFLD: a multisystem disease. *J Hepatol* 2015; 62: 47-64.

To cite this article: Yazıcı MU, Özdemir FMA, Öztoprak Ü, Azapağası E, Ekşioğlu AS, Yüksel D. Çocuk yoğun bakım ünitesinde akut hipoksi nedeniyle yatan hastaların yakın dönem nörolojik takibi. Turk J Clin Lab 2019; 10: 364-368.

## ■ Orjinal Makale

# Çocuk yoğun bakım ünitesinde akut hipoksi nedeniyle yatan hastaların yakın dönem nörolojik takibi

## *Recent neurological outcomes of patients admitted to pediatric intensive care unit for acute hypoxia*

Mutlu Uysal YAZICI\*<sup>1</sup> , Fatih Mehmet Akif ÖZDEMİR<sup>2</sup> , Ülkühan ÖZTOPRAK<sup>2</sup> , Ebru AZAPAĞASI<sup>1</sup> , Ayşe Seçil EKŞİOĞLU<sup>3</sup> , Ayşe AKSOY<sup>2</sup> , Deniz YÜKSEL<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Dr. Sami Ulus Kadın Doğum Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Pediatri Yoğun Bakım Kliniği, Ankara/TÜRKİYE

<sup>2</sup>Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Dr. Sami Ulus Kadın Doğum Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Nöroloji Kliniği, Ankara/TÜRKİYE

<sup>3</sup>Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Dr. Sami Ulus Kadın Doğum Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Radyoloji Kliniği, Ankara/TÜRKİYE

### Öz

**Amaç:** Beyin kan akımını ve dokulara oksijen sunumunu etkileyen çeşitli durumlarda (boğulma, arrest, asfiksi gibi) gelişebilen hipoksik iskemik beyin hasarı önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Bu çalışmanın amacı son iki yılda çocuk yoğun bakım ünitesi'nde akut hipoksi nedeniyle yatan hastaların etyoloji, klinik özellikler, tedavi ve yakın dönem nörolojik takip sonuçlarının değerlendirilmesidir.

**Gereç ve Yöntemler:** Çalışmaya Mayıs 2017- Nisan 2019 tarihleri arasında ÇYBÜ'ye yatırılan 1 ay-18 yaş arası daha öncesinden sağlıklı, mental ve motor gelişim basamakları normal olan akut hipoksi nedeniyle yatırılan 25 hasta alındı. ÇYBÜ'de arrest sonrası değerlendirme için Pediatrik Serebral Performans Kategori Skorlama Sistemi (PCPC) kullanıldı.

**Bulgular:** Hastaların geliş Glaskow koma skalası (GKS) median:6 (min:3 max:15) iken; yoğun bakımdan çıkış GKS: 10 (min:6 max:15) olarak tespit edildi ( $p<0,05$ ). Hastaların arrest olduktan hemen sonra kan gazında asidozda oldukları,  $HCO_3^-$ 'ün belirgin düşük olduğu, pH: (min:7.23 - max:7.61); Laktat'ın yüksek (min:8 - max: 145); AST'nin min:21 - max:712 ve CK'nın yüksek (min:47 - max:3351) olduğunu ve ÇYBÜ'ye yatırılıp hızlıca uygun tedavi başlandıktan 24 saat sonra hastaların asidozdan çıktığı pH: (min:7.23 - max:7.61); AST (min:15 - max:83); ALT (min:6 - max:45) ve CK (min:16 - max:258) ve Laktat'ın (min:8 - max:93) gerilediğini gördük ve bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı saptandı. ( $p<0,05$ )

**Sonuç:** Akut Hipoksinin patofizyolojisinin iyi anlaşılması, erken dönemde tedavi stratejilerinin geliştirilerek beynin hasardan korunması gereklidir. Olguların nörolojik izlemi ve yardımcı görüntüleme tetkikleri ile hasarın ciddiyeti ve prognoz üzerine etkileri araştırılıp en uygun tedavi yapılmalıdır. Akut hipoksiden geçen çocuklarda nörolojik sekel riskini en aza indirmek için hastalar resusitasyon sonrası en erken dönemde ÇYBÜ'ye yatırılmalı ve multidisipliner tedavi edilmelidir.

**Anahtar kelimeler:** akut hipoksi; nörolojik sonuç; çocuk; yoğun bakım

Sorumlu Yazar\*: Mutlu Uysal YAZICI, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Dr. Sami Ulus Kadın Doğum Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Pediatri Yoğun Bakım Kliniği, Ankara/TÜRKİYE

E-posta: mutluuysal@yahoo.com

ORCID: 0000-0001-7377-4718

Received: 18.06.2019 accepted: 19.08.2019

Doi: 10.18663/tjcl.578865

## Abstract

**Aim:** Hypoxic ischemic brain injury is an important cause of morbidity and mortality in all age groups. It may develop in various conditions (such as drowning, arrest, asphyxia ) affecting brain blood flow and oxygen supply to tissues. The aim of this study was to evaluate the etiology, clinical features, treatment and recent neurological follow-up outcomes of the patients hospitalized for acute hypoxia in the pediatric intensive care unit (PICU) in the last two years.

**Material and Methods:** The study included 25 patients whose age was 1 month-18 years and hospitalized in the PICU with complaint of acute hypoxia in between May 2017 and April 2019. The patients were previously having normal mental and motor development levels. Pediatric Cerebral Performance Category Scoring System (PCPC) was used for evaluation.

**Results:** The median Glaskow coma scale (GCS) was 6 (min: 3 max: 15) at admission compared with the median GCS: 10 (min: 6 max: 15) at the time of discharge from PICU ( $p < 0,05$ ). The tests immediately after the cardiac arrest revealed that the patients were in acidosis in blood gas test pH: (min:6.91 - max: 7.49); Hco<sub>3</sub> was lower, Laktat was high (min:8 - max: 145); AST (min:21 - max:712) ve CK was high (min:47 - max:3351) compared with the results measured 24 hours after the appropriate treatment was started the patients were released from acidosis pH: (min:7.23 - max:7.61); AST (min:15 - max:83); ALT (min:6 - max:45)ve CK (min:16 - max:258) ve Laktat'ın (min:8 - max:93) were measured as in between normal limits and the differences were found to be statistically significant ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** It is necessary to understand the pathophysiology of acute hypoxia and to protect the brain from damage by developing treatment strategies in the early period. The most appropriate treatment should be started while making close neurological follow up and trying to understand the severity of damage and effects on prognosis of these patients. To minimize the risk of neurological sequelae in pediatric patients undergoing acute hypoxia, in earlier period of admission these patients should be hospitalized in the PICU and managed by multidisciplinary team.

**Keywords:** acute hypoxia, neurological outcome, pediatric intensive care unit

## Giriş

Hipoksi dokuya taşınan oksijen miktarında azalma olup, iskemi dokuya glikoz ve oksijen ulaştırılmasını engelleyen kan akımındaki parsiyel veya tam yokluktur. Beyin kan akımını ve dokulara oksijen sunumunu etkileyen çeşitli durumlarda (boğulma, arrest, asfiksi gibi) gelişebilen hipoksik iskemik beyin hasarı her yaş grubunda önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Çocuk Yoğun Bakım ünitesi'nde sıklıkla karşılaşılan hipoksik iskemik beyin hasarı sonrasında prognostik durumun değerlendirilmesi uzamış hastane yatışı, maliyet ve bakım veren aile için kaygı uyandırmaktadır [1, 2]. Çocuk Yoğun Bakım Ünitesi'ne resüsitasyon yapılarak yatırılan bu hastaların uzun dönemde bilişsel ve motor alanda sekel gelişme riski yüksektir. İngiltere'de yapılmış bir çalışmada çocuklarda travmatik olmayan komanın yani akut hipoksinin insidansı 30/100.000 olarak bildirilmiştir [3]. Hipoksi ve iskemiye en hassas organ olan beyinde aynı anda birçok yolakta gelişen biyokimyasal olaylar zinciri hücre hasarına giden süreci başlatır. Patofizyolojisinin iyi anlaşılması, erken dönemde tedavi stratejilerinin geliştirilerek beynin hasardan korunması gereklidir. Olguların yakın nörolojik izlemi ve yardımcı görüntüleme tetkikleri ile hasarın ciddiyeti ve prognoz üzerine etkileri anlaşılmasına çalışılarak en uygun tedavi yaklaşımı

belirlenmeye çalışılır [4, 5]. Bu çalışmanın amacı son iki yılda çocuk yoğun bakım ünitesi'nde akut hipoksi nedeniyle yatan hastaların etyoloji, klinik özellikler, tedavi ve yakın dönem nörolojik takip sonuçlarının değerlendirilmesidir.

## Gereç ve Yöntemler

Çalışmaya Mayıs 2017- Nisan 2019 tarihleri arasında çocuk yoğun bakım ünitesi'ne yatırılan 1 ay-18 yaş arası daha öncesinden sağlıklı , mental ve motor gelişim basamakları normal olan akut hipoksi nedeniyle yatırılan 25 hasta alındı. Her hasta için demografik veriler, etyoloji, klinik, laboratuvar ve görüntüleme bulguları, tedavi ve yakın dönem nörolojik takiplerini içeren formlar dolduruldu. Hipoksi etyolojisinde; yabancı cisim aspirasyonu, ası, suda boğulma, arrest, şok, akut hava yolu obstrüksiyonu olan olgular dahil edildi. Travmatik, hemorajik, enfeksiyöz, metabolik ve kardiyak nedenle arrest olan olgular çalışmaya dahil edilmedi. Daha önceden nörolojik hastalığı ya da altta yatan kronik bir hastalığı olan olgular çalışmaya dahil edilmedi. ÇYBÜ'de arrest sonrası değerlendirme için Pediatrik Serebral Performans Kategori Skorlama Sistemi (PCPC) kullanıldı. Bu skorlama sistemi 1-6 puan arasında değişmektedir. 1: normal 2: ılımlı engellilik 3: orta derecede engellilik 4: ağır derecede engellilik 5: koma veya vejetatif state 6: beyin ölümü. şeklindedir. Tüm hastalar

çocuk yoğun bakımdan çıkarken bu sınıflama kullanılarak değerlendirildi. Sayısal verilerin normal dağılım durumu Kolmogorov-Smirnow ve Shapiro-Wilk testleriyle, normal dağılım göstermeyen sayısal verilerin dağılımı ortanca (min- max) şeklinde gösterildi. Normal dağılım göstermeyen bağımlı sayısal değişkenler arasındaki farklar Wilcoxon testi ile değerlendirildi. Çalışma için hastanemiz etik kurulundan onay alınmıştır ve çalışmamız Helsinki İlkeler Deklerasyonuna uyularak gerçekleştirilmiştir. Tüm hasta ebeveynlerinden bilgilendirilmiş onarm formları alınmıştır.

## Bulgular

Çalışmaya daha öncesinden sağlıklı olan 11 kız, 14 erkek olmak üzere toplam 25 hasta dahil edildi. Ortanca yaşları 13 ay ( min: 1 ay max: 16 yaş ) idi. Hipoksi etyolojisi ise sırayla şu şekildeydi ; Hastane dışı arrest (15 hasta) , 5 hasta akut gelişen hava yolu obstrüksiyonu, 2 hasta suda boğulma, 2 hasta başka hastanelerde iyi tedavi edilememiş hipovolemik şok ve 1 hastada da yabancı cisim aspirasyonu mevcuttu. Akut hipoksiden geçen hastaların 6'sında aspirasyon ve aspirasyon pnömonisi tespit edildi.

Hastaların geliş Glaskow koma skalası (GKS) median:6 ( min: 3 max: 15 ) iken; yoğun bakımdan çıkış GKS: 10 ( min: 6 max: 15 ) olarak tespit edildi. Kardiyopulmoner resüsitasyon 18 hastaya uygulanmış olup, ortanca resüsitasyon süresi 15 dak idi. (min: 10 dak maximal 60 dak) Çocuk yoğun Bakım ünitesinde 18 hastaya invaziv mekanik ventilasyon uygulanmış olup, 7 hastanın rezervuarlı maske ile oksijen tedavisi aldığı gözlemlendi.

Hastaların çocuk yoğun bakıma yatıştaki ilk muayenesinde; pupil incelemesi sonucu direk ışık refleksi 18 hastada bilateral pozitif alınırken, 7 hastada alınamadı. 13 hastada pupiller izokorik iken, 6 hastada pupiller miyotik, 6 hastada fix dilateydi. Hastaların geliş kan gazlarında ortanca pH: 7.1 ( min: 6,9 max: 7,3 ) , laktat düzeyi 46 mMol/L( min: 8 max: 145 ) ve HCO<sub>3</sub> düzeyleri 13 ( min: 4 max : 25 ) olarak bulundu. Hipoksi sonrasında hastaların ÇyBü'ye yatıştaki ve 24 saat sonraki laboratuvar değerleri Tablo 1 'de gösterilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1'e detaylı bakıldığında hastaların arrest olduktan hemen sonra kan gazında asidozda oldukları, Hco<sub>3</sub>'ün belirgin düşük olduğu, Laktat'ın yüksek, AST'nin ve CK'nin yüksek olduğunu ve Çocuk Yoğun Bakım Ünitesi'ne yatırılıp hızlıca uygun tedavi başlandıktan 24 saat sonra hastaların asidozdan çıktığı, kan pH'sının, AST/ALT/CK değerlerinin ve Laktatın hızlıca normale geldiğini görmekteyiz ve bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı saptandı. ( p<0,05)

25 hastanın çocuk yoğun bakımda ortanca yatış süresi : 10 gün (min:4 gün - max:85 gün )saptanırken, toplam hastanede yatış süresi ortancası 20 gün (min: 8max:140 gün )olarak görüldü.

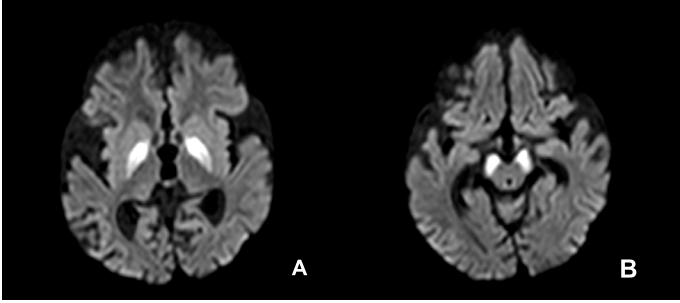
25 hastanın 6 tanesi ilk 72 saat içinde ex olurken, 19 hastanın yoğun bakım tedavisi tamamlanıp servislere devredildi. Ex olan hastaların geliş GKS: 3 ve resüsitasyon süresi 30 dakikadan uzundu, ilk nörolojik muayenelerinde ışık refleksi alınmıyordu ve pupiller fix dilate olarak görüldü, destek tedavisine rağmen nörolojik muayene bulgularında değişiklik olmadı, 3 hastaya beyin ölümü tanısı koyuldu fakat aile organ donasyonu olmayı kabul etmedi. Diğer 3 hasta nazokomiyal enfeksiyonlar nedeniyle kaybedildi. Çocuk yoğun izleminde nörolojik muayene ve radyolojik olarak beyin ödemi saptanan 16 hastaya antiödem tedavi olarak hipertonic salin (%3 NaCl) ve başa 30 derece elevasyon uygulandı .

Akut Hipoksiden geçen hastalar hemodinamik olarak stabilendikten ve hipoksi üzerinden 5-7 gün geçtikten sonra nöroradyolojik görüntüleme ve eş zamanlı olarak EEG çekilerek beyin aktivitesi değerlendirildi. Hastaların nöroradyolojik görüntülenmesinde 10 hastada sadece bazal ganglion tutulumu ( Şekil 1a ve 1b), 6 hastada ise hemisferik tutulum (Şekil 2a ve 2b) 9 hastada bazal ganglion ve watershed sulama alanlarında tutulum (Şekil 3 a ve 3b) saptandı. Elektroensefalografik incelemesinde ise; toplamda 18 hastaya yoğun bakımda şartlarında hasta başında EEG çekilebildi, bunlardan bir tanesi yoğun artefakt nedeniyle net değerlendirilemedi, geriye kalan 7 hastanın bulguları normal sınırlardaydı. Yedi hastada zemin aktivitesinde anormallik

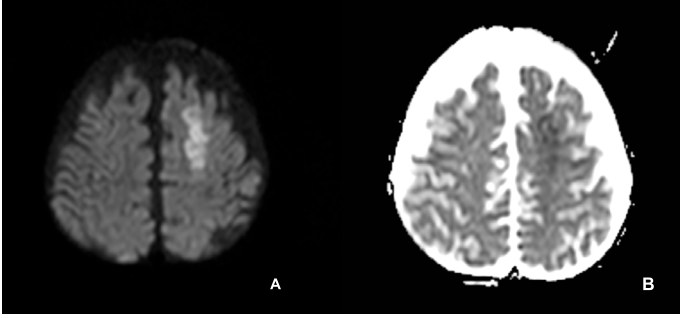
**Tablo 1:** Hastaların ÇYBÜ'ye ilk yatış ve 24 saat sonraki laboratuvar değerleri

	ÇYBÜ ilk Yatış ortanca	(min - maks)	ÇYBÜ 24 Saat sonraki ortanca	(min - maks)	p
HCO <sub>3</sub> (mEq/L)	18	4 - 30	24	17 - 47	0.002
Laktat (mMol/L)	26	8 - 145	17	8 - 93	0.001
pH	7.27	6.91 - 7.49	7.40	7.23 - 7.61	<0.001
AST (IU/L)	118	21 - 712	83	15 - 551	0.004
ALT (IU/L)	68	7 - 299	45	6 - 223	0.09
CK	669	47 - 3351	258	16 - 18745	0.37
CK-MB	92	10 - 745	58	13 - 641	0.17
Troponin	0.07	0 - 1.17	0	0 - 6.73	0.40

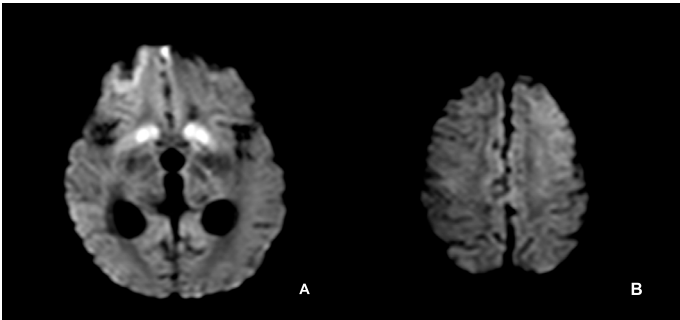
saptanırken bunlardan 3'üne aynı zamanda epileptik anormallik de eşik ediyordu. Toplamda 6 hastada epileptik anormalliğin varlığı saptandı.



**Şekil 1:** Bilateral Globus Pallidusda (a) ve serebral pedinküllerde (b) diffüzyon kısıtlaması gösteren akut hipoksik değişikliklerle uyumlu alanlar izlenmektedir.



**Şekil 2:** a: 800 b: (ADC) sekanslarda diffüzyon ağırlıklı incelemede sol sentrumsemiovale düzeyinde , sol paryetal bölgede subkortikal-derin beyaz cevher alanlarında akut iskemi ile uyumlu diffüzyon kısıtlaması gözlenmektedir.



**Şekil 3:** a: Bazal gangliyon düzeyinde b: sol yüksek paryetal bölgede kortikal düzeyde akut iskemiyeye sekonder kısıtlanmış diffüzyon alanları gösterilmiştir.

18 tane hasta mekanik ventilasyonda izlenirken, 6 hastaya trakeostomi açıldı,12 hasta ekstübe edildi. 4 hastaya gastrotomi takıldı.6 hastaya trakeostomi ve ev tipi ventilatör desteği verildi. 12 hastaya akut konvülsiyon nedeniyle antiepileptik tedavi uygulandı.Hiçbir hastaya terapötik hipotermi tedavisi uygulanmadı. Çocuk nöroloji takiplerinde yatış ve taburculuk sonrası en az 1 yıllık sürelik izlemde

bu hastalardan antiepileptik tedavi başlanan 12 hastanın sadece 3 tanesinde semptomatik epilepsi tanısı koyulup uzun süreli antiepileptik ilaç aldığı görüldü. 3 hastada tetraparezi, 4 hastaya da paraparezi nedeniyle antispazmodik tedavi verildi. Bütün hastalara yattıkları süre boyunca fizik tedavi uygulandı, ayaklarına istirahat splinti takıldı ve tüm ailelere fizik tedavi,aspirasyon ve beslenme eğitimi verildi.

ÇYBÜ'de arrest sonrası değerlendirme için Pediatrik Serebral Performans Kategori Skorum Sistemi (PCPC) kullanıldı. Bu skorum sistemine göre hastalarımızın PCPC özellikleri tablo 2 de gösterilmiştir (Tablo 2).

Tablo 2: Pediatrik Serebral Performans Kategori Skorum Sistemi (PCPC)						
	1 Normal	2 Hafif Disability	3 Orta Disability	4 Ağır Disability	5 Koma	6 Beyin Ölümü
Hasta Sayısı	9	2	4	6	1	3

### Sonuçta;

25 hastanın 6 tanesi ÇYBÜ'de yatarken ilk 72 saat içinde ex oldu, geriye kalan 19 hastanın 6'sı trakeostomi ve ev tipi ventilatör ile evine gönderildi, 3 hasta tetraparezi olarak izlendi, %36 kötü nörolojik prognoz görülürken, 10 hastada (%45 ) iyi nörolojik prognoz izlendi.

### Tartışma

Bu çalışmada iki yıllık süreçte akut hipoksi ile kabul edilen öncesinde sağlıklı olan 25 olgunun verileri incelenmiş olup; 25 hastanın 6 tanesi ilk 72 saat içinde ex olurken, 19 hastanın yoğun bakım tedavisi tamamlanıp servislere devredildi. 18 tane hasta mekanik ventilasyonda izlenirken, 6 hastaya trakeostomi açıldı,12 hasta ekstübe edildi. 4 hastaya gastrotomi takıldı.6 hastaya trakeostomi ve ev tipi ventilatör desteği verildi. 12 hastaya akut konvülsiyon nedeniyle antiepileptik tedavi uygulandı.

Çocuk yoğun Bakım Ünitesi(ÇYBÜ)'ne akut hipoksi nedeniyle yatan hastalarda beyin hasarına yol açan(travma, arrest, boğulma, ası, hava yolu obstrüksiyonu gibi)nedenler gösterilmiştir. Tedavide önemli olan primer beyin hasarından çok sekonder beyin hasarı gelişmesini önlemektir. [6]. Primer beyin hasarı olay yerinde olmuştur, ÇYBÜ'de izlenirken hastaların nöbet kontrolü sağlanmalı, hiponatremi, hipokalsemi, hipoglisemi ve asidoz gibi durumların düzeltilmesi, hipotansiyon gelişmesi önlenmeli, ateşi düşürülmeli,gerekliyse antiödem tedavi başlanmalı,hastalarda serebral perfüzyon basıncını korumak için ortalama arteryel



tansiyon yükseltmeli ve kafa içi basınç düşürülmeye çalışılmalıdır. Kafa içi basınç düşürmek için baş 30C eleve edilir, hipertonic salin tedavisi başlanır ve hasta entübe ise end-tidal CO2 seviyesi ölçülerek beyin perfüzyonu optimal sağlanmaya çalışılır. [7]. Tüm hastalara optimal solunum ve kardiyak destek verildi, ılımlı hipokapni ile beraber hiperventilasyon uygulandı. arteriyel CO2 düzeyi 30-35 arasında tutuldu.

Akut hipoksi ile ÇYBÜ'ye kabul edilen hastalarda nörolojik sekel ve prognozu belirleyen önemli faktörler: geliş GKS, uygulanan resüsitasyon süresi, hastane dışı arrest olması ve ilk 72 saat içinde verilen uygun yoğun bakım tedavisidir. Fransa'da çok merkezli yapılan bir çalışmada üç yılda akut hipoksi öyküsü olan 57 hasta alınmış, başvurudan ilk 24 saat içinde 12 hasta ex olmuş, 3 hasta uyanmış ve 42 hastanın nörolojik durumları takip edilmiş, %38 oranında iyi nörolojik prognoz gösterilmiş. Yine aynı çalışmada resüsitasyon süresi >10 dakikadan uzun olması, geliş GKS<5 en kötü prognoza sahip olan hastalar olarak bildirilmiş. (pozitif prediktif değer:%91,%100, sensitivite %50, %54 bulunmuş [2]. Bizim çalışmamızda ilk 72 saatte 6 hasta(%24) ex oldu, 6 hasta uyandı, 9 hasta tam sekelsiz yoğun bakımdan taburcu edildi. Literatürde Hipoksik iskemik ensefalopati de mortalite %34-%73 oranında bildirilmiştir [8]. Bizim çalışmamızda mortalite %24 olarak görüldü.

Arrest sonrası ÇYBÜ'de izlenen hastaların morbidite ve mortalitesi çok yüksektir ve uzamış yatış süresi nazokomiyal enfeksiyonlar ve ciddi bir maliyete yol açmaktadır. Ronko ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada akut hipoksi sonrası yaşayan serebral palsili çocukların hastanede yatış maliyeti serebral palsili çocuk başına 100.000 dolar iken , kaybedilen çocuklar için bu maliyet 10.667 dolar olarak bildirilmiştir. [9]. Akut hipoksi sonrası rehabilitasyon ihtiyacı olan çocukların hastanede yatış süreleri uzundur ve maliyeti yüksektir.

Akut hipoksik hasar sonrası prognozu uzun dönemde belirleyen faktörler ise evde oksijen desteği , nazogastrik tüple ya da gastrostomi ile beslenme, trakeostomi ve ev tipi ventilatör olup olmamasıdır. 2017 yılında yenidoğan yoğun bakımda yapılmış 79 hastanın dahil edildiği bir prospektif çalışmada akut hipoksiden 72 saat sonra organ yetmezliğinin eşlik ettiği en sık da solunum ve kardiyak yetmezlik görüldüğü bildirilmiş. asidoz süresi ve derinliği ne kadar ağırsa o kadar çok organ yetmezliği görüldüğü söylenmiş [10]. Bizim çalışmamızda 6 hastada >4 organ yetmezliği, 3 hastada 3 organ yetmezliği saptanırken 2 hastada da 2 organ yetmezliği görüldü. En sık görülen organ yetmezlikleri solunum ve hepatik yemezlik iken bunu kardiyak yetmezlik takip ediyordu.

Çalışmanın kısıtlılıkları retrospektif kohort çalışması olması ve vaka sayısının az olmasıdır. Akut hipoksi ile başvuran hastaların çocuk yoğun bakımdan taburculuk sonrası uzun dönemde nörolojik takip ve radyolojik görüntüleme yapılmaması da diğer bir kısıtlılık olarak değerlendirilebilir.

## Sonuç

Çalışmamızda ; iki yıllık süreçte akut hipoksi ile kabul edilen öncesinde sağlıklı olan 25 olgunun verileri incelenmiş olup %36 kötü nörolojik prognoz görülürken, 10 hastada ( %45 ) iyi nörolojik prognoz izlendi.

## Maddi destek ve çıkar ilişkisi:

Çalışmayı maddi olarak destekleyen kişi/kuruluş yoktur ve yazarların herhangi bir çıkarı dayalı ilişkisi yoktur.

## Kaynaklar:

1. Kitai Y et al. Long-term outcome of childhood hypoxic-ischemic encephalopathy. No To Hattatsu 2015; 47: 43-48.
2. Mandel, R et al. Prediction of outcome after hypoxic-ischemic encephalopathy: a prospective clinical and electrophysiologic study. J Pediatr 2002; 141: 45-50.
3. Wong CP et al. Incidence, aetiology, and outcome of non-traumatic coma: a population based study. Arch Dis Child 2001; 84: 193-99.
4. Abend NS, Licht DJ. Predicting outcome in children with hypoxic ischemic encephalopathy. Pediatr Crit Care Med 2008; 9: 32-39.
5. Polat İK et al. Hipoksik İskemik Beyin Hasarı. Türkiye Klinikleri J Pediatr Sci 2018; 14: 30-36.
6. Kochanek PM et al. Cerebral resuscitation after traumatic brain injury and cardiopulmonary arrest in infants and children in the new millennium. Pediatr Clin North Am 2001; 48: 661-81.
7. Moler FW et al. Multicenter cohort study of out-of-hospital pediatric cardiac arrest. Crit Care Med 2011; 39: 141-49.
8. Carter BG, Taylor A, Butt W. Severe brain injury in children: long-term outcome and its prediction using somatosensory evoked potentials (SEPs). Intensive Care Med 1999; 25: 722-28.
9. Ronco R et al. Outcome and cost at a children's hospital following resuscitation for out-of-hospital cardiopulmonary arrest. Arch Pediatr Adolesc Med 1995; 149: 210-14.
10. Alsina M et al. The Severity of Hypoxic-Ischemic Encephalopathy Correlates With Multiple Organ Dysfunction in the Hypothermia Era. Pediatr Crit Care Med 2017; 18: 234-40.

■ Original Article

## Novel prognostic markers associated with poor survival in stage III rectal cancers: Invasive growth pattern and Tumor necrosis

### *Evre III rektal kanserlerde kötü sağkalım ile ilişkili yeni prognostik belirteçler: İnvaziv büyüme paterni ve Tümör nekrozu*

Mehmet ZENGİN\* 

Kirikkale University, Department of Pathology, Kirikkale/Turkey.

#### Abstract

**Aim:** Rectal carcinomas (RC) are one of the most common cancers in the Western World. TNM system is the most significant predictive indicator in these tumors but patients characterized by the same stage often have prominent distinct survival. In this research, we analyzed the survival effect of Invasive growth pattern (IGP) and Tumor necrosis (TN) in stage III RC.

**Material and Methods:** A hundred forty-five patients operated for stage III RC during 1999-2012 at Kirikkale University were included in this research. These parameters were scored on hematoxylin and eosin stained sections. The relationship between the results and the clinicopathological characteristics was analyzed.

**Results:** These parameters were significantly upregulated in RCs which classified as higher tumor size (IGP:  $p<0.001$ ; TN:  $p=0.033$ ), higher pT (IGP:  $p=0.016$ ; TN:  $p=0.047$ ), angiolymphatic invasion (IGP:  $p=0.025$ ), high number of metastatic lymph nodes (IGP:  $p<0.001$ ; TN:  $p=0.001$ ), advanced stage (IGP:  $p<0.001$ ; TN:  $p=0.018$ ), and advanced grade (IGP:  $p<0.001$ ). In univariate analysis, patients with these two parameters had worse 5-year survivals ([IGP= RFS: 50%,  $p=0.001$ ; OS=55%,  $p=0.003$ ], [TN= RFS: 53%,  $p=0.005$ ; OS: 58%,  $p=0.017$ ]). Multivariate analyzes confirmed that these two parameters are independent worse survival parameters for RFS (IGP=Hazard ratio [HR]: 1.58 [1.05-2.66],  $p=0.005$ ; TN=1.44 [1.07-2.34],  $p=0.013$ ) and OS (IGP=HR: 1.55 [1.11-3.18],  $p=0.008$ ; TN= 1.38 [1.09-2.28],  $p=0.024$ ). In addition, IGP was found to be more successful than TN.

**Conclusion:** Our data suggest that IGP and TN provide valuable prognostic information for RC, and adding these parameters to the current risk classification may contribute to better patient selection.

**Keywords:** Invasive growth pattern; tumor necrosis; rectal cancer; prognostic markers; stage III

Corresponding author\*: Mehmet Zengin, Kirikkale University, School of Medicine, Kirikkale/Turkey,

E-mail: mz1379@hotmail.com

ORCID: 0000-0003-1937-2771.

Received: 31.05.2019 accepted : 22.08.2019

Doi: 10.18663/tjcl.572566

## Öz

**Amaç:** Rektal kanserler (RK) batı dünyasında en sık görülen kanserlerden biridir. RK için en önemli prediktif gösterge TNM sistemidir. Bununla birlikte, aynı tümör evresi ile karakterize edilen hastalar sıklıkla belirgin farklı sağ kalımlara sahiptir. Bu araştırmada, stage III RK'larda İnvaziv büyüme paterni (İBP) ve Tümör nekrozu (TN)'nun hayatta kalmaya etkisini analiz ettik.

**Gereç ve Yöntemler:** 1999-2012 yılları arasında Kırıkkale Üniversite'sinde stage III RK nedeniyle opere olan yüz kırk beş hasta bu çalışmaya dahil edildi. Bu parametreler hematoxilen ve eozin boyalı kesitlerde skorlandı. Sonuçlar ve klinikopatolojik özellikler arasındaki ilişki analiz edildi.

**Bulgular:** Bu parametreler, büyük boyutlu tümör (İBP:  $p < 0.001$ ; TN:  $p = 0.033$ ), ileri PT (İBP:  $p = 0.016$ ; TN:  $p = 0.047$ ), angiolymphatic invazyon (İBP:  $p = 0.025$ ), lenf nodu metastazı sayısı (İBP:  $p < 0.001$ ; TN:  $p = 0.001$ ), ileri evre (İBP:  $p < 0.001$ ; TN:  $p = 0.018$ ) ve ileri grade (İBP:  $p < 0.001$ ) bulgusu gösteren RK'larda anlamlı olarak artırılıyordu. Tek değişkenli analizde, bu iki parametreye sahip hastalar 5 yıllık kötü sağkalıma sahipti ([İBP= RFS: 50%,  $p = 0.001$ ; OS=55%,  $p = 0.003$ ], [TN= RFS: 53%,  $p = 0.005$ ; OS: 58%,  $p = 0.017$ ]). Çok değişkenli analizler, bu iki parametrenin RFS (İBP=Hazard ratio [HR]: 1.58 [1.05-2.66],  $p = 0.005$ ; TN=1.44 [1.07-2.34],  $p = 0.013$ ) ve OS (İBP=HR: 1.55 [1.11-3.18],  $p = 0.008$ ; TN= 1.38 [1.09-2.28],  $p = 0.024$ ) için bağımsız bir kötü hayatta kalma parametresi olduğunu doğruladı. Ayrıca, IGP'nin TN'den daha yararlı olduğu bulundu.

**Sonuç:** Verilerimiz İBP ve TN'nin RK için değerli prognostik bilgiler sağladığını ve mevcut risk sınıflamasına bu parametrelerin eklenmesinin daha iyi hasta seçimine katkıda bulunabileceğini göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** invazif büyüme paterni; tümör nekrozu; rektal kanser; prognostik belirteçler; evre III

## Introduction

In the Western World, rectal cancers (RC) are one of the most frequent tumors. Prognosis is mainly affected by the spreading of the tumor at the diagnosis time. In the late stage of patients, especially stage III, there is generally a poor survival with an approximately 50-60% of 5-year overall survival after surgery and using of adjuvant chemo-radiotherapy is certain [1]. However, the same stage patients of cancer have often prominent distinct prognosis. In these cases, the TNM system does not consider other evidence that allows risk stratification such as Invasive growth pattern (IGP) and Tumor necrosis (TN). This is a particular clinical challenge and recent markers are needed to determined high-risk cases in RC [2].

Various histological features, including tumor differentiation, nodal metastases, and perineural or angiolymphatic invasion have been described as predictors of tumor recurrence. Since 1987, many studies described the presence of the IGP as a survival marker in RC with pushing cancers having a good prognosis than infiltrative cancers [3,4]. In addition, the IGP of RC's with liver metastases were shown to predict prognosis after liver resection [5]. However, it is not known whether the IGP is a response to local tumor-stromal interaction, genetically determined feature of the tumor, or a combination of the two. Moreover, TN has been considered as an independent survival marker in RC [6, 7]. However, the mechanisms that support the relationship between survival and necrosis are unclear.

The main propose of this research was to investigate the potential value of these two markers on recurrence and survival in stage III RC patients.

## Material and Methods

### Patients selection

The study was approved by Kırıkkale University Health Research Ethics Committee (2019.05.12). In this study, all procedures were consistent with the 1964 Helsinki declaration and the ethical standard of the national/institutional research committee. Informed consent was obtained from patients individually. The author do not have any financial participation and there is no conflict of interest.

In this retrospective research, all patients who surgically resected for stage III RC in Kırıkkale University between 1999-2012 ( $n = 145$ ) were identified. In this database; age, pT, size, number of lymph node metastasis, neural/vascular invasion, grade, and stage were collected retrospectively. RCs were categorized according to the following criteria: Age (mean age was 75;  $< 75$  and  $\geq 75$ ), pT (pT1/pT2 and pT3/pT4), size (mean size was 5,5 cm;  $\geq 5.5$  cm and  $< 5.5$  cm), perineural invasion (Yes and No), angiolymphatic invasion (Yes and No), Number of Lymph Node Metastasis ( $< 7$  and  $\geq 7$ ), stage (stage IIIA/IIIB and stage IIIC) and grade (Low/Moderate grade and High grade). All cases were re-evaluated according to American joint committee on cancer classification, 7th [8].

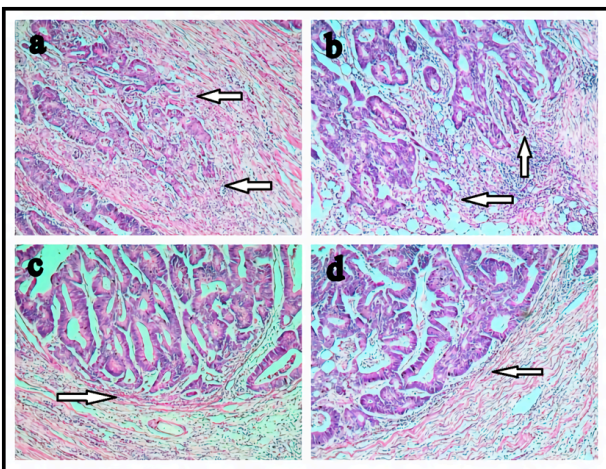
### Tissue Processing

Fixed in formalin, embedded in paraffin, archival tumor specimens from a hundred forty-five patients who operated for CRC during 1999-2012 at the Pathology department were retrieved. From each patient, one tumor block demonstrated the deepest invasively area was chosen. Cases were only admitted finally when sufficient tissue remained in the paraffin block for future review. A 4  $\mu$ m thickness section (n=145) was taken from each block, and hematoxylin & eosin (H&E) was stained.

### Estimates of IGP and TN

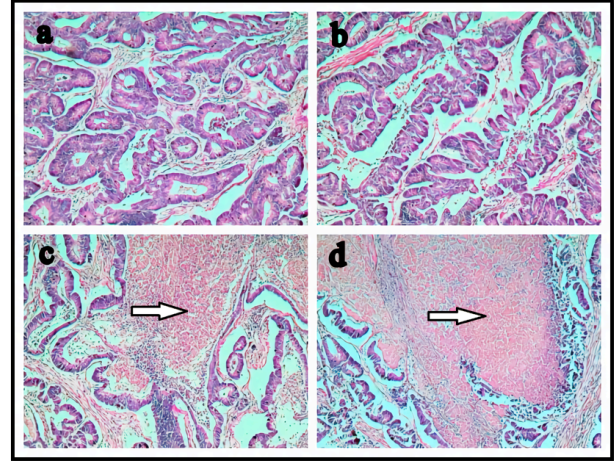
IGP was evaluated by categorizing the tumors at the invasive front for a pushing or an infiltrating tumor border. The recognition of these categories was made at x 10 objective (4.9 mm<sup>2</sup>). The well circumscribed invasive edge and the absence of tissue dissection were defined as the pushing tumor border, whereas the widespread dissection of the tissue with loss of a clear boundary and mesenteric adipose tissue dissection by tumour glands or cells were defined as the infiltrative tumor border.

TN was visually noted for all tumour sections. Our method was the same with two previous studies [6, 7]. In H&E stained sections, a tumor area that shows nuclear shrinkage, increased eosinophilia, disappearance, fragmentation, and shadows of tumor cells was recognized as TN. Although not required for definition, the neutrophilic inflammatory infiltrates at tumor boundaries was identified to support classification as necrosis. Intraluminal necrosis was included in the evaluation of TN and fulfilled the criteria. All the histological evaluations were made blinded to the clinical information. Representative examples of IGP and TN are shown in Figure 1a-1b.



**Figure 1a:** The recognition of Invasive growth pattern (IGP) was made at a x 10 objective (4.9 mm<sup>2</sup>). IGP was recognized when there was a widespread dissection of the tissue at the tumor margins with loss of a clear boundary between tumor and host. Then, one area

where the IGP was the most extensive was selected and, the clusters were classified as invasive (a-b) and expansive (c-d) at x20 objective.



**Figure 1b:** Tumor necrosis (TN) was specified as an area with increased eosinophilia and nuclear shrinkage, fragmentation and disappearance, with shadows of tumor cells visible to a variable extent. Then, one area where the TN was the most extensive was selected and, the clusters were classified as negative (a-b) and positive (c-d) at a x20 objective.

### Patients follow-up

Survival information was obtained from the archives of Kırıkkale University. In this study, survival rates were evaluated for outcome measures. The event end-point time was calculated from the primary surgery day. The follow-up period was selected as a wide range of thirteen years in order to make a more reliable decision about the relapse of the cases. The time from surgery to death or distant and local-regional recurrence time was called recurrence-free survival (RFS). The time from primary surgery to the last follow-up day or the death day was defined overall survival (OS). After sixty months, the events were censored as sixty months.

### Statistical Analysis

Descriptively data were listed using ranges, means and standard deviation for continuous data and percentages and frequencies for categorical data. Analyses of clinicopathological variables of IGP and TN were carried by using the test of the Chi-Square, and the test of Fisher's Exact was applied when the Chi-Square test was not available. The log-rank test was used for significant differences between univariable survival groups and the Kaplan-Meier method was used in survival curves. The Cox regression model with a 95% confidence interval (CI) and a hazard ratio (HR) of 1.0 as a reference was used for the significant difference between multivariable survival groups. All tests were bilateral and P values less than 0.05 were noted as significant. SPSS 21.0 (IBM Institute, North Castle, USA) was used in the analysis.

## Results

### Patients characteristics

A hundred forty-five cases that surgically resected for RC were included in the study. 92 (63.4%) of the cases were male and 53 (36.6%) were female. Average of age and size were  $75,08 \pm 7.45$  (range:39-86) and  $5.50 \pm 1.85$  (range: 2-10), respectively. 24 (16.6%) of the cases were detected as PT1/PT2, 121 (83.4%) as PT3/PT4 and 98 (67.6%) of the tumor was low/moderately differentiated and 47 (32.4%) as poorly differentiated.

### Assessment of IGP and TN

IGP and TN were scored on H&E stained sections mentioned above. At low-power magnification, the distribution of these parameters was not relatively homogeneous within slides.

One suitable block was selected from each tumor that had a good level of homogeneity of invasive edge and necrosis.

For IGP, 49 (33.8%) of patients were considered as positive whereas 96 (66.2%) of patients were considered as negative. Significantly association existed between the IGP and large size ( $p < 0.001$ ), high pT ( $p = 0.016$ ), perineural invasion ( $p = 0.025$ ), high number of metastatic lymph nodes ( $p < 0.001$ ), advanced grade ( $p < 0.001$ ) and advanced stage ( $p < 0.001$ ). For TN, 35 (24.1%) of patients were considered as positive whereas 110 (75.9%) of patients were considered as negative. Significantly association existed between the TN and large size ( $p = 0.033$ ), high pT ( $p = 0.047$ ), high number of metastatic lymph nodes ( $p = 0.001$ ), and advanced stage ( $p = 0.018$ ). The relationship between IGP/ TN and clinicopathological characteristics are shown in Table 1.

**Table 1** The relationship between IGP/TN and clinicopathological characteristics.

		Invasive Growth Pattern (n=145) (%)			Tumor Necrosis (n=145) (%)		
		Positive	Negative	P value	Positive	Negative	P value
PT-stage	pT1/pT2	21 87.5%	3 12.5%	0.016*	15 62.5%	9 37.5%	0.047*
	pT3/pT4	75 62.0%	46 38.0%		49 40.5%	72 59.5%	
Age	<75	36 65.5%	19 34.5%	0.881	25 45.5%	30 54.5%	0.803
	≥75	60 66.7%	30 33.3%		39 43.3%	51 56.7%	
PN invasion	Negative	82 68.9%	37 31.1%	0.141	54 45.0%	66 55.0%	0.647
	Positive	14 53.8%	12 46.2%		10 40.0%	15 60.0%	
Size	<5.5 cm	70 76.9%	21 23.1%	<0.001*	34 37.4%	57 62.6%	0.033*
	≥5.5cm	26 48.1%	28 21.9%		30 55.6%	24 44.4%	
AL invasion	Negative	86 69.9%	37 30.1%	0.025*	54 43.9%	69 56.1%	0.893
	Positive	10 45.5%	12 54.5%		10 45.5%	12 54.5%	
LN Status	<7	61 79.2%	16 20.8%	<0.001*	44 57.1%	33 42.9%	0.001*
	≥7	35 51.5%	33 48.5%		20 29.4%	48 70.6%	
Grade	Low/Moderate grade	79 80.6%	19 19.4%	<0.001*	40 40.8%	58 59.2%	0.245
	High grade	17 36.2%	30 63.8%		24 51.1%	23 48.9%	
Stage	Stage IIIA/IIIB	70 76.9%	21 23.1%	<0.001*	47 51.6%	44 48.4%	<0.018*
	Stage IIIC	26 51.9%	28 51.9%		17 31.5%	37 68.5%	

The significant limit for Chi-square test is 0.05. Results are italic when the results are significant. Abbreviations: IGP: Invasive growth pattern, TN: Tumor necrosis, PT: Pathologic tumour stage, PN: Perineural, LN: Lymph Node, AL: Angiolymphatic.



