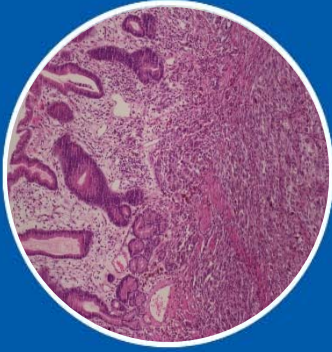
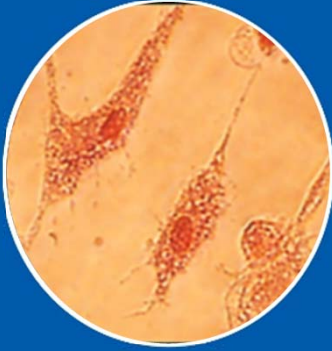


EISSN 2602-3148



CİLT/VOLUME :35
SAYI/ISSUE :1
YIL/YEAR :2021



JOURNAL OF
DOKUZ EYLUL
UNIVERSITY
MEDICAL FACULTY

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DERGİSİ

- **Ekzom dizileme verilerinin tekrar değerlendirilmesi ile saptanan klinik olarak anlamlı ekzom tabanlı kopya sayısı değişimleri**
Fatma KURT ÇOLAK
- **Prevalence and predictors of fear of childbirth in unselected pregnant women: a cross-sectional study**
Naime Meriç KONAR, Beyzanur ÖZCAN, Ahmet TAŞ, Ezgi YAĞRINCALI, Ece KAPLAN, Alperen ERDURAN ve ark.
- **2009-2018 arasında Türkiye'de intihar hızı ve ilişkili özellikler**
Elif Nur YILDIRIM ÖZTÜRK, Mustafa ÖZTÜRK
- **Efficacy of metformin therapy in obese children with insulin resistance**
Gizem ATAĞUL, Hale TUHAN, Ayhan ABACI, Ece BÖBER
- **İnsan göbek kordonu Wharton jölesinden mezenkimal kök hücrelerin eldesinde izolasyon yöntemlerinin ve antioksidatif kültür koşullarının etkisi**
Tuğba ŞAN, Uğur BORA, Özge SAYIN, Mehmet Emin GÜNEŞ, Deniz ÖZTEKİN, Bekir Uğur ERGÜR ve ark.
- **Periampuller bölge tümörlerinde laparoskopi yardımlı pankreatikoduodenektomi**
Serkan ZENGER, Uğur CAN, Bülent GÜRBÜZ, Çağrı BİLGİÇ, Erman SOBUTAY, Orhan BİLGE
- **The effect of general anesthesia and combined general and regional anesthesia on postoperative pain in arthroscopic rotator cuff surgery: A randomized controlled prospective study**
Mehmet Akif AKÇAL, Ebru GÖKSU, İlkay BAYAR, Emel Ece ÖZKAN
- **Retrospective single center evaluation of endosonographic features of ectopic pancreas cases**
Ali ŞENKAYA, Ferit ÇELİK, İlkçe AKGÜN KURTULMUŞ, Fatih TEKİN, Nevin ORUC, Ahmet AYDIN
- **Clinical evaluation of patients with classical Rett syndrome and MECP2 gene analysis**
Filiz HAZAN, Semra GÜRSOY, Ayca ÜNALP, Ünsal YILMAZ
- **Assessment of postoperative complications in a university hospital in Turkey: A retrospective cohort study**
Aslınur SAGÜN, Mustafa AZİZOĞLU, Handan BİRBİÇER



DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DERGİSİ

JOURNAL OF
DOKUZ EYLUL UNIVERSITY MEDICAL FACULTY

Cilt/Volume: 35

Sayı/Issue: 1

Yıl/Year: Nisan/April 2021



EISSN: 2602-3148

YAYIN KURULU / EDITORIAL BOARD

Baş Editör / Editor in Chief

Canan ÇOKER, DEÜTF Tıbbi Biyokimya AD /DEUFM, Dept. of Biochemistry

Editörler / Editors

Banu LEBE, DEÜTF Tıbbi Patoloji AD / DEUFM, Dept. of Pathology

Caner ÇAVDAR, DEÜTF İç Hastalıkları AD, Nefroloji BD / DEUFM, Dept. of Internal Medicine, Nephrology

Cenk DEMİRDÖVER, DEÜTF Plastik ve Rekons. Cer. AD / DEUFM, Dept. of Plastic, Rec. and Aest. Surg.