### Follow-up

For IGP, in the follow-up period of thirteen years, eighty-five patients died (58.6%; n=65 in positive, and n=20 in negative), and ninety-six patients had relapsed (66.2%; n=72 in positive, n=24 in negative). The 5-year RFS and OS ratios were 50.4% and 55.2% in positive cases, versus 83.5% and 86.3% in negative

patients, respectively. For TN, eighty-five patients died (58.6%; n=61 in positive, and n=24 in negative), and ninety-six patients had relapsed (66.2%; n=68 in positive, n=28 in negative). The 5-year RFS and OS ratios were 53.2% and 58.0% in positive cases, versus 80.7% and 83.5% in negative patients, respectively (Table 2).

**Table 2.**

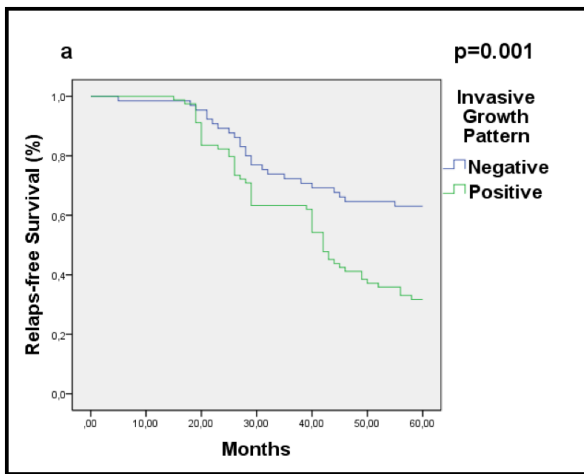
	Univariate survival analysis (n=145) (%)				Multivariate survival analysis (n=145) (%)			
	OS		RFS		RFS		OS	
	5-year (%)	P value	5-year (%)	P value	HR (95% CI)	P value	HR (95% CI)	P value
PT-stage		0.555		0.378		NC		NC
	pT1/pT2	71		70		-		-
	pT3/pT4	70		63		-		-
Age		0.718		0.785		NC		NC
	<75 cm	66		63		-		-
	≥75 cm	75		70		-		-
PN invasion		0.466		0.553		NC		NC
	No	75		68		-		-
	Yes	66		65		-		-
Size		0.357		0.263		NC		NC
	<5.5 cm	78		73		-		-
	≥5.5cm	63		60		-		-
AL invasion		0.243		0.145		NC		NC
	No	81		75		-		-
	Yes	60		58		-		-
LN Status		0.033*		0.025*		0.334		0.052
	<7	84		79		1		1
	≥7	57		54		2.58 (0.73-6.52)		1.58 (0.97-2.15)
Grade		0.043*		0.009*		0.199		0.033*
	Low/Moderat- e-grade	83		80		1		1
	High grade	58		53		3.47 (0.58-5.47)		1.47 (1.13-3.35)
Stage		0.007*		0.003*		0.036*		0.025*
	Stage IIIA/IIIB	85		81		1		1
	Stage IIIC	56		52		1.54 (1.10-2.72)		1.64 (1.08-2.47)
IGP		0.003*		0.001*		0.008*		0.005*
	Positive	55		50		1		1
	Negative	86		83		1.55 (1.11-3.18)		1.58 (1.05-2.66)
TN		0.017*		0.005*		0.024*		0.013*
	Positive	83		80		1		1
	Negative	58		53		1.38 (1.09-2.28)		1.44 (1.07-2.34)

The significant limit for Chi-square test is 0.05. Results are italic when the results are significant. Abbreviations: IGP: Invasive growth pattern, PT: Pathologic tumour stage, PN: Perineural, LN: Lymph Node, AL: Angiolymphatic, NC: Not calculable, CI: Confidence interval, HR: Hazard ratio, OS: Overall survival, RFS: Relapse-free survival

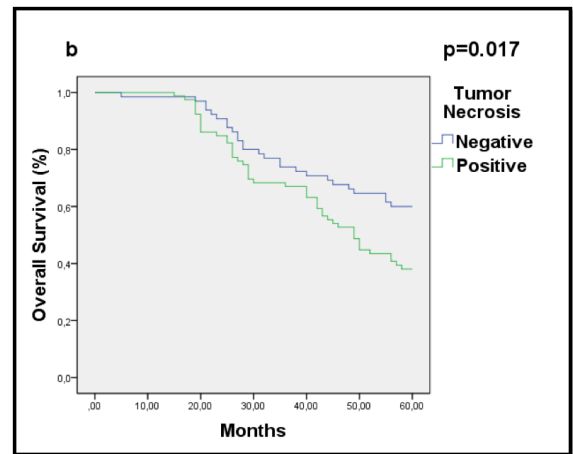
### Survival analyses

In univariate analysis, for IGP, significant differences between survival groups were observed for RFS (p=0.001) and OS (p=0.003).

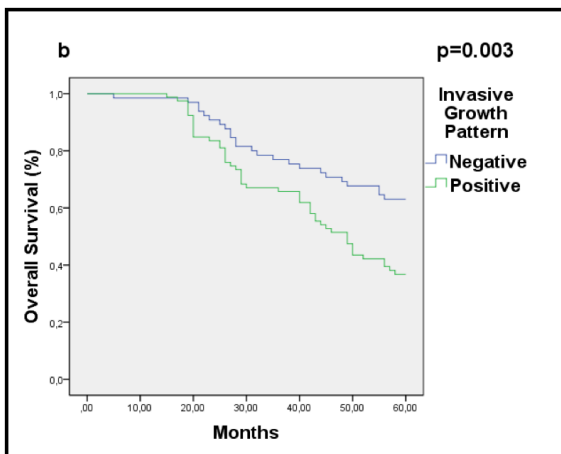
For TN, in univariate analysis, significant differences between survival groups were observed for RFS (p=0.005) and OS (p=0.017). Lymph nodes status, grade and stage were significantly related to an adverse outcome for RFS and OS (Table 2, Figure 2-3).



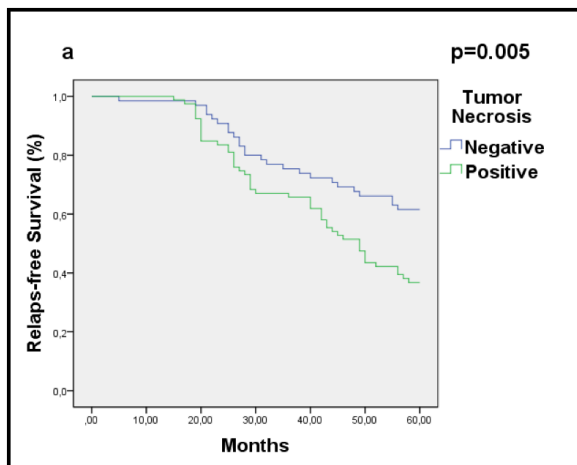
**Figure 2a:** Relapse-free-survival curves of Invasive growth pattern  
Kaplan-Meier survival curves were used for Relapse-free survival. P value is significant at the 0,05 level.



**Figure 3b:** Overall-survival curves of Tumor necrosis  
Kaplan-Meier survival curves were used for Overall survival. P value is significant at the 0,05 level.



**Figure 2b:** Overall-survival curves of Invasive growth pattern  
Kaplan-Meier survival curves were used for Overall survival. P value is significant at the 0,05 level.



**Figure 3a:** Relapse-free-survival curves of Tumor necrosis  
Kaplan-Meier survival curves were used for Relapse-free survival. P value is significant at the 0,05 level.

In multivariate analysis, IGP was an independent worse prognostic parameter for RFS (HR=1.58 [1.05-2.66], p=0.005) and OS (HR=1.55 [1.11-3.18], p=0.008). In addition, TN was also an independent worse prognostic parameter for RFS (HR=1.44 [1.07-2.34], p=0.013) and OS (HR=1.38 [1.09-2.28], p=0.024). PT-stage, lymph nodes status and stage were significantly related to an adverse outcome for RFS and OS (Table 2).

### Discussion

The potential value of IGP and TN in stage III RC patients was examined in this retrospective research. Our findings suggest that IGP and TN acts a significant role in the metastatic process of RC. If this evidence is confirmed within a more advanced clinic study, these parameters can be preferred as a predictive biomarker in RC.

In the World, one of the very commonly encountered malignant cancers is RC. This highly malignant tumor is in the third row for men and in the second row for the woman [1, 2]. For risk stratification of cancer, the TNM classification is the main principle. Whereas there are several cases with the same TNM stage of diseases that shows a different clinical outcome and thus this order is not impeccable [2]. For example, it is well known that a few portions of advanced (especially stage III) tumors never recurrence which may a little of patients alone benefited from adjuvant therapy, while in additionally 20-25% of early stage (stage I/II) tumor indicate adverse clinical course [2]. For this reason, additional risk criteria including recent markers are researched by broad consensus. The benefit of IGP and TN in survival has been demonstrated by some recent researches, also distinct from the TNM system [3-7]. So, these parameters are a possible strongly survival marker.



Histomorphological different tumor growth patterns in RC were first reported by Jass in 1987 [3]. In several well-designed retrospective cohorts in the literature, IGP was defined as a negative prognostic factor in advanced stage RCs. These were found that IGP is an independent prognostic parameter for cancer-related death and recurrence (9-15). There are also studies investigating the growth pattern of early stage RCs in the literature. These studies report that IGP provides additional prognostic information in these patients. For example, Cianchi et al. reported a significant relationship between IGP and prognosis in early stage RC patients ( $p < 0.01$ ) [16]. These findings were also confirmed in a large cohort by Ueno et al. ( $P = 0.015$ ) [14]. In our study, we found that IGP is an independent prognostic factor for poor RFS and OS in stage III RC patients by supporting the above-mentioned studies.

In addition, another example of the prognostic value of IGP in RC is that it correlates with vascular invasion, which is common in malignant tumors. For example, Ueno et al. described a strong relationship of infiltrative growth pattern with the presence of angioinvasion in RC [14]. This finding is consistent with the correlation between IGP and increased vascular invasion, as defined by Zlobec et al. [15]. In this research, we also found a significant association between IGP and worse prognostic factors including angiolymphatic invasion.

TN is a common feature of solid tumors, thought to reflect intratumoral hypoxic environment due to rapid increase of tumor cell numbers, such as lung [17], urothelial carcinoma [18], breast [19], renal malignancies [20, 21], GIST [22] and ewing sarcoma [23]. However, there is little information about RCs and is limited to several studies [6, 7, 24]. Our observations indicate that extensive TN is a good predictor for cancer-specific survival and disease progression in RC.

TN shows a paradoxical prognostic relationship in which increased tumor cell death indicates a more aggressive cancer. This relationship can be explained by the fact that normal blood flow in the tissue does not suffice for rapidly growing tumor cells and therefore a hypoxic microenvironment is formed [17]. However, it is still unclear whether inadequate tumor vascularization and inadequate tumor oxygenation are the only factors that cause TN. A statistically significant relationship between the high TN rate and the high proliferation rate supports this hypothesis in tumors with low vascularity, e.g. papillary renal cell carcinoma [20, 21].

In this study, there are a few restrictions. The inherent of retrospective analyses are firstly and foremost limitation. In our

study, cases were treated with previous methods before 2012, which produce a distinction between the treated researches of RC today. We investigated IGP and TN using one block and section, well known that this symbolizes only a little portion of all tumor. This sampling bias was impossible to overcome because of the retrospective researches, as the examination cases had already been sampled and used for diagnostic intention. Nevertheless, this study has been a large study of these parameters among the studies in our country so far.

## Conclusion

In our research, the presence of IGP and TN is related with adverse prognostic factors in stage III RC. Therefore, these parameters can be a good survival marker in surgically operated RC cases. Adding these useful markers in the risk-status should benefit a good stratification for treatment of RC. In addition, IGP was found to be more useful than TN.

## Abbreviations

RC: rectal cancer, AJCC: American Joint Cancer Committee, IGP: Invasive growth pattern, TN: Tumor necrosis, HPF: High power field, H&E: Hematoxylin and eosin, SD: Standard deviation, HR: Hazard ratio, OS: Overall survival, RFS: Relapse-free survival

## Declarations

### Acknowledgements

We thanks the Kırıkkale University, Department of Pathology members and attendance in this research.

### Declaration of conflict of interest

The authors received no financial support for the research and/or authorship of this article. There is no conflict of interest.

## References

1. Fulop ZZ, Gurzu S, Bara T et al. Dragus E, Bara T Jr, Voidazan S, Baniias L, Jung I. Lymph node ratio, an independent prognostic factor for patients with stage II-III rectal carcinoma. *Pathol Res Pract* 2019; 215: 152384
2. Takiyama H, Kawai K, Ishihara S et al. Different Impacts of Preoperative Radiotherapy and Chemoradiotherapy on Oncological Outcomes in Patients with Stages II and III Lower Rectal Cancer: A Propensity Score Analysis. *Dig Surg* 2018; 35: 212-19.
3. Jass JR, Love SB, Northover JM. A new prognostic classification of rectal cancer. *Lancet* 1987; 1: 1303-306
4. Rajaganeshan R, Prasad R, Guillou PJ et al. The influence of invasive growth pattern and microvessel density on prognosis in colorectal cancer and colorectal liver metastases. *Br J Cancer* 2007; 96: 1112-17.



5. Okano K, Yamamoto J, Kosuge T et al. Fibrous pseudocapsule of metastatic liver tumors from colorectal carcinoma. Clinicopathologic study of 152 first resection cases. *Cancer* 2000; 89: 267–75.
6. Pollheimer MJ, Kornprat P, Lindtner RA et al. Tumor necrosis is a new promising prognostic factor in colorectal cancer. *Hum Pathol* 2010; 41: 1749–57.
7. Richards CH, Roxburgh CS, Anderson JH et al. Prognostic value of tumour necrosis and host inflammatory responses in colorectal cancer. *Br J Surg* 2012; 99: 287–94.
8. Sobin LH, Compton CC. TNM seventh edition: what's new, what's changed: communication from the International Union Against Cancer and the American Joint Committee on Cancer. *Cancer* 2010; 116: 5336–39.
9. Zlobec I, Baker K, Minoo P, et al Hayashi S, Terracciano L, Lugli A. Tumor border configuration added to TNM staging better stratifies stage II colorectal cancer patients into prognostic subgroups. *Cancer* 2009; 115: 4021–29.
10. Halvorsen TB, Seim E. Association between invasiveness, inflammatory reaction, desmoplasia and survival in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 1989; 42:162–66.
11. Kubota Y, Petras RE, Easley KA, et al Bauer TW, Tubbs RR, Fazio VW. Ki-67-determined growth fraction versus standard staging and grading parameters in colorectal carcinoma. A multivariate analysis. *Cancer* 1992; 70: 2602–609.
12. Shepherd NA, Saraga EP, Love SB, et al Jass JR. Prognostic factors in colonic cancer. *Histopathology* 1989; 14: 613–20.
13. Zlobec I, Terracciano LM, Lugli A. Local recurrence in mismatch repair-proficient colon cancer predicted by an infiltrative tumor border and lack of CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 3792–97.
14. Ueno H, Hase K, Hashiguchi Y et al. Growth pattern in the muscular layer reflects the biological behaviour of colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2009; 11: 951–59.
15. Zlobec I, Holler S, Tornillo L, et al Terracciano L, Lugli A. Combined histomorphologic and immunohistochemical phenotype to predict the presence of vascular invasion in colon cancer. *Dis Colon Rectum* 2009; 52: 1114–21.
16. Cianchi F, Messerini L, Comin CE et al. Pathologic determinants of survival after resection of T3N0 (stage IIA) colorectal cancer: proposal for a new prognostic model. *Dis Colon Rectum* 2007; 50: 1332–41.
17. Swinson DE, Jones JL, Richardson Det al. Tumour necrosis is an independent prognostic marker in non-small cell lung cancer: correlation with biological variables. *Lung Cancer*, 2002; 37: 235-40
18. Langner C, Hutterer G, Chromecki T et al. Tumor necrosis as prognostic indicator in transitional cell carcinoma of the upper urinary tract. *J Urol* 2006; 176: 910-14
19. Leek RD, Landers RJ, Harris AL, et al Lewis CE. Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. *Br J Cancer* 1999; 79: 991-95
20. Sengupta S, Lohse C.M, Leibovich BC et al. Histologic coagulative tumor necrosis as a prognostic indicator of renal cell carcinoma aggressiveness. *Cancer* 2005; 104: 511-20
21. Lam JS, Shvarts O, Said JW et al. Clinicopathologic and molecular correlations of necrosis in the primary tumor of patients with renal cell carcinoma. *Cancer* 2005; 103: 2517-25
22. Muro-Cacho CA, Cantor AB, et al Morgan M. Prognostic factors in malignant gastrointestinal stromal tumors. *Ann Clin Lab Sci* 2000; 30: 239-47
23. Llombart-Bosch A, Contesso G, Henry-Amar M et al. Histopathological predictive factors in Ewing's sarcoma of bone and clinicopathological correlations. A retrospective study of 261 cases. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1986; 409: 627-40
24. Knutsen A, Adell G, Sun XF. Inflammatory infiltration, fibrosis, necrosis and mucinous content in relation to clinicopathological and molecular factors in rectal cancers with or without preoperative radiotherapy *Oncol Rep* 2006; 16: 321-27.

■ Orjinal Makale

## Sol ventrikül destek cihazı implantasyonu sonrası driveline ile ilişkili enfeksiyonlar: Tek merkez deneyimi

### *Driveline-related infections after left ventricular assist device implantation: A single center experience*

Sinan Sabit KOCABEYOĞLU\* , Doğan EMRE SERT 

Türkiye Yüksek İhtisas Hastanesi, Kalp ve Damar Cerrahisi, Ankara/TÜRKİYE

#### Öz

**Amaç:** Sol ventrikül destek cihazı sonrası görülen en sık komplikasyon driveline kaynaklı enfeksiyonlardır. Bu komplikasyon hastaların hayat kalitesini ileri derecede bozmaktadır. Bu çalışmanın amacı sol ventrikül destek cihazı takılan hastalarda driveline enfeksiyonlarını araştırmak ve tedavi stratejimizi ortaya koymaktır.

**Gereç ve Yöntemler:** Mayıs 2013 ile Ekim 2018 tarihleri arasında sol ventrikül destek cihazı takılan 90 erişkin hasta çalışmaya dahil edildi. Driveline enfeksiyon oranları, özellikleri, patojen mikroorganizmalar araştırıldı. Ayrıca enfeksiyonlara karşı uygulanan tedavi seçenekleri incelendi.

**Bulgular:** Hastaların ortalama yaşları  $46,3 \pm 13,7$  idi ve %83,3'ü (75/90) erkekti. Hastaların %62,2'sinde dilate kardiyomyopati mevcuttu. Tüm hastaların %35,5'inde (32/90) driveline enfeksiyonu tespit edildi. İmplantasyon ve driveline enfeksiyonu görülme arasında geçen ortalama süre  $304 \pm 309$  (15-1500) gündü. Alınan sürüntü ve/veya doku kültürlerinde en çok tespit edilen mikroorganizmalar gram pozitif koklar idi. Yedi hastada oral antibiyotik, 25 hastada ise hastaneye yatırılarak sistemik antibiyotik tedavisine gereksinim duyuldu. On üç hastada oral/sistemik antibiyotik tedavisi ile enfeksiyon kontrol altına alınırken 15 hastada ise cerrahi olarak debridman yapıldı, üç hastada driveline daha yukarı bir bölgeye taşındı ve bir hastaya kalp nakli gerekti. Hiçbir hastada cerrahi olarak cihazın çıkarılmasını gerektirecek kontrolsüz enfeksiyona rastlanmadı.

**Sonuç:** Sol ventrikül destek cihazları yüksek oranda driveline enfeksiyonu oranlarına sahiptir; bu çalışmada oran 1. yılda %24,4 olarak bulunmuştur. Oral veya sistemik antibiyotik tedavisi ile ve/veya seçilmiş vakalarda debridman tedavisi ile enfeksiyon kontrol altına alınmış, nadiren driveline kablosunun taşınması ve kalp nakline ihtiyaç duyulmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Sol ventrikül destek cihazı; driveline enfeksiyonu; çıkış yeri

Sorumlu Yazar\*: Sinan Sabit Kocabeyoğlu, Türkiye Yüksek İhtisas Hastanesi, Kalp ve Damar Cerrahisi, Ankara/TÜRKİYE

Eposta: s4126k@yahoo.com.tr

ORCID: 0000-0001-5492-4004

Gönderim: 08.09.2019 kabul: 10.09.2019

Doi: 10.18663/tjcl.617027

## Abstract

**Aim:** The most common complication after left ventricular assist device implantation is driveline-induced infections. This complication severely deteriorates quality of life of the patients. The aim of this study was to investigate driveline infections in patients with left ventricular assist device and to introduce our treatment strategy.

**Material and Methods:** Between May 2013 and October 2018, 90 adult patients who underwent left ventricular assist device implantation were included. Driveline infection rates, characteristics, pathogen microorganisms were investigated. Treatment options for infections were also analyzed.

**Results:** The mean age of the patients was  $46.3 \pm 13.7$  and 83.3% (75/90) were male. Dilated cardiomyopathy was present in 62.2% of the patients. Driveline infection was detected in 35.5% (32/90) of the patients. The mean time between implantation and driveline infection was  $304 \pm 309$  (15-1500) days. The most commonly detected microorganisms from swabs and/or tissue cultures were gram positive cocci. Seven patients required oral antibiotic treatment whereas 25 patients required systemic antibiotic treatment. While infection was controlled by oral/systemic antibiotic therapy in 13 patients, 15 patients underwent surgical debridement, three patients required translocation and heart transplant was required in one patient. None of the patients had uncontrolled infection requiring device extraction.

**Conclusion:** Left ventricular assist device implantation carries high risk of driveline infection; In this study, the rate was found to be 24.4% in the first year. Infection was controlled by oral or systemic antibiotic therapy and/or debridement therapy in selected cases, driveline translocation and heart transplant were rarely required.

**Key words:** Left ventricular assist device; driveline infection; exit site

## Giriş

Kalp yetmezliği dünyada en önemli mortalite ve morbidite nedenlerinden biridir ve her geçen gün kalp yetmezliği nedeni ile hastaneye yatan hasta sayısı giderek artmaktadır [1]. Son dönem kalp yetmezliğinin altın standart tedavisi ortotopik kalp naklidir, ne yazık ki, organ kıstıllığı nedeni ile bu hastalara yeterli sayıda kalp nakli yapılamamaktadır ve alternatif tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır; bu sebeple implante edilebilen sol ventrikül destek cihazlarının, organ kıstıllığı nedeniyle kalp nakline köprülenmesi veya ko-morbid hastalıklar nedeniyle kalp nakline uygun olmayan hastalara destinasyon tedavi seçeneği olarak kullanılması giderek artmaktadır.

Sol ventrikül destek cihazları, hastaların kalp yetmezliği semptomlarını azaltmakta, fonksiyonel kapasitesini artırmakta ve yaşam kalitesini iyileştirmektedirler [2]. İlk jenerasyon cihazlar büyük, gürültülü ve pulsatil bir mekanizma ile çalışırken, teknolojinin gelişmesi ile cihazlar küçülmüş, sessizleştirilmiş ve pulsatil akımdan ise devamlı akım prensibi ile çalışmaya başlamışlardır. Yeni jenerasyon cihazlarda kanama, tromboz gibi komplikasyon oranları azalırken enfeksiyon oranlarında pek bir değişiklik olmamıştır [3,4]. Bunun nedeni ise teknolojiye tüm gelişmelere rağmen cihaz tamamen vücudun içine alınamamıştır; ayrıca bu cihazlar, elektrik sinyallerinin kontrol ünitesine iletilmesi ve enerjinin pillerden cihaza doğru ilerlemesi

için perkütan bir kabloya ihtiyaç duymaktadırlar. Driveline kablosu, abdominal duvar boyunca tünel oluşturulduktan sonra üst abdominal bölgeden çıkmakta ve bu bölgede enfeksiyona açık bir alana sebebiyet vermektedir.

Driveline enfeksiyonu, sol ventrikül destek cihazı takıldıktan sonra görülen en sık komplikasyondur [5]; literatürde %14-28 oranında rastlanılmaktadır [4,6,7]. Driveline enfeksiyonu morbidite riskini artırırken, enfeksiyonun disseminasyonu ile inme ve pompa trombozu riskini yükselterek mortalite oranlarını da arttırmaktadırlar [8,9]. Driveline enfeksiyonunun tedavisi zor ve uzun soluklu olabilmektedir. Antibiyotik seçimi, süresi ve ne zaman cerrahi müdahale edileceğine dair uluslararası kabul görmüş bir kılavuz bulunmamaktadır; her merkezin kendine özgü çeşitli protokolleri mevcuttur ve bu protokollerin bir standardizasyonu mevcut değildir. Ayrıca driveline çıkış yeri için hangi pansuman malzemesinin kullanılacağı ve ne sıklıkta pansuman yapılmasına dair de bir konsensüs yoktur.

Bu çalışmada, merkezimizde devamlı akım ile çalışan sol ventrikül destek cihazı takılan hastalarda driveline enfeksiyon oranları ve tedavi stratejimiz ortaya konulmuştur.

## Gereç ve Yöntemler

Yerel etik kurul kararının alınmasını takiben Mayıs 2013 ile Ekim 2018 tarihleri arasında devamlı akımlı sol ventrikül destek cihazı takılan 90 erişkin hasta çalışmaya dahil edildi

ve verileri retrospektif olarak analiz edildi. Tüm hastalardan bilgilendirilmiş onam formları alındı. Biventriküler destek ihtiyacı olan hastalar, izole sağ ventrikül destek pompası takılan hastalar, ilk 30 günde ölen veya erken dönem nakile (ilk 30 gün) köprülenen hastalar ve 18 yaşın altındaki hastalar çalışma dışı bırakıldı. Çalışmada üç farklı sol ventrikül destek cihazı kullanıldı. Driveline enfeksiyonu olan tüm hastalardan sürüntü ve/veya ameliyat sırasında doku kültürleri alındı ve mikrobiyoloji laboratuvarına gönderildi; kültür ve antibiyogram sonucu beklenmeden enfeksiyon tespit edilir edilmez profilaktik antibiyotik tedavisi başlandı, kültür ve antibiyogram sonuçlandıktan sonra antibiyotik tedavisi spesifikleştirildi. Hastalarda böbrek fonksiyon bozuklukları mevcut ise dozlar ona göre ayarlandı.

#### Driveline enfeksiyonu tanım:

Driveline enfeksiyonu tanımı International Society for Heart and Lung Transplantation konsensüs kriterlerine uygun olarak yapıldı (pürülan drenaj, apse veya enfeksiyon traktında bulunan diğer enfeksiyonlar) [10]. Driveline enfeksiyonu ilk 6 ay içinde ise erken, daha sonra tespit edildi ise geç olarak tanımlandı. Ayrıca enfeksiyon musküler fasiyanın üzerinde ise yüzeysel, fasiya ve kaslar olaya iştirak etti ise derin enfeksiyon olarak tanımlandı.

#### Driveline çıkış tekniği:

Mediyan sternotomi ile implantasyon yapılan tüm hastalarda driveline rektus kasının altından ilerletilerek karnın sağ üst tarafından, sol torakotomi ile implantasyon yapılanlarda ise karın duvarında soldan sağa rektus kılıfının altında bir tünel oluşturularak yine karın sağ üst tarafından çıkarıldı. Poliflaman 2/0 dikişlerle driveline cilde sabitlendi ve dikişler poliklinik takipleri sırasında alınmadan yerinde bırakıldı.

#### Driveline bakımı:

Postoperatif erken dönemde pansumanın kirlenmesine göre günde birkaç sefer, hasta stabil olduktan sonra, eğer akıntı yok ise günde tek sefer %10 povidon iyodin ile pansumanı takiben driveline tamamen kapanacak şekilde driveline bakımı yapıldı. Eğer akıntı var ise %10 povidon iyodin ve rifampisin ile, kuru kalacak şekilde günde birkaç defa pansuman yapıldı. Hastalar, kendi ve ailelerine nasıl driveline bakımı yapılacağına dair hemşireler ve doktorlar tarafından gerekli eğitimler (pansuman, banyo ve kıyafet değiştirme) verildikten sonra taburcu edildi. Taburculuk sonrası hastalar ve/veya yakınları günde tek sefer %10 povidon iyodin ile driveline tamamen kapalı kalacak şekilde ve oynamasını engelleyici sabitleyici

kullanarak driveline bakımlarını yaptılar. Herhangi bir akıntı veya kötü koku olduğunda hastalara vakit kaybetmeden hastaneye başvurmaları önerildi.

#### İstatistiksel analiz

İstatistiksel analiz SPSS versiyon 15.0 ile yapıldı. Sürekli değişkenler ortalama  $\pm$  standart sapma, kategorik değişkenler ise sayı ve frekans olarak belirlendi. Değişkenlerin dağılımı Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi. Olaysız takip süresini hesaplamak için Kaplan Meier sağ kalım analizi kullanıldı.

#### Bulgular

Hastaların ortalama yaşları  $46,3 \pm 13,7$  idi ve %83,3' ü (75/90) erkekti. Hastaların %62,2' sinde dilate kardiyomiyopati mevcuttu. Hasta karakteristikleri tablo 1 de özetlenmiştir. Tüm hastaların %35,5'inde (32/90) driveline enfeksiyonuna rastlandı, birinci yılın sonunda driveline enfeksiyonu görülme oranı ise %24,4 idi. İmplantasyon ve driveline enfeksiyonu görülme arasından geçen süre ortalama süre  $304 \pm 309$  (15-1500) gündü. Tüm hastalar nakil, ölüm veya çalışmanın sonuna kadar takip edildi. Ortalama takip süresi  $655 \pm 499$  (31-2230) gündü. Takip sırasında hiçbir hasta enfeksiyon nedeniyle kaybedilmedi.

**Tablo 1.** Hasta karakteristikleri

	n	
Yaş	46,3 $\pm$ 13,7	
Erkek cinsiyet	75 (%83,3)	
BSA(m2)	1,83 $\pm$ 0,2	
BMI (kg/m2)	24,89 $\pm$ 4,58	
Etyoloji	DKMP	56 (%62,2)
	İKMP	34 (%37,8)
INTERMACS	1	6 (%6,7)
	2	18 (%20)
	3	48 (%53,3)
		18 (%20)
EF (%)	19,2 $\pm$ 6,1	
LVEDD (cm)	6,8 $\pm$ 0,9	
mPAP (mmHg)	30,6 $\pm$ 10,3	
PVR (woods)	3,8 $\pm$ 1,9	
TPG (mmHg)	10,5 $\pm$ 5,3	
PCWP (mmHg)	23,1 $\pm$ 7,7	
CVP (mmHg)	9,9 $\pm$ 5	
TAPSE (mm)	14 $\pm$ 3,7	

BSA: Body surface area, BMI: Body mass index, DKMP: Dilate kardiyomiyopati, İKMP: İskemik kardiyomiyopati, INTERMACS: Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support, EF: Ejeksiyon fraksiyonu, LVEDD: Sol ventrikül end-diastolik çapı, mPAP: Ortalama sistolik arter basıncı, PVR: Pulmoner vasküler rezistans, TPG: Trans-pulmoner gradient, PCWP: Pulmoner kapiller wedge basıncı, CVP: Santral venöz basınç, TAPSE: Tricuspid annular plane systolic excursion.

Ortalama entübasyon süresi  $2,3 \pm 6,1$  gün iken, ortalama yoğun bakım süresi  $9,9 \pm 12,2$  gün idi. Elli dokuz hastaya implantasyon

için median sternotomi yapılırken 31 hastaya sol torakotomi yapıldı. Hastaların %14,4'üne ise operasyon sırasında ek girişim gerekti. Elli iki hastaya HeartWare HVAD (Medtronic Inc., Minneapolis, Minnesota, USA), 3 hastaya Heartmate II (Abbott Inc., Chicago, Illinois, USA) ve 35 hastaya da Heartmate III (Abbott Inc., Chicago, Illinois, USA) implante edildi. Operatif ve postoperatif veriler tablo 2 de özetlenmektedir.

**Tablo 2.** Operatif ve postoperatif veriler

	n
Geçirilmiş kardiyak cerrahi	12 (%13,3)
HVAD	52 (%57,8)
LVAD tipi	3 (%3,3)
HM 2	35 (%38,9)
HM 3	35 (%38,9)
Ek girişim	13 (%14,4)
İnsizyon	59 (%65,6)
Mediyan Sternotomi	31 (%34,4)
Sol lateral torokotomi	31 (%34,4)
CPB süresi (dk)	83±34
Entübasyon süresi (gün)	2,3±6,1
Yoğun bakımda kalış süresi (gün)	9,9±12,2
Revizyon gerektirecek kanama	8 (%8,9)
HVAD: HeartWare, HM 2: Heartmate II, HM 3: Heartmate III, CPB: Kardiyopulmoner baypas	

Driveline enfeksiyonu olan hastaların hepsinde sürüntü kültürlerinde veya ameliyat sırasında çıkarılan dokularda mikroorganizma üremesi tespit edildi. Driveline enfeksiyonuna neden olan mikroorganizmaların prevalansları tablo 3'de gösterilmiştir; en çok tespit edilen mikroorganizmalar gram pozitif koklar idi; Gram negatifler arasından pseudomonas en sık görülen patojendi. İdentifiye edilen mikroorganizmalar: Staphylococcus aureus (17/32 hasta), Staphylococcus epidermidis (4/32 hasta), diğer stafilkoklar (2/32 hasta), enterokoklar (2/32), Acinetobacter baumannii (2/32 hasta), Pseudomonas Aeruginosa (3/32 hasta), Proteus mirabilis (1/32 hasta) ve 1 hastada ise enfeksiyondan sorumlu birden fazla mikroorganizma mevcut idi. Altı aydan önce tespit edilen enfeksiyon oranı %47 (15/32) iken geç enfeksiyon 17 (%53) hastada tespit edildi. Driveline enfeksiyonların 21 tanesi yüzeysel enfeksiyon iken 9 tanesi daha derin katmanları tutmuş idi, iki hastada enfeksiyonun ilerlemesi ile pompanın enfeksiyonu ve bakteriyemi gerçekleşti; bu iki hastadan bir tanesine 700 gün sonra başarılı bir şekilde kalp nakli yapılırken, diğer hasta halen antibiyotik supresyon tedavisi altına acil kalp nakil listesinde beklemektedir. Yedi hasta hastaneye yatırılmadan ayaktan oral antibiyotik tedavisi ve günlük %10 Povidon İyodin ile yara kuru kalacak şekilde her gün en az 1

sefer pansuman ile tedavi edildi, 25 hastada ise hastaneye yatırılarak sistemik antibiyotik tedavisine gereksinimi duyuldu. On üç hastada oral/sistemik antibiyotik tedavisi ile enfeksiyon kontrol altına alınırken 15 hastada ise antibiyotik tedavisi yetersiz kaldı ve cerrahi olarak debridman yapıldı, üç hastada driveline daha yukarı bir bölgeye taşındı ve 1 hastada kalp nakli gerekti (Tablo 4). Üç hastada ise negatif basınçlı vac tedavisi gerekti ve hiçbir hastada cerrahi olarak cihazın çıkarılmasını gerektirecek kontrolsüz enfeksiyona rastlanmadı. Hiçbir hastada enfeksiyon tespit edilmeden önce travma hikayesine rastlanmadı.

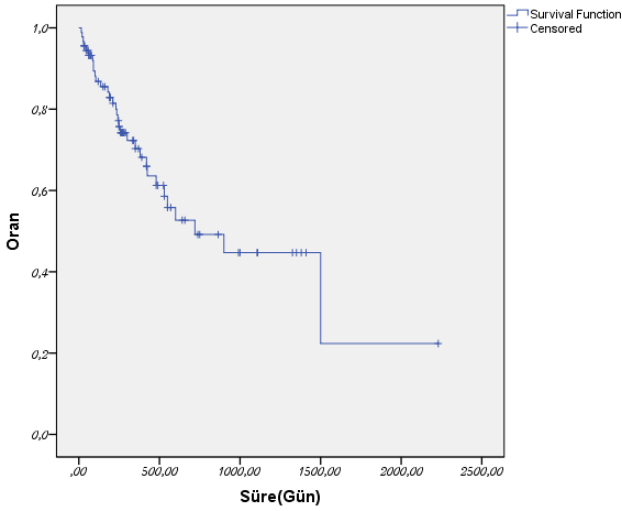
**Tablo 3.** Mikroorganizma prevalansları

	n
Staphylococcus aureus	17
Staphylococcus epidermidis	4
Staphylococcus lentus	1
Staphylococcus haemolyticus	1
Pseudomonas Aeruginosa	3
Acinetobacter baumannii	2
Proteus mirabilis	1
Enterococcus faecalis	1
Enterococcus chloe	1
Acinetobacter baumannii + Corynebacterium striatum	1

**Tablo 4.** Enfeksiyon özellikleri ve tedavi seçenekleri

	n	
Enfeksiyon seviyesi	Yüzeysel	21 (%65,6)
	Derin	9 (%28,1)
	Bakteriyemi	2 (%6,3)
Enfeksiyon yaşı	Erken	15 (%46,9)
	Geç	17 (%53,1)
Reküran enfeksiyon	20 (%62,5)	
Tedavi Seçenekleri		
Antibiyotik tedavisi (oral/sistemik)	13 (%40,6)	
Debridman	15 (%46,9)	
Translokasyon	3 (%9,4)	
Kalp nakli	1 (%3,1)	

Oral veya parenteral antibiyotik tedavisi alan hastaların ortalama antibiyotik tedavi süresi 82±153 (5-700) gün idi. Yirmi hastada reküran enfeksiyona rastlandı, 12 hastada ise bir daha driveline enfeksiyonuna rastlanmadı. On üç hastada bir sefer girişim yeterli iken beş hastada ikinci girişim bir hastada ise üçüncü girişim gerekti. Hasta popülasyonumuzda toplam 58 hastada hiçbir şekilde driveline ile ilişkili bir enfeksiyon görülmezken, driveline enfeksiyonundan bağımsız yaşam 1. yılın sonunda %75,6 bulundu (Şekil 1).



**Şekil 1.** Driveline enfeksiyonundan bağımsız yaşam, birinci yıl driveline enfeksiyon oranı %24,4 (22/90 hasta).

## Tartışma

Son dönem kalp yetmezliğinin tedavisinde sol ventrikül destek cihazları (nakile köprülemek veya destinasyon tedavisi) giderek artan sayıda kullanılmaktadır. Driveline enfeksiyonu ise sol ventrikül destek tedavisinin en önemli morbidite nedeni olmaya devam etmektedir. Sol ventrikül destek cihazlarının dizayn ve boyutlarında birçok gelişme olduğu halde bu cihazlar tamamen vücut içine alınamamış ve halen enerji ve veri transferi için ekstrakorporeal bir kabloya ihtiyaç duymaktadır. Bu kabloyu oluşturan materyal, bakteri biyofilmlerinin oluşması için ideal ortamı sağlarken bu kablonun çıkış yeri ise mikroorganizmaların vücut içine girmesini kolaylaştırmaktadır [11]. Driveline enfeksiyonu, sol ventrikül destek tedavisi için önemli bir yük olmaya devam etmekte ve artmış antibiyotik kullanımı, cerrahi girişim ve hastaların hayat kalitesinin düşmesine neden olmaktadır. Ayrıca bu istenmeyen komplikasyon planlanmayan hasta yatışlarını ve sağlık giderlerini artırmaktadır [12]. Bu çalışmanın sonucunda, çalışmaya dahil edilen hastaların üçte birinde herhangi bir zamanda driveline ile ilişkili bir enfeksiyon tespit edildi. Önceki raporlar ile kıyaslandığında benzer oranlarda bu komplikasyona rastlanırken, daha önce yayınlanan raporlara göre daha geç bir zamanda bu enfeksiyona rastlandı [3,13]. Alınan kültürlerden üretilen en sık patojenler cilt florası ile ilişkili olarak bulundu. Hastaların büyük bir çoğunluğu antibiyotik ve cerrahi debridman ile tedavi edildi, geniş debridman, kablonun translokasyonu ve negatif basınçlı vac tedavisine ise çok az hastada ihtiyaç duyuldu.

Driveline çıkış yerine olan travmalar buradaki enfeksiyon riskini artırmakta ve buranın travmadan korunması enfeksiyonun korunması için önemli bir husus teşkil etmektedir [14]. Bizim hasta popülasyonumuzda hiçbir travma ilişkili enfeksiyona rastlanmamıştır. Driveline enfeksiyonlarının birçoğu cilt florasından kaynaklanmaktadır ve perioperatif antibiyotik profilaksisi bu komplikasyondan korunmak için çok önemlidir [15]. Enfeksiyonun ilerlemesi, buna bağlı mediastinit, sepsis gerçekleşebilir ve pompanın değişimi gerekebilir [16]. Bu çalışmanın sonucunda tüm hastalar cihaz çıkarılmadan tedavi edilebildi. Eğer hasta kalp nakline uygun ise ve enfeksiyon kontrol altına alınabilirse pompa değişimi yerine antibiyotik supresyon tedavisi altına hastaya kalp nakli de yapılabilmektedir. Bizim hasta popülasyonumuzda kontrolsüz enfeksiyona bağlı pompa değişimi gerektiği halde 2 hasta derin driveline enfeksiyonuna bağlı olarak acil kalp nakil listesine alındı ve bir tanesi başarılı bir şekilde kalp nakline köprülendi.

Enfeksiyöz mikroorganizmaların en önemli giriş yerleri erken dönemde implantasyon için yapılan cerrahi insizyon yerleri ve driveline kablosunun çıkış yeridir. Perioperatif antibiyotik profilaksisi ve sonraki hasta takiplerindeki driveline pansuman ve bakımı bu komplikasyonun azaltılmasında anahtar rol oynamaktadır. Bizim merkezimizde driveline bakımı %10 Povidon İyodine ile günlük pansuman yapılması ve driveline çıkış yerinin tamamen kapatılması ve kablonun oynamasına engel olmak için sabitleyici cihaz veya bant kullanılması şeklindedir, fakat driveline bakımı her merkeze göre farklılıklar ihtiva etmektedir. Pansumanın ne ile yapılacağı ve ne sıklıkta yapılacağına dair bir standart bulunmamaktadır. Literatürde, çeşitli farklı solüsyonlarla driveline çıkış bakımı yapılmış; Menon [17] ve ark. merbromid antimikrobiyal solüsyon kullanmış ve daha az oranda enfeksiyona rastlandığını ortaya koymuştur, gene benzer şekilde Cagliostro [18] ve ark yeni driveline bakım sistemi ile ve Aslam [13] ve ark. ise gümüşlü preparatlar kullanarak enfeksiyon oranlarını azalttıklarını ortaya koymuşlardır. Fakat Zainah [19] ve ark. gümüşlü preparatların bir faydası olmadığını ortaya koymuşlardır. Bir başka çalışmada ise pansuman sıklığının enfeksiyon oranlarını etkilemediği ortaya konulmuştur [20]. Driveline kablolarının cilt altına tutunması ve doku proliferasyonunu kolaylaştırmak için cihazların driveline kablolarının en dış katmanını politetraetilen ile kaplıdır. Bu bölgenin enfeksiyonu artırdığına ait tartışmalar mevcuttur; Dean ve ark bu bölgenin tamamen cilt altında kalmasının enfeksiyon oranlarını azalttığını ortaya koymuştur [21]. Bu teknik, bizim hasta popülasyonumuzda driveline enfeksiyonunu azaltmak için hemen her hastaya uygulanmıştır.

Çalışmamızda en çok izole edilen mikroorganizmalar stafilokok aureus, koagulaz negatif stafilokoklar ve pseudomonas aeruginosadır.; bu mikroorganizmalar insan cilt florasında en sık rastlanan mikroplardır. Benzer olarak birçok çalışmada gösterilmiştir ki en sık izole edilen mikroorganizmalar cildin florasına ait olanlardır [22], insan cildi normalde patojen bakterilerin içeri girmesini engelleyen bir bariyer sağlar iken bütünlüğü bozulduğunda kendi florasında mevcut olan bakteriler enfeksiyon gelişmesini kolaylaştırmaktadır [23]. Driveline çıkış yeri genellikle abdominal bölgede umblikusa yakın bir alandadır, bu bölge nemlidir, buranın nemli olması ve cilt bütünlüğünün olmaması enfeksiyon riskini artırmaktadır, bu yüzden bu bölgenin bakımı özenli ve dikkatli yapılmalıdır. Zamanla bu bölgedeki flora gram pozitiften gram negatif yoğunluğa değişim göstermektedir, gram negatif mikroorganizmalarla oluşan enfeksiyonlar inatçı ve tedavisi daha zordur [3]. Bizim çalışmamızda en çok izole edilen patojen bakteriler gram pozitif iken, gram negatif ile olan driveline enfeksiyonlarının tedavisi uzun olmuş ve genellikle ek girişim gerektirmiştir.