Ege Nazan TAVMERGEN GÖKER, EÜ Kadın Hast. ve Doğum AD / Ege University, Dept. of Gyn. and Obstet.

Enver AKALIN, AECM Böbrek ve Pank. Nakli Prog. / Albert Einstein Col. of Med. Kidney and Panc. Trans. Prog.

Fatma SAVRAN OĞUZ, İÜTF Tıbbi Biyoloji AD / Istanbul University Fac. Of Med., Dept. of Medical Biology

Funda TÜZÜN, DEÜTF Çocuk Sağl. ve Hast. AD Neonatoloji BD / DEUFM, Dept. of Pediatrics, Neonatology

Gülden AKDAL, DEÜTF Nöroloji AD / DEUFM, Dept. of Neurology

Murat GÖKDEN, UAMS Patoloji AD / UAMS College of Medicine, Dept. of Pathology

N. Sinem GEZER, DEÜTF Radyoloji AD / DEUFM, Dept. of Radiology

Oğuz ALTUNGÖZ, DEÜTF Tıbbi Biyoloji AD / DEUFM, Dept. of Medical Biology

Serap CİLAKEKER MIÇILI, DEÜTF Histoloji ve Embriyoloji AD / DEUFM, Dept. of Histology and Embryology

Yüksel ERKİN, DEÜTF Anesteziyoloji ve Rean. AD, Algoloji BD / DEUFM, Dept. of Anaesthesiology and Rean.

İstatistik Editörü / Statistical Editor

Pembe KESKİNOĞLU, DEÜTF Bitoistatistik ve Tıbbi Bilişim AD / DEUFM, Dept. of Biostatistics

Yayın Koordinatörü/Publishing Coordinator:

Ceren KOYUNCUOĞLU YILMAZ

Yönetim Yeri/Managerial Office:

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı
35340 İnciraltı/Balçova - İZMİR /TÜRKİYE

Yayının Türü: Yılda en az üç kez elektronik yayınlanan Akademik Hakemli Dergidir. 4 ayda bir (Nisan, Ağustos, Aralık) yayımlanır.

Journal of Dokuz Eylül University Medical Faculty (J DEU Med) is a peer reviewed academic journal, electronically published three-times (April, August, and December) in a year.

Erişim Adresi/ URL:

<http://tip.deu.edu.tr/tr/tip-fakultesi-dergisi/>

Tel/Phone: +90 232 4122263

e-posta/e-mail: tipdergisi@deu.edu.tr

Yazışma Adresi / Correspondence Address:

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı
Yayın Kurulu 35340 İnciraltı/Balçova - İZMİR
/TÜRKİYE

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi (DEU Tıp Derg) 'nde yayımlanan yazıların yayın hakkı Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (DEÜTF)'ne aittir.

Dergide yayınlanan makalelerin bilim, içerik ve dil bakımından sorumluluğu yazarlarına aittir.

DEU Tıp Derg, Index Copernicus Master List, TÜBİTAK ULAKBİM Türk Tıp Dizini ve TÜRKİYE ATIF DİZİNİ'nde yer almaktadır.

The copyright of the articles published in the J DEU Med belongs to Dokuz Eylül University Faculty of Medicine (DEUFM).

The responsibility of the articles published in the journal in terms of science, content and language belongs to the authors.