Driveline çıkış bölgesi mikroorganizmalar için bir giriş kapısıdır ve buranın kontaminasyonu kolaydır. Driveline bakımını yapan kişinin kendi elinin ve bu bölgenin hijyenine azami dikkati ve özeni göstermesi, pansumanı aseptik teknik ile yapması steril pansuman malzemesi kullanması gerekmektedir yoksa enfeksiyon gelişmesi kaçınılmazdır. ISHLT driveline enfeksiyonundan korunmak için bazı kılavuz bilgileri yayınlamıştır [24] fakat buradaki öneriler hangi pansuman malzemesinin kullanılacağı, hangi antiseptik seçilmesi gerektiği veya hangi sıklıkta yapılacağına dair güçlü önerileri ihtiva etmemektedir. Santral kateter bakımındaki gibi güçlü önerilerin oluşması ile belki de driveline enfeksiyonu azalacaktır, fakat tamamen vücut içerisine yerleştirilen cihazlar icat edilmeden bu enfeksiyonun ortadan kalkması mümkün görünmemektedir.

Bu can sıkıcı ve hayat kalitesini düşüren komplikasyonun azalması için doktorlar, cerrahlar, hemşireler, hasta ve hasta yakınları ile iş birliği içinde olmalı ve driveline bakımı sırasında hijyene azami dikkat edilmesi gerekmektedir. Ayrıca hasta ve hasta yakınları iyice eğitilmelidir; enfeksiyon başlar başlamaz sağlık personeline ulaşılmalı ve enfeksiyon çok ilerlemeden sağlık kurumlarına başvurulmalıdır; böylelikle daha erken tanı ve tedavi şansı ile hastanede yatış süreleri kısalmalı, hastane masrafları azalabilir ve hastalar daha yüksek bir hayat kalitesinde yaşayabilirler.

## Limitasyonlar

Bu çalışma prospektif bir çalışma değildir ve retrospektif çalışmaların kısıtlılıklarını ihtiva etmektedir, nispeten az hasta sayısına sahiptir ve tek merkezli bir çalışmadır; bu çalışmanın sonuçlarına göre genellemeler yapılması çok uygun olmamaktadır. Tüm antibiyotik tedavisi ve girişim her hasta için ayrı ayrı yapılmıştır ve bir standardizasyon mevcut değildir.

## Sonuç

Sol ventrikül destek cihazları hayatta kalmayı artırmakta, fonksiyonel kapasiteyi düzeltmekte ve yaşam kalitesini yükseltmektedir, fakat yüksek oranda driveline enfeksiyonu oranlarına sahiptir; bu çalışmada oran 1. yılda %24,4 olarak bulunmuştur. Oral veya sistemik antibiyotik tedavisi ile ve/veya seçilmiş vakalarda debridman tedavisi ile enfeksiyon kontrol altına alınmış, nadiren driveline kablosunun taşınması ve kalp nakline ihtiyaç duyulmuştur. Driveline enfeksiyonundan korunmak için hastaların eğitimi; travmadan korunması, hijyene dikkat etmesi, uygun ve düzgün bir şekilde driveline bakımının yapılması ve en ufak problemde koordinatöre veya doktoruna ulaşması neticesinde hastalar daha erken tanı ve tedavi şansına sahip olacaktır. Bu alanda yapılacak daha çok çalışma ile driveline bakımının standardizasyonu bu komplikasyonu minime indirecek ve cihazların tamamen vücut içine alınması ile de elimine edilecektir. Driveline enfeksiyonunu tedavisi ve korunmasının standardizasyonu için prospektif çok merkezli çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## Maddi destek ve çıkar ilişkisi

Çalışmayı maddi olarak destekleyen kişi/kuruluş yoktur ve yazarların herhangi bir çıkar dayalı ilişkisi yoktur.

## Kaynaklar

1. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS et al. Heart disease and stroke statistics-2016 update: a report from the American Heart Association. Circulation 2016; 133: 447-54.
2. Genovese EA, Dew MA, Teuteberg JJ et al. Incidence and Patterns of Adverse Event Onset During the First 60 Days After Ventricular Assist Device Implantation. Ann Thorac Surg 2009; 88: 1162-70.
3. Koval CE, Thuita L, Moazami N, Blackstone E. Evolution and impact of drive-line infection in a large cohort of continuous-flow ventricular assist device recipients. J Hear Lung Transplant 2014; 33: 1164-72.
4. Topkara VK, Kondareddy S, Malik F et al. Infectious complications in patients with left ventricular assist device: etiology and outcomes in the continuousflow era. Ann Thorac Surg 2010; 90: 1270-77.



5. Kirklin JK, Pagani FD, Kormos RL et al. Eighth annual INTERMACS report: Special focus on framing the impact of adverse events. *J Hear Lung Transplant* 2017; 36: 1080–86.
6. Goldstein DJ, Naftel D, Holman W et al. Continuous-flow devices and percutaneous site infections: clinical outcomes. *J Heart Lung Transplant* 2012; 31: 1151-57.
7. Pagani FD, Miller LW, Russell SD et al. Extended mechanical circulatory support with a continuous-flow rotary left ventricular assist device. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54: 312-21.
8. Gordon RJ, Weinberg AD, Pagani FD et al. Prospective, multicenter study of ventricular assist device infections. *Circulation* 2013; 127: 691–702.
9. Kilic A. The future of left ventricular assist devices. *J Thorac Dis* 2015; 7: 2188–93.
10. Hannan MM, Husain S, Mattner F et al. International Society for Heart and Lung Transplantation. Working formulation for the standardization of definitions of infections in patients using ventricular assist devices. *J Heart Lung Transpl* 2011; 30: 375–84.
11. Pereda D, Conte JV. Left ventricular assist device driveline infections. *Cardiol Clin* 2011; 29: 515–27.
12. Akhter SA, Badami A, Murray M et al. Hospital readmissions after continuous-flow left ventricular assist device implantation: incidence, causes, and cost analysis. *Ann Thorac Surg* 2015; 100: 884–89.
13. Aslam S, Dan J, Topik A et al. Decrease in Driveline Infections with Change in Driveline Management Protocol. *VAD J* 2016; 2: 1–13.
14. Zierer A, Melby SJ, Voeller RK et al. Late-onset driveline infections: the Achilles' heel of prolonged left ventricular assist device support. *Ann Thorac Surg* 2007; 84: 515–20.
15. Meszaros K, Fuehrer U, Grogg S et al. Risk factors for sternal wound infection after open heart operations vary according to type of operation. *Ann Thorac Surg* 2016; 101: 1418–25.
16. Sharma V, Deo SV, Stulak JM et al. Driveline infections in left ventricular assist devices: implications for destination therapy. *Ann Thorac Surg* 2012; 94: 1381–86.
17. Menon AK, Baranski S-K, Unterkofler J et al. Special Treatment and Wound Care of the Driveline Exit Site after Left Ventricular Assist Device Implantation. *Thorac Cardiovasc Surg* 2015; 63: 670–74.
18. Cagliostro B, Levin AP, Fried J et al. Continuous-flow left ventricular assist devices and usefulness of a standardized strategy to reduce drive-line infections. *J Hear Lung Transplant* 2016; 35: 108–114.
19. Zainah H, Karthikeyan A, Buitron P et al. The Efficacy of Acticoat-Silver Dressing in Preventing Left-ventricular-Assisted Device Infections. *Immunochem Immunopathol* 2016; 2: 2–4.
20. Wus L, Manning M, Entwistle III JW, Entwistle JWC. Left ventricular assist device driveline infection and the frequency of dressing change in hospitalized patients. *Hear Lung* 2015; 44: 225–29.
21. Dean D, Kallel F, Ewald GA et al. Reduction in driveline infection rates: Results from the HeartMate II Multicenter Driveline Silicone Skin Interface (SSI) Registry. *J Heart Lung Transplant* 2015; 34: 781-89 .
22. Pavlovic NV, Randell T, Madeira T, Hsu S, Zinoviev R, Abshire M. Risk of left ventricular assist device driveline infection: A systematic literature review. *Heart Lung* 2019; 48: 90-104.
23. Byrd AL, Belkaid Y, Segre JA. The human skin microbiome. *Nat Rev* 2018; 16: 143– 55.
24. Kusne S, Mooney M, Danziger-Isakov L et al. An ISHLT consensus document for prevention and management strategies for mechanical circulatory support infection. *J Hear Lung Transplant* 2017; 36: 1137–53.



To cite this article: Ocak F, Çıfci A, Cesur S, Kınıklı S. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten E. coli izolatlarının çeşitli antibiyotiklere duyarlılıklarının belirlenmesi. Turk J Clin Lab 2019; 10: 384-387.

## ■ Orjinal Makale

# Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten E. coli izolatlarının çeşitli antibiyotiklere duyarlılıklarının belirlenmesi

## *Determinating of susceptibilities to various antibiotic of the extended spectrum beta-lactamase producing E. coli isolates*

Fatih OCAK<sup>1</sup> , Atilla ÇİFCİ<sup>2</sup> , Salih CESUR<sup>\*3</sup> , Sami KINIKLI<sup>3</sup> 

<sup>1</sup>Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Yenimahalle Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara/TÜRKİYE

<sup>2</sup>Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Yenimahalle Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara/TÜRKİYE

<sup>3</sup>Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara/TÜRKİYE

### Öz

**Amaç:** Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) enzimi üretimi ile beta-laktam antibiyotiklere direnç gelişmesi E.coli ve Klebsiella species (Klebsiella spp.) suşlarında en sık görülen direnç mekanizmasıdır. GSBL üreten E. coli ve Klebsiella spp. neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde son yıllarda temosilin ve fosfomisin de kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı, çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve GSBL üreten E. coli izolatlarının; temosilin, fosfomisin, ertapenem, imipenem, meropenem ve piperasilin-tazobaktam duyarlılıklarının olarak disk difüzyon yöntemiyle belirlenmesidir

**Gereç ve Yöntemler:** Çalışmaya Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Yenimahalle Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) ürettiği çift disk sinerji yöntemiyle belirlenen 80 E. coli suşu dahil edildi. Suşların; temosilin, fosfomisin, ertapenem, imipenem, meropenem ve piperasilin-tazobaktam duyarlılıkları disk difüzyon yöntemiyle CLSI önerileri doğrultusunda belirlendi.

**Bulgular:** Çalışmaya dâhil edilen GSBL üreten E. coli suşlarında antibiyotik duyarlılık oranları sırasıyla; ertapenem %100 (80/80), imipenem %100 (80/80), meropenem %100 (80/80), temosilin %98,7 (79/80), piperasilin-tazobaktam %96 (77/80) ve fosfomisin %95 (76/80) olarak belirlendi.

GSBL üreten E. coli suşlarında karbapenemlere (ertapenem, imipenem ve meropenem) direnç saptanmadı.

**Sonuç:** Hastanemizde GSBL üreten E. coli suşlarında temosilin ve fosfomisin duyarlılık oranlarının yüksek olduğu, temosilin ve fosfomisin bu etkenlere bağlı enfeksiyonların tedavisinde karbapenemlere alternatif ilaçlar olarak kullanılabileceği belirlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz; E. coli; antibiyotik duyarlılığı; disk difüzyon yöntemi; temosilin; fosfomisin

Sorumlu Yazar\*: Salih Cesur, Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara/TÜRKİYE

E-posta: scesur89@yahoo.com

ORCID: 0000 0003 4960 7375

Gönderim: 13.08.2019 kabul: 22.08.2019

Doi: 10.18663/tjcl.605182



## Abstract

**Aim:** Production of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) enzymes are the most common resistance mechanism against beta-lactam antibiotics on *E. coli* and *Klebsiella* spp. Temocillin and fosfomycin have also been used in the treatment of infections caused by ESBL producing *E. coli* and *Klebsiella* spp. The aim of this prospective study is to determine the susceptibility of temocillin, fosfomycin, ertapenem, imipenem, meropenem, and piperacillin-tazobactam to ESBL-producing *E. coli* isolate isolated from various clinical samples by the disk diffusion method.

**Material and Methods:** The study included 80 *E. coli* strains isolated from various clinical samples in Ankara Yıldırım Beyazıt University Yenimahalle Training and Research Hospital, Microbiology Laboratory and ESBL producing were determined by double disc synergy method. The susceptibilities of the strains to temocillin, fosfomycin, ertapenem, imipenem, meropenem, and piperacillin-tazobactam were determined according to the CLSI recommendations by disk diffusion method. Determined by double disc synergy method. The susceptibilities of the strains to temocillin, fosfomycin, ertapenem, imipenem, meropenem, and piperacillin-tazobactam were determined according to the CLSI recommendations by disk diffusion method.

**Results:** The antibiotic susceptibility rates of ESBL-producing *E. coli* strains included in the study were as follows; ertapenem 100% (80/80), imipenem 100% (80/80), meropenem 100% (80/80), temocillin 98.7% (79/80), piperacillin-tazobactam 96% (77/80) and fosfomycin 95% (76/80).

**Conclusion:** Sensitivity of ESBL-producing *E. coli* strains against temocillin and fosfomycin were found to be high in our hospital. It has been determined that temocillin and fosfomycin can be used as alternative drugs to carbapenems in the treatment of infections due to these agents.

**Keywords:** Extended spectrum beta-lactamase; *E. coli*; antibiotic susceptibility; disc-diffusion method; temocillin; fosfomycin

## Giriş

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten Enterobacteriaceae ailesi üyeleri sıklıkla sağlık bakımıyla ilişkili enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bununla birlikte GSBL üreten mikroorganizmalarla oluşan toplum kaynaklı enfeksiyonlar da bildirilmektedir. GSBL üreten *Escherichia coli* (*E. coli*) ve *Klebsiella* spp. suşlarının neden olduğu enfeksiyonların tedavisi güçtür ve tedavide sıklıkla karbapenemler kullanılmaktadır [1]. Ayrıca son yıllarda karbapenemlere dirençli *E. coli* ve *Klebsiella* spp. suşları da bildirilmektedir [2]. Bu nedenle tedavide karbapenemler dışındaki antibiyotikler de gündeme gelmiştir. GSBL üreten *E. coli* ve *Klebsiella* spp. enfeksiyonlarında karbapenemlere alternatif antibiyotikler içerisinde, temosilin ve fosfomisin yer almaktadır. Bu çalışmada GSBL üreten *E. coli* suşlarının temosilin, fosfomisin, karbapenemler (imipenem, meropenem ve ertapenem) ve piperacilin-tazobaktam duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlandı.

## Gereç ve Yöntemler

Çalışmaya 2018 yılında Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Yenimahalle Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji

Laboratuvarında çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve çift disk sinerji yöntemiyle GSBL pozitif saptanan 80 *E. coli* suşu dahil edildi. Suşların tanımlanması konvansiyonel yöntemler ve otomatize identifikasyon sistemleri kullanılarak yapıldı. Suşların izole edildiği klinik örneklerin dağılımı aşağıdaki Tabloda gösterilmiştir. Retrospektif çalışma kurum onayı alınmıştır. Hastalardan aydınlatılmış onam formları alınmıştır.

**Tablo.** *E. coli* suşlarının izole edildiği klinik örneklerin dağılımı (n:80)

Örnek türü	Sayı (%)
İdrar	70 (87,5)
Kan	2 (2,5)
Balgam	2 (2,5)
Derin trakeal aspirat (DTA)	2 (2,5)
Yara	2 (2,5)
Boğaz sürüntüsü	1 (1,2)
Vajinal akıntı	1 (1,2)
Toplam	80 (100)

## Çift disk sinerji testi

Mc Farland 0,5 standardı yoğunluğunda olacak şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonu Mueller-Hinton agar (MHA) plağına yayıldı. Plağın ortasına bir amoksisilin-klavulanik asit diski (AMC 20/10 Mg) ile disk merkezleri arasındaki uzaklık

30 mm. olacak şekilde seftazidim (CAZ), seftriakson (CRO) veya sefotaksim (CTX), aztreonam (ATM) diskleri yerleştirildi. Bir gece 35°C'de inkübasyondan sonra sefalosporin veya ATM etrafındaki inhibisyon zonunun AMC diskinde doğru genişlemesi veya arada bakterinin üremediği bir sinerji alanının bulunması GSBL varlığını olarak değerlendirildi [3].

Çalışmada, besiyeri ve disklerin kalite kontrolü ve doğrulanması amacıyla E. coli ATCC 25922 suşu standart suş olarak kullanıldı. İzole edilen suşların; temosillin, fosfomisin, ertapenem, imipenem, meropenem ve piperasilin-tazobaktam duyarlılıkları bu antibiyotiklerin emdirilmiş olduğu ticari diskler ile (Becton-Dickinson, USA) disk difüzyon yöntemiyle belirlendi. Suşların bu antibiyotiklere duyarlılıkları CLSI önerileri doğrultusunda belirlendi [4]. Temosilin için zon çapı  $\geq 19-20$  mm ise duyarlı, 16-18 mm ise orta duyarlı,  $\leq 15$  mm ise dirençli olarak kabul edildi [5,6]. Fosfomisin için zon çapı  $\geq 16$  mm ise duyarlı, 13-15 mm ise orta duyarlı,  $\leq 12$  mm ise dirençli olarak kabul edildi [4]. Elde edilen duyarlılık oranları % olarak ifade edildi.

## Bulgular

Sunduğumuz çalışmaya dâhil edilen E. coli suşlarının %77,5'u idrar örneklerinden, %22,5'i ise idrar dışı örneklerden (kan, balgam, yara vb.) oluşmaktaydı. Çalışmaya dahil edilen 80 E. coli suşunun hepsinde GSBL varlığı çift disk sinerji yöntemi ile belirlendi. Çalışmamızda GSBL üreten E. coli suşlarında antibiyotik duyarlılıkları ise disk difüzyon yöntemiyle belirlendi.

Çalışmaya dahil edilen GSBL üreten E. coli suşlarında antibiyotik duyarlılık oranları sırasıyla; ertapenem %100 (80/80), imipenem %100 (80/80), meropenem %100 (80/80), temosilin %98,7 (79/80), piperasilin-tazobaktam %96 ve fosfomisin %95 olarak belirlendi. GSBL üreten E. coli suşlarında karbapenemlere (ertapenem, imipenem ve meropenem) direnç saptanmadı.

## Tartışma

Enterobacteriaceae ailesi üyeleri içerisinde yer alan E. coli toplum ve hastane kaynaklı üriner sistem enfeksiyonlarına en sık neden olan etkidir [7,8].

Enterobacteriaceae ailesi üyelerinde beta-laktam antibiyotiklere karşı en fazla bildirilen direnç mekanizması GSBL enzimi üretimidir. GSBL enzimi, 1., 2., 3. kuşak sefalosporinleri ve aztreonamı parçalayarak etkisiz hale getirirken, sefamisin grubu (sefoksitin, sefotetan) ve karbapenemlere karşı etkisizdir. GSBL enziminin etkileri klavulanik asitle inhibe olur. Hem hastane kaynaklı hem de toplum kaynaklı E. coli suşlarında, tüm dünyada ve ülkemizde artan direnç oranları

bildirilmektedir [9,10]. Türkiye'de E. coli suşlarında bildirilen GSBL oranı %42, Klebsiella pneumoniae (K. pneumoniae) suşlarında ise %41,4 olarak bildirilmiştir [10].

GSBL üreten E. coli ve K. pneumoniae izolatlarının tedavisinde en sık kullanılan antibiyotikler karbapenemlerdir [11]. Bununla birlikte son yıllarda karbapenemlerin yaygın kullanımına bağlı olarak karbapenemlere dirençli E. coli ve K. pneumoniae enfeksiyonları sıklıkla bildirilmektedir [2]. Bu nedenle GSBL üreten Enterobacteriaceae ailesi üyelerinin tedavisinde karbapenemler dışındaki alternatif antibiyotiklere gereksinim vardır. Bu antibiyotikler içerisinde; piperasilin-tazobaktam, fosfomisin, temosilin ve kolistin yer almaktadır [9,11,12].

Çalışmamızda GSBL pozitif E. Coli suşlarında karbapenemlere (imipenem, meropenem ve ertapenem) direnç saptanmazken, temosiline %1,3, piperasilin-tazobaktama %4, fosfomisine ise %5 oranında direnç saptadık.

İp ve ark. [9] Hong Kong'da yaptıkları bir çalışmada kan ve idrar kültüründen izole edilen 613 Enterobacteriaceae ailesi üyesinin duyarlılık oranlarını mikrodilüzyon yöntemiyle temosiline %93, ertapeneme %99, meropeneme %99,7, piperasilin-tazobaktama %86, siprofloksasine %71,5, nitrofurantoin %76,4 olarak, agar dilüzyon yöntemiyle ise fosfomisine duyarlılık oranını %92,8 olarak belirlemişlerdir. Aynı çalışmada GSBL pozitiflik oranı %23,2 olarak belirlenirken, GSBL pozitif izolatlarda temosilin direnci %16,1 olarak bildirilmiştir. Çalışmada temosilin özellikle siprofloksasin, nitrofurantoin ve piperasilin-tazobaktama yüksek direnç nedeniyle GSBL üreten Enterobacteriaceae ailesi üyelerinin neden olduğu enfeksiyonlarının tedavisinde uygun bir seçenek olduğu bildirilmiştir.

Chen ve ark. [8] 155 çoklu ilaca dirençli E. coli ve K. pneumoniae suşunda temosilin duyarlılığını E. coli ve K. pneumoniae suşları için %95, fosfomisin için ise sırasıyla; %78 ve %66 olarak belirlemişlerdir. Çalışmadaki suşlarda GSBL oranı %30 olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda temosiline direnç oranının düşük (%1,3) olmasının nedeni, ülkemizde temosilin henüz kullanıma girmemiş olmasından kaynaklanabilir.

Çalışmamızın sınırlandırıcı yanları; izole edilen suşlarda maliyet nedeniyle temosilin, fosfomisin etken maddelerinin temin edilememesi, altın standart yöntem olan sıvı mikrodilüzyon yöntemiyle minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinin belirlenememiş olması ve temosilin için CLSI ve EUCAST tarafından 2018 yılı dokümanlarında disk difüzyon yöntemi için zon çaplarının henüz belirlenmemiş



olmasıdır. Sunduğumuz çalışmada temosilin zon çapının değerlendirilmesinde bu konuda yapılmış çalışmalar referans olarak alınmıştır [5,6].

Zykov ve ark. (12) Norveç'te GSBL üreten 105 E. coli suşunda otomatize sistem veya MİK gradient test yöntemleriyle yaptıkları çalışmada, tüm izolatların fosfomisin, temosilin ve meropenem duyarlı olduğunu bildirmişlerdir.

Fournier ve ark. [11] 100 GSBL üreten E. coli suşunda yaptıkları çalışmada, suşların %90'ından fazlasını fosfomisine duyarlı saptadıklarını ve üriner sistem enfeksiyonlarında iyi bir oral tedavi seçeneği olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada temosilin ve piperasilin-tazobaktamın ise kan akımı enfeksiyonları ve piyelonefrit için karbapenemlere alternatif etkili antibiyotikler olduğunu bildirmişlerdir.

Titelman ve ark. [13] GSBL üreten 159 E. coli suşunda yaptıkları çalışmada fosfomisin direnç oranını %3, ertapenem için %1, piperasilin-tazobaktam için %9, temosilin içinse %24 olarak bildirmişlerdir.

Sonuç olarak, GSBL üreten E. coli suşlarında temosilin ve fosfomisin duyarlılık oranlarının yüksek olduğu, temosilin ve fosfomisinin bu etkenlere bağlı enfeksiyonların tedavisinde karbapenemlere alternatif ilaçlar olarak kullanılabileceği belirlendi.

### **Maddi Destek ve Çıkar İlişkisi**

Çalışmayı maddi olarak destekleyen kişi/kuruluş yoktur ve yazarların herhangi bir çıkar dayalı ilişkisi yoktur.

### **Kaynaklar**

1. Kuzucu Ç, Yetkin F, Görgeç S, Ersoy Y. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. suşlarının ertapenem ve diğer karbapenemlere karşı duyarlılıklarının araştırılması. *Mikrobiyol Bül* 2011; 45: 28-35.
2. Nordmann P. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: overview of a major public health challenge. *Med Mal Infect* 2014; 44: 51-55
3. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 657-86.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twentieth Informational Supplement. Document M100-S20-U, 2010. CLSI, Wayne, PA.
5. Fuchs PC, Barry AL, Thornsberry C, Jones RN. Interpretive criteria for temocillin disk diffusion susceptibility testing. *Eur J Clin Microbiol* 1985; 4: 30-33.

6. Vanstone GL, Dille R, Schwenk S, Williams A, Balakrishnan I. Temocillin disc diffusion susceptibility testing by EUCAST methodology. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 2688-89.
7. Ullah F, Malik SA, Ahmed J. Antibiotic susceptibility pattern and ESBL prevalence in nosocomial *Escherichia coli* from urinary tract infections in Pakistan. *African J Biotechnol* 2009; 8: 3921-26
8. Chen YT, Murad KA, Ng LS, Seah JTH, Park JJ, Tan TY. In vitro efficacy of six alternative antibiotics against multidrug resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from urinary tract infections. *Ann Acad Med Singapore* 2016; 45: 245-50.
9. Ip M, Lai CK, Fung KSC et al. Activity of temocillin and 15 other agents, including fosfomycin and colistin, against Enterobacteriaceae in Hong Kong. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2017; 36: 2491-94.
10. Gur D, Hascelik G, Aydın N et al. Antimicrobial resistance in Gram-negative hospital isolates: Results of Turkish HITIT-2 Surveillance Study of 2007. *J Chemother* 2009; 21: 383-89.
11. Fournier D, Chirouze C, Leroy J, et al. Alternatives to carbapenems in ESBL-producing *Escherichia coli* infections. *Med Mal Infect* 2013; 43: 62-66.
12. Zykov IN, Sundsfjord A, Småbrekke L, Samuelsen O. The antimicrobial activity of mecillinam, nitrofurantoin, temocillin and fosfomycin and comparative analysis of resistance patterns in a nationwide collection of ESBL-producing *Escherichia coli* in Norway 2010-2011. *Infect Dis (Lond)* 2016; 48: 99-107.
13. Titelman E, Iversen A, Kahlmeter G, Giske CG. Antimicrobial susceptibility to parenteral and oral agents in a largely polyclonal collection of CTX-M-14 and CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *APMIS* 2011; 119: 853-63.

To cite this article: Akbulut A, Gursoy K, Yumusak N, Koca G, Korkmaz M. Results of a hemostatic agent to potentiate ischemia-induced skin flap necrosis in an experimental rat model. Turk J Clin Lab 2019; 10: 388-395.

## ■ Original Article

# Results of a hemostatic agent to potentiate ischemia-induced skin flap necrosis in an experimental rat model

## *Deneysel sıçan modelinde iskemiye bağlı deri flep nekrozunda hemostatik ajan kullanımı*

Aylin AKBULUT<sup>1\*</sup> , Koray GURSOY<sup>2</sup> , Nihat YUMUSAK<sup>3</sup> , Gökhan KOCA<sup>1</sup> , Meliha KORKMAZ<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> University of Health Sciences, Ankara Training and Education Hospital, Nuclear Medicine Clinic, Ankara/TURKEY

<sup>2</sup> University of Health Sciences, Ankara Training and Education Hospital, Department of Aesthetic and Reconstructive Surgery, Ankara/TURKEY

<sup>3</sup> Harran University, Faculty of Veterinary, Sanliurfa/TURKEY

### Abstract

**Aim:** The uses of plant based hemostatic agents are increasing for obtaining operative field hemostasis. However, their effects on vascularly challenged tissue is not known. The aim of this study was to investigate the effect, if any, of plant-based hemostatic agent, Ankaferd (ABS) on flap viability in a rat model.

**Material and Methods:** **Twenty rats underwent McFarlane flaps under general anesthesia. Ten rats in Group I received no** other treatment. Ten rats in Group II received ABS to the underside of flaps. Viable flap area was determined in scintigraphic images and percentage of viable flap area pixel size to the total flap area pixel size was calculated. Additionally all flap areas were digitally photographed and underwent histopathologic evaluation.

**Results:** Scintigraphic analysis has shown limited viability at proximal pedicle zone of flap in Group II compared to Group I. The mean area of flap survival percentage was calculated in Group I and in Group II was as follows respectively 56.33 ±9.94%, 26.27±7.05%. Differences between groups were statistically significant (p<0.001). Similarly, Group II has shown significantly smaller area of viable tissue percentage compared to Group I (26.81±5.55%, versus 59.66±12.04%, p<0.001) by digital photographic analysis. Histopathologic results were significantly high in Group II compared to Group I (p<0.001) whereas neovascularization was significantly low in Group II compared to Group I (p<0.001).

**Conclusion:** Despite its efficacy in surgical hemostasis, ABS use is associated with an increased incidence of distal tip necrosis in dorsal rat skin flaps. Therefore ABS use in marginally perfused tissues particularly in random skin flaps should be cautious.

**Keywords:** flap viability; Ankaferd; ABS (Ankaferd Blood Stopper); hemostatic agent

Corresponding author\*: Aylin Akbulut, University of Health Sciences, Ankara Training and Education Hospital, Nuclear Medicine Clinic, Ankara/TURKEY  
ORCID: 0000-0003-4665-7895

Gönderim: 10.07.2019 kabul: 29.07.2019

Doi: 10.18663/tjcl.589447

## Öz

**Amaç:** Operasyon alanlarında hemostazı elde etmek için bitki bazlı hemostatik ajanların kullanımı artmaktadır. Ancak bu ajanların vasküler kanlanmanın önemli olduğu durumlarda kullanımı ile ilgili herhangi çalışma bulunmamaktadır. Kullanımı son yıllarda yaygınlaşan, bitki bazlı bir topikal hemostatik ajan olan Ankaferd'in (ABS) McFarlane flep viyabilitesi üzerindeki etkisini sıçan modelinde inceledik.

**Gereç ve Yöntemler:** Yirmi sıçanda McFarlane tarzı flepler genel anestezi altında eleve edildi. Sıçanların 10'u Grup I olarak atandı ve başka ek tedavi uygulanmadı. Grup II'deki 10 sıçanın fleplerinin alt yüzlerine ABS uygulandı. Flepler orijinal yerlerine adapte edildikten sonraki 7. günde flap viyabilitesi için sintigrafik çekim ve dijital olarak çekilen fotoğraflarla topografik analiz yapıldı. Canlı flep alanları sintigrafik görüntülerde belirlendi ve bu alanların pikselleri total flep alanına oranlandı. Sonrasında flep dokuları histopatolojik olarak değerlendirildi.

**Bulgular:** Sintigrafik analizde, Grup I ile karşılaştırıldığında, Grup II'de flepin proksimal sap kesiminde sınırlı alanda viyabilite gözlemlendi ve flep viyabilitesi yüzdesi Grup I ve Grup II için sırasıyla, %56.33±9.94, %26.27±7.05 olarak bulundu. Grup II'de gözlenen nekrotik doku yüzdesi Grup I'e oranla anlamlı olarak yüksekti ( $p < 0.001$ ). Aynı şekilde makroskopik gözlemlerle uyumlu olarak ABS ile tedavi edilen sıçanlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, topografik analizinde bulunan canlı doku alanı anlamlı olarak daha küçüktü (%26.81±5.55, karşı %59.66±12.04,  $p < 0.001$ ). Benzer şekilde histopatolojik sonuçlarda, ABS grubunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında histopatolojik değişikliklerde anlamlı artış ( $p < 0.001$ ), neovaskülarizasyonda anlamlı azalma saptandı ( $p < 0.001$ ).

**Sonuç:** Çalışmamızın sonucunda cerrahi hemostazdaki etkinliğine rağmen, ABS kullanımının özellikle cilt flepleri gibi marjinal olarak perfüze dokularda flep viyabilitesine olumsuz etkisi bulunmuştur. Dolayısıyla, vasküler damarlanmanın önemli olduğu dokularda ABS kullanımında dikkatli olunmalıdır.

**Anahtar Kelimeler:** flep canlılığı; Ankaferd; ABS (Ankaferd Blood Stopper); hemostatik ajan

## Introduction

Studies on skin flap survival mechanisms have been conducted abundantly over the last 50 years, however; still little progress has been made. One of the most important complications of flap surgery is ischemia, which often results in necrosis. To reduce the possibility of necrosis, to prevent necrosis and to reduce ischemic conditions, many drugs, methods or situations have been assessed.

Topical hemostatic agents have now become an important assistant in many surgical procedures for reducing intraoperative and postoperative bleeding and also in nonsurgical bleedings. The hemostasis definitely has an outstanding role attaining in favorable postoperative outcomes. Ankaferd blood stopper (ABS) (Ankaferd Drug Inc., Istanbul, Turkey) is a plant-based topical hemostatic agent, which is increasingly used as an adjunctive for obtaining operative field hemostasis. And also it is the first topical hemostatic agent regarding the red blood cell- fibrinogen interactions tested in the clinical trials. It has been shown that ABS-induced pharmacological modulation of fundamental

erythroid proteins (ankyrin, spectrin, actin) can cause vital erythroid accumulation by affecting fibrinogen gamma.

The effectiveness of ABS has been demonstrated in a wide range of studies including different types of injuries, in clinical applications such as in oral and maxillofacial surgery, and in orthopedics and plastic surgery. Its efficiency has been shown in to control bleeding and healing in colorectal anastomosis and in dermal wounds. However, the ideal hemostatic agent is the one that reliably controls bleeding in the operative field and does not incite deleterious effects directly attributable to its application. Considering this wide-ranging utility of ABS in hemostasis in a variety of surgical procedures, one may wonder whether tissue survival in vascularly challenged areas, could be adversely affected. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of ABS, if any, on tissue survival using a rat model.

## Material and Methods

### Experimental Design

All the experimental protocols used in this study were conducted according to international regulations and

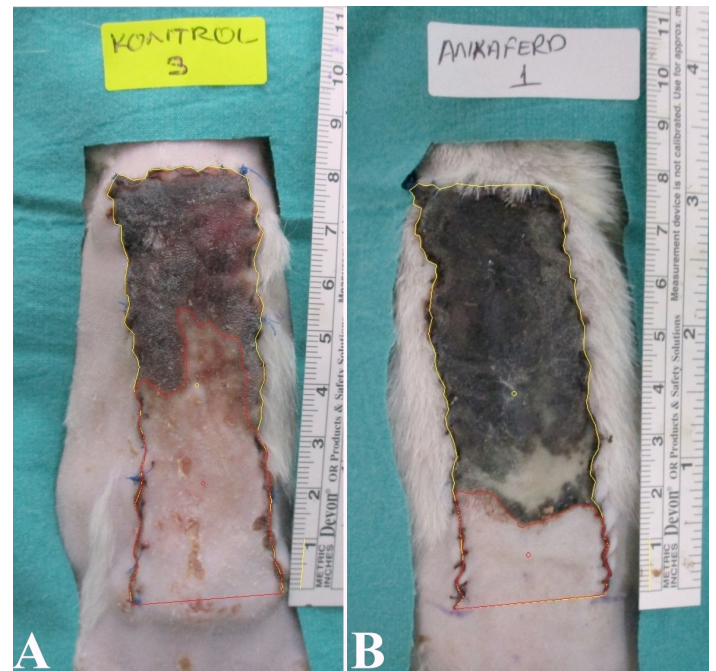
declarations concerning animal care guidelines outlined in the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the study was approved by the ethics committee institutional review board-approved. Twenty male, Wistar albino rats weighing between 250-300g were used. They were distributed randomly into two equal groups of 10. The rats were kept individually in separate cages in a room with controlled light and temperature and they received standard chow and water ad libitum. The rats were anesthetized by a combination of intramuscularly injected ketamine hydrochloride (87.5mg/kg) and xylazine hydrochloride (12.5 mg/kg) and the surgical procedures were performed under sterile conditions. The dorsum of the animals was depilated and caudal based random pattern McFarlane-style skin flaps, each with a length- to-width ratio of 3:1 and measuring 9×3cm were raised from the dorsum of both groups. The flap was then repositioned on its original position and the closure was performed by simple stitches using 4-0 polypropylene sutures (Propilen®, Dogsan, Turkey). Group I was the control group, in which only exposed to McFarlane flaps were elevated and repositioned. Group II was the study group and after the McFarlane flap elevation, a thin layer of ABS was applied to the underside of flaps and then the flaps were adapted to its original place and similarly sutured in place using 4-0 polypropylene sutures.

#### Calculating Mean Areas of Flap Survival

The outer boundaries of each flap were outlined, identified according to appearance, pliability, and texture indicative of non-viability. At post-operative 7th day all rats were digitally photographed and a scintigraphy of the flap survival was obtained.

#### Topographic Analysis

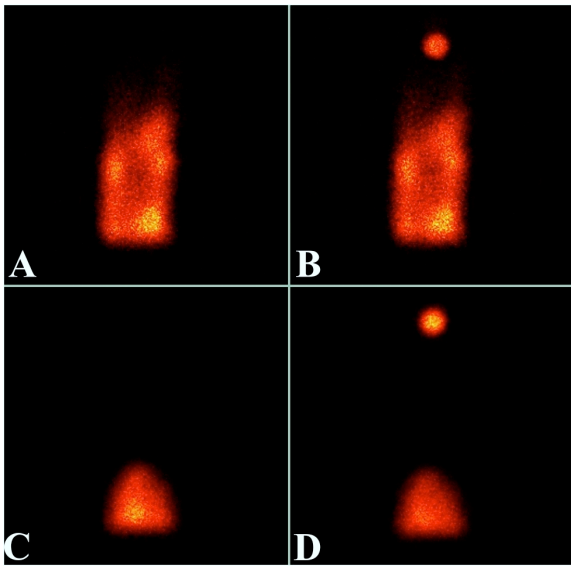
The viability of the flaps was daily observed. The digital photographs of the flap were taken from a standard distance. The percentage of skin flap necrosis area was calculated on the seventh postoperative day by means of Digimizer image analysis software (Med- Calc Software, Ostend, Belgium). The demarcation between viable and necrotic tissues was identified and the percentage of the viable flap area was calculated (Figure 1).



**Figure 1.** Topographic analysis of rats from a) Group I with 54.2 % of flap viability and b) Group II with 22.5 % of flap viability by topographic analysis.

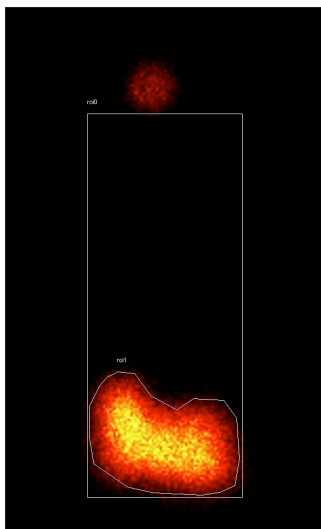
#### Radionuclide Scintigraphic Analysis

On the seventh postoperative day after intramuscular (IM) ketamine and xylazine 2% injections, the scintigraphic images were obtained. The dynamic images were showing the tissue perfusion, were acquired simultaneously under the gamma camera (Siemens e.cam, USA) equipped with pinhole collimator after the administration of 1 mCi of Tc-99m pertechnetate through the tail vein. After the perfusion images, the blood pool and late blood pool phases were acquired. The blood pool images were acquired just after the perfusion images and the late blood pool images were acquired after the clearance of heart and large vascular tissue. Because of the systemically given radioactivity, to prevent the background radioactivity scattering to the flap area and also the superficial tissue perfusion increase due to superficial bleeding the lead layers were placed under the flap, contacting to the flap pedicle and the whole body of the rat was closed with lead layers. In order to prevent contamination with the radioactive material in the lead layer, the layer was wrapped with a sheet of water-proof nylon outer face paper. This cover was replaced with a new one after each acquisition and the contamination was prevented by radioactive material. A separate image was acquired with a radioactive marker to determine the distal tip of the flap due to the expected perfusion defects at the distal part of the flap (Figure 2).



**Figure 2.** Flap viability on scintigraphic image of a rat from a) Group I b) same rat image from Group I with radioactive marker shown on the top of the image c) Group II d) same rat image from Group II with radioactive marker shown on the top of the image.

The images were first assessed visually for the hyperemic areas. After that by semi-automatically drawn region of interests (ROI) on the late blood pool phase images were the pixel size of the viable flap area were acquired. The manual ROIs were drawn over the total flap area through images with radioactive marker, and the pixel size of the total flap area were obtained and the ratio of the viable flap area was calculated (Figure 3). The percentages of necrosis were calculated by subtracting the viable area from the total flap area.



**Figure 3.** The manual rectangular ROI (roi0) drawn over the total flap area via images with radioactive marker, and the pixel size of the total flap area were obtained. The pixel size of the viable flap area is determined by the semi-automatically drawn region of interest (roi1) and the ratio of the viable flap to the total area was calculated.

## Histopathologic Examination

The animals were adequately anesthetized using high dose of intraperitoneal ketamine and xylazine and the flap tissue was raised before sacrifice and immediately fixed in 10% buffered formalin. Following routine tissue procedures, a 5- $\mu$ m section was taken with a microtome device and paraffin embedded and stained with hematoxylin-eosin and Masson's trichrome. For each flap tissue, the degree of neovascularization, inflammation, oedema, and necrosis were scored from 0 (none) to 4 (severe) (score 0: none, score 1: mild, score 2: positive, score 3: strong positive, score 4: severe positive) for the non-viable flap area, the demarcation zone and the viable flap area. Photomicrographs were taken using light microscopy AxioScope.A1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) at x 5-fold magnification.

## Data Analysis

Data analysis was performed using Statistical Package for Social Sciences for Windows software (SPSS version 23.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Kolmogorov-Smirnov test was used to examine whether the variables are normally distributed or not. The descriptive statistics are given as mean  $\pm$  standard deviation for the numeric variables with normal distribution and for the numeric variables without normal distribution as median (minimum-maximum) values. The differences between the groups were analyzed by the Mann-Whitney U test. A value of  $p < 0.05$  was accepted as statistically significant.

## Results

### Operative Results

During the course of the experiment, all rats were noted to be healthy. On post-operative 7th day, there was a clear demarcation zone between the viable and necrotic tissue. The necrotic skin was noted to be black, firm with no bleeding when cut, whereas the surviving skin was soft, yellow, and hairy and bled when cut. The majority of skin flaps in Group II survived, with small areas of viability in the pedicular zone and large areas of distal tip necrosis.

### Histologic Results

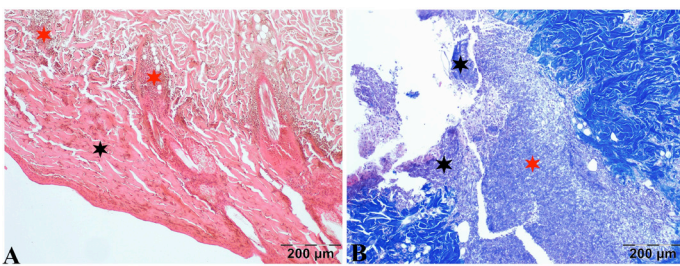
The sections were obtained from the necrotic area, the demarcation zone and the pedicle zone in both groups. The flap zones of the groups were compared between each other according to the number of neovascularization in the tissues, and oedema, inflammation and necrosis scores (Table 1). All the parameters were significantly different between 2 groups (Table 1). The tissue oedema, inflammation and necrosis scores were significantly higher in Group II compared to Group I, whereas the neovascularization was significantly lower in Group II (Figure 4).



**Table 1.** The histopathologic comparison of the flap zones are presented in both groups.

	Neovascularization†	p value	Oedema	p value	Inflammation	p value	Necrosis	p value
Group I Necrotic zone	6.50±8.8	p<0.01	2 (0-2)	p<0.001	1.50 (0-4)	p<0.001	3 (0-4)	p<0.001
Group II Necrotic zone	0.00±0		4 (4-4)		4 (4-4)		4 (4-4)	
Group I Demarcation zone	14.30±6.1	p<0.001	2 (0-4)	p<0.001	1 (0-4)	p<0.01	1 (0-2)	p<0.001
Group II Demarcation zone	0.00±0		4 (4-4)		3 (3-4)		3 (3-4)	
Group I Pedicle zone	23.50±5.5	p<0.001	0 (0-2)	p<0.001	0 (0-1)	p<0.001	0 (0-1)	p<.001
Group II Pedicle zone	6.80±2.9		3 (2-3)		3 (1-3)		3 (1-3)	

According to the Mann-Whitney U test, p value of <0.05 was considered statistically significant. For neovascularization, †, the values are expressed in mean±standard deviation; for oedema, inflammation, necrosis the values are expressed in median (minimum-maximum).