J DEU Med is indexed in Index Copernicus Master List, TÜBİTAK ULAKBİM Türk Tıp Dizini and TÜRKİYE ATIF DİZİNİ.

AMAÇ VE KAPSAM

DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi (DEU Tıp Derg), Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi adına yayımlanan hakemli, multidisipliner, akademik bir dergidir. Türkçe ve İngilizce dillerinde yılda üç sayı olarak Nisan, Ağustos ve Aralık aylarında elektronik yayımlanır.

DEU Tıp Derg'in amacı, tıbbın her alanında uygun hipotezle, bilimsel yöntemler kullanılarak yapılmış özgün araştırmaları yayınlamaktır. Disiplinler arası işbirliği ile yapılmış temel, çevrimsel ve klinik araştırmalar, toplum temelli araştırmalar dergide öncelikli olarak yer bulur. Yanı sıra, güncel konulardaki derlemeleri, ender rastlanan tıbbi olguları, eğitim amaçlı kısa tıbbi bulmacaları, editör görüşlerini, alanında uzman hekimlerin deneyim ve yorumlarını içeren editöre mektupları yayımlar.

DEU Tıp Derg'in hedef okuyucu kitlesi; tıbbın her alanı ile ilgili hekimler, uzmanlar, araştırmacılar, uzmanlık ve doktora öğrencileri yanı sıra tıp fakültesi öğrencileridir. Sürekli mesleki gelişim ve araştırma kültürünün yaygınlaşmasına katkı sağlamayı hedefler.

DEU Tıp Derg, bilimsel yayımlara açık erişim sağlar. Yazarlardan makale yayımı için herhangi bir ücret talep edilmez.

DEU Tıp Derg Yayın Kurulu, "DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi Yönergesi" uyarınca, uluslararası kuruluşların [International Council of Medical Journal Editors (ICMJE), World Association of Medical Editors (WAME), Council of Science Editors (CSE), Committee on Publication Ethics (COPE) ve European Association of Science Editors (EASE)] etik kurallarını gözeterek çalışmalarını yürütür.

Dergiye makale gönderimi için izlenecek yol ve ilgili kurallar, "Yazarlara Bilgi" bölümünde tanımlanmaktadır.

DEU Tıp Derg, **Index Copernicus Master List**, **TÜBİTAK ULAKBİM TR Tıp Dizini** ve **Türkiye Atıf Dizini**'nde indekslenmektedir.

AIMS AND SCOPE

Journal of Dokuz Eylul University Medical Faculty (J DEU Med), is a multidisciplinary, peer reviewed, academic journal published by Dokuz Eylul University Medical Faculty. It is e-published in April, August and December in Turkish and English.

The aim of J DEU Med is to publish original research in every branch of medicine with relevant hypothesis and highly qualified scientific methods. Basic, translational and clinical multidisciplinary research as well as population based research have priority. Additionally, reviews on recent developments, medical case reports on rare disease, educational material, editorial short notes and letters from specialists in different branches of medicine covering their experience and comments are published.

General practitioners, specialists and fellows in every branch of medicine, as well as the researchers and students of the medical faculty are among our target audience. The journal aims to contribute to continuous medical education and to research culture in medicine.

J DEU Med is an open access, nonprofit journal and no payment is requested from the authors for publishment of their articles. Published volumes since 2005 are available full text free-of-charge online at <http://tip.deu.edu.tr/tr/kapsam/>.

The Editorial Board of J DEU Med adheres to the principles of International Council of Medical Journal Editors (ICMJE), World Association of Medical Editors (WAME), Council of Science Editors (CSE), Committee on Publication Ethics (COPE) and European Association of Science Editors (EASE) in accordance with "Directive of J DEU Med".

The guides and rules for sending manuscript are explained in "Instructions for Authors" online at <http://tip.deu.edu.tr/tr/yazarlara-bilgibasvuru/>. J DEU Med is indexed in Index Copernicus Master List, TÜBİTAK ULAKBİM Turkish Journal Index (TR Index) and Turkiye Atif Dizini.

İçindekiler / Contents

Araştırma Makaleleri / Research Articles

Ekzom dizileme verilerinin tekrar değerlendirilmesi ile saptanan klinik olarak anlamlı ekzom tabanlı kopya sayısı değişimleri

Clinically significant exome-based copy number variants detected by re-evaluation of exome sequencing data
Fatma KURT ÇOLAK. 1 - 11

Prevalence and predictors of fear of childbirth in unselected pregnant women: a cross-sectional study

Gebelerde doğum korkusu prevalansı ve risk faktörleri: kesitsel bir çalışma
Naime Meriç KONAR, Beyzanur ÖZCAN, Ahmet TAŞ, Ezgi YAĞRINCALI, Ece KAPLAN, Alperen ERDURAN, Beria Binnaz KUZU, Tala AKBARİ, Selda SONGUR DAĞLI. 13 - 22

2009-2018 arasında Türkiye'de intihar hızı ve ilişkili özellikler

The crude incidence rate of suicide and related factors in Turkey between 2009 and 2018
Elif Nur YILDIRIM ÖZTÜRK, Mustafa ÖZTÜRK. 23 - 32

Efficacy of metformin therapy in obese children with insulin resistance

İnsülin direnci olan obez çocuklarda metformin tedavisinin etkinliği
Gizem ATAKUL, Hale TUHAN, Ayhan ABACI, Ece BÖBER. 33 - 41

İnsan göbek kordonu Wharton jölesinden mezenkimal kök hücrelerin eldesinde izolasyon yöntemlerinin ve antioksidatif kültür koşullarının etkisi

The effect of antioxidant culture conditions and isolation methods in obtaining of mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly of human umbilical cord
Tuğba ŞAN, Uğur BORA, Özge SAYIN, Mehmet Emin GÜNEŞ, Deniz ÖZTEKİN, Bekir Uğur ERGÜR, Kemal BAYSAL, Pınar AKAN. 43 - 60

Periampuller bölge tümörlerinde laparoskopik yardımcı pankreatikoduodenektomi

Laparoscopic assisted pancreaticoduodenectomy in periampullary tumors
Serkan ZENGER, Uğur CAN, Bülent GÜRBÜZ, Çağrı BİLGİÇ, Erman SOBUTAY, Orhan BİLGE. 61 - 69

The effect of general anesthesia and combined general and regional anesthesia on postoperative pain in arthroscopic rotator cuff surgery: A randomized controlled prospective study

Artroskopik rotator manşet ameliyatlarında genel anestezi ile kombine genel ve rejijyonel anestezi kullanımının postoperatif ağrıya olan etkisi: Randomize kontrollü çalışma

Mehmet Akif AKÇAL, Ebru GÖKSU, İlkay BAYAR, Emel Ece ÖZKAN. 71 – 77

Retrospective single center evaluation of endosonographic features of ectopic pancreas cases

Ektopik pankreas olgularının endosonografik özelliklerinin retrospektif tek merkez değerlendirilmesi

Ali ŞENKAYA, Ferit ÇELİK, İlkçe AKGÜN KURTULMUŞ, Fatih TEKİN, Nevin ORUC, Ahmet AYDIN. . 79 – 85

Clinical evaluation of patients with classical Rett syndrome and MECP2 gene analysis

Klasik Rett sendromu olan hastaların klinik değerlendirmesi ve MECP2 gen analizi

Filiz HAZAN, Semra GÜRSOY, Ayca ÜNALP, Ünsal YILMAZ. 87 – 97

Assessment of postoperative complications in a university hospital in Turkey: A retrospective cohort study

Türkiye’de bir üniversite hastanesinde postoperatif komplikasyonların değerlendirilmesi: Retrospektif kohort çalışma