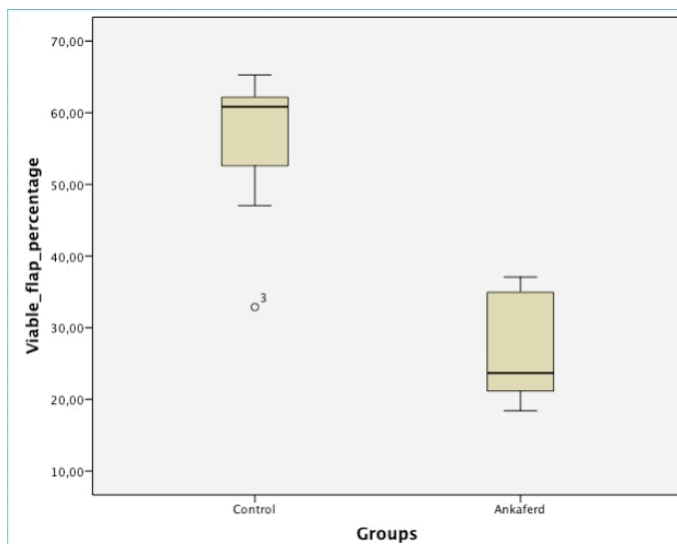


**Figure 4.** The representative photomicrographs of the flaps in Group II showing the necrosis (black stars) and the inflammation (red star) a) in Haematoxylin-Eosin x400 and b) in Masson's trichrome stain. Scale Bar: 200 µm.

### Scintigraphic Examination

The pixel size of the total flap area calculated on scintigraphic images was in  $8227.5 \pm 3765.64$  pixels in Group I versus  $7740.6 \pm 1531.38$  pixels in Group II (Table 2). However, there was no statistically significant difference between the study groups in terms of pixel size of the total flap area ( $p=0.257$ ).

The percentages of viable flap area evaluated in scintigraphic study were as follows;  $56.33 \pm 9.94$  % in Group I and  $27.24 \pm 7.05$  % in Group II (Figure 5). The differences between 2 groups were statistically significant ( $p < 0.001$ ).



**Figure 5.** The viable flap percentages for 2 groups are presented.

### Topographic Analysis

On postoperative day 7, the total area of the flap was  $21.14 \pm 2.21$  cm<sup>2</sup> in Group I and  $19.14 \pm 1.80$  cm<sup>2</sup> in Group II. The differences between 2 groups were not significant in terms of total area ( $p > 0.05$ ) (Table 2). The viable flap area in Group I was  $12.23 \pm 1.2$  cm<sup>2</sup> in Group I and  $5.11 \pm 1.03$  cm<sup>2</sup> in Group II. The viable flap area differences between groups were statistically significant ( $p < 0.001$ ). The percentages (mean±SD) of the viable in flap area, evaluated on digital images by the Digimizer analysis program, in each group were as follows for Group I  $59.66 \pm 12.04$  % and for Group II  $26.81 \pm 5.55$  %. There was a statistical significant difference in flap survival between groups ( $p < 0.001$ )(Table 2).

**Table 2.** The percentages of viable flap areas and the total flap areas are presented by scintigraphic and topographic analysis.

	Group I	Group II	p value
Percentage of Viable Flap Area by Scintigraphy	$56.33 \pm 9.94$ %	$26.27 \pm 7.05$ %	$p < 0.001$
Percentage of Viable Flap by Topographic Analysis	$59.66 \pm 12.04$ %	$26.81 \pm 5.55$ %	$p < 0.001$
Total Flap Area in Pixels by scintigraphy	$8287.50 \pm 3765.64$	$7740.60 \pm 1531.38$	$p > 0.05$
Total Flap area by Topographic Analysis	$21.14 \pm 2.2$ cm <sup>2</sup>	$19.14 \pm 1.8$ cm <sup>2</sup>	$p > 0.05$

### Discussion

Random pattern skin flaps are frequently used in reconstructive surgery for the open wounds. However, the most common complication of flap surgery, the skin flap necrosis remains as an important drawback. Although the exact mechanism of necrosis occurring in the distal part of the skin flap is unknown; vasospasm, thrombosis and insufficient blood flow



are thought to be the main reasons. The partial flap necrosis is caused by blood vessel injury, which leads to the blood flow abnormality, proceeding with hemodynamic instability. The distal part is commonly affected due to the diminished vascular perfusion at the distal portion. To improve the flap viability, numerous experimental studies with many treatment methods and various agents have been carried out to increase the flap survival and it is still a challenging issue .

ABS is a standardized mixture of the plants *Thymus vulgaris*, *Glycyrrhiza glabra*, *Vitis vinifera*, *Alpinia officinarum*, and *Urtica dioica* which is a widely used hemostatic agent. Through its ingredients it has been shown that *Thymus vulgaris* is an antioxidative via its effects on lipid peroxidation ; *Glycyrrhiza glabra* decreases vascular endothelial growth factor production and cytokine-induced neovascularization ; *Vitis vinifera* has antiatherosclerotic effects ; *Alpinia officinarum* prevents nitric oxide production and *Urtica dioica* induces nitric oxide in the endothelium and causes vasodilation . Other than these the anti-oxidant and anti-mutagenic activities and anti-inflammatory effects of ABS have been recently demonstrated. Its efficiency in wound healing and in tendon healing have been discussed in randomized clinical studies and also its use in septorhinoplasty, in split thickness skin graft, in cleft-palate patients have been reported in a report with individual cases . Furthermore, a study demonstrated that on an aortotomy wound, ABS treatment provided hemostasis whilst preserving vascular patency . These encouraging results led the authors of this study to explore the effect of this agent on flap survival in a rat model. Former studies had not verified the qualitative ischemic effects of ABS on vascular-damaged tissues.

To obtain a consistent and uniform technique, we have used McFarlane-style skin flaps planned to fixed anatomical points with a flap size of 3x9 cm keeping the aspect ratio of 1: 3. McFarlane et al. found that, the ratio of necrosis area to total flap area ranged from 22% to 50% . Similar rates of necrosis was reported in a study of Myers and Cherry . Likely, in our study, we used the flap size of 3x9 cm and we found that the ratio of necrosis area in the control group to the total flap area was similar to the rate of necrosis in the literature . Similar to the literature, scintigraphic examination was found to be compatible with the topographic analysis . Furthermore, there was no statistically significant difference in terms of the total

flap areas in both groups in scintigraphy ( $p>0.05$ ) and also in topographic analysis ( $p>0.05$ ) (Table 2).

ABS have demonstrated safety and efficacy in a variety of surgical procedures with the profound hemostatic effect and also its topical application has been reported to shorten the duration of bleeding . Similarly, in our study its application has shortened the duration of bleeding. However, in our study, other than subjective effectiveness of ABS on duration of bleeding that we have observed, we didn't evaluate this subject deeply, as it has been deeply discussed elsewhere .

However, our results of the macroscopic analysis, the topographic analysis and the scintigraphic evaluation have shown that the percentages of necrotic areas were significantly higher in Group II compared to Group I (Table 2).

In the pathophysiology of flap necrosis, the triggering event is the separation of the feeding blood supply and the sympathetic nerves. Following elevation of the flap, there are two main factors responsible for the pathogenesis of necrosis in the distal part of the flap; the first one is the decreased nutrition in the distal flap due to sympathetic activation process with diminished blood flow and the second one is the reperfusion injury occurring after 6-12 hours of ischemia when circulation is restored. Moreover, in the ischemic tissues, with anaerobic glycolization, reactive oxygen radicals (ROS) occur. Increased radicals directly lead to lipid peroxidation in the cell membrane and show toxic effects such as acute inflammation, leukocyte accumulation and adhesion, resulting in endothelial damage, which result in microvascular collapse and usually necrosis occurs .

The basic mechanism of action for ABS is the formation of an encapsulated protein web, which represents the focal point for vital erythrocyte masses . During the blood coagulation, the red blood cells make an almost impermeable seal in a clot and bind to the fibrinogen via a beta3-containing integrin, with almost similar affinity as platelets . However, despite the several tissue protective effects that the agent has , possibly the clot formation by the protein network resulting the impermeable seal may feasibly increased the microvascular collapse which may explain the increased incidence of outsized necrosis in dorsal rat skin flaps. Though this was a preliminary study we believe that the flap survival was decreased either by its cytotoxic effects on normal cells

with DNA damage, apoptosis and cytotoxicity by generating ROS activity or increased microvascular collapse via red blood cell– fibrinogen interactions.

## Conclusion

Our study results demonstrate the use of a rat model that reliably mimics a common clinical scenario for random skin flaps, and the provision of topographic, scintigraphic and histopathologic data. Our data unequivocally demonstrated that the application of ABS was associated with an increased incidence of distal necrosis in dorsal rat skin flaps. This is particularly important because of its increasingly used modality for maintaining hemostasis. However, as the experience with ABS increases, it is indispensable that clinicians continue to analytically evaluate it to upgrade the effectiveness, the limits of indications and the safety with its complications.

To our knowledge, this is the first study reporting the effects of ABS in an experimental random skin flap study with histopathological evidence. In conclusion, despite its efficacy in surgical hemostasis, our results show that ABS use should be cautious, particularly with marginally perfused tissues such as random based skin flaps.

**Conflict of Interest:** There is no conflict of interest among the authors.

**Disclosure:** The authors have no financial interest in any of the products or devices mentioned in this article.

## References

1. Haznedaroglu BZ, Beyazit Y, Walker SL, Haznedaroglu IC. Pleiotropic cellular, hemostatic, and biological actions of Ankaferd hemostat. *Crit Rev Oncol Hematol* 2012; 83: 21–34.
2. Ozel-Demiralp D, İğci N, Ayhan B, Eğin Y, Haznedaroglu IC, Akar N. Prohemostatic and antithrombin activities of Ankaferd hemostat are linked to fibrinogen gamma chain and prothrombin by functional proteomic analyses. *Clin Appl Thromb* 2012; 18: 604–10.
3. Teker AM, Korkut AY, Gedikli O, Kahya V. Prospective, controlled clinical trial of Ankaferd Blood Stopper in children undergoing tonsillectomy. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2009; 73: 1742–45.
4. Aydın BK, Altan E, Acar MA, Erkoçak ÖF, Ugraş S. Effect of Ankaferd blood stopper® on tendon healing: an experimental study in a rat model of Achilles tendon injury. *Eklemler Hast Ve Cerrahisi Jt Dis Relat Surg* 2015; 26: 31–37.
5. Findikçioğlu K, Findikçioğlu F. Ankaferd® Kanama Durdurucunun Plastik Cerrahi Pratiğinde Kullanım Alanları: Olgu Sunumlar. *Türk Plast Rekonstrüktif Ve Estet Cerrahi Derg Turk J Plast Surg* 2010 Jun 25; 17: 149–52.
6. Kuru S, Kismet K, Bağ YM et al. Does the application of Ankaferd Blood Stopper rectally have positive effects on the healing of colorectal anastomosis and prevention of anastomotic leakage? An experimental study. *Biomed Pharmacother* 2017; 96: 968–73.
7. Akalin C, Kuru S, Barlas AM et al. Beneficial effects of Ankaferd Blood Stopper on dermal wound healing: an experimental study. *Int Wound J* 2014; 11: 64–68.
8. Dölen UC, Sungur N, Koca G et al. The Vasodilator Effect of a Cream Containing 10% Menthol and 15% Methyl Salicylate on Random-Pattern Skin Flaps in Rats. *Arch Plast Surg* 2015; 42: 695–703.
9. Baris R, Kankaya Y, Ozer K et al. The effect of microneedling with a roller device on the viability of random skin flaps in rats. *Plast Reconstr Surg* 2013; 131: 1024–34.
10. Beyazit Y, Kurt M, Kekilli M, Goker H, Haznedaroglu IC. Evaluation of hemostatic effects of Ankaferd as an alternative medicine. *Altern Med Rev*. 2010; 15: 329–36.
11. Lee S-J, Umamo K, Shibamoto T, Lee K-G. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chem* 2005; 91: 131–37.
12. Sheela ML, Ramakrishna MK, Salimath BP. Angiogenic and proliferative effects of the cytokine VEGF in Ehrlich ascites tumor cells is inhibited by *Glycyrrhiza glabra*. *Int Immunopharmacol* 2006; 6: 494–98.
13. Yamakoshi J, Kataoka S, Koga T, Ariga T. Proanthocyanidin-rich extract from grape seeds attenuates the development of aortic atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 1999; 142: 139–49.
14. Matsuda H, Ando S, Kato T, Morikawa T, Yoshikawa M. Inhibitors from the rhizomes of *Alpinia officinarum* on production of nitric oxide in lipopolysaccharide-activated macrophages and the structural requirements of diarylheptanoids for the activity. *Bioorg Med Chem* 2006; 14: 138–42.
15. Testai L, Chericoni S, Calderone V et al. Cardiovascular effects of *Urtica dioica* L.(Urticaceae) roots extracts: in vitro and in vivo pharmacological studies. *J Ethnopharmacol*. 2002;81:105–109.



16. Uğur A, Saraç N, Çankal DA, Özle M. The antioxidant and antimutagenic activities of Ankaferd blood stopper, a natural hemostatic agent used in dentistry. *Turk J Med Sci* 2016; 46: 657–63.
17. Koçak E, Akbal E, Taş A et al. Anti-inflammatory efficiency of Ankaferd blood stopper in experimental distal colitis model. *Saudi J Gastroenterol Off J Saudi Gastroenterol Assoc* 2013; 19: 126.
18. Kandemir O, Buyukates M, Kandemir NO et al. Demonstration of the histopathological and immunohistochemical effects of a novel hemostatic agent, ankaferd blood stopper, on vascular tissue in a rat aortic bleeding model. *J Cardiothorac Surg* 2010; 5: 1–7.
19. McFarlane RM, DeYoung G, Henry RA, McFarlane RM. The design of a pedicle flap in the rat to study necrosis and its prevention. *Plast Reconstr Surg* 1965; 35: 177–82.
20. Myers MB, Cherry G. Augmentation of survival in pedicle skin flaps by the chemical production of ischemia. *Plast Reconstr Surg* 1972; 49: 669.
21. Vedder N B. *Flap Physiology*. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier; 2006. p. 483–506.
22. Stein HJ, Fayman MS, Oosthuizen MMJ, Hinder RA. Verapamil improves survival of rat hyperemic island skin flaps. *Surgery* 1989; 106: 617–23.
23. Goker H, Haznedaroglu IC, Ercetin S et al. Haemostatic actions of the folkloric medicinal plant extract Ankaferd Blood Stopper. *J Int Med Res* 2008; 36: 163–70.
24. Ariëns RAS. A new red cell shape helps the clot. *Blood* 2014; 123: 1442–43.
25. Kocyigit A, Guler EM, Haznedaroglu IC, Malkan UY. Ankaferd hemostat induces DNA damage, apoptosis and cytotoxic activity by generating reactive oxygen species in melanoma and normal cell lines. *Int J Clin Exp Med* 2017; 10: 2116–26.

To cite this article: Altinbas A, Kronenberger B, Canbay A. Changes in the relationship between hepatitis B virus and liver transplantation in the last decades . Turk J Clin Lab 2019; 10: 396-404.

## ■ Review

# Changes in the relationship between hepatitis B virus and liver transplantation in the last decades

## *Hepatit B virus enfeksiyonu nedenli karaciğer nakillerde son yıllardaki değişim*

Akif ALTINBAS<sup>1</sup> , Bernd KRONENBERGER<sup>2</sup> , Ali CANBAY<sup>3\*</sup> 

<sup>1</sup> Karatay University Medical Faculty, Medicana Konya Hospital, Department of Gastroenterology, Konya/TURKEY

<sup>2</sup> Medizinische Klinik 1, Schwerpunkt Gastroenterologie und Hepatologie, Universitätsklinikum Frankfurt, Frankfurt/Main, Germany

<sup>3</sup>Department of Gastroenterology, Hepatology, and Infectious Diseases, University Hospital Magdeburg, Otto von Guericke University Magdeburg, Magdeburg, Germany

### Abstract

In the last decade, both hepatitis B virus (HBV) prevalence and mortality related to HBV infection have decreased promptly. Worldwide HBV vaccination programs, precautions against HBV transmission and effective anti-viral drugs on market play crucial role for this encouraging result. Besides stopping or reversing the hepato-fibrogenesis induced by HBV infection, fighting against HBV related acute severe hepatitis are also improved recently. HBV associated cirrhosis is still the major cause of LTx, particularly in developing countries, whereas in developed countries, the rate of LTx due to HBV induced cirrhosis has declined over time. With the expanding use of NUCs before LTx, and the use of NUCs and HBIg even after LTx, HBV recurrence after LTx is no longer an important reason for graft loss or patient death. However, this positive impact is not yet reflecting survival, probably because of increasing recipient and donor ages. On the other hand, in the era of Milan criteria, overall hepatocellular carcinoma (HCC) survival has so increased that the number of transplanted HCC cases has almost doubled. However tumor recurrence is still the major cause of death, and treatment is still problematic.

**Keywords:** hepatitis B virus; acute or chronic infection; cirrhosis; hepatocellular carcinoma; liver transplantation; vaccine; anti-viral drugs

### Öz

Hepatit B virus (HBV) enfeksiyonu prevalansındaki ve HBV ilişkili mortalitesindeki azalma son yıllarda oldukça dikkat çekicidir. Dünya çapında yaygın olarak uygulanan HBV aşı programları ve HBV'ye karşı kullanımda olan anti-viral ilaçların etkinliği bu başarıda başat rol oynamaktadır. HBV ile mücadelede, sadece HBV'ye bağlı karaciğer fibrozunun ilerlemesi veya geriye döndürülmesi değil, aynı zamanda HBV ilişkili şiddetli akut hepatit tablosunun tedavisinde güzel sonuçlar alınmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde HBV ilişkili siroz karaciğer nakli konusunda halen esas sebep iken, gelişmiş ülkelerde zaman içinde HBV nedenli karaciğer nakil sıklıkları ciddi oranda düşüş göstermiştir. Anti-viral ilaçların karaciğer nakli öncesi etkin kullanımı, HBIg tedavisinin nakil sonrasında yaygın olarak kullanımı sayesinde karaciğer nakli sonrası HBV nüksü, mortalite ve greft kaybı konusunda eskisi kadar sorun olmaktan çıkmıştır. Bu başarının nakil sonrası sürviler üzerine bariz bir yansıması henüz olmamıştır. Buradaki esas sebep ise, alıcı ve verici yaşının son yıllarda önemli oranda artış göstermesi olarak gösterilmektedir. Ekolarak, Milan kriterlerinin yaygın olarak klinik pratiğe girmesiyle karaciğer nakli yapılan hepatosellüler kanser (HCC) hasta sayısı da neredeyse ikiye katlamıştır. Ancak, HCC rekürrensi, nakil sonrası en önemli ölüm nedeni olarak devam etmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** hepatit B virus; akut ve kronik HBV enfeksiyonu; siroz; hepatosellüler kanser; karaciğer nakli; aşı; anti-viral ilaçlar

Corresponding Author\*: Ali Canbay, Magdeburg University Hospital, Department of Gastroenterology and Hepatology, Magdeburg/GERMANY

E-mail: ali.canbay@med.ovgu.de

ORCID: 0000-0001-6069-7899

Received: 10.07.2019 accepted : 29.07.2019

Doi: 10.18663/tjcl.590478



## Introduction

### What has changed in overall HBV epidemiology in the last decade?

Hepatitis B virus (HBV) is the smallest DNA virus infecting human beings. It is estimated that almost 2 billion people have been exposed to the virus and that nearly 350 million people worldwide are chronically infected [1, 2]. The routes of transmission vary from one geographic area to another (mainly vertical transmission among the poor, mostly horizontal transmission in intermediate economic populations, and sexual or percutaneous route in wealthy populations) [3, 4]. The route of transmission and the prevalence of HBV may also vary according to the availability of health resources in different countries [5]. It is also important to obtain exact data on HBV epidemiology in order to organize health plans in each country. Routine neonatal vaccination programs against HBV have become important health precautions, particularly in undeveloped countries. In countries where sanitation is poor, HBV is endemic and the most frequent route of HBV transmission is vertical. On the other hand, vaccination against HBV for the population at risk seems to be feasible in countries where HBV is rare [3, 4]. Indeed, routine vaccination against HBV for neonates and for people at risk is the main program accepted by many countries.

In recent years, some encouraging data related to routine vaccination against HBV has been reported. Declining HBV prevalence is evidenced by a reduction in acute HBV infection all over the world [6-8]. Studies investigating HBV seroprevalence in some specific groups (e.g. blood donors, pregnant women, soldiers and immigrants) showed that even though HBV is still epidemic in some parts of the world, the overall prevalence of HBV is steadily declining [1, 8, 9]. Guidelines recommend routine neonatal vaccination against HBV, giving immunoglobulins against HBV (HBIG) to neonates of HBsAg positive mothers, and starting anti-viral medication in HBsAg positive mothers in the third trimester to reduce HBV DNA viral load [10, 11]. Anti-viral medication with lamivudin or tenofovir (both are class B in use during pregnancy) in the third trimester is suggested for a HBV viral load greater than 10<sup>6</sup> copies/mL, and this was shown to reduce the vertical transmission rate from 10% to 0% [12]. However, the main route of HBV transmission in wealthy countries is sexual contact or intravenous drug abuse under non-sterile conditions. After the emergence of the human immune deficiency virus (HIV) in developed countries, HBV related problems appeared with more serious disorders due to the same route of transmission of these two viruses [13]. Thus,

health societies in wealthy countries have sped up their work on protection from HBV and HIV co- or separate transmission, and have tried to solve some serious conditions associated with the presence of HBV and HIV. HBV and HIV share the same transmission route from mother to neonates. Cesarean section is not helpful in preventing transmission from HBV positive mothers, but is for HIV positive cases.

In conclusion, with routine precautions against HBV applied in both developed and developing countries, HBV prevalence has declined all over the world in the last ten years.

### Trends in the management of acute HBV infection

Spontaneous clearance of HBV after acute infection appears in only 10% of neonates [14]. Thus, protective measures for neonates from HBV transmission when born from HBV infected mothers are the most important part of the fight against HBV (Figure 1). On the other hand, acute HBV infection, diagnosed by the presence of HBsAg and IgM anti-HBc, resolves spontaneously in 95-99% of adult patients [15-18]. In this case, routine anti-viral treatment of acute HBV infection in adults is not feasible. However, the need for liver transplantation is estimated to be 1% [19]. The mortality rate is high in adult patients presenting with acute liver failure (ALF), characterized by the presence of rapid deterioration of transaminases, hepatic encephalopathy, and coagulopathy.

In case series studies with HBV induced ALF patients, survival rates varied between 15.3% and 77.7%. If all of the published cases are taken into account, the mean survival rate without lamivudin therapy is nearly 45% [15, 20, 21]. In the era of liver transplantation (LTx), survival rates have increased to greater than 70% [22, 23]. Even though Kumar et al. determined that lamivudin is ineffective in preventing death, and Dao et al. claimed that spontaneous survival was similar in both treated and untreated groups, the LTx free survival rates with NUCs therapy were shown to increase to 70- 100% [20, 21, 24-29] (Figure 2). Investigators concluded that initiation of lamivudin therapy may have been too late to rescue those patients presenting with a systemic inflammatory response (SIRS) [28]. The drawback of lactic acidosis risk under entecavir therapy, which was pointed out in HBV related cirrhosis patients, was not seen in ALF patients [20, 30].

Besides acute HBV infection, hepatic failure related to HBV reactivation with chronic HBV infection may lead to 30- 70% mortality [31]. Adding oral antiviral drugs in these patients has additional beneficial effects on survival [31, 32]. However, the mortality rate does not decrease to under 90% among those with >30 MELD scores, even with oral anti-viral drugs; in contrast

mortality rates declined to nearly 15% with <20 MELD scores [31]. Probably entecavir is not superior to lamivudine in treating acute severe reactivation of HBV infection; moreover, some reports revealed higher mortality rates in short term follow-up under entecavir therapy compared with lamivudin[32-34].

ALF accounted for 7% of all LTx in Europe from 1999- 2009, similar to the 8% for 1988- 2009, the same as in the US [35, 36]. And the number of LTx for HBV induced ALF among all ALF related LTx in Europe decreased from 17.9% to 13.2% in the periods from 1988- 2003 and 2004- 2009, respectively.

Most Western countries have been able to succeed in finding deceased donors, in contrast to Eastern countries[37, 38]. After the first performed living donor LTx in Asia at the end of the 1990s, living donor LTx became the main source of liver for ALF related LTx in some countries, e.g. 62.5% in Turkey, 78.6-90.9% in Korea, 97.2% in Japan, and 80% in Hong Kong [36, 39-42]. The rate of ALF patients undergoing deceased LTx in Western countries was reported as 21- 93%; 0.1% living LTx were performed for the etiology of severe ALF before 1993, whereas it was 1.9% from 2004- 2009 overall in Europe [43]. In contrast, deceased LTx remains under 10% in most Asian countries [39, 41, 42,44]. Thus, the waiting list mortality has reached 60%, and therefore having a potential living donor has become a good positive predictor for ALF patients in Asian countries [39]. Investigators also showed that the number of living donor LTx peaked in the US in 2001, and started to decrease over the subsequent years [45-47]. The survival for deceased LTx is similar to living LTx in adults (63% vs 64% 5 year graft survival, respectively) [35].

In conclusion, probably due to the increase of preventive precautions and the marketing of effective anti-viral medications against HBV, the overall number and the necessity of LTx in HBV related severe ALF patients has decreased significantly in the last decade. We should also keep in mind that living LTx is a highly effective alternative to deceased LTx, particularly in countries in which the source of deceased organs is limited.

### **Trends in the management of chronic HBV infection and cirrhosis**

The natural course of chronic HBV ends with cirrhosis or hepatocellular carcinoma (HCC) in almost 20% of the patients without any specific treatment. Each year, almost 600,000 patients with chronic HBV infection are estimated to die due to the complications of the disease [48]. Progression of HCC from chronic HBV infection usually occurs after two to three decades of disease, and approximately 80% of HCC develop

cirrhosis [49]. The economic burden of chronic HBV infection was estimated to be at least \$1 billion worldwide and this amount is going to increase [50, 51]. Thus, data showing a nearly 50% decline in the numbers of HBV related cirrhosis on waiting lists for LTx is important [52].

The main goal of physicians should be to prevent the progression from fibrosis to cirrhosis, from compensated to decompensated cirrhosis, from cirrhosis to HCC, and of course to improve the survival rate of chronic HBV patients [48]. Moreover, a reversibility of cirrhosis has also been demonstrated by investigators. By using entecavir or tenofovir, the improvement in necro-inflammation scores was near 90%; at the end of five years of treatment, 74% of the cirrhotic patients had no more cirrhosis [53, 54]. And lastly, preventing HBV infection recurrence in patients undergoing LTx is a targeted outcome.

Interferon (IFN) therapies (standard or pegylated), shown to be safe in compensated cirrhosis patients, is a choice for chronic HBV treatment in patients with limited indications [55, 56]. However, IFN usage was found to be related to an increased risk of hepatitis flares and some infectious complications in patients with decompensated cirrhosis [57, 58].

Even though recent guidelines recommend choosing nucleos(t)ide analogs (NUC) with a high genetic barrier against viral resistance in both chronic HBV and cirrhosis stages, most of the long term follow-up studies were performed with lamivudin[10, 11]. The clinical improvement related to hepatitis flare, hepatic decompensation and death was more prominent in patients with sustained virologic suppression [58, 59]. Histological improvement, regression of cirrhosis and decrease of fibrosis score were also found under NUCs with the help of follow-up liver biopsies at the end of 3- 5 years of therapy [54, 60-63].

In contrast to interferon, NUCs have also been found to be safe in decompensated cirrhosis [64-66]. It was shown repeatedly that in decompensated HBV patients all of the NUCs resulted in improvement of liver function tests, decreasing Child Pugh and MELD scores, mortality and need for LTx, even in patients already listed for LTx[53, 64, 66, 67]. Yao et al. showed that the LTx rate declined from 73.9% to 34.8% in lamivudin treated vs. non-treated groups, respectively [64] (Figure 2). A reduction in Child Pugh score ( $\geq 2$  points) was observed in 26- 50% of the treated, decompensated HBV cirrhosis patients [48]. One year mortality or LTx rates appeared to be as low as 4-16% with NUC medications [48]. Due to the reverse effect of virologic resistance to NUCs, the authors suggested a preference for entecavir or tenofovir in decompensated HBV patients [10, 11]. However, reaching a fast virologic response with a

combination of entecavir and tenofovir is not feasible in light of current data [48]. Lastly, the risk of lactic acidosis shown in cirrhosis patients with  $\geq 20$  MELD scores under entecavir therapy in one study from Germany was not supported by other investigators [30].

Cirrhosis is the most common reason for LTx in Europe [35]. Between 1988 and 2009, 52% of the patients who underwent LTx had cirrhosis, and 10% were chronic HBV patients (the rates revealed only HBV infection; if we add the co-infections with hepatitis C or hepatitis D, it reached 15% among all cirrhosis patients) [35]. The rates were found to be not greatly changed in comparing the periods from 1988-1998 and 1999-2009. However, even though the rate of cirrhosis among LTx indications has not changed in the last 10 years, Burra et al determined a significant change after an analysis of the rate of HBV cirrhosis related LTx before 1995 (1988-1995), since we know the year of marketing of IFN was 1991, and for lamivudine was 1998, compared with the data after 2006 (2006-2010) [68]. Among all LTx indications, HBV cirrhosis declined from 24.4% in the years between 1988 and 1995 to 16.3% between 2006 and 2010. To separate the time period as done by Burra et al. seems to be more appropriate for defining the impact of antiviral medications against HBV, and also for determining trends related to HBV cirrhosis in the last decade [68].

The problem in HBV related LTx is the recurrence of HBV infection after LTx leading to a decline in survival of both the graft and the patient [68, 69]. Before effective prophylaxis, the recurrence rates of HBV after LTx was greater than 80%. It declined immediately after the introduction of routine use of hepatitis B immunoglobulin (HBIg) to less than 30%, and after the introduction of the combination of HBIg and NUCs, it declined to nearly 3% [5, 70-72]. On the other hand, the authors claimed that entecavir and tenofovir, the high genetic barrier drugs against HBV infection, may be superior to lamivudine in terms of post-LTx prophylaxis for HBV. Cholangitas et al. showed that HBV recurrence was 6.1% under lamivudine and HBIg prophylaxis, whereas it declined to 1% with the use of entecavir/tenofovir and HBIg [73]. Moreover, the results after discontinuation of HBIg in the entecavir/tenofovir treated group were also similar to HBIg and lamivudine combination therapy. However, it was also shown that HBIg should be a part of HBV prophylaxis, even when entecavir or tenofovir is chosen [73]. The rate of death or graft loss related to HBV recurrence after LTx was 21.5% among all HBV recurrences from 1988-1995, and it dropped to 1.1% in the period from 2006-2010 [68]. Patient survival after LTx then suddenly increased from 73% to 86% in 1 year, and from 63% to 78% in 5 years in the

years 1988-1995 and 1996-2000, and the survival rates have had a plateau since then [68]. Investigators claimed that the main reasons for the plateau seen in recent decades were the improvements in prophylaxis against HBV, surgical techniques, immunosuppressive drugs, and post-op care, and the increasing ages of both donors and recipients [68, 74]. Donors over 60 years old increased from 1.8-5% to 21-30%, and for recipients from 3.3-11% to 9.3-22% in the last 20 years [35, 71, 75]. Burro et al determined that both donor and recipient age were related to long and short term survival, whereas Yamashiki et al found recipient age to be similar, however donor age was related only to long term survival [68, 76].

### **Trends in the management of HBV related HCC**

The incidence of HCC, the sixth most common cancer in the world, has increased in the last years, and this increase is estimated to continue in the next two decades [49, 77]. Chronic HBV infection is still the major risk factor for HCC in developing countries, while in contrast, chronic HCV infection and non-alcoholic steatohepatitis (NASH) are the two main risk factors in developed countries [49, 78]. The presence of chronic HBV infection raises the risk of HCC 100 fold compared to the healthy population, however not all of the chronic HBV or cirrhotic patients develop HCC. Persistence of HBeAg, and high HBV viral load, older age, male gender, presence of cirrhosis, HCV or HDV co-infection, family history of HCC, alcohol intake, smoking, and aflatoxin exposure are the risk factors for HBV related HCC [79-84].

Unfortunately, only 25% of HCC cases were diagnosed at an early stage for which curable treatment exists, and the 5 year survival is only 3% in symptomatic HCC patients [85]. Therefore, most HCC patients not suitable for surgery and local ablation therapies are candidates for palliative treatment with sorafenib, a multikinase inhibitor which targets the main signaling pathways of HCC, transarterial chemoembolization and radiotherapy applied with Yttrium-90 microspheres. Transarterial chemoembolization (TACE) is the only alternative for non-metastatic and non-invasive tumors; sorafenib is for advanced HCC with extrahepatic tumor spread and/or vascular invasion. Both agents were proven to increase survival [86]. Surgical resection, liver transplantation and local ablative therapies (e.g. radiofrequency ablation (RFI) and percutaneous ethanol injection (PEI)) are the most frequently used curative treatments for HCC [87]. Surgical resection in selected cases has the best survival rates in HCC patients compared to other therapies (70-90% 5 year survival rate). Lack of cirrhosis or Child A cirrhosis, but without any findings



of portal hypertension and with a normal range of bilirubin in the serum, are favorable criteria for resection of HCC.

Probably the most cost-effective way to fight against the problem of HCC is in the prevention of HCC [88]. Apart from the other specific etiologies, in order to prevent HBV related HCC, we have two main options: first, nation-wide vaccination programs against HBV have already proven to be effective in reducing not only overall HBV prevalence, but also HBV related HCC (an almost 70% decline was reported from Taiwan) [88-90]. Second, anti-viral medications lead to a decrease in HBV viral load in the serum or increase the chance of seroconversion of HBsAg and HBeAg, which were all shown to be risk factors for HBV related HCC [88]. Studies revealed that among chronic HBV patients who were treated with IFN, and who reached a sustained virologic response and/ or biochemical improvement, there was a risk reduction for HCC [91, 92]. It was also pointed out that chronic HBV patients with maintained virologic suppression under NUCs showed a lower incidence of HCC compared with patients with no virologic response [93]. Not only lamivudine, but also tenofovir and entecavir may also decrease the rate of HCC, particularly in non-cirrhotic patients, however the rates are still higher than those in inactive healthy carriers [79, 94-96]. The exact impact of anti-viral drugs on HCC progression among cirrhotic patients is still controversial [96-98]. On the other hand, NUCs have beneficial effects on long-term survival even when used after curative treatment of HCC [99-101]. It is not widely accepted, but IFN may also be an alternative option to treat HBV patients after curative resection [102].

In the eighties, among all of the LTx, 12% were related to HCC; similarly, this was nearly 14.4% in the 2000s [35]. However, it was reported that the rate of HCC related LTx represents almost 40% of all transplanted patients [80]. Han et al found that almost half of the HBV patients undergoing LTx had HCC at the time of LTx [103]. Moreover, one fourth of all HCC patients received the diagnosis while on the waiting list or after explanting the liver [103]. With LTx, the etiology of HBV related decompensated cirrhosis dropped from 84.2% to 70.4%, whereas HBV related HCC increased from 15.8% to 29.6% in the periods of 1988- 1995 and 2006- 2010, respectively [68].

Due to the shortage of donors, HCC patients were given 22 points over the MELD score to avoid the chance of dropping off the transplant list during the waiting time. It was estimated that a one year stay on the waiting list resulted in 40% of HCC patients losing LTx criteria [77, 86, 104]. Thus, as a bridge therapy to LTx, RF or TACE is performed on the tumor in order

to prevent the progression of tumor size beyond the Milan criteria during the waiting time. Moreover, HCC patients responding to TACE therapy followed by LTx had a 90% 5 year survival compared with 35% who failed to respond to TACE therapy before LTx [105]. However, poor hepatic reserve appears to be a risk factor for TACE related mortality [106].

The 1 and 3 year survival rates of patients with HCC undergoing LTx were shown to increase from 65% to 89% and from 48% to 78% from 1988- 1995 to 2006- 2010, respectively [68, 80]. Even though there is a great improvement in the survival of HCC, the survival rates of HBV associated HCC are lower than those for HBV associated decompensated cirrhosis (84%, 68% vs. 83%, 78% in HCC vs. cirrhosis cases for 1 and 5 year patient survival, respectively) [68]. Nevertheless, some research studies have claimed that the overall survival of HCC related and HCC unrelated LTx are similar [80]. HBV recurrence is the major cause of death or graft loss after LTx, followed by tumor recurrence (26.3% and 20.7%, respectively) [68, 103]. It is important to note that none of the HCC diagnosed patients with explanted liver experienced HCC recurrence [103].

Even though HBV recurrence rates dropped from 18.7% to 3.6% from the years 1988- 1995 to 2006- 2010 (p value <0.001), the recurrence rates of HBV related HCC did not differ over time (30.9% and 36.1% for 1988- 1995 and 2006- 2010, p value 0.63) [68].

Tumor staging, tumor grading, moderate or poorly differentiated tumors, and the presence of vascular invasion, higher immunosuppressive levels or choice of mTOR- free inhibitors consisting of immunosuppressive regimes are the main risk factors of post LTx HCC recurrence (Table) [77]. Serum alpha-fetoprotein at the time of LTx may be a good predictor for HCC recurrence [103]. In the first years after LTx, the cancer incidence almost doubled and this was mainly attributed to the use of immunosuppressive drugs [107]. Even though the efficacy of treatment of recurrent HCC after LTx is controversial, all of the treatment options for advanced cirrhosis are on the table [77, 80, 108]. Even LTx seems to be the most feasible therapy for recurrent HCC after LTx, though surgery alone or accompanied by radiofrequency ablation may be good options [108]. Patients treated with TAKE prior to LTx or suffering from arterial stenosis following LTx, may not be eligible for TAKE for recurrent HCC after LTx [108].

## Conclusion

With routine precautions against HBV, both HBV prevalence and the rate of mortality, and the necessity of LTx related to HBV induced ALF have declined in the last decade. Early

initiation of NUCs, at least before the appearance of SIRS, in ALF cases seems to be important for preventing death. HBV associated cirrhosis is still the major cause of LTx, particularly in developing countries, whereas in developed countries, the rate of LTx due to HBV induced cirrhosis has declined over time. With the expanding use of NUCs before LTx, and the use of NUCs and HBIg even after LTx, HBV recurrence after LTx is no longer an important reason for graft loss or patient death. However, this positive impact is not yet reflected in survival, probably because of increasing recipient and donor ages. On the other hand, in the era of Milan criteria, overall HCC survival has so increased that the number of transplanted HCC cases has almost doubled. However tumor recurrence is still the major cause of death, and treatment is still problematic.

**Table 1.** The risk factors of HCC recurrence following LTx- which performed fullfilling the Milan or University of San Fransisco (UCSF) criteria.

High Risk	Low Risk
Moderate or poor differentiation of tumor	mTOR inhibitor containing immuno-suppressive regime following LTx
Micro-vascular invasion of tumor	HCC diagnosed in the explanted liver
High serum AFP level at the time of LTx	Good response to pre-LT local ablative treatments
High immuno-suppressive level in serum following LTx	

**Declaration of conflict of interest**

The authors received no financial support for the research and/or authorship of this article. There is no conflict of interest.

**References**

1. A review of chronic hepatitis B epidemiology and management issues in selected countries in the Middle East. *J Viral Hepat* 2012. 19(1): p. 9-22.
2. Schweitzer, A., et al., Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. *Lancet*, 2015.
3. Locarnini, S., et al., Strategies to control hepatitis B: Public policy, epidemiology, vaccine and drugs. *J Hepatol*, 2015. 62(1 Suppl): p. S76-86.
4. Shepard, C.W., et al., Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination. *Epidemiol Rev*, 2006. 28: p. 112-25.
5. Degertekin, H. and G. Gunes, Horizontal transmission of hepatitis B virus in Turkey. *Public Health*, 2008. 122(12): p. 1315-7.
6. Goyal, A. and J.M. Murray, The impact of vaccination and antiviral therapy on hepatitis B and hepatitis D epidemiology. *PLoS One*, 2014. 9(10): p. e110143.

7. Liang, X., et al., Epidemiological serosurvey of hepatitis B in China--declining HBV prevalence due to hepatitis B vaccination. *Vaccine*, 2009. 27(47): p. 6550-7.
8. Rantala, M. and M.J. van de Laar, Surveillance and epidemiology of hepatitis B and C in Europe - a review. *Euro Surveill*, 2008. 13(21).
9. Altinbas, S., M. Erdogan, and N. Danisman, The seroprevalences of HBs Ag and anti-HCV in pregnant women in Ankara. *Arch Gynecol Obstet*, 2010. 281(2): p. 371.
10. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol*, 2012. 57(1): p. 167-85.
11. Lok, A.S. and B.J. McMahon, Chronic hepatitis B: update 2009. *Hepatology*, 2009. 50(3): p. 661-2.
12. Han, G.R., et al., A prospective and open-label study for the efficacy and safety of telbivudine in pregnancy for the prevention of perinatal transmission of hepatitis B virus infection. *J Hepatol*, 2011. 55(6): p. 1215-21.
13. Nunez, M., Routine hepatitis B virus DNA testing in human immunodeficiency virus-infected patients with positive hepatitis B core antibody but negative hepatitis B surface antigen is not justified by current evidence. *Hepatology*, 2010. 51(3): p. 1087-8.
14. McMahon, B.J., et al., Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state. *J Infect Dis*, 1985. 151(4): p. 599-603.
15. Tillmann, H.L., K. Zachou, and G.N. Dalekos, Management of severe acute to fulminant hepatitis B: to treat or not to treat or when to treat? *Liver Int*, 2012. 32(4): p. 544-53.
16. Kuruuzum, Z., et al., Rate of chronicity and time of disappearance of HBsAg following acute hepatitis B. *Hepatogastroenterology*, 2009. 56(90): p. 466-9.
17. Zhang, H.W., et al., Risk factors for acute hepatitis B and its progression to chronic hepatitis in Shanghai, China. *Gut*, 2008. 57(12): p. 1713-20.
18. Altinbas, A., et al., Spontaneous HBsAg seroconversion after severe flare of chronic hepatitis B infection. *Ann Hepatol*, 2010. 9(2): p. 194-7.
19. Cornberg, M., et al., Prophylaxis, diagnosis and therapy of hepatitis B virus (HBV) infection: the German guidelines for the management of HBV infection. *Z Gastroenterol*, 2007. 45(12): p. 1281-328.
20. Tillmann, H.L., et al., Safety and efficacy of lamivudine in patients with severe acute or fulminant hepatitis B, a multicenter experience. *J Viral Hepat*, 2006. 13(4): p. 256-63.
21. Miyake, Y., et al., Lamivudine treatment improves the prognosis of fulminant hepatitis B. *Intern Med*, 2008. 47(14): p. 1293-9.