Aslınur SAGÜN, Mustafa AZİZOĞLU, Handan BİRBIÇER. 99 – 107

Olgu Sunumları / Case Reports

Mide metastazı yapan orbita malign melanom, olgu sunumu

Orbital malign melanoma causing gastric metastasis, a case report

Bartu BADAĞ, Mustafa SALIŞ, İbrahim Emin TUNCER 109 – 112

Üst havayolu obstruksiyonu sonrası negatif basınçlı pulmoner ödem gelişen bir çocuk olgu

Child case with negative pressure pulmonary edema after upper airway obstruction

İkbal TÜRKER, Rıza Dinçer YILDIZDAŞ, Özden Özgür HOROZ, Faruk EKİNCİ. 113 – 116

Düzeltilme / Erratum

Kolorektal kanser ve immünoterapi

Colorectal cancer and immunotherapy

Suna ÇOKMERT, Zekiye ALTUN, İlhan ÖZTOP, Safiye AKTAŞ, Nur OLGUN 117

Yazarlara Bilgi. I – IX

Instructions For Authors. XI – XIX

Ekzom dizileme verilerinin tekrar değerlendirilmesi ile saptanan klinik olarak anlamlı ekzom tabanlı kopya sayısı değişimleri

CLINICALLY SIGNIFICANT EXOME-BASED COPY NUMBER VARIANTS DETECTED BY RE-EVALUATION OF EXOME SEQUENCING DATA

 Fatma KURT ÇOLAK

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Kahramanmaraş, TÜRKİYE

ÖZ


Amaç: Son zamanlarda yeni nesil dizileme (next generation sequencing-NGS) birçok klinik laboratuvarda yaygınlaşmakta ve kullanımdaki bu artış neticesinde analiz platformlarına entegre edilmek üzere bazı özel yazılımlar geliştirilmektedir. Özel yazılıma sahip bu platformlar aynı anda tek nükleotid varyantları (single nucleotide variants-SNV) ile birlikte kopya sayısı değişikliklerini (copy number variation-CNV) tanımlamak için giderek daha fazla kullanılmaktadır. Tek nükleotid polimorfizm (single nucleotide polymorphism-SNP) genotiplemesini içeren mikrodizin tabanlı teknolojiler, CNV karakterizasyonu için NGS'e paralel olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada ekzom analizi yapılmış, herhangi bir varyant tespit edilememiş ve tanısı konulamamış 30 hasta tekrar değerlendirmeye alınmış ve tanıya olan katkısına bakılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Hastalarda NGS testi için Sophia genetics in Clinical Exome Solution (CES) kiti kullanıldı. Illumina Next Seq 550® cihazında çalışıldı. CNV olaylarının teyidi için mikrodizin çalışması olarak Illumina Infinium® HumanCytoSNP-12 v2.1 SNP-array çipleriyle Bluefuse® multi (v4.5) analiz programı ve Affymetrix® Cytoscan Optima çipleri ve Chromosome Analysis Suite (ChAS) 3.1 Thermo Fisher Scientific® programları kullanıldı. Bir hastada teyit için multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) testi için SALSA MLPA probemix P089 TK2® kiti kullanıldı.

Bulgular: Tekrar değerlendirilen 30 hastadan 4 vakada sırasıyla RRM2B geni delesyonu, Xq28 duplikasyonu, 22q11.21 delesyonu ve 15q21.2 delesyonu bulunmuştur.

Sonuç: NGS verilerini iyi geliştirilmiş yazılımlarla analiz etmenin birçok avantajı vardır. Özellikle bazı durumlarda hem SNV hem de CNV verilerini birlikte değerlendirebilen yazılım, klinik vakaların çözümüne yardımcı olabilmektedir. Teknolojideki gelişmeler daha iyi sonuçlar veren yazılım araçlarının geliştirilmesine yol açmaktadır. Bu tür analiz yöntemleri, özellikle genin bir kopyası silindiğinde, diğer kopya patojenik veya patojenik olabilen varyantlar taşıdığına, resesif koşullar için tıbbi genetikteki zorlu vakaların çözümünde zaman ve maliyet açısından fayda sağlamaktadır.