22. Hadem, J., et al., Etiologies and outcomes of acute liver failure in Germany. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2012. 10(6): p. 664-9 e2.
23. Fujiwara, K., et al., Fulminant hepatitis and late onset hepatic failure in Japan. *Hepatol Res*, 2008. 38(7): p. 646-57.
24. Kumar, M., et al., A randomized controlled trial of lamivudine to treat acute hepatitis B. *Hepatology*, 2007. 45(1): p. 97-101.
25. Torii, N., et al., Effectiveness and long-term outcome of lamivudine therapy for acute hepatitis B. *Hepatol Res*, 2002. 24(1): p. 34.
26. Kondili, L.A., H. Osman, and D. Mutimer, The use of lamivudine for patients with acute hepatitis B (a series of cases). *J Viral Hepat*, 2004. 11(5): p. 427-31.
27. Yu, J.W., et al., Lamivudine treatment is associated with improved survival in fulminant hepatitis B. *Liver Int*, 2011. 31(4): p. 499-506.
28. Yu, J.W., et al., The study of efficacy of lamivudine in patients with severe acute hepatitis B. *Dig Dis Sci*, 2010. 55(3): p. 775-83.
29. Dao, D.Y., et al., Use of nucleoside (tide) analogues in patients with hepatitis B-related acute liver failure. *Dig Dis Sci*, 2012. 57(5): p. 1349-57.
30. Lange, C.M., et al., Severe lactic acidosis during treatment of chronic hepatitis B with entecavir in patients with impaired liver function. *Hepatology*, 2009. 50(6): p. 2001-6.
31. Yuen, M.F., Anti-viral therapy in hepatitis B virus reactivation with acute-on-chronic liver failure. *Hepatol Int*, 2015. 9(3): p. 373-7.
32. Wong, V.W., et al., Entecavir treatment in patients with severe acute exacerbation of chronic hepatitis B. *J Hepatol*, 2011. 54(2): p. 236-42.
33. Chen, C.H., et al., Entecavir vs. lamivudine in chronic hepatitis B patients with severe acute exacerbation and hepatic decompensation. *J Hepatol*, 2014. 60(6): p. 1127-34.
34. Tsai, W.L., et al., Early entecavir treatment for chronic hepatitis B with severe acute exacerbation. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014. 58(4): p. 1918-21.
35. Adam, R., et al., Evolution of indications and results of liver transplantation in Europe. A report from the European Liver Transplant Registry (ELTR). *J Hepatol*, 2012. 57(3): p. 675-88.
36. Campsen, J., et al., Outcomes of living donor liver transplantation for acute liver failure: the adult-to-adult living donor liver transplantation cohort study. *Liver Transpl*, 2008. 14(9): p. 1273-80.
37. Ostapowicz, G., et al., Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Ann Intern Med*, 2002. 137(12): p. 947-54.
38. de Villa, V.H., C.M. Lo, and C.L. Chen, Ethics and rationale of living-donor liver transplantation in Asia. *Transplantation*, 2003. 75(3 Suppl): p. S2-5.
39. Liu, C.L., et al., Right-lobe live donor liver transplantation improves survival of patients with acute liver failure. *Br J Surg*, 2002. 89(3): p. 317-22.
40. Kayaalp, C., V. Ersan, and S. Yilmaz, Acute liver failure in Turkey: a systematic review. *Turk J Gastroenterol*, 2014. 25(1): p. 35-40.
41. Matsui, Y., et al., Living donor liver transplantation for fulminant hepatic failure. *Hepatol Res*, 2008. 38(10): p. 987-96.
42. Park, S.J., et al., Emergency adult-to-adult living-donor liver transplantation for acute liver failure in a hepatitis B virus endemic area. *Hepatology*, 2010. 51(3): p. 903-11.
43. Germani, G., et al., Liver transplantation for acute liver failure in Europe: outcomes over 20 years from the ELTR database. *J Hepatol*, 2012. 57(2): p. 288-96.
44. Ikegami, T., et al., Living donor liver transplantation for acute liver failure: a 10-year experience in a single center. *J Am Coll Surg*, 2008. 206(3): p. 412-8.
45. Qiu, J., M. Ozawa, and P.I. Terasaki, Liver transplantation in the United States. *Clin Transpl*, 2005: p. 17-28.
46. Vagefi, P.A., et al., Use of living donor liver transplantation varies with the availability of deceased donor liver transplantation. *Liver Transpl*, 2012. 18(2): p. 160-5.
47. Carlisle, E.M. and G. Testa, Adult to adult living related liver transplantation: where do we currently stand? *World J Gastroenterol*, 2012. 18(46): p. 6729-36.
48. Mutimer, D.J. and A. Lok, Management of HBV- and HCV-induced end stage liver disease. *Gut*, 2012. 61 Suppl 1: p. i59-67.
49. Ertle, J., et al., Non-alcoholic fatty liver disease progresses to hepatocellular carcinoma in the absence of apparent cirrhosis. *Int J Cancer*, 2011. 128(10): p. 2436-43.
50. Altinbas, A., et al., Retrospective analysis of total direct medical costs associated with hepatitis B patients with oral antiviral versus pegylated interferon therapy in Turkey. *J Viral Hepat*, 2014. 21(11): p. 794-801.
51. Kim, W.R., Epidemiology of hepatitis B in the United States. *Hepatology*, 2009. 49(5 Suppl): p. S28-34.
52. Bernal, W., et al., Outcome after wait-listing for emergency liver transplantation in acute liver failure: a single centre experience. *J Hepatol*, 2009. 50(2): p. 306-13.
53. Liaw, Y.F., et al., Efficacy and safety of entecavir versus adefovir in chronic hepatitis B patients with hepatic decompensation: a randomized, open-label study. *Hepatology*, 2011. 54(1): p. 91-100.
54. Marcellin, P., et al., Regression of cirrhosis during treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B: a 5-year open-label follow-up study. *Lancet*, 2013. 381(9865): p. 468-75.



55. Lau, G.K., et al., Peginterferon Alfa-2a, lamivudine, and the combination for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med*, 2005. 352(26): p. 2682-95.
56. Marcellin, P., et al., Peginterferon alfa-2a alone, lamivudine alone, and the two in combination in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med*, 2004. 351(12): p. 1206-17.
57. Hoofnagle, J.H., et al., Interferon alfa for patients with clinically apparent cirrhosis due to chronic hepatitis B. *Gastroenterology*, 1993. 104(4): p. 1116-21.
58. Perrillo, R., et al., Low-dose, titratable interferon alfa in decompensated liver disease caused by chronic infection with hepatitis B virus. *Gastroenterology*, 1995. 109(3): p. 908-16.
59. Lok, A.S., et al., Long-term safety of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology*, 2003. 125(6): p. 1714-22.
60. Dienstag, J.L., et al., Histological outcome during long-term lamivudine therapy. *Gastroenterology*, 2003. 124(1): p. 105-17.
61. Hadziyannis, S.J., et al., Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B for up to 5 years. *Gastroenterology*, 2006. 131(6): p. 1743-51.
62. Chang, T.T., et al., Long-term entecavir therapy results in the reversal of fibrosis/cirrhosis and continued histological improvement in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology*, 2010. 52(3): p. 886-93.
63. Heathcote, E.J., et al., Three-year efficacy and safety of tenofovir disoproxil fumarate treatment for chronic hepatitis B. *Gastroenterology*, 2011. 140(1): p. 132-43.
64. Yao, F.Y., et al., Lamivudine treatment is beneficial in patients with severely decompensated cirrhosis and actively replicating hepatitis B infection awaiting liver transplantation: a comparative study using a matched, untreated cohort. *Hepatology*, 2001. 34(2): p. 411-6.
65. Koklu, S., et al., Long-term efficacy and safety of lamivudine, entecavir, and tenofovir for treatment of hepatitis B virus-related cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2013. 11(1): p. 88-94.
66. Liaw, Y.F., et al., Tenofovir disoproxil fumarate (TDF), emtricitabine/TDF, and entecavir in patients with decompensated chronic hepatitis B liver disease. *Hepatology*, 2011. 53(1): p. 62-72.
67. Shim, J.H., et al., Efficacy of entecavir in treatment-naive patients with hepatitis B virus-related decompensated cirrhosis. *J Hepatol*, 2010. 52(2): p. 176-82.
68. Burra, P., et al., Liver transplantation for HBV-related cirrhosis in Europe: an ELTR study on evolution and outcomes. *J Hepatol*, 2013. 58(2): p. 287-96.
69. Mascarenhas, R. and A. Gurakar, Recent advances in liver transplantation for the practicing gastroenterologist. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*, 2009. 5(6): p. 443-50.
70. Gane, E.J., et al., Lamivudine plus low-dose hepatitis B immunoglobulin to prevent recurrent hepatitis B following liver transplantation. *Gastroenterology*, 2007. 132(3): p. 931-7.
71. Gane, E., Posttransplant prophylaxis strategies for hepatitis B. *Am J Transplant*, 2010. 10(8): p. 1721-2.
72. Perrillo, R., et al., Entecavir and hepatitis B immune globulin in patients undergoing liver transplantation for chronic hepatitis B. *Liver Transpl*, 2013. 19(8): p. 887-95.
73. Cholongitas, E. and G.V. Papatheodoridis, High genetic barrier nucleos(t)ide analogue(s) for prophylaxis from hepatitis B virus recurrence after liver transplantation: a systematic review. *Am J Transplant*, 2013. 13(2): p. 353-62.
74. Burroughs, A.K., et al., 3-month and 12-month mortality after first liver transplant in adults in Europe: predictive models for outcome. *Lancet*, 2006. 367(9506): p. 225-32.
75. Karam, V., et al., Quality control of the European Liver Transplant Registry: results of audit visits to the contributing centers. *Transplantation*, 2003. 75(12): p. 2167-73.
76. Yamashiki, N., et al., Outcomes after living donor liver transplantation for acute liver failure in Japan: results of a nationwide survey. *Liver Transpl*, 2012. 18(9): p. 1069-77.
77. Clavien, P.A., et al., Recommendations for liver transplantation for hepatocellular carcinoma: an international consensus conference report. *Lancet Oncol*, 2012. 13(1): p. e11-22.
78. Yim, S.Y., et al., The management and prognosis of patients with hepatocellular carcinoma: what has changed in 20 years? *Liver Int*, 2015.
79. Kim, W.R., et al., Impact of long-term tenofovir disoproxil fumarate on incidence of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B. *Cancer*, 2015. 121(20): p. 3631-8.
80. Mancuso, A. and G. Perricone, Hepatocellular Carcinoma and Liver Transplantation: State of the Art. *J Clin Transl Hepatol*, 2014. 2(3): p. 176-81.
81. Kwon, H. and A.S. Lok, Does antiviral therapy prevent hepatocellular carcinoma? *Antivir Ther*, 2011. 16(6): p. 787-95.
82. Yang, H.I., et al., Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*, 2002. 347(3): p. 168-74.
83. Lee, M.H., et al., Prediction models of long-term cirrhosis and hepatocellular carcinoma risk in chronic hepatitis B patients: risk scores integrating host and virus profiles. *Hepatology*, 2013. 58(2): p. 546-54.

84. Loomba, R., et al., Synergistic effects of family history of hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus infection on risk for incident hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2013. 11(12): p. 1636-45 e1-3.
85. de Lope, C.R., et al., Management of HCC. *J Hepatol*, 2012. 56 Suppl 1: p. S75-87.
86. Forner, A., J.M. Llovet, and J. Bruix, Hepatocellular carcinoma. *Lancet*, 2012. 379(9822): p. 1245-55.
87. Chen, Q.W., et al., Radiofrequency ablation plus chemoembolization versus radiofrequency ablation alone for hepatocellular carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2015.
88. Lok, A.S., Does antiviral therapy for hepatitis B and C prevent hepatocellular carcinoma? *J Gastroenterol Hepatol*, 2011. 26(2): p. 221-7.
89. Leroy, V. and T. Asselah, Universal hepatitis B vaccination: the only way to eliminate hepatocellular carcinoma? *J Hepatol*, 2015.
90. Chang, M.H., et al., Decreased incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B vaccinees: a 20-year follow-up study. *J Natl Cancer Inst*, 2009. 101(19): p. 1348-55.
91. Yang, Y.F., et al., Interferon therapy in chronic hepatitis B reduces progression to cirrhosis and hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *J Viral Hepat*, 2009. 16(4): p. 265-71.
92. Lin, S.M., et al., Interferon therapy in HBeAg positive chronic hepatitis reduces progression to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 2007. 46(1): p. 45-52.
93. Sung, J.J., et al., Meta-analysis: Treatment of hepatitis B infection reduces risk of hepatocellular carcinoma. *Aliment Pharmacol Ther*, 2008. 28(9): p. 1067-77.
94. Idilman, R., et al., Long-term entecavir or tenofovir disoproxil fumarate therapy in treatment-naive chronic hepatitis B patients in the real-world setting. *J Viral Hepat*, 2015. 22(5): p. 504-10.
95. Hosaka, T., et al., Long-term entecavir treatment reduces hepatocellular carcinoma incidence in patients with hepatitis B virus infection. *Hepatology*, 2013. 58(1): p. 98-107.
96. Cho, J.Y., et al., Patients with chronic hepatitis B treated with oral antiviral therapy retain a higher risk for HCC compared with patients with inactive stage disease. *Gut*, 2014. 63(12): p. 1943-50.
97. Kim, S.S., et al., Effect of virological response to entecavir on the development of hepatocellular carcinoma in hepatitis B viral cirrhotic patients: comparison between compensated and decompensated cirrhosis. *Am J Gastroenterol*, 2014. 109(8): p. 1223-33.
98. Kurokawa, M., et al., Long-term effect of lamivudine treatment on the incidence of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis B virus infection. *J Gastroenterol*, 2012. 47(5): p. 577-85.
99. Liu, G.M., et al., Adjuvant antiviral therapy for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma after curative treatment: A systematic review and meta-analysis. *Hepatol Res*, 2015.
100. Sun, P., et al., Nucleot(s)ide analogues for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma after curative treatment: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 2014. 9(7): p. e102761.
101. An, H.J., et al., Sustained low hepatitis B viral load predicts good outcome after curative resection in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, 2010. 25(12): p. 1876-82.
102. Xu, J., et al., Effect of adjuvant interferon therapy on hepatitis b/c virus-related hepatocellular carcinoma after curative therapy - meta-analysis. *Adv Clin Exp Med*, 2015. 24(2): p. 331-40.
103. Han, S.H., et al., Clinical outcomes of liver transplantation for HBV-related hepatocellular carcinoma: data from the NIH HBV OLT study. *Clin Transplant*, 2011. 25(2): p. E152-62.
104. Poon, R.T., et al., Difference in tumor invasiveness in cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma fulfilling the Milan criteria treated by resection and transplantation: impact on long-term survival. *Ann Surg*, 2007. 245(1): p. 51-8.
105. Otto, G., et al., Response to transarterial chemoembolization as a biological selection criterion for liver transplantation in hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl*, 2006. 12(8): p. 1260-7.
106. Garwood, E.R., et al., Morbidity and mortality following transarterial liver chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma and synthetic hepatic dysfunction. *Liver Transpl*, 2013. 19(2): p. 164-73.
107. Collett, D., et al., Comparison of the incidence of malignancy in recipients of different types of organ: a UK Registry audit. *Am J Transplant*, 2010. 10(8): p. 1889-96.
108. Welker, M.W., et al., Recurrent hepatocellular carcinoma after liver transplantation - an emerging clinical challenge. *Transpl Int*, 2013. 26(2): p. 109-18.

## ■ Derleme

# İnsan biyolojik materyalinin araştırma amaçlı olarak kullanılması ile ilgili araştırmacı ve araştırma etik kurul sorumluluğu

## *Investigator and research ethics committee responsibility for the use of human biological material for research purposes*

Nüket BÜKEN\* 

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıp Etiği ve Tıp Tarihi Anabilim Dalı, Ankara/TÜRKİYE

### Öz

Laboratuvar hekimleri sıklıkla, kapasiteleri ölçüsünde yeteneklerine göre klinisyen, araştırmacı ve sağlık savunucusu olarak farklı roller oynamaktadır. Hastayla direkt temasta bulunmuyor olsalar da, "meçhul" laboratuvar hekimlerinin ilk ve en önemli görevi "yüzü bilinmeyen" ve sadece bir sayı ile ifade edilen hastası için, en uygun olanı, en doğru şekilde yapmak olacaktır. Laboratuvar hekimi hastayla ilgili kişisel bilgilere sahip olmasa da, hastanın en azından bir parçasıyla yakın temastadır, biyolojik örnekle güçlü bir ilişki kurulmuştur ve dolayısıyla bu alışılmadık sözleşme klinisyen, laboratuvar hekimi ve biyolojik örneğin sahibi olan hasta arasında kurulmuştur.

Tıbbi ilerlemeler, her zaman insan bedenleri ve insan doku örnekleri kullanılarak gerçekleştirilen eğitim süreçlerine güvendi. Son yıllarda, insan organ, doku ve genetik materyallerinin Dünya çapında toplanması ve depolanması ile "insan doku arşivi" olarak bilinen, geniş kaynak ve sayısız önemli tıbbi buluşlar sağlanmıştır. Bu biyolojik arşivler araştırma kaynağı olarak kullanılmaya devam ettiği sürece insanlık ilerleyecektir.

Biyolojik materyallerin saklanmasıdaki teknik olanakların gelişimi yanında, biyolojik verilerin dijital ortamda işlenmesi ve bilgisayar teknolojilerindeki yenilikler de örneklere ait verilerin toplanmasını, izlenmesini ve üzerinde her türlü analizin yapılmasını kolaylaştırmaktadır. Biyobankalar arasındaki veri akışının etkin bir biçimde yapılabilmesi, çok odaklı bilimsel araştırmaları kolaylaştıran bir etkidir ve bu nedenle ulusal ve uluslararası düzeyde biyobankaların belirli standartlara uygun olarak işlev görmeleri sağlanmaya çalışılmaktadır. Biyobankacılığın hızla gelişmesi ve giderek daha da karmaşık bir yapıya bürünmesi sonucunda bilinen temel etik konular dışında yeni etik sorunlarla da karşılaşmaktadır.

**Anahtar kelimeler:** laboratuvar tıbbi; biyoetik; araştırma; insan biyolojik materyali; biyobanka; onam

Sorumlu Yazar\*: Nüket Büken, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıp Etiği ve Tıp Tarihi Anabilim Dalı, Ankara/TÜRKİYE

E-posta: nuketbuken@hotmail.com

ORCID: 0000 0001 9166 6569

Gönderim: 09.04.2018 Kabul: 28.05.2018

Doi:10.18663/tjcl.413878

## Abstract

Laboratory medicine physicians frequently play several roles in their capability as clinicians, investigators and health defender. Even though there is commonly no direct touch on patients, the “faceless” laboratory doctor’s first and prominent task is to act in the best interests of the “faceless” patient who is frequently “just a number”. Although individual information of the patient is often deficient, the laboratory doctor does have sincere knowledge of at minimum part of the patient -the specimen- and an unusual three-way contract is made between clinician, laboratory physician and patient.

Medical progress has always relied on learning from human bodies and human tissue samples. In recent years, human organs, tissue, and genetic material throughout the World have been collected and stored, and this vast resource, known as “the human tissue archive,” has enabled countless crucial medical discoveries. It is essential that humankind continue to add to this archive and that it remain available as a research resource.

The development of technical facilities in storage of biological materials as well as utilizing digital medium in processing biological data and innovations in the computer technology have made collection, monitoring and analysis of the data samples easier. Efficient data flow between the biobanks is a factor that facilitates multifocal scientific research. Therefore, biobanks / biolabs in both national and international level are aimed to function in accordance with specific standards. As a result of rapid development and increasingly complex structure of biobanking we have encountered in new ethical challenges besides the main ethical issues.

**Keywords:** laboratory medicine; bioethics; research; human biological material; biobanking; consent

## Giriş

Günümüz tıbbı artık daha çok kişisel (personalized medicine), öngörülebilir, önleyici, hassas (precision medicine) ve bu alandaki bütün aktörlerin katılımını öngören bir anlayıştır. Laboratuvar tıbbı da tıpkı klinik tıbbı gibi bu dönüşüme büyük katkı sağlamaktadır ve gelecekte çok daha etkin bir rol oynama potansiyeline sahiptir. Özellikle insan biyolojik materyalleri üzerinde yapılan laboratuvar çalışmaları ve elde edilen verilerin disiplinlerarası ve çok uluslu araştırmalarda kullanımı, ülkeler için önemli sonuçlar içerme potansiyeline sahip olmaları nedeniyle, hükümetler tarafından da giderek daha çok desteklenmektedir.

Günümüzde biyotıp teknolojileri, yalnızca tanı-tedavi sürecini değil, biyotıp araştırmalarının niteliğini ve bu süreçte sınırları belirleyecek olan etikolegal düzenlemeleri değiştirmekte, dönüştürmektedir; gen editing teknolojileri, tüm genom sekanslama, genetik testler ve tesadüfi bulgular, tüketiciye verilen doğrudan genetik hizmetler (direct-to-consumer testing), insan embriyosunda genom biçimlendirme, süper insan, yapay zeka, özerk makineler, büyük veri (big data), robot teknolojileri etiği, embriyonun bilimsel araştırmalardaki kullanımı, yapay üreme teknolojilerinde babalık ve anneliğin yeni boyutunun tartışılmaya başlanması, bu teknolojilerin kötüye kullanılmasının önlenmesi ya da insanın doğal kapasitesinin iyileştirilmesinin yol açacağı sorunlar... gibi.

Sağlık alanında hızlı bir şekilde kullanılmaya başlanan bu yeni ve gelişen teknolojiler toplumu karmaşık, belirsiz ve öngörü-

lemez bir sürece dahil etmektedir. Bunun sebeplerinden biri bu teknolojilerin risk ve yan etkilerinin öğrenilmesinin, ancak tecrübe yolu ile mümkün olabilmesidir. Öte yandan, henüz güvenilirliği bilinmeyen teknolojilerin geliştirilmesi ve kullanılması ile ortaya çıkan biyoetik sorunlar da pek çoktur; gizlilik, mahremiyet, ayrımcılık, özerkliğe saygı, risklerin önlenmesi, bu teknolojilere eşit ve adil erişimin nasıl sağlanacağı... gibi.

Özellikle genetik araştırmalar, biyotıp araştırmaları ve biyoteknoloji alanındaki gelişmeler sonucunda, insan biyolojik materyali üzerindeki etik sorumlulukların ve hakların belirlenmesinde geleneksel etik yaklaşımların artık yetersiz kaldığı görülmektedir. Birkaç damla kan veya örneğin, KC dokusuna ait birkaç patolojik doku örneğinin, tek başına fazla bir değer taşımadığını ancak geniş bir koleksiyona dönüştürüldüğünde, önemli boyutta bilimsel ve ekonomik değere ulaşabildiğini artık biliyoruz. Hatta bu veriler, tıbbi kayıtlarla veya vericilerle ilgili başka kayıtlarla ilişkilendirildiğinde, bu değer daha da artmaktadır. Bu nedenle “biyolojik örnekler üzerindeki sahiplik hakları”, “yararın paylaşımı”, “gizliliğin ve mahremiyetin korunması”, “patent hakkı” gibi konularda, yeni etik ve hukuksal sorunlar ortaya çıkmaktadır.

Çağımızda, yüksek teknoloji tıbbının hüküm sürdüğü biyotıp alanında, etkililik ve teknik yenilikler, yalnızca bilim insanlarının değil, hastaların ve toplumun da ilgisini üzerine toplamaktadır. Yüksek etik standartların hem klinik hem de laboratuvar çalışmalarında hayati önemi olmasına ve laboratuvar takiplerinde

de etik ikilemlerle sık karşılaşılıyor olunmasına rağmen, laboratuvar uygulamalarında etik konusu ister tanı isterse araştırma ile ilgili olsun, günümüzde hak ettiği ilgiyi görmemektedir.

Özellikle patolojik/biyokimyasal değerlendirmelerde hem tanı/tedavi hem de araştırma uygulamalarında doğruluk, standartlara uygunluk çok önemlidir; hastayla direkt temasta bulunmuyor olsalar da laboratuvar hekimlerinin ilk ve en önemli görevi "yüzü bilinmeyen" hastası için en uygun olanı en doğru şekilde yapmak olacaktır. Laboratuvar hekimi hastayla ilgili kişisel bilgilere sahip olmasa da, hastanın en azından bir parçasıyla yakın temastadır, biyolojik örnekle güçlü bir ilişki kurulmuştur ve dolayısıyla genetik bilgiyi taşıyan biyolojik örneğin sahibi olan hastadan da sorumludur.

Hastayla direkt temasta bulunmuyor olsalar da, laboratuvar hekimlerinin (tıbbi biyolog, biyokimya uzmanı ve patoloğların) ilk ve en önemli görevi, "yüzü bilinmeyen" ve sadece bir doku veya hücresi ile var olan ve dosya sayısı ile ifade edilen hastası için, en uygun olanı, en doğru şekilde yapmak olacaktır. Laboratuvar hekimleri ve patoloğlar, hastayla ilgili kişisel bilgilere sahip olmasalar da, hastanın en azından bir parçasıyla yakın temastadırlar. Hastanın biyolojik örneğiyle güçlü bir ilişki kurulmuştur ve bu alışılmadık sözleşme; klinisyen, laboratuvar hekimi/patolog ve biyolojik örneğin sahibi olan hasta arasında kurulmuştur (1).

Tıbbi ilerlemeler, her zaman insan bedenleri ve insan doku örnekleri kullanılarak gerçekleştirilen eğitim süreçlerine güvenildi. Son yıllarda, insan organ, doku ve genetik materyallerinin Dünya çapında toplanması ve depolanması ile "insan doku arşivi" olarak bilinen, geniş kaynaklara ve sayısız önemli tıbbi buluşlara imkân sağlanmıştır. Bu biyolojik arşivler araştırma kaynağı olarak kullanılmaya devam ettiği sürece de biyotıp araştırmaları ilerleyecektir.

Biyolojik materyallerin saklanmasıdaki teknik olanakların gelişimi yanında, biyolojik verilerin dijital ortamda işlenmesi ve bilgisayar teknolojilerindeki yenilikler de örneklere ait verilerin toplanmasını, izlenmesini ve üzerinde her türlü analiz yapılmasını kolaylaştırmaktadır. Yani hem biyolojik materyalin kendisi, hem de bu materyalden elde edilen veriler önem kazanmaktadır. Bu materyaller her zaman bir biyobankada ve biyobankanın güvenlik koşullarında var olmayabilir; bir laboratuvar arşivi, patoloji arşivi şeklinde bireysel ya da kurumsal olarak oluşturulmuş olabilir. Bu durumda tanı ya da araştırma amaçlı olarak toplanan insan biyolojik materyallerinin toplama amacı dışında kullanılması mümkün müdür? Araştırmacıyı, çalıştığı kurumu ve kurumun etik kurullarını bağlayıcı hükümler nelerdir? Söz konusu biyobankalar olduğunda belirlenen

etikolegal sınırlar, bu tür durumlardaki sorunu çözmediğinde yapılması gerekenler nelerdir?

Biliyoruz ki, biyobankalar arasındaki veri akışının etkin bir biçimde yapılabilmesi, çok odaklı bilimsel araştırmaları kolaylaştıran bir etkidir ve bu nedenle ulusal ve uluslararası düzeyde biyobankaların belirli standartlara uygun olarak işlev görmeleri sağlanmaya çalışılmaktadır. Biyobankacılığın hızla gelişmesi ve giderek daha da karmaşık bir yapıya bürünmesi sonucunda bilinen temel etik konular dışında yeni etik sorunlarla da karşılaşmaktadır. Bu konu ile ilgili ulusal literatür de oluşmaya başlamıştır. Ancak öte taraftan yine biliyoruz ki ülkemizde "biyobanka" olma koşullarını sağlayabilecek çok az sayıda örnek vardır; bu durumda, "biyobanka" olmayan, ama kişisel ya da kurumsal olarak "depolanmış biyolojik materyal içeren" arşivlerin durumu ne olacaktır? Özellikle patoloğlar, biyokimya uzmanları ve tıbbi biyoloğlar tarafından en sık sorulan soru da budur.

Hasta ile klinisyen hekim ve laboratuvar hekimi arasındaki ilişki, incelemesi yapılan biyolojik materyal üzerinden kurulmakta olup, ilgili tanı materyalinin o anda devam eden ya da gelecekte yapılması öngörülen herhangi bir araştırma amacıyla kullanımı konusu, laboratuvar hekimi sorumluluğuna, bir de "araştırmacı hekim sorumluluğu"nun eklenmesi anlamına da gelmektedir.

Laboratuvar tıbbi açısından, yapılacak tetkikler için aydınlatılmış onamın bulunduğundan emin olmak ve test sonuçlarını etik ve kanuni gereklilik veya toplum sağlığı açısından tersi gerekmedikçe, hastanın bakım çerçevesi dışına çıkarmamak zaten laboratuvar hekiminin sorumluluğudur (1).

Diğer taraftan, DNA'a ulaşımın ticari değerinin yüksek olduğu biyoteknoloji çağında, hastanın yapılması için izin vermemiş olduğu testlerin (tanısal amaçlı) yapılmasının uygun olmadığı ve yine sahiplerinin aydınlatılmış onamı alınmadan depolanmış dokuların/insan biyolojik materyallerinin araştırma amaçlı olarak kullanılmaması gerektiğinin kabul edilmesi ve göz önünde bulundurulması önemlidir.

Klinik teşhisi koyan klinisyen ile doku teşhisi koyan laboratuvar hekiminin arasındaki iletişimin niteliğinin önemi kadar, araştırmacı laboratuvar hekimi ile örneği veren hasta arasındaki iletişim de en az o kadar önemlidir. İnsan biyolojik verilerinin laboratuvar araştırmalarında araştırma materyali olarak kullanılması durumlarında, söz konusu bireylerin araştırma konusunda ayrıntılı bir biçimde (amacı, süresi, yararları, tehlikeleri...) bilgilendirilmeleri, aydınlatılmış onamlarının alınması, diledikleri zaman deneyden çekilme haklarının olduğu konusunda bilgilendirilmeleri önemlidir (2, 3).



## Hasta Mahremiyeti Açısından Veri Güvenliğinin Sağlanması

Bilgisayar teknolojileri ve dijital bilginin hayatımızın hemen her alanına girmiş olduğu günümüzde, mahremiyetin ve güvenliğin sağlanması son derece önem kazanmaktadır. Sağlık kuruluşları/laboratuvarları arasındaki ya da biyobankalar gibi tıbbi veri sağlayıcı organizasyonlar arasındaki veri akışları, sağlık hizmetlerinin kalitesini ve araştırma olanaklarını artırırken hasta mahremiyetinin ihlal edilmesi riskini de arttırmaktadır (2,3). İletişim teknolojilerinin biyotıp alanında kullanımının hızla yaygınlaşması pek çok açıdan kolaylıklar sağlarken, bu verilerin depolanması ve transferi konularında güvenlik ihtiyacını da gündeme getirmektedir. Gizliliğin korunmasında teknik önlemlerin alınması, iletişim kanallarının güvenliğinin sağlanması, verilerin anonimleştirilmesi, kodlama veya dijital imza kullanılması alınacak önlemlerden bazılarıdır. Özellikle tıbbi kayıtların elektronik ortama dönüşümü, bu verilere yetkisiz erişilmesine karşı yeni koruma kalkanlarının geliştirilmesi gereğini doğurmaktadır.

Veri güvenliğinin sağlanmasında; verilerin kalitesini koruyacak sistemlerin geliştirilmesi, verilerin toplanma amaçları dışında kullanılmaması, verilere ilgilinin rızası olmadan ulaştırılması, verilerin veri toplama amacına uygun sürede saklanması gibi ilkeler bulunmaktadır. Tıbbi verilerin korunmasında yasal düzenlemelerin yanında bireyi de etkinleştiren mekanizmalar yararlı olmaktadır. Bu sistemde verilerin kullanımı onaya tabidir, verilere erişimin çeşitli seviyelerde gerçekleştirilmesi kontrol altındadır, kullanıcıların kimlikleri denetim altındadır, şifreleme metotları kullanılmaktadır (2,3).

Bugün tıp uygulamaları sırasında özel yaşamın, mahremiyetin ya da özneliğin korunması hakkı, kaynağını anayasalardan almaktadır. Tıp hizmetlerinden yararlanan kişilerin, kişisel nitelikteki bilgilerinin "mahremiyeti" korunmalıdır. Tutulan kayıtlar ve elde edilen bilgiler, hastanın rızası olmaksızın üçüncü kişilere aktarılamaz. Kimi ülkelerde bu onamın yazılı olması istenmektedir. Bu bilgilerin adsız olarak, örneğin istatistiksel izlem, bilimsel araştırma gibi amaçlarla kullanılması ise düzenlemelere tabidir. Her bireyin özel yaşamının dokunulmazlığı hakkına saygı gösterilmeli ve bu hak korunmalıdır; bireyin düşünce, duygu ve kişisel yaşamının sırlarını, başkalarıyla ne ölçüde paylaşacağına, kendisinin karar vermesi hakkına saygı gösterilmelidir. Günümüzde, tıp kayıtlarının bilgisayarda korunması, özel sigorta kuruluşlarının yaygınlaşması ve ağırlık kazanması, sağlık kuruluşlarının bilimsel, yönetsel, ekonomik yönden yoğun bir denetim altında bulundurulması gibi durumlar nedeniyle, hasta kayıtlarının mahremiyetinin korunması konusunda, ye-

terince titizlik gösterilemeyeceği kaygısı yaygınlaşmaktadır. Bir sigorta ağına ya da bir işe girerken, yapılan tıbbi değerlendirmeler sırasında elde edilen bilgilerin korunması, en az bu taramaların kendisi kadar tartışma konusu olmaktadır.

Tıp uygulamaları sırasında, hekimin tedavisini üstlendiği hastaya ait kişisel bilgileri saklı tutma zorunluluğu, hiç kuşkusuz insan araştırmaları için de geçerli olan bir ilkedir ve araştırmaya katılan hekimlerin gönüllü katılımcının mahremiyetine (özel yaşamına) değer vermeleri ve bunun sorumluluğunu üstlenmeleri gerekmektedir. Araştırmaların sürdürülmesinde ve sonuçların yayımlanmasında gönüllülerin mahremiyetinin korunması, kişisel kimlik bilgilerinin açıklanmamasını gerektirmektedir. Bu konuda önlem olarak, örneğin kayıtların gizliliği esas alınarak veriye ulaşım sınırlandırılabilir ya da kişilere bir tanıttım numarası verilebilir.

Kişisel verilerin korunmasıyla ilgili Avrupa Birliği çerçeve yönetmeliklerinde ve özellikle biyomedikal araştırmalar açısından Oviedo Sözleşmesi (4) kapsamında çeşitli maddeler bulunmaktadır. Özellikle genetik örnek ve bilgilerin saklandığı biyobankalarda bu verilerin ayrımcılığa yol açmaması, kişilerin işveren ve sigortalar gibi üçüncü şahıslar nezdinde haklarının korunması açısından önemlidir.

### İnsan Biyolojik Materyalinin ve Bu Materyalden Elde Edilen Kişisel Verilerin Korunması ile İlgili Etik ve Hukuki Durum

Klinik araştırmalar alanında, multidisipliner ve uluslararası çalışmalarda, günümüzde ve gelecekte en tartışmalı alanlardan birisi, "insan kökenli biyolojik örneklerin kullanımı" konusudur. Katılımcılardan alınmış insan kökenli biyolojik örnek ve benzeri maddelerin en yararlı biçimde kullanılmasına gösterilecek özen önemlidir. İnsanlardan araştırma için alınan örnekler; belli bir araştırma projesinde hemen kullanılmak üzere veya gelecekte öngörülen çalışmalarda kullanılmak üzere depolanmak amacıyla alınabilir. Bu iki kullanım arasında ayırım çok kesin değildir ve örneklerin bir kısmı hemen kullanılırken, kalan bölümü daha sonra kullanılmak üzere saklanabilir. İnsan kökenli biyolojik maddelerin araştırmalarda kullanılmasında etik sorunlar, iki başlıkta incelenebilir:

- İlk olarak, insan kökenli biyolojik madde ve örneklerin alınmasında, bedene müdahale edilmesini gerektiren durumlara ilgili sorunlardır. Bu, araştırma yürütülürken yapılan müdahalelerde, kişinin bedensel bütünlüğünün riske girdiği veya aynı anda ek koruyucu önlemlerin alınması gerektiği durumlarda gündeme gelir (örneğin onam verme yeteneği olmayan kişiler).
- İkinci olarak, alınan biyolojik örneğin kullanılmasına ve depo-

lanarak saklanması ile ilgili onam alınması / izin verilmesi ve elde edilen tıbbi bilginin ve verinin güvenliğinin ve gizliliğinin korunması durumudur. İkinci gruptaki sorunlar ciddi dikkat ve özen gösterilmesini gerektirir ve gerek uluslararası gerekse ulusal pek çok kurum tarafından yayımlanmış belgeler ve kılavuzlarca düzenlenmiştir.

İnsan biyolojik materyalinin ve bu materyalden elde edilen verilerin kendine özgü niteliği ve ilgili tarafların menfaatlerinin farklı özellikleri nedeniyle, bu konunun hukuki açıdan da özel bir şekilde ele alınması gerekmektedir. İster biyobanka isterse de arşiv materyali olsun buralarda saklanan örneklerin nasıl alınacağından başlayarak, yapılacak her türlü işlemin yasal sınırlarının kendine özgü koşulları içerisinde çizilmiş olması ve başta katılımcı olmak üzere, tüm tarafların menfaatlerinin hukuken dengelenmiş olması gerekmektedir.

Bu konunun etik ve yasal sınırlarının çizilmesi gerekliliğinin gerekçelerine bakacak olursak;

- Örneklerin ilgilinin rızası olmadan kolayca elde edilebilmesi,
- Örneklerin alınma amaçları dışında kolaylıkla kullanılabilmesi,
- Elde edilen verilerin kalıcı bilgiler içermesi,
- İlgilinin hayatı için çok önemli verileri içermesi,
- İlgilinin ailesi ve ait olduğu gruba ait bilgileri içermesi,
- Verilerin ayrımcılık amacıyla kullanılma potansiyeli taşıması,
- Verilerin başkalarının kullanımının bilimsel ve ticari olanaklar yaratması,
- Kötüye kullanılmaları durumunda kişilik haklarının zedelenmesi olasılığı.

İnsan biyolojik materyalinin ve biyolojik verilerinin güvenliği ve korunmasıyla ilgili olarak 1982 Anayasası'nın sağladığı temel anayasal güvenceler, 17. maddeyle düzenlenen kişi dokunulmazlığı, kişinin maddi ve manevi varlığını koruma ve geliştirme hakkı ile 20. maddeyle düzenlenen özel hayatın gizliliği ve korunmasıdır. İnsan biyolojik materyali üzerinde yapılacak tıbbi araştırmalar ve bunlar sonucunda elde edilecek bulguların kötüye kullanılmasının, kişinin vücut bütünlüğünü, maddi ve manevi varlığını veya kişilik haklarını zedeleme riski mevcuttur. Bu nedenle, insan genetik materyali üzerinde yapılacak saklama veya araştırma faaliyetlerinin Anayasamızın çizmiş olduğu bu çerçeve içerisinde yapılması gerekmektedir (5).

1982 Anayasası'nın 20. maddesi de, genetik araştırmalarla zedelenmesi riski bulunan özel hayatın gizliliğini güvence altına almaktadır. Bu maddeye göre; herkes, özel hayatına ve aile hayatına saygı gösterilmesini isteme hakkına sahiptir ve özel

hayatın ve aile hayatının gizliliğine dokunulamaz. Bu düzenlemeye 2010 yılında bir ek yapılarak kişisel verilerin korunması ve ancak kişinin izniyle işlenebilmesi anayasal güvence altına alınmıştır. Bu düzenlemeye göre; "Herkes, kendisiyle ilgili kişisel verilerin korunmasını isteme hakkına sahiptir. Bu hak; kişinin kendisiyle ilgili kişisel veriler hakkında bilgilendirilme, bu verilere erişme, bunların düzeltilmesini veya silinmesini talep etme ve amaçları doğrultusunda kullanılıp kullanılmadığını öğrenmeyi de kapsar. Kişisel veriler, ancak kanunda öngörülen hallerde veya kişinin açık rızasıyla işlenebilir. Kişisel verilerin korunmasına ilişkin esas ve usuller kanunla düzenlenir." (5)

Anayasada yapılmış olan bu değişikliğin gerektirdiği kişisel verilerin korunmasını düzenleyen kanun (Kişisel Verilerin Korunması Kanunu, Kanun No: 6698) nihayet 24 Mart 2016 tarihinde TBMM'de kabul edilerek yasalaşmış ve 6 Nisan 2016 tarihinde yürürlüğe girmiştir (6). Bu Kanunun amacı, kişisel verilerin işlenmesinde başta özel hayatın gizliliği olmak üzere kişilerin temel hak ve özgürlüklerini korumak ve kişisel verileri işleyen gerçek ve tüzel kişilerin yükümlülükleri ile uyacakları usul ve esasları düzenlemektir (6). Gerek 6698 sayılı Veri Koruma Kanunu, gerekse sonrasında çıkarılan Kişisel Sağlık Verilerinin İşlenmesi ve Mahremiyetinin Sağlanması Hakkında Yönetmelik (7), biyotıp araştırmaları ile ilgili açık bir düzenleme getirmemiştir.

Kanunda (Madde-3) "kişisel verilerin işlenmesi" ile ilgilidir; "kişisel verilerin tamamen veya kısmen otomatik olan ya da herhangi bir veri kayıt sisteminin parçası olmak kaydıyla otomatik olmayan yollarla elde edilmesi, kaydedilmesi, depolanması, muhafaza edilmesi, değiştirilmesi, yeniden düzenlenmesi, açıklanması, aktarılması, devralınması, elde edilebilir hâle getirilmesi, sınıflandırılması ya da kullanılmasının engellenmesi gibi veriler üzerinde gerçekleştirilen her türlü işlem" (6).

Kişisel veriler, ancak kullanılacak amaçla bağlantılı ve bu amaç gereklilikleriyle sınırlı olacak şekilde işlenebilir. Kişisel verilerin toplanmasından önce, bu verilerin toplanmasının amaçlarının belli olması, sonraki kullanımların da bu amaçlarla sınırlı tutulması temel ilkelerden biridir. Amaca uygun kullanım ilkesi gereğince; veri konusu kişinin rızası veya kanunun yetki verdiği haller hariç olmak üzere, kişisel verilerin toplandığı ve işlendiği amaçlar dışında kullanılmaması, elde edilebilir hale getirilmesi veya açıklanmaması gerekmektedir.

Söz konusu kanunun yürürlüğe girmesinin ardından 20 Ekim 2016 tarihinde Kanunu'nun ilk uygulama Yönetmeliği, Kişisel Sağlık Verilerinin İşlenmesi ve Mahremiyetinin Sağlanması Hakkında Yönetmelik (7) adıyla yürürlüğe girmiştir. Yönetmeliğin 4. maddesine göre "Kimliği belirli veya belirlenebilir gerçek kişiye ilişkin

her türlü sağlık bilgisi" kişisel sağlık verisidir. Gerek söz konusu Kanun, gerekse de Yönetmelik kişisel sağlık verileri için "hassas veri" yerine "özel nitelikli veri" ifadesini kullanmıştır. Özel nitelikli kişisel verilerin, ilgilinin açık rızası olmaksızın işlenmesi yasaktır.

Özel nitelikli kişisel verilerin işlenmesi süreci ile ilgili 6698 sayılı Veri Koruma Kanununda tanımlanan Kişisel Verileri Koruma Kurulu tarafından belirlenen yeterli önlemlerin alınması şartı getirilmiştir. Ancak hangi önlemlerin alınacağı konusunda belirtilmemiştir. Ülkemiz açısından biyoetik ve insan haklarına ilişkin en önemli uluslararası ve bağlayıcı iç hukuk metni olan Avrupa Konseyi Biyotıp ve İnsan Hakları Sözleşmesi (OVIEDO) (2) başta olmak üzere ulusal sağlık mevzuatımız değerlendirildiğinde araştırmaya katılacak kişilerden aydınlatılmış onam almak hukuki bir zorunluluktur. Geçerli bir aydınlatılmış onamdan söz edebilmek için, kişiye kendisinden alınacak örneğin hangi prosedüre göre alınacağını anlatılması, kişiye örneğinin saklanacağı ve saklanacak veri tabanı hakkında temel bir bilgi verilmesi gerekmektedir. Bu bilgilerin; veri sorumlusunun kimliğini, verinin işleme amacını, araştırmacının etik kurul izni aldığını, onamın gönüllü olduğunu ve çalışmaya katılmayı reddetmenin kişiye olumsuz sonuçlarının olmayacağını içermesi gerekmektedir

### **İnsan Biyolojik Örneklerinin Araştırma Amaçlı Kullanımı**

Avrupa'da bu alanda hukuki çerçeve, Avrupa Konseyi Oviedo Biyotıp Sözleşmesi'nde (1997) ve Konsey'in (2006) 4 numaralı İnsan Kökenli Biyolojik Maddeler hakkında Tavsiye Kararı'nda çizilmiştir (8). Sözleşme'nin 22. Maddesi (İnsan vücudundan alınmış parçalar üzerinde tasarruf; bir müdahale sırasında insan vücudunun herhangi bir parçası alındığında, çıkarılan parça, yalnızca uygun bilgi verme ve muvafakat alma usullerine uyulduğu takdirde, çıkarılma amacından başka bir amaç için saklanabilir ve kullanılabilir) katılımcılardan alınan biyolojik örneğin araştırmada belirtilen amaçlardan farklı biçimde kullanılabilmesi ve saklanabilmesi için katılımcıların özgür iradeleriyle verdikleri aydınlatılmış onamlarının alınmasını şart koşar. Ayrıca Sözleşme'nin 21. maddesinde insan vücudunun ve parçalarının maddi çıkar amacıyla kullanılmayacağını belirtir. Tüm bu düzenlemeler, bu maddelerin kullanıldığı bilimsel araştırmalardan kaynaklanan fikri mülkiyet haklarının ruhsatlandırılmasını / satılmasını engellemez ve bu durum diğer fikri mülkiyet hakları olguları ile benzer özellik gösterir. Ancak bu durum, insan kökenli biyolojik maddeler ticari amaçlarla kullanılacaklarsa, onları veren kişilerin bilgilendirilmemesi anlamına da gelmez. Aynı zamanda, araştırmacılar, yalnızca kazanç sağlamak uğruna bu maddeleri satamazlar; bu madde

ve örneklerin sahipleri ticari kâr elde etme amacıyla hareket edemezler. Yalnızca harcadıkları emek ve zaman kaybı, makul düzeyde tutularak, telafi edilebilir (4,8).

Avrupa Konseyi 2006 tarihli 4 numaralı Tavsiye Kararı; gelecekteki araştırmalarda kullanılmak üzere insanlardan biyolojik örnek ve madde alınması, saklanması, ileride kullanımı; toplanan insan kökenli ürünlerin depolanması ve biyobankaların yönetimi ile ilgili ilkeleri –örneğin klinik çalışmalardan, bilimsel araştırmalardan, adli tıp incelemelerinden artakalan maddelerin kullanım kuralları- gibi konuları düzenler. Tavsiye Kararı, insan kökenli biyolojik maddeler ve örnekler üzerinde araştırmaların, ancak bağımsız bilimsel ve etik kurul incelemesinin yapılarak, Biyotıp Sözleşmesi'nin ilkelerini yansıtan biçimde ve vericinin aydınlatılmış onamı alındıktan sonra gerçekleştirilebileceğini ifade eder (8). Ayrıca Araştırma Etik Kurulu incelemesinde temel bir sorun olan, biyolojik maddeler veya benzeri kişisel verilerden, katılımcının kimliğinin saptanması meselesine açıklık getirir. Genel anlamda, kimlik bilgilerine ya doğrudan dosyalarda kayıtlı kişisel veriler üzerinden ya da dolaylı olarak, araştırmacıların veya ilgili üçüncü tarafların bildikleri bir şifre ile girilebilen kayıt sisteminden ulaşılabilir. Teşhis edilemeyen maddeler, belli bir çaba gösterildikten sonra bile vericinin kimlik bilgilerine ulaşamayan ürünlerdir. Araştırma Etik Kurulu, insan kökenli biyolojik maddelerin kullanımını içeren bir projeyi değerlendirirken, katılımcı kimlik bilgilerine erişimde ne düzeyde kalınacağını, araştırmacılar tarafından projede açıklanmış olması koşulunu arar.

Helsinki Bildirgesi (2013) Madde 32; "Biyobankalar veya benzer saklama kuruluşlarında bulunan materyal veya veriler gibi, kime ait olduğu bilinmeyen veya istenirse belirlenebilen örnek ya da verilerin kullanılacağı bir biyotıp araştırması için örnek ve verilerin alınmasından sorumlu hekim; verilerin toplanması, saklanması ve/veya yeniden kullanımı konusunda onam almalıdır. Bu onamın elde edilmesinin söz konusu araştırma için olanaksız olduğu veya pratik istisnai durumlar olabilir. Böyle durumlarda araştırma, yalnızca bir araştırma etik kurulunun değerlendirme ve onayından sonra yapılabilir" demektedir (9). "Benzer saklama koşullarında" ifadesinin arşiv materyallerine gönderme yaptığı varsayılır ise, görülmektedir ki sorumluluk, önce onamı alacak olan araştırmacı hekimin sonra da ilgili protokolü değerlendirip etik onay verecek olan etik kuruludur.

Böyle durumlar için şimdilik uygun çözüm; halen arşivde olan ve araştırmalar için kullanılmak istenen materyaller için, katılımcıların mahremiyetinin en geniş anlamda korunması, tam bir anonimasyonun sağlanması, planlanan yeni araştırma için katılım-

çılara tekrar aydınlatılmış onam almak üzere gidilmesinin pratik olarak mümkün olmadığı ve bunun gerekçelerinin etik kurula sunulması ve ilgili etik kurulların söz konusu araştırmalara olur vermesidir. Görüldüğü gibi bu durumda, özerklikten belirli oranda vazgeçilirken, bu sorun mahremiyet ve veri güvenliğinin artırılmasıyla dengelenmeye çalışılmaktadır.

Araştırma Etik Kurulu, insan kökenli biyolojik madde koleksiyonu veya biyobankalar kurulması ile ilgili proje önerisi kendilerine sunulduğunda bu noktaları dikkatle incelemelidir: Başvuru projesinde, öncelikle, güvenilir bir denetim mekanizması oluşturulmuş olmalıdır; biyolojik örnekler ve maddelere araştırma amaçlı olarak erişimi düzenleyen kurallar saydam ve açık biçimde ifade edilmiş olmalıdır.

6698 sayılı Veri Koruma Kanunu ve ilgili Yönetmelik değerlendirildiğinde, hassas verilerin işlenmesi aşamalarında alınacak yeterli önlemlerin neler olduğu, biyometrik genetik veriler gibi ekstra koruma gerektiren verilerin biyotıp araştırmaları özelinde nasıl işleneceği ve alınan biyolojik materyal/verilerin daha sonraki araştırmalarda yeniden kullanılıp kullanılmayacağı düzenlenmediği görülmüştür. Ayrıca, AB düzenlemelerinde olduğu gibi veri güvenliği için kodlama yöntemlerine ilişkin bir düzenlemeye de rastlanmamıştır. İlgili literatürde tanımlanmış olan açık onam (open consent) türünün gerek 6698 sayılı Veri Koruma Kanunu gerekse Yönetmelik'te biyotıp araştırmaları açısından bir karşılığının olmaması da bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. İlgili onam belgelerinin nasıl düzenleneceğinin açık ve net biçimde tanımlanmasına ve uygulamaya sokulmasına gereksinim vardır.

Ülkemizde de konu ile ilgili tüm tarafların (arşiv materyalinin/ biyobankaların ilgili tarafları) hak ve sorumluluklarının tanımlandığı yol gösterici rehberler hazırlanmaktadır. Bunlardan bir tanesi de HÜ Biyoetik Merkezi (HÜBAM) ve HÜ Biyolojik Kaynak Bankası ve Genombilim Uygulama ve Araştırma Merkezi (HÜBİ-GEM) tarafından bir çalıştay sonrası hazırlanmış ve hem araştırmacıların hem de etik kurulların kullanımına sunulmuştur (10).

### **Konu ile İlgili Onam Formları**

Bir biyobankada ya da arşiv materyali olarak bireysel ya da kurumsal olarak depolanan ve araştırmalarda kullanılmayı bekleyen insan biyolojik materyalleri için gereklilikleri yukarıda tanımladık. Burada geçerliliği olan 2 onam türünden söz edilebilir;

- Kademeli (çok seçenekli) Onam ve
- Geniş/Boş onam (Etik Kurulun kabul etmesi koşuluyla) kullanılabilir.

Herhangi bir nedenle elinde kurumsal ya da kişisel bir biyolojik

materyal arşivi olan herhangi bir araştırmacı, bu arşiv materyalini kullanarak bir araştırma projesi planladığında; şimdilik uygun çözüm, halen arşivde olan ve araştırmalar için kullanılacak istenen materyaller için, katılımcıların mahremiyetinin en geniş anlamda korunması, tam bir anonimleştirmenin yapılması yani biyolojik materyal ile kişi bağlantısının yeniden kurulamayacak şekilde kesildiğinin güvencesinin beyan edilmesi, planlanan yeni araştırma için katılımcılara tekrar aydınlatılmış onam almak üzere gidilmesinin pratik olarak mümkün olmadığı ya da olanaksız olduğunun araştırmacı tarafından beyanı ve bunun gerekçelerinin etik kurula proje protokolünde sunulması ve ilgili etik kurulların da söz konusu araştırmalara Helsinki Bildirgesi (2013) Madde 32'ye dayanarak, olur vermesidir.

Görüldüğü gibi aksi durumda atık biyolojik materyal olacak materyal araştırma sonucunda elde edilmesi olası yarar gözetilerek, materyal vericisinin özerkliğinden belirli oranda vazgeçilerek ve bu vazgeçiş hem yararlılık hem de mahremiyet ve veri güvenliğinin artırılmasıyla dengelenmeye çalışılarak mevcut durum etik açıdan haklı çıkarılabilir. Ancak başta da ifade ettiğimiz gibi ilgili etik kurulun bilgilendirilmesi ve araştırmacı yazılı beyanına dayalı olarak vereceği etik kurul onayı şarttır.

Hastadan şimdi alınacak ve arşiv materyali olarak saklanması planlanan her tür biyolojik materyal için, ister tanı/televi amaçlı, isterse araştırma amaçlı alınmış olsun, onam formu alınmalıdır ve onam formuna aşağıdaki olasılıklar eklenmelidir (KADEMELİ ONAM);

- Biyolojik materyalimin yalnızca tanı amaçlı kullanımına izin veriyorum.
- Biyolojik materyalimin..... (belli bir nedenle) kullanılmasına izin veriyorum / vermiyorum.
- Sadece kimliksizleştirilmiş kullanımına izin veriyorum.
- Ek bir bilgilendirme gerekmeden ..... belli tip araştırmalarda kullanımına izin veriyorum
- Tekrar onam alınmak kaydıyla araştırmalarda kullanımına izin veriyorum.
- Her çeşit araştırmada kullanılmasına izin veriyorum (GENİŞ ONAM)

### **Sonuç ve Öneriler**

İnsan biyolojik materyali ve verilerinin elde edilmesi/saklanması/işlenmesi, erişimi süreçlerinde bilimsel geçerlilik ve güvenilirliğin sağlanması, bu açıdan da kalite güvence sistemlerinin etkin kullanılması etik bir gerekliliktir. Her bir basamakta uyulması gerekli bilimsel, teknolojik, etik gereklilikler çerçeve kurullar şeklinde tanımlanmalıdır. Örneklerin saklanmasıdaki

teknik olanakların gelişiminin yanı sıra, biyolojik verilerin dijital ortamda işlenebilmesi ve bilgisayar teknolojilerindeki yenilikler de örneklere ait verilerin toplanmasını, izlenmesini ve üzerinde her türlü analizin yapılmasını günümüzde kolaylaştırmaktadır.

Ülkemiz açısından biyoetik ve insan haklarına ilişkin en önemli uluslararası ve bağlayıcı iç hukuk metni olan Avrupa Konseyi Biyotıp ve İnsan Hakları Sözleşmesi (OVIEDO) başta olmak üzere ulusal sağlık mevzuatımız değerlendirildiğinde araştırmaya katılacak kişilerden aydınlatılmış onam almak hukuki bir zorunluluktur (11). Hiçbir kişisel çıkar veya maddi teşvik olmaksızın, girişimsel ya da girişimsel olmayan yöntemler yoluyla elde edilen insan biyolojik materyalinin araştırmacılar, kamu ya da özel kurumlar tarafından toplanması, işlenmesi, kullanımları ve saklanmaları için özgür, aydınlatılmış ve amaca yönelik onam alınmalıdır.

Planlanan her bir yeni araştırma için katılımcılara tekrar aydınlatılmış onam almak üzere gidilmesi gerekmele beraber, bu durum sıklıkla hastalarda kafa karışıklığına yol açmakta, bunun yanı sıra, zaman alıcı, pahalı ve pratik olmayan bir yoldur. Katılımcılara tekrar başvurulması kişilerin özerkliklerine saygı açısından en uygun etik yaklaşım gibi görünmekle beraber, sıklıkla olanaksızdır. Bu nedenle önerilen “geniş onam” ya da “kademeli onam”dır (11).

Araştırma dünyası önemli değişikliklere gebe görünmektedir; bu değişiklikler arasında, yeni gelişmiş genetik ve genomik teknolojilerin geliştirilmesi, büyük miktarda genotipik ve fenotipik veri içeren veri tabanlarının çoğalması ve hem ulusal hem de uluslararası düzeyde birçok kurum arasında geniş çaplı veri paylaşımının gerçekleşmesi yer almaktadır. Bu değişiklikler, biyogüvenlik konusunda da, araştırma katılımcılarının en iyi nasıl korunacakları konusunda, yeni sorular sorulmasına yol açmaktadır. Bu sorulara cevaben, biyobankacılığın yasal, etik ve sosyal konularına yönelik en iyi uygulama örneklerinin geliştirilmesine gereksinim vardır. Biyobankacılığa ilişkin yeni etik kuralların yanı sıra, gizlilik ve insan hakları korumalarına ilişkin yeni düzenlemelere de gereksinim bulunmaktadır.

Bilim ve araştırma ortamındaki değişiklikler, büyük veri araştırmaları, ticari kullanım ve mülkiyet konuları için kullanılabilir en uygun onam modelleri hakkında tartışmalar devam etmektedir(12).

Biyobankalama ile ilgili etik, yasal ve sosyal konuları tartıştığı makalesinde Bledsoe, bireylerin biyolojik örneklerinde sahip oldukları hakların açıklığa kavuşturulmasının önemli olduğunu ifade ederek, bazı hasta ve hasta savunucularının biyolojik örneklerle ilgili haklarını dile getiren ve “biyohak” hareketi olarak da adlandırılan yakın tarihli bir hareketten söz etmektedir

(12). Biyohak bağlamında dile getirilen sorular, yukarıda tartıştığımız sorunlarla aynıdır; araştırma örneklerini sunan bireyler, bu örneklerin araştırmada nasıl kullanıldıklarını ve araştırma bulgularından elde edilen karlardan yararlanma konusunda ne tür haklara sahip olmalıdır? Bireyler biyolojik örneklerinin araştırmada nasıl kullanılacağı konusunda ne kadar kontrol sahibi olmalıdır? Böyle bir “biyohak” ile ilgili pratik düşünceler ve sınırlamalar nelerdir? Özerklik hakları, araştırmalarda insan örneklerinin kullanımından kaynaklanan toplumsal faydalarla en iyi nasıl dengelenmelidir?

Araştırma amaçlı sağlık veri tabanlarının ve biyobankaların oluşturulmasının, bağımsız etik kurullar tarafından onaylanması önemlidir. Buna ek olarak etik kurul verilerin ve biyolojik materyalin kullanılmasını da onaylamalı, verilerin ve materyalin toplanması sırasında verilmiş olan onamın planlanmış kullanım açısından yeterli olup olmadığını kontrol etmeli, bağışçıyı (veri sahibi) koruma açısından başka önlemlere de gerek olup olmadığını belirlemelidir. Etik kurul, bu alanda sürmekte olan etkinlikleri izleme hakkına da sahip olmalıdır. İnsanlardan elde edilen ve kime ait olduğu belirlenebilen materyal veya veriler üzerinde yapılan araştırmalar da dahil olmak üzere, gönüllülerin yer aldığı tıbbi araştırmalar için etik ilkeleri belirleyen Helsinki Bildirgesi'nin 23. Maddesi, etik kurulun sürdürülmekte olan çalışmalarını izleme hakkını ifade etmektedir. Toplumsal güvenin inşa edilmesi biyobanka araştırmalarına katılımın sağlanması açısından çok önemlidir. Bu nedenle güvenli veri koruma ortamı ve mekanizmalarının kurulmasının yanı sıra araştırmaya katılan gönüllülere hangi verilerinin, kim tarafından ne amaçla kullanıldığının açık, anlaşılır ve şeffaf bir şekilde anlatılması gerekmektedir, bunun denetimi de Etik Kurullara verilmiştir. Bağımsız etik kurulların, kişilerin özel hayatının gizliliğinin korunması ile, araştırmaların yürütülebilmesi için gerekli olan verilerin kullanımı arasında, bir denge kurulup kurulmadığını her araştırma özelinde, araştırmacının doğası ve şartlarına göre değerlendirmesi önemlidir.

### **Çıkar çatışması / finansal destek beyanı**

Bu yazıdaki hiçbir yazarın herhangi bir çıkar çatışması yoktur. Yazının herhangi bir finansal desteği yoktur.

### **Kaynaklar**

1. Nishardi Wijeratne and Solomon R Benatar, Ethical issues in laboratory medicine, J Clin Pathol 2010, 63: 97-98.
2. Büken N. Opinions about the future of Clinical Trial in Turkey, Journal of Clinical and Experimental Investigations, JCEI 2016; 7: 258-64.



3. Buken NO. Clinical trial ethics in Turkey in the context of some expectations and predictions. *Int J Clin Trials* 2016; 3: 180-186.
4. The Convention for the Protection of Human Rights and Dignity of the Human Being with regard to the Application of Biology and Medicine: Convention on Human Rights and Biomedicine (ETS No 164) was opened for signature on 4 April 1997 in Oviedo (Spain).
5. Uzeltürk, S. 1982 Anayasası ve İnsan Hakları Avrupa Sözleşmesine Göre Özel Hayatın Gizliliği Hakkı, İstanbul: Beta Yayıncılık, 2004.
6. 24/3/2016 tarih ve 6698 sayılı Kişisel Verilerin Korunması Kanunu; c2016 (cited 2016 April 25). Available from: <http://www.resmigazete.gov.tr/main.aspx?home=http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2016/04/20160407.htm&main=http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2016/04/20160407.htm>.
7. 20 Ekim 2016 Tarih ve 29863 Sayılı Kişisel Sağlık Verilerinin İşlenmesi ve Mahremiyetinin Sağlanması Hakkında Yönetmelik.
8. COUNCIL OF EUROPE COMMITTEE OF MINISTERS, Recommendation Rec (2006) 4 of the Committee of Ministers to member states on research on biological materials of human origin Adopted by the Committee of Ministers on 15 March 2006 at the 958th meeting of the Ministers' Deputies
9. World Medical Association. Helsinki Declaration. World Medical Association; c2017 (cited: 14.12.2017). Available from: <http://www.wma.net>.
10. HÜ Biyoetik Merkezi, Araştırma Biyobankacılığı Rehberi, 2016 (cited 2016 Feb). Available from: [http://www.hubam.hacettepe.edu.tr/ekler/pdf/biyobanka/arastirma\\_biyobanka\\_rehber.pdf](http://www.hubam.hacettepe.edu.tr/ekler/pdf/biyobanka/arastirma_biyobanka_rehber.pdf)
11. Ünsal Ç.Z., Büken N.Ö. 'Biyotıp araştırmaları ile ilgili olarak, "kişisel verilerin korunması kanunu" ve "kişisel sağlık verilerinin işlenmesi ve mahremiyetinin sağlanması hakkında yönetmelik" ne diyor?. *Türkiye Klinikleri* 2018; 82-90.
12. Bledsoe Marianna J. Ethical legal and social issues of biobanking: past, present, and future" *Biopreservation and Biobanking* 2017; 5:2

## ■ Review

## Bee venom: A medical perspective

### Arı zehri: Tıbbi bakış

Ali Korhan SIG\*<sup>1</sup> , Mustafa GUNEY<sup>2</sup> , Ozlem OZ SIG<sup>3</sup> , Huseyin SAN<sup>4</sup> 

<sup>1</sup>Hacettepe University, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara/TURKEY

<sup>2</sup> University of Health Sciences, Gulhane Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara/TURKEY

<sup>3</sup>Balikesir Ataturk City Hospital, Department of Pediatrics, Balikesir/TURKEY

<sup>4</sup>Karabuk Training and Research Hospital, Department of Nuclear Medicine, Karabuk/TURKEY

#### Abstract

Apitherapy is a complementary medical technique that has an old history and is applied in various diseases worldwide. Apitherapeutic applications are not treatment methods by themselves, but they can be substantial parts of multidisciplinary approaches. One of them, bee venom therapy (BVT), is a currently-applied method worldwide. Bee venom (BV) includes several substances such as peptides, phospholipids, bioactive amines, amino acids, sugars, pheromones, enzymes and minerals. Studies on whole BV and its singular components indicated that they have a huge potential in anti-inflammatory, anti-arthritis, anti-nociceptive, neuroprotective, anti-tumoral, anti-microbial, anti-diabetic and anti-rheumatic activities. Results of in vivo studies against arthritis, Parkinson's and Alzheimer's disease and cancer are very promising, and also in vitro results indicating other activities such as antimicrobial effect are observed. Although mechanisms of action and many bioactive substances still remain unclear, beneficial effects and potential utilities in certain medical conditions are obvious. It seems bioactive components of BV may open new doors in treatment of various diseases.

**Keywords:** apitherapy; apitoxin; bee venom therapy; bee venom acupuncture

#### Öz

Apiterapi, dünya çapında çok sayıda hastalığın tedavisinde kullanılan ve kökeni çok eski tıbbi kayıtlara dayanan bir tamamlayıcı tıp uygulamasıdır. Apiterapötik teknikler kendi başlarına tedavi yöntemleri değil, aslında, çok disiplinli tıbbi yaklaşımın parçasıdır. Bu yöntemlerden biri, arı zehri tedavisi, dünyada şu anda uygulanan bir tekniktir. Arı zehri, peptitler, fosfolipitler, biyoaktif aminler, amino asitler, şekerler, feromonlar, enzimler ve mineraller gibi çok sayıda madde içermektedir. Arı zehrinin tümü ve içerdiği materyallere ayrı ayrı yapılan çalışmalarda, bunların, antiinflamatuvar, antiartrit, antinosiseptif, nöroprotektif, antitümöral, antimikrobiyal, antidiyabetik ve antiromatizmal etki potansiyeli açıkça gösterilmiştir. Artrit, Parkinson ve Alzheimer hastalığı ile kansere yönelik in vivo çalışmalar ile antimikrobiyal etkinlik gibi in vitro çalışmalarda son derece umut verici sonuçlar gözlenmiştir. Her ne kadar etki mekanizması ve birçok biyoaktif içeriği henüz aydınlatılmamış olsa da, belirli tıbbi durumlarda etkinliği açıkça görülmüştür. Arı zehrinin biyoaktif komponentlerinin diğer başka hastalıklar için de yeni kapılar açacağı düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** apiterapi; apitoksin; arı zehri tedavisi; arı zehri akupunkturu

Corresponding Author\*: Ali Korhan SIG, Hacettepe University, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara/TURKEY

E-mail: dr\_korhan@hotmail.com

ORCID: 0000-0003-2907-257X

Received: 07.08.2018 accepted: 20.10.2018

Doi: 10.18663/tjcl.451586



## Introduction

Bee products have a wide space among complementary medicinal methods. The use of bee products in medicine, called apitherapy, includes bee venom (BV) (apitoxin), royal jelly, honey, pollen, propolis and beeswax, and each of them has recently become topics of studies worldwide [1]. Apitherapy usage has an very old history and even from the times of Hippocrates there are records of different usages. Ancient Roman and Middle-age physicians were frequently applied BV, but scientific reports mainly depend studies at the late 1800s. In 20th century, researchers were interested in potential medical components in BV. Today, bee venom therapy (BVT) itself and some components of BV are in medical use worldwide [2,3]. BVT, bee sting therapy or acupuncture is a complementary and integrative medicinal technique by application BV via bee sting to the particular points of the patient's body. Recently, this method is widely used in treatment of arthritis, some rheumatoid and chronic inflammatory diseases. Numerous studies were published about its modes of actions and various substances were identified in BV, but the actual chain of action is still unclear[4,5].

To date, over than 20 bioactive substances were isolated and identified in BV, which are acting as anti-inflammatory, anti-arthritis, anti-nociceptive, neuroprotective, anti-tumoral, antimicrobial, anti-diabetic and anti-rheumatic [3-8]. Some of these substances are peptides (melittin, apamin, adolapin, mast cell degranulating peptide-MCD), phospholipids, bioactive amines (histamine, dopamine, norepinephrine), amino acids (gamma-aminobutyric acid), sugars (glucose, fructose), pheromones, enzymes (phospholipase A2 and B, acid amino-esterase, hyaluronidase, phosphatase, glucosidase, lysophospholipase) and minerals (phosphor, calcium, magnesium) [2,3,7,9-12].

Regarding these substances and detected modes of actions, with further studies, more indications and application areas may come forward. In this article, it is aimed to consolidate the information about BV and BVT, provide an overall vision and to take a broad look to modes of actions.

## Major Bioactive Substances

In overall, the studies about BV mainly focus on a few substances. These molecules seem to be the actual bioactive components, but it should be noted that researches are just in preliminary phase and there is a huge lack of in vivo studies. Major bioactive substances in BV and their potential effects were summarized in Table 1.

**Table 1:** Major bioactive substances in BV and their potential effects

Substance	Effect	Reference
Melittin	Anti-inflammatory, anti-arthritis, anti-tumor, antimicrobial activity	1,9,10,13-32
Apamin	Anti-neurodegenerative, anti-inflammatory, anti-tumor,	1,13,33-35
Phospholipase A2	Anti-tumor, neuroprotective effect (dopaminergic cells), immunomodulatory	1,13,36-38
Adolapine	Anti-inflammatory, anti-rheumatic, antipyretic, analgesic, anti-coagulant	1
MCD	Histaminergic or Anti-histaminergic <sup>a</sup>	1,13
Secapin	Antimicrobial activity	1,13
Tertiapin	Parasympathomimetic	1,13
Cardiopep	Antiarrhythmic	1,13
Lasiocepsin, macropin, melectin, bombolitin, halictine 1, panurgines, mastoparans, codesanes	Antimicrobial activity	39,40
Minimine, procamine, dopamine, noradrenaline, histamine, pamine, hyaluronidase	Insufficient data	1,13,14

<sup>a</sup>The activity varies dose-dependently

Melittin is a short, cationic, hemolytic protein consisting of 26 linear amino acid sequence. It forms the main part of the venom consisting of both hydrophobic and hydrophilic components, thus it provides a protein-lipid association for cell membrane penetration by opening channels that results voltage-dependent changes and membrane destruction. This peptide also suppresses cyclooxygenase (COX) activity, proinflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 and release of free radicals. It is believed that by this way, melittin has a major role in anti-inflammatory and anti-arthritis actions [1,9,10,13,14].

Melittin seems to have a promising anti-tumoral effect. A recently published review article investigated anti-cancer activities of BV by focusing on melittin and it was very obvious that for several types of cancers, melittin and its derivations particularly show anti-tumoral actions via multiple pathways [14]. In vitro studies with cell culture indicated such a "selective action" that the peptide particularly chooses cells which have an active ras oncogene and are expressing oncoproteins. As previously stated, melittin destruct the



cancer cells by membrane disruption, but it also shows effects against transformation [10]. Interestingly, melittin found to be showing a cell-cycle stopper effect in hepatoma and glioma cells [15,16]. Apoptosis induction was also observed in hepatocarcinoma, osteosarcoma and leukemia cells [10]. Cell death was provided via induction of caspase and Bax, inhibitor of JAK-STAT and Bcl-2. Furthermore, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), an enzyme which is crucial for malign invasion, was successfully inhibited by melittin [17-19]. Similarly, Wang et al [20] reported that melittin significantly inhibited invasion of human breast adenocarcinoma line (MCF-7) cells. In a recent study, Lee et al [21] reported a significant reduce with melittin treatment in tumor-associated macrophages, which are strongly related tumor growth. They also stated particular decrease in angiogenesis. Results of other studies supported this information. Xiang et al [22] claiming that dwindling expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$  may be an explanation about reduced tumor growth. In another study, Zhang et al [23] reported that melittin inhibited complex pathways of invasion and angiogenesis. Wang et al [24] created a hybrid peptide with melittin and VEGF, and they studied this peptide on hepatocellular carcinoma both in vitro and in vivo. Combination treatments of melittin with current agents are also showed very promising results. Wang et al [25] reported enhanced inhibition on growth of pancreatic ductal carcinoma when melittin was applied with gemcitabine. Similarly, Jin et al [26] studied melittin containing hydrogel in combination with cancer photothermal therapy for glioblastoma treatment, and the results showed enhanced success of treatment regarding to tumor size, since they observed a significant inhibition on tumor growth. Actually it seems inhibitory effect on growth, angiogenesis and metastasis of various tumors indicates that melittin might be used as a chemotherapeutic agent.

Antimicrobial activity of melittin is another topic. Even as singular or a hybrid peptide, it was studied against *Leishmania* spp. and *Trypanosoma* spp., and researchers found direct antimicrobial and indirect immunomodulatory results [27-30]. Another promising result was found about HIV. Dose-dependently, melittin was found to prevent synthesis of group-specific antigen (gag)/DNA polymerase (pol) and intracellularly reduce Gag antigen and HIV-1 mRNA levels. In addition, it has a direct inhibitory effect on the "HIV long terminal repeat". In overall, it is believed that this peptide may be an agent to inhibit viral expression of HIV [9,31,32].

One other major substance is Apamin, which is the smallest neurotoxin in venom. It has a specific inhibitory act on Ca<sup>2+</sup> dependent K<sup>+</sup> channels, resulting hyperpolarization in red muscle that causes hyperexcitability in neurons. Interestingly, this toxin was showed to have protective effect on dopaminergic neurons and in animal models with Parkinson's disease, partial anti-neurodegeneration was observed [1,13]. Studies also indicated that apamin caused improvement on cognitive functions in animal models as a potential agent against Alzheimer's disease [1,33]. Furthermore, this toxin also promising for anti-tumoral effect [34,35]. Apamin also have become a target molecule for immunopathologic studies. Kim et al [34] reported that apamin suppressed proinflammatory and Th-2 related inflammatory pathways and this makes the molecule as a candidate in treatment of atopic dermatitis. Interestingly, Kim et al [35] studied apamin for possible effects in biliary fibrosis, and they stated that it suppressed activated hepatic cells, which are major reason of arised collagen deposition causing biliary fibrosis. They also noted that apamin decreased the proinflammatory cytokine levels in hepatic tissue. It seems there is an uncharted map of ocean to explore about apamin, that it does not just affect as channel blocker, but it may have many immunologic activities.

Phospholipase A2 is the most allergic substance in BV and as known, this enzyme is actually works in inflammatory processes. The enzyme has cytotoxic ability and so it is claimed that it is one of the anti-tumoral substances in BV [1,13]. Phospholipase A2 also found to be protective for dopaminergic cells in Parkinson's disease and show alleviating effect on neuropathic pain [13,36]. In an interesting study, Bae et al [37] found that phospholipase A2 immunologically protected the fetus from abortion in mice models by regulating Treg cells. Similarly, Jung et al [38] found interactions of phospholipase A2 with Treg in treatment of atopic dermatitis. The substance seems to carry huge potential as a therapeutic against various diseases.

Adolapine, MCD, phospholipase B, secapin, tertiapin, cardiopep, minimine, procamine, dopamine, noradrenaline, histamine, pamine and hyaluronidase are other main substances in BV [1,13,14]. Adolapine inhibits COX and lipooxygenase activity resulting anti-inflammatory, anti-rheumatic, antipyretic, analgesic and anti-coagulant [1]. MCD is a 22 amino-acid long peptide associated with allergies. It has opposed actions dose-dependently, that it induces histamine release in low doses and inhibits in high doses. There are very few data about the other components, but secapin is thought



to be an antimicrobial, tertiapin seems to be a potential parasympathomimetic and cardiopep may have antiarrhythmic function [1,13]. Furthermore, some of these substances are claimed to have radioprotective effect. There are more bioactive molecules isolated from different bee species such as lasioepsin, macropin, melectin, bombolitin, halictine 1, panurgines, mastoparans and codesanes. These substances actually show antimicrobial activity with different potencies [39,40]. Finally, hyaluronidase is the enzyme that facilitates the spread of BV to the tissues. It destructs local connective tissue and arises vascular permeability [1].

### Potential Effects

BV have the potential of containing various molecules that may provide different effects. These substances may have not only one action, but affect on multiple chain reactions resulting various outcomes. In overall, these actions are; anti-inflammatory, anti-arthritis, anti-nociceptive, neuroprotective, anti-tumoral, anti-microbial and anti-rheumatic. Furthermore, a few studies indicated that BV has a potential of having anti-diabetic effect.

Anti-inflammatory, anti-arthritic and anti-rheumatoid effects mainly depends on the same mechanisms. As previously stated, some substances such as melittin act through the suppression of inflammatory processes. Inhibition of COX, suppression on release of proinflammatory cytokines and nitric oxide(NO) seems to be the major routes. Lee et al. [41] compared the control group with the BVT group in mice with type 2 collagen arthritis, and they found a significant difference on TNF- $\alpha$  levels (decreased in bee-venom group) which is supported by histopathological and symptomatic changes. However, they reported that there was no alteration on IL-1 $\beta$  levels. BV stimulates Bcl-2 and caspase-3 expression in synovial cells which limits cell-level effects of rheumatoid arthritis such as synovial proliferation and hyperplasia by directing the cells to apoptosis [5,42]. Furthermore, as perviously stated, adolapin shows particular inhibition on inflammatory enzymes and MCD provides mast cell lysis dose-dependently, but low-dose MCD and the phospholipase A2 in venom make the evaluation controversial. The venom itself includes many allergic substances that provoke inflammation immediately, so the actual modes of action in suppression of autoinflammatory reactions are still blurry and need further studies.

Cytotoxic activity of venom substances were previously mentioned. Studies indicate that possible anti-tumoral actions do not only depend on this activity, but molecular

interactions may occur that strongly inhibit oncogenic biochemical reactions. Potential activity of melittin on oncoagens and oncogenic proteins were mentioned before, which was a result of complex interactions [7,14]. However, it seems this "supression of oncogeny" is far more complex. BV substances somehow affect on cell-level messengers, causing directly apoptosis and cell-cycle arrest [2,7]. In addition, some substances somehow particularly reduce expression of angiogenesis factors and supresses tumor growth [21,22]. A recent study of Sin et al [43] indicated that BV may have strong relations with immune response cells as a cancer chemotherapeutic. Although mellitin is under focus of these studies, BV has the potential of more substances or venom as a whole may have this kind of act more promisingly.

BVT shows a potent anti-nociceptive effect. It is known and used for a long time, but studies focusing on this topic have recently been published [4]. Kwon et al [44] reported that acupuncture to particular points provided a reducing activity on edema and an anti-nociceptive effect on rats that had experimental arthritis. In another study, Kwon et al [45] observed that water-soluble components of BV(>10kDa) directly reduced visceral pain. Interestingly, following the injection, major inflammation signs immediately occurred, but in time, it reduced pain by stimulating axonal reflexes. In addition, venom stimulated descending adrenergic system and Fos expression in catecholaminergic neurons. Reserchers stated that this may provoke descending noradrenergic system that may result a anti-nociceptive effect [45]. In another study of Baek et al [46], researchers applied venom to two groups of rats with collagen-induced arthritis, and additionally, yohimbine ( $\alpha$ 2 receptor blocker) and naloxone (opioid receptor blocker) to each one group. They reported that they observed anti-nociceptive effect in only naloxone group, so they claimed this may be proof of venom to show its anti-nociceptive effect via  $\alpha$ 2 receptors. Similarly, in a recent study, Huh et al [47] notified possible analgesic mechanisms on BVT via  $\delta$ -opioid and  $\alpha$ 2-adrenergic receptors. On the other hand, in the study of Kim et al [48], researchers applied opioid and 5-HT3 receptor antagonists following BVT and morphine application to mice with experimental oxaliplatin-induced neuropathic pain. Interestingly, they found a strong "anti-BV effect" due to serotonergic receptor blockage and they commented that serotonergic system may play more important role in treatments with BVT. Similar results were previously stated by Lee et al [49]. Of course, these mechanisms may not be

the only explanation, since anti-inflammatory and analgesic effects should also be noted.

Neuroprotective activities of BV are also under focus of researchers. Neuroprotective effects of BV and its components against Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease and amyotrophic lateral sclerosis were reported [50]. Parkinson's disease and multiple sclerosis are by far the most studied diseases with BV and promising results were observed. In their study on rats with experimental Parkinson's disease, Doo et al [51] reported protective effect of BV on dopaminergic neurons. Although the substance apamin is mainly focused about this neuroprotective effect, Alvarez-Fisher et al [11] stated that there was a relative difference on "neuroprotection" between whole BV (higher) and just apamin itself, that venom may contain many other bioactive molecules working in the same way. Recently, Khalil et al [149] studied on mice with experimental Parkinson's disease and compared L-Dopa and BV. They stated a significant decrease on expression of apoptotic proteins such as Bax and caspase-3 in dopaminergic neurons in venom group. They claimed that BV suppressed neuroinflammation and was obviously neuroprotective, comparing to L-dopa. Chung et al [52] focused on potential immunoregulatory effect of venom on mice with experimental Parkinson's disease. Following venom application, they confirmed neuroprotective activity in substantia nigra, microglial deactivation and reduced CD4+ T-cell infiltration, arising immigration of immunoregulatory CD4+CD25+Foxp3+Treg cells. However, they could not observe the same neuroprotective effect after blocking the Treg cells. It seems this effect does not only depend on suppression of inflammation by direct biochemical mechanisms, but complex immunomodulatory activities are also current. Han et al [54] reported inhibition on production of NO and TNF- $\alpha$  in lipopolysaccharide-induced microglia cells. Interestingly, Daghestani et al [55] studied on propionic acid-induced neurobehavioral status and effects of BV. They reported that venom strongly contributes to the propionic acid treatment in a positive way. This result actually indicates possible interactions of venom with neurotransmitter systems and transcriptions in neurons. Although these researches strongly support potential benefits of BVT, there is a huge gap on human studies. Wesselius et al [56] stated that BVT did not provide any improvement on neither pathological status nor life quality of patients. It is clear that there is a promising vision for especially neurodegenerative and autoinflammatory

diseases, but correlation between in vitro studies and animal models to clinical outcome is controversial.

Antimicrobial activity of BV is another issue of studies. Activity of melittin on HIV and *Leishmania* were previously stated. Similarly, Fennel et al [57] had already reported antibacterial activity of melittin on gram negative and positive bacteria. Many studies were confirmed this antibacterial action by testing BV against frequently-isolated bacterial pathogens [1]. Furthermore, Kawakami et al [33] identified two peptides (Xac-1 and Xac-2) from venom of Japanese carpenter bee, showing hemolytic and antimicrobial activity. Strong antimicrobial effects were observed against *E.coli*, *S.aureus*, *M.luteus* and *S.cerevisiae*. Interestingly, Yu et al [58] studied cecropin-melittin hybrid proteins and found strong antimicrobial effect against *E.coli*, *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae*, *B.subtilis*, *B.thuringiensis* and *S.derby*. These results indicate that there is still a huge potential of novel antimicrobial peptides, and this potential might arise, even with synthetically derived ones.

There are a few studies claiming anti-diabetic effects of BV. It is believed that this potential mainly depends on two substances; melittin and phospholipase A2 [59]. But, studies about specific molecules are very limited. In a recent in vitro study, Behroozi et al [6] compared two groups of solutions including hemoglobin and glucose with and without venom. They found a significant decrease on hemoglobin glycation in the venom group, so they claimed that BV might be a light to prevent long-term complications of diabetes. Potential beneficial effects of venom on wound healing also arouse curiosity. A recent study on diabetic mice indicated accelerated wound healing via decreasing oxidative stress and affecting on transcription factors [60]. Finally, BV is also a candidate as an anticoagulant agent, affecting on several coagulation factors dose dependently [61].

## Conclusion

BV contains various bioactive substances. Only a few of these have become topic of studies. On the other hand, external factor such as climate and bee species may cause variations on components itself or amount rates of them. Even the venom from the same species may show alterations in amounts of substances, seasonally [62-64].

Although BV clearly have many utilities in clinical medicine, adverse effects may be observed. There are reports of hemolysis, liver injury, immune thrombocytopenia [13,65]. Melittin, hyaluronidase and phospholipase A2 are serious allergens in BV [13]. This condition forced researchers to derive



novel substances. For example, Wu et al [66] derived a peptide from melittin and they have stated that it showed stronger anti-hepatoma activity and also enhanced resistance to proteases. But, it is really hard to make scientific interpretations due to serious limitation of studies, especially in vivo and human research.

In conclusion, BV is a valuable traditional agent with strong biochemical and immunological actions. Although mechanisms of action and bioactive substances still remain unclear, beneficial effects and potential utilities in certain medical conditions are obvious. Indications, possible complications, application frequency and dosage should be carefully evaluated according to the patient and physician's opinion. It should be noted that apitherapeutical applications are not treatment methods by themselves, but they can be substantial parts of multidisciplinary approaches.

### Declaration of conflict of interest

The authors received no financial support for the research and/or authorship of this article. There is no conflict of interest.

### References

1. Shimpi R, Chaudhari P, Deshmukh R, Devare S, Bagad Y, Bhurat MA. A review: pharmacotherapeutics of bee venom. *World J Pharm Pharm Sci* 2016; 5: 656-67.
2. Kim CMH. Apitherapy – Bee Venom Therapy. In: Grassberger M, Sherman RA, Gileva OS, Kim CMH, Mumcuoglu KY (eds). *Biotherapy-history, principles and practice: A practical guide to the diagnosis and treatment of disease using living organisms*. Springer Science & Business Media, Amsterdam 2013; 77-112.
3. Lee JD, Park HJ, Chae Y, Lim S. An overview of bee venom acupuncture in the treatment of arthritis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2005; 2:79-84.
4. Lee MS, Pittler MH, Shin BC, Kong JC, Ernst E. Bee venom acupuncture for musculoskeletal pain: a review. *J Pain* 2008; 9:289-97.
5. Son DJ, Lee JW, Lee YH, Song HS, Lee CK, Hong JT. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacol Ther* 2007; 115: 246-70.
6. Behroozi J, Divsalar A, Saboury AA. Honey bee venom decreases the complications of diabetes by preventing hemoglobin glycation. *J Mol Liq* 2014; 199: 371-75.
7. Oršolić N. Bee venom in cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev* 2012; 31: 173-94.
8. Chang YH, Bliven ML. Anti-arthritic effect of bee venom. *Agents Actions* 1979; 9: 205-11.
9. Raghuraman H, Chattopadhyay A. Melittin: a membrane-active peptide with diverse functions. *Biosci Rep* 2007; 27: 189-223.
10. Gajski G, Garaj-Vrhovac V. Melittin: a lytic peptide with anticancer properties. *Environ Toxicol Pharmacol* 2013; 36: 697-705.
11. Alvarez-Fischer D, Noelker C, Vulinović F, et al. Bee venom and its component apamin as neuroprotective agents in a Parkinson disease mouse model. *PLoS One* 2013; 8: 61700.
12. Yang EJ, Kim SH, Yang SC, Lee SM, Choi SM. Melittin restores proteasome function in an animal model of ALS. *J Neuroinflammation* 2011; 8: 69.
13. Cornara L, Biagi M, Xiao J, Burlando B. Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products. *Front Pharmacol* 2017; 8: 412.
14. Rady I, Siddiqui IA, Rady M, Mukhtar H. Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy. *Cancer Lett* 2017; DOI:10.1016/j.canlet.2017.05.010.
15. Hu H, Chen D, Li Y, Zhang X. Effect of polypeptides in bee venom on growth inhibition and apoptosis induction of the human hepatoma cell line SMMC-7721 in-vitro and Balb/c nude mice in-vivo. *J Pharm Pharmacol* 2006; 58: 83-89.
16. Yang ZL, Ke YQ, Xu RX, Peng P. Melittin inhibits proliferation and induces apoptosis of malignant human glioma cells. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2007; 27: 1775-77.
17. Park JH, Jeong YJ, Park KK, et al. Melittin suppresses PMA-induced tumor cell invasion by inhibiting NF- $\kappa$ B and AP-1-dependent MMP-9 expression. *Mol Cell* 2010; 29: 209-15.
18. Park MH, Choi MS, Kwak DH, et al. Anti-cancer effect of bee venom in prostate cancer cells through activation of caspase pathway via inactivation of NF- $\kappa$ B. *Prostate* 2011; 71: 801-12.
19. Jo M, Park MH, Kollipara PS, et al. Anti-cancer effect of bee venom toxin and melittin in ovarian cancer cells through induction of death receptors and inhibition of JAK2/STAT3 pathway. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012; 258: 72-81.
20. Wang J, Li F, Tan J, et al. Melittin inhibits the invasion of MCF-7 cells by downregulating CD147 and MMP-9 expression. *Oncol Lett* 2017; 13: 599-604.
21. Lee C, Choi D, Lee S, Sung-joo SB, Joo H, Bae H. Melittin suppresses tumor progression by regulating tumor-associated macrophages in a Lewis lung carcinoma mouse model. *J Immunol* 2017; DOI: 10.18632/oncotarget.18627
22. Zhang SF, Chen Z. Melittin exerts an antitumor effect on non-small cell lung cancer cells. *Mol Med Rep* 2017; 16: 3581-86.