Fatma KURT ÇOLAK

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üni.
Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD
Kahramanmaraş-TÜRKİYE
E-posta: drfatmakurt@gmail.com
 <https://orcid.org/0000-0002-8777-8100>

Anahtar Sözcükler: mikrodizin, kopya sayısı değişikliği, yeni nesil dizileme

ABSTRACT

Objective: The next-generation sequencing (NGS) method is becoming widespread in many clinical laboratories and as a result of this increase in usage some tools are developed to be integrated into analysis platforms. These platforms with dedicated software are increasingly being used to identify copy number variations (CNVs) along with single nucleotide variants (SNVs) simultaneously. Array-based technologies including single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping has been employed in parallel to NGS for further characterization of the CNV event. In this study, exome analysis was performed, no variant was detected and 30 patients who could not be diagnosed were re-evaluated.

Materials and Methods: Clinical Exome Solution (CES) kit by Sophia Genetics was used to IlluminaNextSeq550® platform. The data obtained after sequencing was uploaded to SophiaDDM software for analysis. HumanCytoSNP-12v2.1BeadChip Kit at IlluminaInfinium®SNP-array platform and Affymetrix®Cytoscan Optima chips kit was used for follow-up confirmation of CNV events. The RRM2B gene gains and/or losses were detected by the SALSA MLPAprobemix P089TK2®.

Results: In 4 cases out of 30 patients re-evaluation included RRM2B gene deletion, Xq28 duplication, 22q11.21 deletion, and 15q21.2 deletion.

Conclusion: There are many advantages of analyzing NGS data with well-developed software. Software that can evaluate SNV and CNV data together, especially in our cases, help in solving clinical cases. In technology, the steps will lead to the development of software tools that give better results. Such analysis methods are of time and cost benefit in solving challenging cases in medical genetics for recessive conditions, especially when one copy of the gene is deleted and the other copy carries variants that may be pathogenic.

Keywords: microarray, copy number variations, next generation sequencing.

Ekzom dizileme, genomdaki protein kodlayan bölgelerin (20.000 gen) kitlesel paralel dizilişinin gerçekleştirildiği bir tekniktir (1). Klinik ekzom dizileme ise şu ana kadar hastalıklarla ilişkilendirilmiş olan ya da henüz herhangi bir hastalıkla ilişkilendirilmemiş ancak potansiyel aday gen olabilecek olan genlerin (4.500 gen) dizilendiği bir platformdur. Bu nedenle klinik ekzom dizileme rutin tanı kapsamında daha çok tercih edilmektedir (2). Klinik ekzom dizilemenin farklı çalışmalarda ve farklı hasta gruplarında tanı oranı %20 ile %30 arasında değişkenlik göstermektedir (1, 3). Tanı oranının %30 civarında olması nadir hastalıklar için kabul edilebilir olmakla birlikte nadir hastalıkların yaklaşık %70'inin genetik etiyojisi günümüzde halen belirlenememiştir (3).

İnsan genomunda kopya sayısı varyasyonu(copy number variation-CNV) büyük bir yer kaplamakla birlikte

tek bir genom içinde referans genoma göre %1,2'lik bir fark oluşturmaktadır (4). CNV'ler sadece normal genomik farklılıklar dışında önemli hastalıklara da sebep olabilmektedir. Örneğin zihinsel yetersizlik hastalarının %10-20'sinde CNV'ler tanımlanmıştır (5, 6). CNV'ler doğrudan genleri içerebilir, ama bu her zaman gerekli değildir ve genellikle klasik mendel kalıtımına uyan biçimde aktarılırlar. CNV'ler bir genin içinde bulunarak veya genin bir kısmını içererek hastalıklara neden olabileceği gibi dozaja hassas genlerin miktarlarını değiştirerek de hastalıklara neden olabilmektedir (7). Birçok ülkede nörogelişimsel bozukluklar için mikrodizin tabanlı CNV profili ilk tanı testi olarak son 10 yılda laboratuvarlarda kullanılmaktadır. Araştırmalar birçok hastalık için CNV'lerin önemli olduğunu tespit etmiştir (8, 9).