23. Zhang Z, Zhang H, Peng T, Li D, Xu J. Melittin suppresses cathepsin S-induced invasion and angiogenesis via blocking of the VEGF-A/VEGFR-2/MEK1/ERK1/2 pathway in human hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett* 2016; 11: 610-18.
24. Wang D, Hu L, Su M, Wang J, Xu T. Preparation and functional characterization of human vascular endothelial growth factor-melittin fusion protein with analysis of the antitumor activity in vitro and in vivo. *Int J Oncol* 2015; 47: 1160-68.
25. Wang X, Xie J, Lu X, et al. Melittin inhibits tumor growth and decreases resistance to gemcitabine by downregulating cholesterol pathway gene CLU in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Lett* 2017; 399: 1-9.
26. Jin H, Zhao G, Hu J, et al. Melittin-Containing Hybrid Peptide Hydrogels for Enhanced Photothermal Therapy of Glioblastoma. *ACS Appl Mater Interfaces* 2017; DOI: 10.1021/acsami.7b06431
27. Sardar AH, Das P, Das P. Development of antimicrobial peptide based anti-leishmanial agents: current understandings and future perspective. In: Méndez-Vilas A (ed). *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*. Formatex Research Center, Badajoz 2015; 137-43.
28. Hurwitz I, Forshaw A, Yacisin K, Ramalho-Ortigao M, Satoskar A, Durvasula R. Paratransgenic Control of Leishmaniasis: New Developments. In: Satoskar A, Durvasula R (eds). *Pathogenesis of Leishmaniasis*. Springer Science & Business Media, New York 2014; 25-43.
29. Pereira AV, de Barros G, Pinto EG, et al. Melittin induces in vitro death of *Leishmania infantum* by triggering the cellular innate immune response. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 2016; 22: 1.
30. Adade CM, Oliveira IR, Pais JA, Souto-Padrón T. Melittin peptide kills *Trypanosoma cruzi* parasites by inducing different cell death pathways. *Toxicon* 2013; 69: 227-39.
31. Wachinger M, Kleinschmidt A, Winder D, von Pechmann N, Ludvigsen A, Neumann M. Antimicrobial peptides melittin and cecropin inhibit replication of human immunodeficiency virus 1 by suppressing viral gene expression. *J Gen Virol* 1998; 79: 731-40.
32. Hood JL, Jallouk AP, Campbell N, Ratner L, Wickline SA. Cytolytic nanoparticles attenuate HIV-1 infectivity. *Antivir Ther* 2013; 18: 95-103.
33. Kawakami H, Goto SG, Murata K, et al. Isolation of biologically active peptides from the venom of Japanese carpenter bee, *Xylocopa appendiculata*. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 2017; 23: 29.
34. Kim WH, An HJ, Kim JY, et al. Apamin inhibits TNF- $\alpha$ - and IFN- $\gamma$ -induced inflammatory cytokines and chemokines via suppressions of NF- $\kappa$ B signaling pathway and STAT in human keratinocytes. *Pharmacol Rep* 2017; DOI:10.1016/j.pharep.2017.04.006
35. Kim JY, An HJ, Kim WH, Park YY, Park KD, Park KK. Apamin suppresses biliary fibrosis and activation of hepatic stellate cells. *Int J Mol Med* 2017; 39: 1188-94.
36. Lee G, Bae H. Bee venom phospholipase A2: Yesterday's enemy becomes today's friend. *Toxins* 2016; 8: 48.
37. Bae H, Baek H, Shin D, Hwang DS. Bee venom phospholipase A2 (bvPLA2) protects against LPS-induced abortion. *J Immunol* 2017; 198: 220.7 (abstract)
38. Jung KH, Baek H, Kang M, Kim N, Lee SY, Bae H. Bee Venom Phospholipase A2 Ameliorates House Dust Mite Extract Induced Atopic Dermatitis Like Skin Lesions in Mice. *Toxins* 2017; 9: 68.
39. Fratini F, Cilia G, Turchi B, Felicioli A. Insects, arachnids and centipedes venom: a powerful weapon against bacteria. A literature review. *Toxicon* 2017; DOI:10.1016/j.toxicon.2017.02.020.
40. Perumal SR, Stiles BG, Franco OL, Sethi G, Lim LH. Animal Venoms as a Source of Natural Antimicrobials: An overview. *Biochem Pharmacol* 2017; 134: 127-38.
41. Lee JD, Kim SY, Kim TW et al. Anti-inflammatory effect of bee venom on type II collagen-induced arthritis. *Am J Chin Med* 2004; 32: 361-67.
42. Park HJ, Lee SH, Son DJ et al. Antiarthritic effect of bee venom: Inhibition of inflammation mediator generation by suppression of NF- $\kappa$ B through interaction with the p50 subunit. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 3504-15.
43. Sin DC, Kang MS, Song HS. Synergistic Effects of Bee Venom and Natural Killer Cells on B16F10 Melanoma Cell Growth Inhibition through IL-4-mediated Apoptosis. *Acupunct* 2017; 34: 1-9.
44. Kwon YB, Lee JD, Lee HJ, et al. Bee venom injection into an acupuncture point reduces arthritis associated edema and nociceptive responses. *Pain* 2001; 90: 271-80.
45. Kwon YB, Ham TW, Kim HW, et al. Water soluble fraction (< 10 kDa) from bee venom reduces visceral pain behavior through spinal  $\alpha$  2-adrenergic activity in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2005; 80:181-87.
46. Baek YH, Huh JE, Lee JD, Park DS. Antinociceptive effect and the mechanism of bee venom acupuncture (Apipuncture) on inflammatory pain in the rat model of collagen-induced arthritis: Mediation by  $\alpha$  2-adrenoceptors. *Brain Res* 2006; 1073: 305-10.
47. Huh JE, Seo BK, Lee JW, et al. Analgesic Effects of Diluted Bee Venom Acupuncture Mediated by  $\delta$ -Opioid and  $\alpha$ 2-Adrenergic Receptors in Osteoarthritic Rats. *Altern Ther Health Med* 2017; 23: 5473.
48. Kim W, Kim MJ, Go D, Min BI, Na HS, Kim SK. Combined effects of bee venom acupuncture and morphine on oxaliplatin-induced neuropathic pain in mice. *Toxins* 2016; 8: 33



49. Lee JH, Li DX, Yoon H, et al. Serotonergic mechanism of the relieving effect of bee venom acupuncture on oxaliplatin-induced neuropathic cold allodynia in rats. *BMC Complement Altern Med* 2014; 14: 471.
50. Han SM, Kim JM, Park KK, Chang YC, Pak SC. Neuroprotective effects of melittin on hydrogen peroxide-induced apoptotic cell death in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *BMC Complement Altern Med* 2014; 14: 286.
51. Doo AR, Kim ST, Kim SN, et al. Neuroprotective effects of bee venom pharmaceutical acupuncture in acute 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced mouse model of Parkinson's disease. *Neurol Res* 2010; 32: 88-91.
52. Khalil WK, Assaf N, ElShebiney SA, Salem NA. Neuroprotective effects of bee venom acupuncture therapy against rotenone-induced oxidative stress and apoptosis. *Neurochem Int* 2015; 80: 79-86.
53. Chung ES, Kim H, Lee G, Park S, Kim H, Bae H. Neuro-protective effects of bee venom by suppression of neuroinflammatory responses in a mouse model of Parkinson's disease: role of regulatory T cells. *Brain Behav Immun* 2012; 26: 1322-30.
54. Han S, Lee K, Yeo J, et al. Effect of honey bee venom on microglial cells nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  production stimulated by LPS. *J Ethnopharmacol* 2007; 111: 176-81.
55. Daghestani MH, Selim ME, Abd-Elhakim YM, et al. The role of apitoxin in alleviating propionic acid-induced neurobehavioral impairments in rat pups: The expression pattern of Reelin gene. *Biomed Pharmacother* 2017; 93: 48-56.
56. Wesselius T, Heersema DJ, Mostert JP, et al. A randomized crossover study of bee sting therapy for multiple sclerosis. *Neurology* 2005; 65: 1764-68.
57. Fennell JF, Shipman WH, Cole LJ. Antibacterial action of melittin, a polypeptide from bee venom. *Proc Soc Exp Biol Med* 1968; 127: 707-10.
58. Cao Y, Yu RQ, Liu Y, et al. Design, recombinant expression, and antibacterial activity of the cecropins-melittin hybrid antimicrobial peptides. *Curr Microbiol* 2010; 61: 169-75.
59. Hossen MS, Gan SH, Khalil MI. Melittin, a Potential Natural Toxin of Crude Bee Venom: Probable Future Arsenal in the Treatment of Diabetes Mellitus. *J Chem* 2017; DOI: doi.org/10.1155/2017/4035626
60. Garraud O, Hozzein WN, Badr G. Wound healing: time to look for intelligent, 'natural' immunological approaches? *BMC Immunol* 2017; 18: 23.
61. Lee J, Park J, Yeom J, Han EH, Lim YH. Inhibitory effect of bee venom on blood coagulation via anti-serine protease activity. *J Asia Pac Entomol* 2017; 20: 599-604.
62. Gaudie J, Hanson JM, Shipolini RA, Vernon CA. The structures of some peptides from bee venom. *FEBS J* 1978; 83: 405-10.
63. Junior RSF, Sciani JM, Marques-Porto R, et al. Africanized honey bee (*Apis mellifera*) venom profiling: Seasonal variation of melittin and phospholipase A2 levels. *Toxicon* 2010; 56: 355-62.
64. Owen MD, Sloley BD. 5-Hydroxytryptamine in the venom of the honey bee (*Apis mellifera* L.): variation with season and with insect age. *Toxicon* 1988; 26: 577-81.
65. Abdulsalam MA, Ebrahim BE, Abdulsalam AJ. Immune thrombocytopenia after bee venom therapy: a case report. *BMC Complement Altern Med* 2016; 16: 107.
66. Wu Y, Han MF, Liu C, et al. Design, synthesis, and antiproliferative activities of stapled melittin peptides. *RSC Adv* 2017; 7: 17514-18.

To cite this article: Karahan İ, Alp Ç, Çifci A, Karadeniz M. Diyabetik hastalarda ayak problemlerinin yönetimi ve vasküler patolojilere yaklaşım. Turk J Clin Lab 2019; 10: 422-425.

## Derleme

# Diyabetik hastalarda ayak problemlerinin yönetimi ve vasküler patolojilere yaklaşım

## *Management of foot problems in diabetic patients and approach to vascular pathologies*

İrfan KARAHAN<sup>1</sup> , Çağlar ALP<sup>2</sup> , Aydın ÇİFCİ<sup>3</sup> , Muhammed KARADENİZ<sup>\*4</sup> 

<sup>1</sup>Yenimahalle Eğitim Araştırma Hastanesi İç Hastalıkları Kliniği, Ankara, Türkiye

<sup>2</sup>Hitit Üniversitesi Çorum Eğitim Araştırma Hastanesi Kardiyoloji Kliniği, Çorum, Türkiye

<sup>3</sup>Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Kırıkkale, Türkiye

<sup>4</sup>Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale, Türkiye

### Öz

Diyabet prevalansı tüm dünyada giderek artmakta ve büyük bir halk sağlığı problemine dönüşmektedir. Diyabetin komplikasyonları hastalığın kendisinden daha büyük problemlere neden olmaktadır. Bir diyabetli hastanın ayağında ülser gelişmesi hastalarda ciddi morbidite ve hatta mortaliteye neden olabilmekte, ayrıca sağlık giderlerinin aşırı derecede artması ile sonuçlanmaktadır. Dünya genelinde tüm sağlık harcamalarının yaklaşık 1/6'sı diyabet ve onun getirdiği problemler nedeniyle. Diyabet hastalarının hayatları boyunca %12-15 oranında diyabetik ayak ülseri geliştirme riski bulunmaktadır ve diyabetlilerin hastaneye yatış nedeninin 1/4'ünü oluşturmaktadır. Ampütasyon insidansı 6-8/1000 DM yıl civarındadır ve travma dışı ampütasyonların dünyada en sık nedeni (%50'den fazlası) diyabettir. Bu hastalarda hem vasküler problemler hem de kan şekeri düzensizliğinin etkisiyle küçük bir enfeksiyon odağı günler içinde hızla sepsise ilerleyip uzuv kaybına yol açabilmektedir. Bu kadar sık karşılaşılan bir problemin önlenmesi en önemli halk sağlığı konularından biridir. Tüm önlemlere rağmen diyabetik bireyler ayak problemi ile karşılaşmışsa, problem erkenden ortaya konulmalı ve diyabetik ayak ekibi olarak gerekli müdahaleler vakit kaybetmeden yapılmalıdır.

**Anahtar kelimeler:** diyabetik ayak; ülser; Wagner sınıflaması; korunma; tedavi

### Abstract

The prevalence of diabetes is increasing all over the world and is becoming a major public health problem. The complications of diabetes are causing more problems than the disease itself. The development of ulcers on the feet of a diabetic patient can cause serious morbidity and even mortality in patients, resulting in an excessive increase in health expenditure. About one-sixth of all health spending worldwide is caused by diabetes and its problems. Diabetic patients are at risk of developing diabetic foot ulcers by 12-15% throughout their lives and account for 1/4 of the diabetic 's hospitalization. The incidence of amputation is around 6-8 / 1000 DM year and the most common cause of non-traumatic amputations in the world (more than 50%) is diabetes. In these patients, due to both vascular problems and blood sugar irregularity, a small area of infection may rapidly develop sepsis and lead to limb loss in days. Preventing such a common problem is one of the most important public health issues. If, despite all precautions, a diabetic individual has encountered a foot problem, the problem should be addressed early and the necessary interventions as a diabetic foot team should be done without losing time.

**Keywords:** diabetic foot; ulcer; Wagner classification; prevention; treatment

Sorumlu Yazar\*: Muhammed Karadeniz, Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale, Türkiye

E-posta: drkaradeniz36@gmail.com

ORCID: 0000-0003-2432-0378

Gönderim: 07.08.2017 Kabul : 14.08.2017

Doi: 10.18663/tjcl.333137

## Giriş ve Etiyopatogenez

Diyabet sıklığı ve karşılaştığımız komplikasyonlar obezitenin de artması ile birlikte giderek artmaktadır. Diyabetli bir hastanın ayağında oluşan her türlü lezyon diyabetik ayak problemi olarak adlandırılabilir. Diyabet hastalarının %12-15'i hayatlarının bir döneminde diyabetik ayak ülseri gelişme riskiyle karşı karşıya kalmaktadır. Diyabetik ayak ülseleri hastanın yaşam kalitesinde ciddi bozulmalara yol açmakta, alt ekstremitte amputasyonlarına neden olabilmekte ve mortalite oranlarında da önemli bir artışa yol açmaktadır. Non-travmatik alt ekstremitte amputasyonlarının yarısından daha çoğu diyabete bağlı ayak problemleri nedeniyledir. Diyabetik ayak ülseleri diyabetin geç komplikasyonlarından olan periferik nöropati, periferik arter hastalığı ve ayak travmalarına bağlı olarak oluşmaktadır. Diyabetik ayak sorunlarının oluşması için iki veya daha fazla risk faktörünün bir arada bulunması gerekir (Tablo 1). Hastaların büyük çoğunda diyabetik periferik nöropati merkezi bir rol oynamaktadır. Diyabet süresi 10 yılı aşan tip 2 diabetes mellitus hastalarının %50'sinden fazlasında nöropati vardır ve bu da ayakta ülser gelişme riskini artıran en önemli faktördür [1,2].

**Tablo 1.** Diyabetik ayak gelişimi risk faktörleri

	Nedenleri
Daha önce ayak ülseri/ amputasyon öyküsü	
Karşı ekstremitede diyabetik ayak yarısı varlığı	
Diyabetik periferik nöropati	
Diğer diyabetik komplikasyonların varlığı	
Periferik vasküler hastalık	
Ayak deformitelerinin gelişmesi	Charcot eklemi, pence ayak vb.
Kötü glisemik ve metabolik kontrol	Kötü glisemi kontrolü, yüksek kan basıncı
yüksek LDL kolesterolü, ileri yaş	
Alkol ve sigara içimi	
Kötü ayak bakımı	Uyumsuz ayakkabı, çorap, tırnak kesimi hataları, hijyen eksikliği

Nöropatiye bağlı olarak, doku bütünlüğünü bozmaya neden olabilecek minör bir travma ülser gelişimini kolaylaştırmaktadır. Motor nöropatiye de bağlı olarak intrensek kaslarda atrofi oluşmakta, kısıtlı eklem hareketleri nedeniyle de deformite oluşum süreci hızlanmaktadır. Deformiteler sonucunda yük dağılım dengesi bozulmakta ve buna bağlı oluşan mekanik travmalarla birlikte metatars başları altına yerleşimli kallus oluşmaktadır. Kallus gelişimi ile birlikte kanama ve iskemi gelişen dokuda zamanla yüzeysel ülseler gelişmektedir. Kontrolsüz hiperglisemi ve iskemi, tekrarlayan travmalar ile birlikte derin yerleşimli ülser oluşumunu kolaylaştırmakta ve enfeksiyonlara zemin hazırlamaktadır.

Hastaneye geç başvurma, saptandığında tedavi sürecinde geri kalınmış olması, hiperglisemi nedeniyle lökositlerde migrasyon, adhezyon, fagositoz ve opsonizasyonunun bozulması diyabetik ayak enfeksiyonlarının ilerlemesini kolaylaştırmaktadır. Hasta ilk görüldüğünde yaranın temizlenmesi, nekrotik dokunun debridmanı yapılmalı ve yaranın kemiğe ulaşip ulaşmadığının araştırılması gerekmektedir. Tüm bu aşamalar düzenli bir şekilde uygulanmadığı takdirde, diyabetik ayak enfeksiyonları oluşmaktadır [1,3].

## Tanım ve Sınıflandırma

Diyabetik ayak enfeksiyonlarında etiyoloji değişken, patolojik değişiklikler farklı, metabolik özellikler farklı, ülseler homojen değildir. Bu nedenle diyabetik ayak sınıflandırma sistemlerine gerek vardır. PEDIS, SAD sınıflaması, Texas Üniversitesi sınıflaması, Forrest ve Gamberg-Nielson sınıflaması, DEPA, DUSS, MAID sınıflaması gibi daha pek çok sınıflama sistemi kullanılmıştır. Günümüzde pratik olduğu için Wagner sınıflaması yaygın olarak kullanılmaktadır (Tablo 2) [4,5].

**Tablo 2.** Diyabetik ayak ülser gelişimine yol açan durumlar

Doğrudan travma (delici bir obje üzerine basmak, yanlış tırnak kesimi)
Tekrarlayan uygunsuz basınç (ayakkabı vurmaları)
Sürekli uygunsuz basınç (yatağa bağımlı hastada topuk sürtmesi)
Yanık, böcek sokmaları ve hayvan ısırılmaları
Eklem hareketlerinde azalma
Ayakta nasırların uygunsuz tedavisi
Kötü ayak hijyeni, ayakta şekil bozukluğu

Klinik değerlendirmede enfeksiyon varlığı (ısı artışı, kızarıklık, hassasiyet, yüksek ateş, pürülan akıntı, kötü koku) mutlaka gözlemlenmelidir. Diyabetik hastalarda ayak problemleri çeşitli yöntemlerle değerlendirilebilir (Tablo 3) [4,5].

**Tablo 3.** Diyabetik ayak sınıflaması (Wagner sınıflaması)

Grade 0	Ülser yok, yüksek riskli 1 ayak
Grade 1	Yüzeysel ülser (cilt altı yağ dokusuna penetrasyon yok, yüzeysel enfeksiyon bulgusu, sellülit olabilir, yara bakımı ile kolay iyileşir)
Grade 2	Subkutan dokuya invaziv ülser (cilt altı yağ dokusu, tendon, eklem kapsülü etkilenmiş; ligamente, kasa, kemiğe penetrasyon ve abse yok)
Grade 3	Sellülit ve apse formasyonu ile birlikte derin ülser (sıklıkla osteomyelit mevcut)
Grade 4	Lokalize gangren (gangren dışındaki diğer bölümler kurtarılabilir)
Grade 5	Tüm ayağı tutan yaygın gangren (ekstremitte amputasyonu gerekebilir)

<sup>1</sup>Nasır, his kusuru, deformite, kötü glisemik kontrol, yaşlılık, yalnız yaşama, kas iskelet sistemi ve nörolojik sorunlar, alkolizm, görme bozukluğu, psikiyatrik ilaç kullanımı vs.



## Laboratuvar

Hastalar öncelikle enfeksiyon yönünden değerlendirilmeli, bu amaçla akut faz reaktanları olan beyaz küre, c-reaktif protein(CRP) , Eritrosit sedimentasyon hızı(ESR) mutlaka bakılmalıdır. Glisemik durumun değerlendirilmesi ve kan şekeri regülasyonu amacıyla HBA1C ve kan şekeri takipleri; organ fonksiyonlarını görmek için üre, kreatinin, aspartat aminotransferaz , alanin aminotransferaz; nütrisyon durumunu değerlendirmek için albümin, tiroid fonksiyonlarının değerlendirilmesi için tiroid stimulan hormon (TSH) bakılması önemlidir. Yara kültürü, eğer akıntılı yara yoksa derin doku kültürü alınması, yüksek ateşi varsa kan kültürü alınması gereklidir. ESR yüksekliği özellikle osteomyeliti değerlendirmek için önemlidir, ayrıca direkt grafi ve prob testi ile de (proben ciltten kemiğe kadar kolayca ulaşması osteomyelit düşündürür) osteomyelit tanısını koymada yol göstericidir. Emin olamadığımız olgularda manyetik rezonans görüntüleme (MRG) büyük ölçüde tanı koydurucudur [6].

## Diyabetik ayakta vasküler patolojilere yaklaşım

Diyabetik ayak yaralarının periferik nöropati, periferik arter hastalığı ve enfeksiyonun birlikteliğinden meydana geldiği bilinmektedir [7]. Diyabetik ayak yarası bulunan hastaların yaklaşık yarısına periferik arter hastalığı (PAH) eşlik eder [8,9]. PAH'da etyolojik sebep "ateroskleroz" dur. Diyabetik hastalarda ateroskleroz genellikle daha erken yaşlarda başlar, arterin birden çok segmentinde tutulum gösterir ve daha çok distal periferik arterleri etkiler. Ateroskleroz PAH'ta mikro ve makroanjiyopatiye sebep olur. Mikroanjiyopati nedeniyle bu hastalarda mikrosirkülasyon bozulur ve dokulara yeterli oksijen ulaştırılmaz, bu da ayakta ülser oluşumuna yol açar.

PAH genellikle alt ekstremitelerde görülür. Hastalık başlangıçta ağrı ile kendini gösterir. Bu dönemde tıkalı arterler yüzünden distale kollaterallerle giden az miktardaki kan istirahatte ekstremitayı beslerken eforla artan kan ihtiyacını karşılayamaz ve ilk önce klodikasyon intermitant (yürüme ağrısı) ortaya çıkar. Hastalık ilerledikçe hastanın ayağının ön bölümünde özellikle geceleri artan istirahat ağrısı olur.

Diyabetik ayakta ayrıntılı vasküler değerlendirme gangren ile gelen hastalar başta olmak üzere tüm hastalarda gereklidir (Tablo 4). En önemli tanı yöntemi fizik muayenedir. İyi bir anamnez ve fizik muayene ile tanı rahatlıkla konulabilir [10]. Fizik muayenede PAH'ın olduğu tarafta cilt parlak görülür, kıllar dökülmüş, tırnaklar kalınlaşmış ve ekstremita soğuk ve soluk görünümündedir. Ülserler genellikle parmaklar, tibia kenarları ve bası noktalarında oluşur. FM'de PAH'dan şüphelenilen hastalarda ilk olarak Ankle-Brakial İndeks (ABI) ölçülmelidir. ABI %95 duyarlılık, %99 özgüllüğe sahip bir tanı yöntemidir. ABI'nın 1.0-1.3 arası olması normal kabul edilir, ≤0.9 olması PAH

açısından tanı koydurucudur. Daha sonra tanı yöntemlerinden non-invaziv olan arterial doppler ultrasonografi ve gereken hastalarda dijital substrakt anjiyografi (DSA) yapılmalıdır. DSA bu hasta grubunda altın standart olarak kabul edilmektedir. Periferik arter hastalarında distal arter nabızları alınabilir olsa bile aterosklerotik lezyonlardan kaynaklanan mikroemboliler diyabetik hastalarda kritik damar iskemisine neden olabilmektedir. Bu tip lezyonlar doppler ve fizik muayenede tespit edilemeyebilir. Bundan dolayı diyabete bağlı vasküler patoloji düşünülüyorsa DSA ön planda düşünülmelidir [11].

**Tablo 4.** Diyabet hastasında ayak değerlendirmesi

- İnspeksiyon,
- Ayak nabızlarının değerlendirilmesi
- 10-g monofilament ile duyu muayenesi, vibrasyon, pinpirik testi, Achille ve patella refleksi
- Claudicatio intermittens sorgulaması
- Ankle-brachial index ile değerlendirilmesi

Hastalarda istirahat ağrısı veya ayakta gangren veya nekroz gelişmesi kritik bacak iskemisi olarak isimlendirilir. Kritik bacak iskemisi geliştikten sonra bu hastalarda çoğu zaman cerrahi veya perkütan yolla revaskülarizasyon gereklidir. Revaskülarizasyon için standart tedavi femorodistal bypass'tır. Diyabetik hastalarda komorbiditenin yüksek olması nedeniyle cerrahi dışında uygun vakalarda anjiyoplasti, stent implantasyonu, endarterektomi, subintimal anjiyoplasti gibi yöntemler de kullanılmaktadır. Son yıllarda teknolojinin gelişmesiyle daha ince kateterlerin ve kılavuz tellerin kullanılmaya başlanmasıyla daha distal damarlara da müdahale imkanı vermektedir. Ayrıca damar yapısına daha uygun balon ve stentlerin geliştirilmesiyle işlem süreleri kısalmış ve komplikasyon oranları ciddi derecede düşmüştür. Hasta açısından daha az travmatik olduğundan ve hastanede yatış süresini kısalttığından dolayı perkütan girişim oranı ve tedaviye uyum giderek artmaktadır. Kritik bacak iskemisi erken dönemde tespit edilip revaskülarize edilirse amputasyon riskini ve ampütasyon seviyesini azaltabilir. Eğer ayağın revaskülarizasyonu sağlanamazsa iskemi daha da artıp ülser ve gangren oluşmasına neden olur. PAH tek başına ülser oluşmasına neden olmaz, genellikle eşlik eden bir travma sonucu yara oluşur.

Tedavinin amacı ağrısız, fonksiyonunu kaybetmemiş bir ekstremita, yaraların kapanması ve yaşam kalitesinin düzelmesidir [12].

## Sonuç

Sadece kan şekeri regülasyonu ve enfeksiyonla mücadele değil vasküler problemlerin de göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Bu nedenle diyabetik ayak problemlerinin yönetimi bir ekip işidir ve bu ekipte dahiliye, endokrinoloji, enfeksiyon hastalıkları uzmanı ve ortopedistin yanısıra kardiyolog ve kalp-damar cerrahı da mutlaka olmalıdır.

### Çıkar çatışması / finansal destek beyanı

Bu yazıdaki hiçbir yazarın herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

Yazının herhangi bir finansal desteği yoktur.






### Kaynaklar

1. Diyabetik Ayak Sorunları. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Kılavuzu. 2016;8. baskı:149-57.
2. Apelqvist J, Bakker K, Houtumvan W. H, Schaper N. C. Practical guidelines on the management and prevention of the diabetic foot. 2008;24:181-7.
3. Yan J, Li S, Li S. The role of the liver in sepsis 2014; 33: 498-510.
4. Mete B. Sepsiste böbrek ve karaciğer. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Güncel Bilgiler Işığında Sepsis Sempozyum Dizisi 2016: 51: 35-43.
5. Saltoğlu N, Kılıçoğlu Ö, Baktıroğlu S, Oşar Siva Z et al. Diyabetik ayak yarası ve enfeksiyonunun tanısı, tedavisi ve önlenmesi: Ulusal Uzlaşma Raporu. Klimik Derg 2015; 28: 2-34.
6. Wheat LJ, Allen SD, Henry M et al. Diabetic foot infections: bacteriologic analysis. Arch Intern Med 1986; 146: 1935-40.
7. Bridges RM, Deitch EA. Diabetic foot infections. Surg Clin North Am 1994; 74: 537-55.
8. Schaper NC. Lessons from Eurodiale. Diabetes Metab Res Rev 2012; 28: 21-26.
9. Prompers L, Schaper N, Apelqvist J et al. Prediction of outcome in individuals with diabetic foot ulcers: focus on the differences between individuals with and without peripheral arterial disease. The EURODIALE Study. Diabetologia 2008; 51: 747-55.
10. McGee SR, Boyko EJ. Physical examination and chronic lower-extremity ischemia: a critical review. Arch Intern Med 1998; 158: 1357-64.
11. Demir Y, Demir S, Gökçe Ç. Diabetik ayak: fizyopatolojisi, tanısı ve rekonstrüksiyon öncesi tedavisinde güncel yaklaşımlar. Kocatepe Med J 2004; 5: 1-12.
12. Apelqvist JA, Lepäntalo MJ. The ulcerated leg: when to revascularize. Diabetes Metab Res Rev 2012; 28: 30-35.

## ■ Olgu Sunumu

# Beyin tümörü ile karışan intrakraniyal tüberküloz olgusu

## *An intracranial tuberculoma case interfere with brain tumor*

Hatice KARACA<sup>1</sup> , Salih CESUR<sup>\*1</sup> , Çiğdem ATAMAN HATİPOĞLU<sup>1</sup> , Sami KINIKLI<sup>1</sup> , Güner MENEKŞE<sup>2</sup> 

<sup>1</sup> Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara/TÜRKİYE

<sup>2</sup> Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı, Ankara/TÜRKİYE

### Öz

Intrakraniyal tüberküloz, tüberküloza bağlı santral sinir sistemi enfeksiyonunun önemli komplikasyonlarından birisidir. Intrakraniyal tüberkülozlar görüntüleme yöntemlerinde beyin tümörleri ile karışabilir. Tanıda etkenin kültürden izolasyonu ve histopatolojik inceleme kullanılabilir. Tedavide cerrahi girişim ve antitüberküloz tedavi uygulanır. Bu yazıda, Cibuti, Afrika'dan gelen ve intrakraniyal kitle nedeni ile opere edilen ancak biyopsi materyalinin histopatolojik incelemesi sonucunda tüberküloz olduğu saptanan 34 yaşında bir kadın hasta sunuldu.

**Anahtar kelimeler:** tüberküloz, intrakraniyal tümör, ayırıcı tanı, tedavi

### Abstract

Intracranial tuberculoma is one of the significant complications of central nervous system infection due to tuberculosis. Intracranial tuberculomas may be confused with brain tumors in imaging modalities. Diagnosis is made with the isolation of the causative agent from culture or histopathological examination. Surgical intervention and antituberculosis treatment are used in the treatment. In this article, 34 years old female patient from Cibuti, Africa, who is operated with the diagnosis of intracranial mass is presented. The definite diagnosis of tuberculosis is made with the histopathologic examination of biopsy specimens.

**Keywords:** tuberculoma, intracranial tumor, differential diagnosis, treatment

Sorumlu Yazar\*: Salih Cesur, Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara

E-posta: scesur89@yahoo.com

ORCID: 0000-0003-4960-7375

Received 28.12.2017 accepted 12.3.2018

Doi: 10.18663/tjcl.372220

## Giriş

Günümüzde HIV infeksiyonu sıklığında artışla birlikte tüberküloz insidansında da artış görülmektedir [1]. İntrakraniyal tüberkülozlar, tüberküloz menenjitte birlikte veya tüberküloz menenjit olmaksızın görülebilir [2].

İntrakraniyal tüberküloz tüberkülozun ciddi seyirli bir komplikasyonudur ve sıklıkla immun sistemi baskılanmış hastalarda görülür [1].

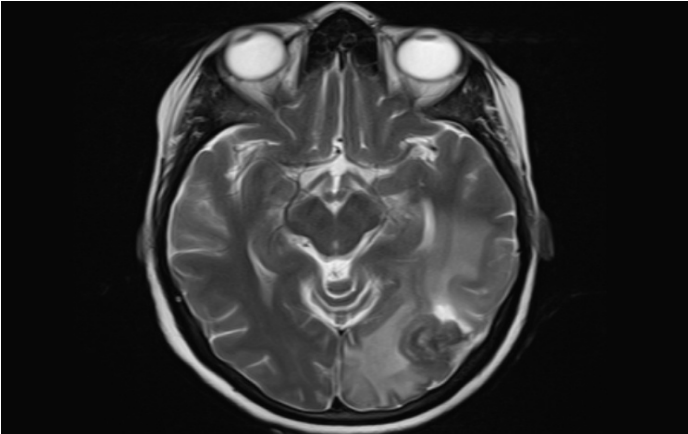
Bu yazıda, beyin tümörü olarak opere edilen ancak operasyon materyalinin histopatolojik incelemesi sonucunda intrakraniyal tüberküloz olduğu saptanan, immünyetmezliği olmayan 34 yaşında bir kadın hasta sunularak literatür gözden geçirildi.

## Olgu

Cibuti'den hastanemize intrakraniyal kitle nedeni ile sevk edilen 34 yaşında kadın hastanın anamnezinden 4 aydır süren baş ağrısı, halsizlik, iştahsızlık yakınmalarının olduğu öğrenildi. Beyin bilgisayarlı tomografi (BT) ve manyetik rezonans görüntüleme (MRG)'de intrakraniyal kitle rapor edildi.

Beyin difüzyon MRG görüntüleme sonucunda; Beyin sapı ve serebelluma ait intensite homojendir. 4. ventrikül orta hattadır, 3. ve lateral ventriküller normal konum ve boyuttur.

Sol oksipital lobda kortikal-subkortikal alanda yer kaplayan, öncelikle intraaksiyel yerleşimli olduğu düşünülen, 25x25 mm boyutlarında çevresel kontrastlanan, lobüle konturlu nodüler lezyon kaydedilmiştir. DAG lerde lezyon içerisinde yer yer difüzyon kısıtlaması seçilmektedir. Lezyon komşuluğunda sol parietotemporookspitalde geniş boyutlarda vazojenik ödem alanı kaydedilmiştir. Ayırıcı tanıda öncelikle neoplazik süreç düşünülmüş olup MR perfüzyon ve spektroskopik MR incelemesi önerilir şeklinde raporlandı. Resim 'de sol oksipital lobda tanımlanan intrakraniyal nodüler lezyon görülmektedir.



**Resim.** Sol oksipital lobda tanımlanan intrakraniyal nodüler lezyon

Hastanın intrakraniyal kitesi için total eksizyon yapıldı. Operasyon materyalinin patolojik sonucu Kronik granülomatöz inflamasyon, yaygın nekroz bulguları, kazeifikasyon nekrozu ve Langhans tipi dev hücreler, epitelooid histiositler görüldü. Mevcut bulgular öncelikle tüberkülozu düşündürmektedir şeklinde rapor edildi. Patolojik inceleme sonucuna göre hasta antitüberküloz tedavi uygulanmak üzere Enfeksiyon hastalıkları kliniğine yatırıldı.

Fizik muayenesinde; hastanın bilinci açık, koopere, oryante idi; ense sertliği yoktu. Diğer sistem muayeneleri doğaldı. Laboratuvar incelemelerinde; biyokimyasal testleri normaldi, lökosit sayısı 12.500/mm<sup>3</sup>, CRP 2.4 mg/dl, sedimentasyon hızı 9 mm/saat idi. Kontrendikasyon açısından beyin cerrahisine danışıldıktan sonra, tüberküloz menenjitte ekarte etmek amacıyla hastaya lomber ponksiyon yapıldı. Beyin omurilik sıvısında (BOS) hücre saptanmadı, BOS glukozu 82 mg/dl (eş zamanlı kan şekeri 101 mg/dl), protein 183 mg/dl idi. BOS'da Gram boyamada bakteri görülmedi, EZN boyamada ARB görülmedi. Tüberküloz polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) sonucu negatif olarak geldi ve kültürde üreme olmadı. Hastaya izoniyazid, rifampisin, pirazinamid ve etambutol'den oluşan antitüberküloz tedavi ile birlikte kortikosteroid tedavisi (prednol 60 mg/gün) başlandı. Kortikosteroid tedavisi ve antitüberküloz tedavinin 2. haftasında hastanın şikayetlerinde gerileme oldu. Tedavisini 12 aya tamamlaması önerildi, kontrole gelmek üzere taburcu edildi.

## Tartışma

HIV epidemisi ile birlikte tüberküloz tekrardan gündeme gelen önemli bir sağlık problemidir. Günümüzde tüm dünyada 2 milyardan fazla kişinin tüberkülozla infekte olduğu ve infekte hastaların da yaklaşık %10'unda hastalık geliştiği bildirilmektedir [3].

Tüberküloz menenjitin komplikasyonları içerisinde beyin infarktı, tüberküloz ve hidrocefali gelişebilir [4]. Santral sinir sistemi tüberkülozu sıklık sırasına göre tüberküloz menenjit, intrakraniyal tüberküloz ve tüberküloz apsesi olarak ortaya çıkabilir. İntrakraniyal tüberkülozlar genellikle soliter, 2-6 cm çapında, oval ya da yuvarlak şekilli, MRG'deki kontrast tutulumuna göre kazeifiye ya da nonkazeifiye lezyonlar şeklindedir [5].

İntrakraniyal tüberkülozlar tüberküloz menenjit olmaksızın da görülebilir [2].

İntrakraniyal tüberkülozlar, tüberküloz granülasyon dokusunun beyin parankiminde oluşturduğu tümöre benzer kitlelerdir ve diğer tüberküloz formlarına göre daha nadir

görürlürler. Genellikle birden fazla sayıda olan, nadiren soliter olarak bulunan tüberkülomlar çok büyük olduğunda kitle etkisi yapabilirler. Tüberkülozla ilişkili olarak fokal nörolojik defisitler, epilepsi nöbetleri veya kafa içi basınç artışına bağlı baş ağrısı gibi semptomlar görülebilir [5, 6]. Görüntüleme yöntemlerinden özellikle beyin MR, bazen de beyin BT ile tüberküloz lezyonlarının yerleşimi, sayısı ve büyüklüğü tanımlanabilir. Bununla birlikte söz konusu lezyonların tümör, abse gibi diğer yer kaplayan lezyonlardan radyolojik olarak ayırdedilmesi güçtür; bu durumda kesin tanı biyopsi ya da otopsi materyalinin histopatolojik incelemesi ile konabilir [5].

Santral sinir sistemi tüberkülozunun prognozu etkili tedavilerle oldukça iyidir. Tedavide cerrahi tedavi ile birlikte veya cerrahi tedavi olmaksızın antitüberküloz tedavi 18 aya kadar uygulanabilir [7]. Literatürde tedavi süresi 12 ay ile 18 ay arasında bildirilmektedir [5,7].

Uygun antitüberküloz tedaviyle tamamen düzelen tüberküloz lezyonlarının ve varsa hidrosefalinin tedaviye yanıtının takibinde kraniyal MRG kullanılabilir [5].

Sunduğumuz olgu da tüberkülozun endemik olduğu bir Afrika ülkesi olan Cibuti'den gelmekte idi. Olguda meninks tutulumunu ekarte etmek için lomber ponksiyon yapıldı. BOS'da hücre görülmedi, BOS biyokimyasında; glukoz 82 mg/dl, protein 183 mg/dl idi. Gram boyamada bakteri görülmedi, EZN boyamada ARB görülmedi, BOS'da tüberküloz PZR negatif olarak rapor edildi, kültürde üreme saptanmadı. Hastanın kesin tanısı operasyon materyalinin histopatolojik incelemesinde tüberkülozla uyumlu lezyon saptanması ile konuldu. Salaskar ve ark.[8] beyin dışında solid organ tümörü olan bir hastada beyin metastazını taklit eden bir intrakraniyal tüberküloz saptadıklarını bildirmişlerdir. Olgu beyin metastazi ön tanısıyla opere edilmiş ancak histopatolojik inceleme sonucunda kitlenin tüberküloz olduğu saptanmıştır.

Türkiye'den Uysal ve ark.[9] diffüz leptomenenjit ve lokal tüberküloz lezyonlarının birlikte görüldüğü 3 yaşında bir santral sinir sistemi tüberküloz olgusu bildirmişlerdir. Olgunun kraniyal MRG incelemesinde sağ temporoparietal bölgede ortasında kontrast tutulumu olan ve kitle etkisi yapan bir lezyon saptanmıştır. Akciğer bulguları, MRG ve diğer laboratuvar bulguları ile olguya intrakraniyal tüberküloz tanısı konmuş ve tedavinin üçüncü ayında MRG'de; lezyonun kitle etkisinin kaybolduğu ve çok sayıda intrakraniyal tüberküloz olduğu bildirilmiştir.

Kocacıbağ ve ark.[10] baş ağrısı ve nöbet şikayetiyle başvuran 74 yaşında erkek hastada beyin MRG tetkikinde; sol parietal

bölgede yaklaşık 2x2x1,5 cm boyutlarında T1 ağırlıklı kesitlerde hipointens, T2 ağırlıklı kesitlerde hiperintens, etrafında şiddetli ödem alanı bulunan, belirgin kontrast tutulumu gösteren kitlesel lezyon saptanmıştır. Başlangıçta hastada MRG görüntüsü ile yüksek evreli gliyal tümör olabileceği düşünülmüş ve kitle tümörüyle çıkartılmıştır. Patolojik inceleme sonucunda tüberküloz uyan granümatöz iltihap saptanmıştır, bunun üzerine hastaya dördü antitüberküloz tedavi başlanmıştır.

Cesur ve ark. [11] Pott hastağı nedeniyle antitüberküloz tedavi görürken paradoksal yanıt olarak tüberküloz gelişen ve uygun antitüberküloz tedavi ile düzelen 53 yaşında bir kadın olgu bildirmişlerdir. Matsumoto ve ark. [1] immunsupresif olmayan ve daha önce tüberküloz geçirme öyküsü olmayan iki olguda intrakraniyal tüberküloz bildirmişlerdir. Olguların birinde sağ ventrikülde granümatöz kitle saptanırken diğer olguda hem akciğer de hem de beyinde dağınık lezyonlar şeklinde odaklar saptanmıştır. Her iki olguda da interferon gama salınım testleri pozitif olarak saptanmıştır.

İzole beyin tüberkülozları endemik bölgelerde intrakraniyal tüberkülozların % 5'inden sorumludur. Sadashiva ve ark. [2] 14 izole beyin tüberküloz olgusunu retrospektif olarak incelemişlerdir. Çalışmada hastaların tanısı anamnez, fizik muayene ve görüntüleme yöntemleri ile konmuştur. Hastalara 6 hafta süreyle kortikosteroid tedavisi ve en az 18 ay veya anlamlı klinik iyileşme olana kadar antitüberküloz tedavi uygulanmıştır.

Li ve ark. [7] santral sinir sistemi tüberkülozması olan 23 hastayı retrospektif olarak değerlendirmişlerdir. Çalışmada yaş ortalaması 30,3, hastalık bulgularının ortaya çıkış süresi ortalama 6 ay (1-19 ay arası) olarak bildirilmiştir. Tüberküloz yerleşimi 10 olguda torakal bölge, 6 olguda servikal bölge, 3 olguda servikotorakal bölge, 1 olguda torakolomber bölge, 6 olguda intrakraniyal kitle, 3 olguda ise çok sayıda lezyon şeklinde bildirilmiştir. Olguların 21'ine cerrahi girişim uygulanırken, iki olguya konservatif tedavi uygulanmıştır. Olgulara antitüberküloz tedavi 18 ay süreyle uygulanmıştır.

Sunduğumuz olgu da 34 yaşında genç bir hasta idi, semptomların başlamasına kadar geçen süre 4 ay idi. Olgumuzda beyinde oksipital bölge tutulumu mevcuttu ve cerrahi ile birlikte dördü antitüberküloz ve kortikosteroid tedavi uygulandı. Ahmadi ve ark.[3] kronik baş ağrısı yakınması olan 32 yaşında bir kadın hastada beyinde çok sayıda tüberküloz bildirmişlerdir. Hastada tanı BOS'da polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) pozitifliği ile konmuştur. Olgu antitüberküloz ve kortikosteroid tedavi ile başarı ile tedavi edilmiştir. Sunduğumuz olguda başlangıçta anamnezde baş

ağrısı yakınması vardı. Hastada tüberküloz menenjitin ekarte edilmesi amacıyla lomber ponksiyon yapıldı, ancak BOS'da hücre saptanmadı ve BOS PZR sonucu negatif olarak saptandı. Antitüberküloz tedavinin 12 ay süreyle uygulanması planlandı.

### **Sonuç**

Sunduğumuz olguda olduğu gibi endemik bölgelerden gelen ve beyinde intrakraniyal kitle saptanan hastalarda kitlenin tüberküloz olabileceği akılda tutulmalı ve tüberküloza yönelik histopatolojik inceleme ve diğer tanısal testler uygulanmalıdır.

### **Çıkar çatışması / finansal destek beyanı**

Bu yazıdaki hiçbir yazarın herhangi bir çıkar çatışması yoktur. Yazının herhangi bir finansal desteği yoktur.

### **Kaynaklar**

1. Matsumoto Y, Aikawa H, Narita S, et al. Intracranial tuberculoma in non immunosuppressive state. *Neurol Med Chir* 2013; 53: 259-62.
2. Sadashiva N, Tiwari S, Shukla D et al. Isolated brainstem tuberculomas. *Acta Neurochir (Wien)*. 2017; 159: 889-97.
3. Ahmadi F, Nashibi R, Naghieh M, Feizi J, Shirmardi M. Multiple brain tuberculomas in a 32-year-old woman with chronic headache. *Arch Iran Med* 2014; 17: 724-25.
4. Mai NT, Thwaites GE. Recent advances in the diagnosis and management of tuberculous meningitis. *Curr Opin Infect Dis*. 2017 ;30 (1):123-128.
5. Apaydın H, Pelin Z, Özekmekçi S, Koçer N. A case of intracranial tuberculoma: Clinical features and MRI findings. *Cerrahpaşa J Med* 1998; 29: 99-106.
6. Martinez-Vasquez C, Bordon J, Rodriguez Gonzales A et al. Cerebral tuberculoma-a comparative study in patients with and without HIV infection. *Infection* 1995; 23: 149-53.
7. Li H, Liu W, You C. Central nervous system tuberculoma. *Clin Neurosci* 2012 ;19: 691-95.
8. Salaskar AL, Hassaneen W, Keenan CH, Suki D. Intracranial tuberculoma mimicking brain metastasis. *J Cancer Res Ther* 2015; 11: 653.
9. Uysal G, Köse G, Özhan B, Güven A, Diren B. Tüberkülozla seyreden bir intrakraniyal tüberküloz olgusu. *Türkiye Klinikleri J Pediatr* 1999; 8: 219-22.
10. Kocabıçak E, Aydın K, Çokluk C, Aras M, Alici Ö. Yüksek evreli gliyal tümör benzeri intrakraniyal tüberküloz: olgu sunumu. *Türk Nöroşirürji Dergisi* 2011; 21: 49-52.
11. Cesur S, Albayrak F, Özdemir D, Birengel S, Sözen TH. Pott hastalığı tedavisi sonrasında tüberküloz gelişen olgu. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)* 2003; 17: 89-91.

To cite this article: Metin B, Erkok MF, Sahin S, Intepe YS. Lymphangioliomyomatosis-associated spontaneous tension hemopneumothorax in multiple organ involvement tuberculosis. Turk J Clin Lab 2019; 10: 430-433.

## ■ Case Report

# Lymphangioliomyomatosis-associated spontaneous tension hemopneumothorax in multiple organ involvement tuberculosis

## *Multi organ tutulumlu tüberosklerozda lenfanjiyoleiyomiyomatozise bağlı spontan tansiyon hemopnömotoraks olgusu*

Bayram METİN\*<sup>1</sup> , Mustafa Fatih ERKOC<sup>2</sup> , Sevinç SAHİN<sup>3</sup> , Yavuz Selim INTEPE<sup>4</sup> 

<sup>1</sup>Bozok University Faculty of Medicine, Department of Thoracic Surgery, Yozgat/TURKEY

<sup>2</sup>Bozok University Faculty of Medicine, Department of Radiology, Yozgat/TURKEY

<sup>3</sup>Bozok University Faculty of Medicine, Department of Pathology Yozgat/ TURKEY

<sup>4</sup>Bozok University Faculty of Medicine, Department of Chest Diseases, Yozgat/ TURKEY

### Abstract

Tuberous sclerosis complex is a genetic disorder that can affect several organs (such as the brain, lungs kidneys, eyes, the heart, bones and the skin). Pulmonary lymphangioliomyomatosis is a disease that is mostly seen among young adult women. It is characterized primarily by the non-neoplastic atypical proliferation of smooth muscle cells in the lung parenchyma. Here, we present a case of lymphangioliomyomatosis-associated spontaneous hemopneumothorax in a tuberous sclerosis patient, which we did not encounter in the literature.

**Keywords:** tuberous sclerosis, lymphangioliomyomatosis; hemopneumothorax

### Öz

Tüberosklerozis kompleksi, beyin, akciğer, böbrek, göz, kalp, kemik ve deri gibi organları etkileyebilen genetik bir hastalıktır. Pulmoner lenfanjiyoleiyomiyomatozis daha çok genç erişkin bayanlarda görülen bir hastalıktır. Akciğer parankimindeki düz kas hücrelerinin neoplastik olmayan atipik proliferasyonu ile karakterizedir. Biz burada literatürde karşılaşmadığımız tüberosklerozis hastasında lenfanjiyoleiyomiyomatozise bağlı spontan hemopnömotoraks olgusunu sunuyoruz.

**Anahtar kelimeler:** tüberosklerozis; lenfanjiyoleiyomiyomatozis; hemopnömotoraks

Corresponding Author\*: Bayram Metin, Bozok University Faculty of Medicine, Department of Thoracic Surgery, Yozgat/TURKEY

E-mail: drbaymet@hotmail.com

ORCID: 0000-0002-7773-9511

Received:02.11.2018 Accepted : 13.12.2018

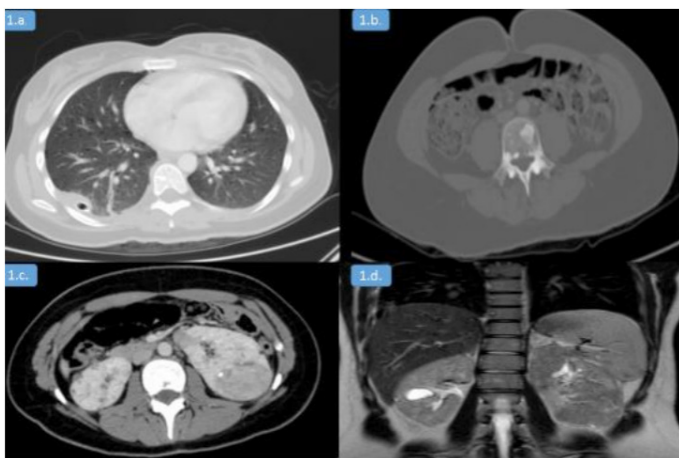
Doi: 10.18663/tjcl.477832

## Introduction

Pulmonary lymphangiomyomatosis (LAM) is a disease that is mostly seen among young adult women. It is characterized primarily by the non-neoplastic atypical proliferation of smooth muscle cells in the lung parenchyma. Tuberosclerosis complex (TBS) can be observed in 1-2.3% of the cases. The most common pleural complications in these cases are recurrent pneumothorax and chylothorax (1). Here, we present a case of LAM-associated spontaneous hemopneumothorax in a TBS patient, which we did not encounter in the literature.

## Case

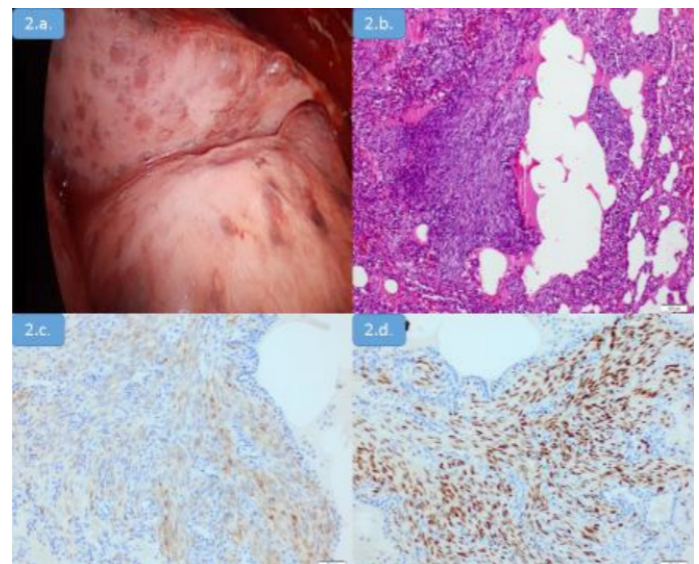
The 20-year-old female patient admitted to the emergency room with the complaints of chest pain and shortness of breath. The oxygen saturation of the patient was 70%; the pulse, 115/min; the blood pressure, 80/40 mm/Hg. The PA lung image revealed total pneumothorax and pleural effusion in the right, and that the mediastinum had shifted towards the left hemothorax. The patients underwent emergency tube thoracostomy. Approximately 1000 cc hemorrhagic fluid was drained together with some air. The hemoglobin value in the pleural fluid was 6.5, and the relative hemoglobin (blood) value was measured as 13.1. There were no abnormal findings in the other routine blood tests. The patient had been monitored for 10 years for Tuberosclerosis. The physical examination revealed lesions compatible with sebaceous adenoma in the face, lesions compatible with Shagreen patch in the back and periungual fibroma in the side of the right hand's third finger. The tomographic imaging revealed paraseptal emphysema regions in both lungs, increased ground-glass densities and mosaic pattern appearances (Figure 1). After 5 days, the patient was discharged with recovery.



**Figure 1a:** Thorax CT, paraseptal emphysema regions in both lungs, ground-glass densities and mosaic pattern. **1b:** Abdominal CT sections, sclerotic tubular formations in the body of lumbar vertebra. **1c, 1d:** Dynamic MRI examination, angiomyolipomas like solid masses (isointense in T2) in both kidneys that have peripheral contrast retention in the CT with contrast, para-medullary cortical cysts.

The follow-up chest radiography, taken 10 days after discharge, revealed recurrent pneumothorax in the right lung. The patient underwent single-port video-assisted thoracoscopy from the previous drain suture. The thoracoscopy revealed extensive bullous formations and color changes in the parenchyma (subpleural hemangioma type).

The patient underwent apical wedge resection and parietal pleurectomy for pleurodesis. The histopathologic examination of the operation material revealed extensive cystic structures, fusiform cells that proliferated around these cystic formations and the dilated bronchioles, and micronodular pneumocyte hyperplasia foci in bundles. The aforementioned areas were histochemically positive for SMA, HMB45, progesterone receptors, estrogen receptors, CK7 and TTF-1 (Figure 2). There were no postoperative complications and the patient was discharged.



**Figure 2a:** The thoracoscopic images revealed extensive bullous formations in the lung and color changes compatible with subpleural hemangioma in the parenchyma. **2b:** The light microscopic examination (Hematoxylin-eosin stain, x100), extensive cystic structures, fusiform cells that proliferated around these cystic formations and the dilated bronchioles, and micronodular pneumocyte hyperplasia foci in bundles. **2c:** HMB45-positive lung lesion (avidin biotin peroxidase assay, x 200). **2d:** Progesterone receptor-positive lung lesion (avidin biotin peroxidase assay, x 200)

## Discussion

Tuberosclerosis complex [also known as tuberous sclerosis (TS) and Bourneville disease] is a genetic (autosomal dominant) disorder that can affect several organs (such as the brain, lungs kidneys, eyes, the heart, bones and the skin). The diagnosis can be made according to the criteria stated by the International Association of Tuberculosis (2,3). In this case, the genetic examinations have shown that the DNA had TSC1 (Hamartin,



chromosome 9q32-34) and TSC2 (tuberin, 16p13.3) pathogenic mutations and the diagnosis was confirmed.

The clinical criteria are divided into two groups: major and minor criteria (1). The major criteria include hypomelanotic macules, angiofibromas or fibrous cephalic plaques, fibromas in the nails, Shagreen patches, multiple retinal hamartomas, cortical dysplasia, subependymal nodules, subependymal giant cell astrocytomas, cardiac rhabdomyoma, LAM, angiomyolipomas (AML). The minor criteria include "confetti" skin lesions, enamel holes, intraoral fibromas, retinal acromic patches, multiple renal cysts and non-renal hamartomas. The definitive diagnosis of TBS requires either 2 major criteria or 1 major criterion with 2 minor criteria (1,2).

The TBS patients with lung involvement commonly have lesions with lymphangioliomyomatosis (TSC-LAM), however, there are reported cases with multifocal micronodular pneumocyte hyperplasia (4). LAM is typically observed among young adult women, which may be associated with estrogen secretion (5). There are sporadic forms of LAM (S-LAM), which are rare and not associated with TSC mutation. These LAM forms can affect the lungs, the lymphatics, the retroperitoneal region and the kidneys, but do not affect the skin, eyes or the central nervous system (5). Clinically, LAM patients are mostly asymptomatic, but the most common symptoms are a chronic cough, hemoptysis, wheezing, chest pain, and effort dyspnea (1,4). The most frequent complaints at the admission are spontaneous pneumothorax and chylous pleural effusion due to lymph node involvement (1,4,6). The spontaneous hemopneumothorax clinic seen in our case has not been found in the literature. Spontaneous hemopneumothorax can develop due to the tear of the adhesion between the parietal and visceral pleura, the rupture of the vascular bullae that lie underneath the lung parenchyma, or the tear of the congenital aberrant veins that are localized in and/or around the bullae in the lung apex (7). In our case, the hemothorax is thought to be caused by the pleural adhesions (observed in the thoroscopic image), the hemangioma-like vascular structures and bullae.

The thorax CT of LAM patients can show paraseptal emphysema areas, air cysts, ground-glass densities and mosaic patterns (4,5). The pathological examination can be done using bronchoscopic biopsy, transthoracic needle biopsy or open lung biopsies (1). Several changes can be observed in the histopathologic examination; such as the diffuse proliferation of the smooth muscle cells (around the alveolar wall, the bronchi, the lymph ducts and blood vessels) and cystic changes in the pulmonary parenchyma. The immunohistochemical LAM cells are HMB45- and progesterone receptor-positive. It is typical

for LAM to visually observe (intraoperative) the multiple and diffuse blebs on the lung surface (1,4,5). The histopathologic examination of our patient has revealed extensive cystic structures, fusiform cells that proliferate around these cystic formations and the dilated bronchioles, and micronodular pneumocyte hyperplasia foci in bundles. The aforementioned areas were histochemically positive for SMA, HMB45, progesterone receptors, estrogen receptors, CK7 and TTF-1.

The kidneys of the TBS can develop AML, fat-density cysts, cortical cysts, and rarely, cancer (8,9). The most dangerous complication of renal AML is bleeding due to vascular rupture (8,9). In our case, the para-medullary cortical cysts and AMLs are shown radiologically shown. There was also a history of emboly in the left kidney due to massive hematuria.

The bone involvement of TBS can include cyst-like lesions, hyperostosis in the internal parts of the calvarial bones, osteoclastic changes, periosteal new bone formations, cystic changes in phalanges and scoliosis. If there are other organ involvements, they are also associated to TBS (8). Our patient had sclerotic tubular formations in the vertebral body (CT image).

The clinical trials among the TBS patients indicate that the sirolimus treatment, mTOR (the mammal target of rapamycin), can provide regression in AML, LAM and brain astrocytomas. The corticosteroid and cytotoxic agent treatments (administered for the improvement of lung functions) were found to have limited benefits (5,10). The literature reports applications of videothoroscopic wedge resection, limited pleurectomy, and pleurodesis. It is indicated that lung transplant can be effective for the terminal patients, however, it is shown that the LAM cells can migrate to the transplanted lung to cause recurrence(1).

## Conclusion

In our case, the 1-year follow-up and the apical wedge resection have indicated that the treatment was sufficient without complications.

## Declaration of conflict of interest

The authors received no financial support for the research and/or authorship of this article. There is no conflict of interest.

## References

1. Tsai C-F, Hsiao C-H, Lee J-M, et al. Video-assisted thoracoscopic surgery for recurrent pneumothorax in pulmonary lymphangioliomyomatosis with tuberous sclerosis complex. *Journal of Cardiothoracic Surgery* 2013; 8:101
2. Northrup H, Krueger DA. Updated diagnostic criteria for tuberous sclerosis complex 2012. *Pediatr Neurol* 2013; 49: 243–54.



3. Kwiatkowski DJ, Whittemore VH, Thiele EA. Tuberous Sclerosis Complex, Genes, Clinical Features and Therapeutics. *Wiley-VCH*2010; 1: 432.
4. Nishida C, Yatera K, Kido T, et al. Two Cases of Tuberous Sclerosis Complex Suggestive of Complicating Multifocal Micronodular Pneumocyte Hyperplasia: A Case Report. *J UOEH* 2017; 39: 133-141.
5. Zhou B, Guo Q, Zhou H et al. Pulmonary lymphangioleiomyomatosis in a 46-year-old female: A case report and review of the literature. *Biomedical Reports* 2016; 4: 719-22.
6. Lama A, Ferreiro L, Golpe A et al. Characteristics of Patients with Lymphangioleiomyomatosis and Pleural Effusion: A Systematic Review. *Respiration* 2016; 91: 256-64
7. Apilioğulları B, Esmel H. Treatment of the spontaneous hemothorax; 2 cases. *J Surg Arts* 2009; 2: 24-28.
8. Ranke FMV, Faria IM, Zanetti G, et al. Imaging of tuberous sclerosis complex: a pictorial review. *Radiol Bras* 2017; 50: 48-54
9. Oesterling JE, Fishman EK, Goldman SM, Marshall FF. The management of renal angiomyolipoma. *J Urol* 1986; 135: 1121-24.
10. Gosein MA, Ameer A, Konduru SKP et al. Tuberous sclerosis presenting with spontaneous pneumothorax secondary to lymphangioleiomyomatosis; previously mistaken for asthma. *BMJ Case Rep* 2013.

## ■ Olgu Sunumu

# Morgagni-Stewart-Morel syndrome: Case report

## *Morgagni-Stewart-Morel sendromu: Olgu sunumu*

Emrah DOĞAN<sup>\*1</sup> , Marwa MOULINE<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Mugla Sıtkı Kocman University, Training and Research Hospital, Department of Radiology, Mugla/TURKEY

<sup>2</sup>Mohammed V University, Department of Cardiology, Rabat/MOROCCO

### Abstract

Hyperostosis frontalis interna (HOFI) is characterized by the benign growth of the inner plate of the frontal bone. It is most common in older women. Etiology is unknown. Morgagni-Stewart-Morel syndrome (MSM) is characterized by HOFI, obesity, hirsutism and mental illnesses but these associations are mostly based only on case reports. MSM syndrome is a misunderstood and less reported pathology. The clinical presentation is not well defined and its finding is usually coincidental. The patient may present variable symptomatology. The idea that we should keep in mind is that HOFI represent the main pattern of MSM. Thus, it is highly important to specify the presence and degree of HOFI in radiological reports.

**Keywords:** Morgagni-Stewart-Morel syndrome; hiperostosis frontalis interna

### Öz

Hiperostozis frontalis interna(HOFI) frontal kemiğin iç tabulasının iyi huylu büyümesi ile karakterizedir. En sık yaşlı kadınlarda görülür. Etiyoloji bilinmemektedir. Morgagni-Stewart-Morel sendromu (MSM); HOFI, obezite, hirsutizm ve zihinsel rahatsızlıklar ile karakterizedir ancak bu ilişkiler çoğunlukla vaka raporlarına dayanır. MSM sendromu daha az anlaşılan ve bildirilen sendromdur. Hasta çeşitli semptomlar gösterebilir. HOFI'nin MSM'nin bir paterni olduğu akılda tutulmalıdır. Radyolojik raporlamada bu nedenle HOFI varlığını ve derecesini belirtmek önem teşkil eder.

**Anahtar kelimeler:** Morgagni-Stewart-Morel sendromu; hiperostozis frontalis interna

Corresponding author\*: Emrah Doğan, Mugla Sıtkı Kocman University, Training and Research Hospital, Department of Radiology, Mugla/TURKEY

E-mail: dr\_e\_dogan@hotmail.com

ORCID: 0000-0002-9446-2294

Received: 15.08.2018 accepted: 10.11.2018

Doi: 10.18663/tjcl.453912

## Introduction

Morgagni-Stewart-Morel syndrome (MSM) is characterized by metabolic, endocrine and neuropsychiatric disorders accompanying hyperostosis frontalis interna (HOFI) [1,2]. The main finding of the disease is HOFI; defined as the benign growth of the inner surface of the frontal bone [3]. The disease can manifest with a wide variety of endocrine and neuropsychiatric conditions. Except HOFI, other findings are partially monitored in most of the cases [1,4]. We present MSM patient with HOFI and neuropsychiatric findings under the light of radiological and clinical findings.

## Case

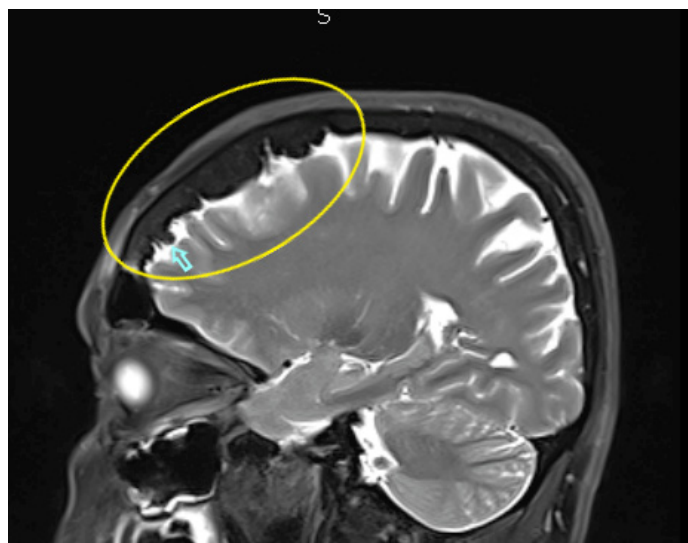
Our patient is 62-year-old female who was admitted to the hospital with a long-term headache. Since 2004, she has been diagnosed with hypertension and since 2014 with diabetes mellitus. The patient was obese (BMI =30) and presented also a hirsutism. Despite of rheumatological symptoms, there was no arthritis. A Dupuytren contracture on the 4th finger was present. The patient was followed and treated for systemic connective tissue disease. Although, the patient consulted psychiatry outpatient clinic several times, she did not have a psychiatric diagnosis other than recurrent depression.

In the family antecedents, the father had a history of diabetes, cirrhosis, and congestive heart disease and mother had a history of hypertension.

Abdominal ultrasonography (USG) revealed a grade 1 hepatosteatosis in the liver while the other abdominal organs were normal. The thyroid parenchyma was heterogeneous and pseudonodular. Several smoothly heterogeneous isohypoechoic nodules were detected on the parenchyma of the thyroid. As Anti TPO rate (ATA) was high (38.2), the diagnosis of thyroiditis was set.

Cranial MRI showed an increase in intertabular distance and thickening in the parietal and frontal bones. Finger-shaped indentations were observed in the internal tabula. Appearance was compatible with HOFI (Figure).

The diagnosis of MSM was established on the base of several collected data: age group, presence of obesity, hirsutism, diabetes mellitus, thyroiditis, connective tissue disease and their association with HOFI in the MRI.



**Figure:** External tabulae regular, increase of intertabular distance is compatible with HOFI (Yellow circle), finger-like bones extending to cerebrospinal fluid (Blue arrow)

## Discussion

In 1719, Morgagni reported for the first time the relationship between the frontal bone thickening, obesity and hirsutism. Stewart added, in 1928, that neuropsychiatric problems may be associated with this condition. The first live case was reported by Morel in 1930. The disease is now defined as the presence of HOFI, which is variably related to metabolic, endocrine and neuropsychiatric disorders [2].

The etiology of MSM syndrome is not yet fully explained. However, some authors have reported that the mechanism behind the syndrome is due to endocrine imbalance involving sex hormones. The proof which supports their theorem is that HOFI is only seen in male patients with gonadal disorders [1].

Ruhli and Hanneberg presented another theorem implicating the leptin hormone. It was reported that leptin metabolism contributes to HOFI formation by the increase of bone metabolism [1,5].

Rosatti evaluated four generations of patients' family and reported experimentally that the disease had an autosomal dominant genetic transition [6]. Genetic theorem is supported in the literature by the case of twins. However, the genetic infrastructure of MSM is still unclear [1,7].

The main finding of the disease is HOFI which is a morphological form of frontal bone and usually appears as single or multiple

bilateral nodules in the inner tabula. Diploe and calvarial mid line characteristic are unchanged[1]. It is most commonly seen in older women. The etiology is unknown. This condition is usually not important clinically and finding is coincidental. [3].

HOFI is divided into 4 groups according to the morphological and histopathological classification of Hershkovitz:

Type A - Single or multiple, single-sided or double-sided, isolated bone thickness, less than 1 cm. usually occupying less than 25% of the frontal bone surface area.

Type B - Increased bone thickness without clear margins. Usually less than 25% of the frontal endocranial surface area is affected.

Type C - wider nodular bone overgrowth associated with irregular thickening up to 50% of the frontal endocranial surface (more than one nodular bone extension).

Type D - Large effected area bone, involving more than 50% of the frontal endocranial surface [8].

MSM syndrome is also called metabolic craniopathy. It is a condition associated with a wide range of endocrine problems such as diabetes mellitus, diabetes insipidus, and hyperparathyroidism. Other signs and symptoms include headache, dizziness, hirsutism, menstrual problems, galactorrhea, obesity, depression, and seizures [2]. The data are mostly based on case reports and there is no clear consensus on the definition of the syndrome [1].

In our case, patient had headache, hirsutism, obesity, diabetes mellitus, recurrent depression and additional symptoms related to thyroiditis and connective tissue disease which were not previously described. According to Hershkovitz, our case was classified as a HOFI type C.

## Conclusion

Morgagni-Stewart-Morel is a less understood and reported syndrome. It should be kept in mind that HOFI is the main pattern of MSM therefore it is important to indicate the presence and the degree of HOFI in radiological reports.

## Declaration of conflict of interest

The authors received no financial support for the research and/or authorship of this article. There is no conflict of interest.

\*This case report was approved by the local ethics committee. Informed consent was collected from the patient.

## References

1. Attanasio F, Granziera S, Giantin V, Manzato E. Full Penetrance of Morgagni-Stewart-Morel Syndrome in a 75-Year-Old Woman: Case Report and Review of the Literature. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: 453-57.
2. Nallegowda M, Singh U, Khanna M, Yadav SL, Choudhary AR, Thakar A. Morgagni Stewart Morel syndrome-additional features. *Neurol India* 2005; 53: 117-19.
3. Smith S, Hemphill RE. Hyperostosis frontalis interna. *J. Neurol. Neurosurg Psychiatr* 1956; 19: 42-45.
4. Klein D, Rosatti P, Mach RS, Ferrier PE, Rauch S: Morgagni-Morel syndrome: an independent clinical and genetic entity, demonstrated in a family study covering 4 generations. *Schweiz Arch Neurol Neurochir Psychiatr* 1973; 112: 239-50.
5. Ruhli FJ, Henneberg M. Are hyperostosis frontalis interna and leptin linked? A hypothetical approach about hormonal influence on human microevolution. *Med Hypotheses*. 2002; 58: 378-81.
6. Rosatti. Family affected by hyperostosis frontalis interna (Morgagni-Morel Syndrome) through 4 successive generations. *J Genet Hum* 1972; 20: 207-52.
7. Koller MF, Papassotiropoulos A, Henke K et al. Evidence of a genetic basis of Morgagni-Stewart-Morel syndrome. A case report of identical twins. *Neurodegener Dis*. 2005; 2: 56-60.
8. Hershkovitz I, Greenwald C, Rothschild BM, et al. Hyperostosis frontalis interna: an anthropological perspective. *Am J Phys Anthropol* 1999; 109: 303-25.



Turkish Journal of Clinics and Laboratory - Türk Klinik ve Laboratuvar Dergisi

Tip dergilerine gönderilecek makalelerin standart gereksinimleri ile ilgili tüm bilgileri [www.icmje.org](http://www.icmje.org) internet adresinde bulabilirsiniz

**Amaç ve kapsam:** "Turkish Journal of Clinics and Laboratory", hakemli, açık erişimli ve periyodik olarak çıkan, DNT Ortadoğu Yayıncılık A.Ş. ye ait bir dergidir. Hedefimiz uluslararası bir tabanda hastalıkların teşhis ve tedavisinde yenilikler içeren yüksek kalitede bilimsel makaleler yayınlamaktır. Yılda dört kez çıkan bir bilimsel bir tıp dergisidir. Hakemli bir dergi olarak gelen yazılar konsültanlar tarafından, öncelikle, biyomedikal makalelere ait Uluslararası Tıp Dergileri Editörleri Komitesi ([www.icmje.org](http://www.icmje.org) adresinden ulaşılabilir) tarafından tanımlanan standart gereksinimler ile ilgili ortak kurallara uygunluğu açısından değerlendirilir. Tıbbın her dalı ile ilgili retrospektif/prospektif klinik ve laboratuvar çalışmalar, ilginç olgu sunumları, davet üzerine yazılan derlemeler, editöre mektuplar, orijinal görüntüler, kısa raporlar ve cerrahi teknik yazılarını yayımlayan bilimsel, uluslararası hakemli bir dergidir. Başka bir dergide yayımlanmış veya değerlendirilmek üzere gönderilmiş yazılar veya dergi kurallarına göre hazırlanmamış yazılar değerlendirme için kabul edilmez.

On-line makale gönderimi: Tüm yazışmalar ve yazı gönderimleri [dergipark](http://dergipark.gov.tr/tjcl) üzerinden <http://dergipark.gov.tr/tjcl> yapılmalıdır. Yazı gönderimi için detaylı bilgi bu internet adresinden edinilebilir. Gönderilen her yazı için özel bir numara verilecek ve yazının alındığı e-posta yolu ile teyid edilecektir. Makalelerin "full-text" pdf formuna <http://dergipark.gov.tr/tjcl> linkinden ulaşılabilir.

**Açık erişim politikası:** Turkish Journal of Clinics and Laboratory açık erişimi olan bir dergidir. Kullanıcılar yazıların tam metnine ulaşabilir, kaynak gösterilerek tüm makaleler bilimsel çalışmalarda kullanılabilir.

Aşağıdaki rehber dergiye gönderilen makalelerde aranan standartları göstermektedir. Bu uluslararası format, makale değerlendirme ve basım aşamalarının hızla yapılmasını sağlayacaktır.

**Yazarlara Bilgi:** Yazıların tüm bilimsel sorumluluğunu yazar(lar)a aittir. Editör, yardımcı editör ve yayıncı dergide yayınlanan yazılar için herhangi bir sorumluluk kabul etmez.

**Dergi adının kısaltması:** Turk J Clin Lab

Yazışma adresi: Yazılar e-mail yoluyla sorumlu yazar tarafından, [Dergipark](http://dergipark.gov.tr) ta yer alan Turkish Journal of Clinics and Laboratory linkine girip kayıt olduktan sonra gönderilmelidir.

**Makale dili:** Makale dili Türkçe ve İngilizcedir. İngilizce makaleler gönderilmeden önce profesyonel bir dil uzmanı tarafından kontrol edilmelidir. Yazıdaki yazım ve gramer hataları içerik değişmeyecek şekilde İngilizce dil danışmanı tarafından düzeltilmelidir. Türkçe yazılan yazılarda düzgün bir Türkçe kullanımı önemlidir. Bu amaçla, Türk Dil Kurumu Sözlük ve Yazım Kılavuzu yazım dilinde esas alınmalıdır.

**Makalenin başka bir yerde yayımlanmamıştır ibaresi:** Her yazar makalenin bir bölümünün veya tamamının başka bir yerde yayımlanmadığını ve aynı anda bir diğer dergide değerlendirilme sürecinde olmadığını, editöre sunum sayfasında belirtmelidirler. 400 kelimedenden az özetler kapsam dışıdır. Kongrelerde sunulan sözlü veya poster bildirilerin, başlık sayfasında kongre adı, yer ve tarih verilerek belirtilmesi gereklidir. Dergide yayımlanan yazıların her türlü sorumluluğu (etik, bilimsel, yasal, vb.) yazarlara aittir.

**Değerlendirme:** Dergiye gönderilen yazılar format ve plagiarizm açısından değerlendirilir. Formata uygun olmayan yazılar değerlendirilmeden sorumlu yazara geri gönderilir. Bu tarz bir zaman kaybının olmaması için yazım kuralları gözden geçirilmelidir. Basım için gönderilen tüm yazılar iki veya daha fazla yerli/yabancı hakem tarafından değerlendirilir. Makalelerin değerlendirilmesi, bilimsel önemi, orijinalliği göz önüne alınarak yapılır. Yayına kabul edilen yazılar editörler kurulu tarafından içerik değiştirilmeden yazarlara haber verilerek yeniden düzenlenebilir. Makalenin dergiye gönderilmesi veya basıma kabul edilmesi sonrası isim sırası değiştirilemez, yazar ismi eklenip çıkartılamaz.

**Basıma kabul edilmesi:** Editör ve hakemlerin uygunluk vermesi sonrası makalenin gönderim tarihi esas alınarak basım sırasına alınır. Her yazı için bir doi numarası alınır.

**Yayın hakları devri:** <http://www.dergipark.ulakbim.gov.tr/tjclinlab> adresi üzerinden online olarak gönderilmelidir. 1976 Copyright Act'e göre, yayımlanmak üzere kabul edilen yazıların her türlü yayın hakkı yayıncıya aittir.

**Makale genel yazım kuralları:** Yazılar Microsoft Word programı (7.0 ve üst versiyon) ile çift satır aralıklı ve 12 punto olarak, her sayfanın iki yanında ve alt ve üst kısmında 2,5 cm boşluk bırakılarak yazılmalıdır. Yazı stili Times New roman olmalıdır. "System International" (SI) unitler kullanılmalıdır. Şekil tablo ve grafikler metin içinde refere edilmelidir. Kısaltmalar, kelimenin ilk geçtiği yerde parantez içinde verilmelidir. Türkçe makalelerde %50 bitişik yazılmalı, aynı şekilde İngilizcelerde de 50% bitişik olmalıdır. Türkçede ondalık sayılarda virgül kullanılmalı (55,78) İngilizce yazılarda nokta (55.78) kullanılmalıdır. Derleme 4000, orijinal çalışma 2500, olgu sunumu 1200, editöre mektup 500 kelimeyi geçmemelidir. Özet sayfasından sonraki sayfalar numaralandırılmalıdır.

### Yazının bölümleri

**1. Sunum sayfası:** Yazının Turkish Journal of Clinics and Laboratory'de yayınlanmak üzere değerlendirilmesi isteğinin belirtildiği, makalenin sorumlu yazarı tarafından dergi editörüne hitaben gönderdiği yazıdır. Bu kısımda makalenin bir bölümünün veya tamamının başka bir yerde yayımlanmadığını ve aynı anda bir diğer dergide değerlendirilme sürecinde olmadığını, maddi destek ve çıkar ilişkisi durumu belirtmelidir.

**2. Başlık sayfası:** Sayfa başında gönderilen makalenin kategorisi belirtilmelidir (Klinik analiz, orijinal çalışma, deneysel çalışma, olgu sunumu vs).

**Başlık:** Kısa ve net bir başlık olmalıdır. Kısaltma içermemelidir. Türkçe ve İngilizce yazılmalı ve kısa başlık (running title) Türkçe ve İngilizce olarak eklenmelidir. Tüm yazarların ad ve soyadları yazıldıktan sonra üst simge ile 1' den itibaren numaralandırılıp, unvanları, çalıştıkları kurum, klinik ve şehir yazar isimleri altına eklenmelidir.

Bu sayfada "sorumlu yazar" belirtilmeli isim, açık adres, telefon ve e-posta bilgileri eklenmelidir.

Kongrelerde sunulan sözlü veya poster bildirilerin, başlık sayfasında kongre adı, yer ve tarih verilerek belirtilmesi gereklidir.

### 3. Makale dosyası: (Yazar ve kurum isimleri bulunmamalıdır)

**Başlık:** Kısa ve net bir başlık olmalıdır. Kısaltma içermemelidir. Türkçe ve İngilizce yazılmalı ve kısa başlık (running title) Türkçe ve İngilizce olarak eklenmelidir.

**Özet:** Türkçe ve İngilizce yazılmalıdır. Orijinal çalışmalarda özetler, Amaç (Aim), Gereç ve Yöntemler (Material and Methods), Bulgular (Results) ve Sonuçlar (Conclusion) bölümlerine ayrılmalı ve 250 sözcüğü geçmemelidir. Olgu sunumları ve benzerlerinde özetler, kısa ve tek paragraflık olmalıdır (150 kelime), Derlemelerde 300 kelimeyi geçmemelidir.

**Anahtar kelimeler:** Türkçe ve İngilizce özetlerin sonlarında bulunmalıdır. En az 3 en fazla 6 adet yazılmalıdır. Kelimeler birbirlerinden noktalı virgül ile ayrılmalıdır. İngilizce anahtar kelimeler "Medical Subject Headings (MESH)" e uygun olarak verilmelidir. ([www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html](http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html)). Türkçe anahtar kelimeler "Türkiye Bilim Terimleri" ne uygun olarak verilmelidir ([www.bilimterimleri.com](http://www.bilimterimleri.com)). Bulunamaması durumunda birebir Türkçe tercümesi verilmelidir.

**Metin bölümleri:** Orijinal makaleler; Giriş, Gereç ve Yöntemler, Bulgular, Tartışma olarak düzenlenmelidir. Olgu sunumları; Giriş, Olgu sunumu, Tartışma olarak düzenlenmelidir. Şekil, fotoğraf, tablo ve grafiklerin metin içinde geçtiği yerler ilgili cümlelerin sonunda belirtilmeli metin içine yerleştirilmemelidir. Kullanılan kısaltmalar altındaki açıklamada belirtilmelidir. Daha önce basılmış şekil, resim, tablo ve grafik kullanılmış ise yazılı izin alınmalıdır ve bu izin açıklama olarak şekil, resim, tablo ve grafik açıklamasında belirtilmelidir. Tablolar metin sonuna eklenmelidir. Resimler/fotoğraf kalitesi en az 300dpi olmalıdır.



**Etik kurallar:** Klinik araştırmaların protokolü etik komitesi tarafından onaylanmış olmalıdır. İnsanlar üzerinde yapılan tüm çalışmalarda, "Yöntem ve reçler" bölümünde çalışmanın ilgili komite tarafından onaylandığı veya çalışmanın Helsinki İlkeler Deklarasyonuna (www.wma.net/e/policy/b3.h) uyularak gerçekleştirildiğine dair bir cümle yer almalıdır. Çalışmaya dahil edilen tüm insanların bilgilendirilmiş onam formunu imzaladığı metin içinde belirtilmelidir. Turkish Journal of Clinics and Laboratory gönderilen yazıların Helsinki Deklarasyonuna uygun olarak yapıldığını, kurumsal etik ve yasal izinlerin alındığını varsayacak ve bu konuda sorumluluk kabul etmeyecektir.

Çalışmada "Hayvan" ögesi kullanılmış ise yazarlar, makalenin Gereç ve Yöntemler bölümünde Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (www.nap.edu/catalog/5140.html) prensipleri doğrultusunda çalışmalarında hayvan haklarını koruduklarını ve kurumlarının etik kurullarından onay aldıklarını belirtmek zorundadır.

**Teşekkür yazısı:** Varsa kaynaklardan sonra yazılmalıdır.

Maddi destek ve çıkar ilişkisi: Makale sonunda varsa çalışmayı maddi olarak destekleyen kişi ve kuruluşlar ve varsa bu kuruluşların yazarlarla olan çıkar ilişkileri belirtilmelidir. (Olmaması durumu da "Çalışmayı maddi olarak destekleyen kişi/kuruluş yoktur ve yazarların herhangi bir çıkar dayalı ilişkisi yoktur" şeklinde yazılmalıdır.

**Kaynaklar:** Kaynaklar makalede geliş sırasına göre yazılmalıdır. Kaynaktaki yazar sayısı 6 veya daha az ise tüm yazarlar belirtilmeli, 7 veya daha fazla ise ilk 3 isim yazılıp ve ark. ("et al") eklenmelidir. Kaynak yazımı için kullanılan format Index Medicus'ta belirtilen şekilde olmalıdır (www.icmje.org). Kaynak listesinde yalnızca yayınlanmış ya da yayınlanması kabul edilmiş veya DOI numarası almış çalışmalar yer almalıdır. Dergi kısaltmaları "Cumulated Index Medicus" ta kullanılan stile uymalıdır. Kaynak sayısının araştırmalarda 25 ve derlemelerde 60, olgu sunumlarında 10, editöre mektupta 5 ile sınırlandırılmasına özen gösterilmelidir. Kaynaklar metinde cümle sonunda nokta işaretinden hemen önce köşeli parantez kullanılarak belirtilmelidir. Örneğin [4,5]. Kaynakların doğruluğundan yazar(lar) sorumludur. Yerli ve yabancı kaynakların sentezine önem verilmelidir.

Şekil ve tablo başlıkları: Başlıklar kaynaklardan sonra yazılmalıdır.

**4. Şekiller:** Her biri ayrı bir görüntü dosyası (jpg) olarak gönderilmelidir.

Makalenin basıma kabulünden sonra "Dizginin ilk düzeltme nüshası" sorumlu yazara e-mail yoluyla gönderilecektir. Bu metinde sadece yazım hataları düzeltilcek, ekleme çıkartma yapılmayacaktır. Sorumlu yazar düzeltmeleri 2 gün içinde bir dosya halinde e-mail ile yayın idare merkezine bildirecektir.

#### Kaynak Yazım Örnekleri

Dergilerden yapılan alıntı;

Özpolat B, Gürpınar ÖA, Ayva EŞ, Gazyağcı S, Niyaz M. The effect of Basic Fibroblast Growth Factor and adipose tissue derived mesenchymal stem cells on wound healing, epithelization and angiogenesis in a tracheal resection and end to end anastomosis rat model. Turk Gogus Kalp Dama 2013; 21: 1010-19. Kitaptan yapılan alıntı;

Tos M. Cartilage tympanoplasty. 1st ed. Stuttgart-New York: Georg Thieme Verlag; 2009.

Tek yazar ve editörü olan kitaptan alıntı;

Neinstein LS. The office visit, interview techniques, and recommendations to parents. In: Neinstein LS (ed). Adolescent Health Care. A practical guide. 3rd ed. Baltimore: Williams&Wilkins; 1996: 46-60.

Çoklu yazar ve editörü olan kitaptan alıntı;

Schulz JE, Parran T Jr: Principles of identification and intervention. In:Principles of Addicton Medicine, Graham AW, Shultz TK (eds). American Society of Addiction Medicine, 3rd ed. Baltimore: Williams&Wilkins; 1998:1-10.

Eğer editör aynı zamanda kitap içinde bölüm yazarı ise;

Diener HC, Wilkinson M (editors). Drug-induced headache. In: Headache. First ed., New York: Springer-Verlag;1988:45-67.

Doktora/Lisans Tezinden alıntı;

Kılıç C. General Health Survey: A Study of Reliability and Validity. PhD Thesis, Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Psychiatrics, Ankara; 1992.

Bir internet sitesinden alıntı;

Sitenin adı, URL adresi, yazar adları, ulaşım tarihi detaylı olarak verilmelidir.

DOI numarası vermek;

Joos S, Musselmann B, Szecsenyi J. Integration of Complementary and Alternative Medicine into Family Practice in Germany: Result of National Survey. Evid Based Complement Alternat Med 2011 (doi: 10.1093/ecam/nep019).

Diğer referans stilleri için "ICMJE Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Sample References" sayfasını ziyaret ediniz.

Bilimsel sorumluluk beyanı: Kabul edilen bir makalenin yayınlanmasından önce her yazar, araştırmaya, içeriğinin sorumluluğunu paylaşmaya yetecek boyutta katıldığını beyan etmelidir. Bu katılım şu konularda olabilir:

a. Deneylerin konsept ve dizaynlarının oluşturulması, veya verilerin toplanması, analizi ya da ifade edilmesi;

b. Makalenin taslağının hazırlanması veya bilimsel içeriğinin gözden geçirilmesi

c. Makalenin basılmaya hazır son halinin onaylanması.

Yazının bir başka yere yayın için gönderilmediğinin beyanı: "Bu çalışmanın içindeki materyalin tamamı ya da bir kısmının daha önce herhangi bir yerde yayınlanmadığını, ve halihazırda da yayın için başka bir yerde değerlendirilmede olmadığını beyan ederim. Bu, 400 kelimeye kadar olan özetler hariç, sempozyumlar, bilgi aktarımları, kitaplar, davet üzerine yazılan makaleler, elektronik formatta gönderimler ve her türden ön bildirimleri içerir."

Sponsorluk beyanı: Yazarlar aşağıda belirtilen alanlarda, varsa çalışmaya sponsorluk edenlerin rollerini beyan etmelidirler:

1. Çalışmanın dizaynı

2. Veri toplanması, analizi ve sonuçların yorumlanması

3. Raporun yazılması

#### Kontrol listesi:

1. Editöre sunum sayfası (Sorumlu yazar tarafından yazılmış olmalıdır)

2. Başlık sayfası ( Makale başlığı/kısa başlık Türkçe ve İngilizce, Yazarlar, kurumları, sorumlu yazar posta adresi, tüm yazarların e-mail adresleri, sorumlu yazarın telefon numarası)

3. Makalenin metin sayfası (Makale başlığı/kısa başlık Türkçe ve İngilizce, Özet/anahtar kelimeler, Summary/keywords, makale metni, kaynaklar, tablo ve şekil başlıkları, tablolar, şekiller)

4. Tablo ve grafikler metin içinde olmalıdır.

5. Şekiller (En az 300 dpi çözünürlükte) ayrı bir veya daha fazla dosya halinde gönderilmelidir.

Özel  
Ortaođu Hastanesi



*Sevgiyle, Bilgiyle, Güvenle...*