Son zamanlarda yeni nesil dizileme (next generation sequencing-NGS) birçok klinik laboratuvarında yaygınlaşmakta ve kullanımdaki bu artış neticesinde analiz platformlarına entegre edilecek bazı araçlar geliştirilmektedir. Özel yazılıma sahip bu platformlar aynı anda tek nükleotid varyantları (single nucleotide variants - SNV) ile birlikte CNV'leri tanımlamak için giderek daha fazla kullanılmaktadır. Tek nükleotid polimorfizm (single nucleotide polymorphism-SNP) genotiplemesini içeren array tabanlı teknolojiler, CNV karakterizasyonu için NGS'e paralel olarak kullanılmıştır (10, 11, 12). Bu tür yaklaşımlar, özellikle genin bir kopyası silindiğinde, diğer kopya patojenik ya da patojenik olabilen varyantlar taşıdığına, resesif koşullar için tanı açısından zorlu vakaları çözebilmektedir.

Kromozomal boyutta 50 bazdan daha büyük alanı kaplayan değişikliklere CNV adı verilmektedir (13). CNV kapsamında referans genoma göre kazanım (duplikasyon/insersiyon) ya da kayıp (delesyon) ilgili kromozomda olabilmektedir. 50 bazlık küçük bir değişimin patojenik olabileceği gibi sağlıklı popülasyonda çok büyük CNV'ler görülebildiği gösterilmiştir (14). CNV'ler belirli hastalıklarla ilişkilendirilmiş olup mendeliyen ve mikrodelesyon/ mikroduplikasyon gibi hastalıkların yanı sıra multifaktöriyel hastalıklar için risk faktörü olabilmektedir (8, 9, 15). Ayrıca aynı bölgenin delesyonu farklı, duplikasyonu farklı bir hastalık ya da klinikle ilişkilendirilebilmektedir(15).

Genetik bozukluklar geniş bir yelpazede yer alır ve bu durum içinde CNV'lerin önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Tek yöntemli ekzom testlerine göre ekzom bazlı CNV profillemeye yöntemi, ek testler olmadan tespit ve teşhis artışına neden olabilmektedir(16).

Yeniden değerlendirme sırasında hastalardaki olası kopya sayısı değişikliklerinin saptanması amacıyla SOPHIA DDM MUSKAT® platformu kullanılmıştır. Bu yazılım 200 baz çifti çözünürlüğünde kopya sayısı değişikliklerini saptayabilmektedir.

Bu çalışmada ekzom dizileme ile hastanın kliniği ile ilişkilendirilebilecek bir varyant bulunamamış 30 hastanın ekzom bazlı CNV profillemeye ile tekrar değerlendirilip tanıya katkı oranına bakılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Örnek seçimi

Etik kurul izni 22.01.2020 tarihinde 2030 karar numarası ile Ankara Keçiören Eğitim Araştırma Hastanesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylandı. Ekzom analizi ile tanı konulamayan 30 hasta tekrar analiz edilip tanı konulan hastalara değerlendirilmiştir. Ekzom dizileme yapılmış 30 hasta için hastaların klinik bulgularına karşılık gelen panelde bulunan (potansiyel) patojenik küçük varyantlar için analiz edilmiş ve tanı konulamamıştır.

Ekzom dizileme

Hastalardan veya hasta velilerinden aydınlatılmış onam alınmıştır. Başlangıç olarak onamı alınan hastanın periferik kandan DNA eldesi QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Germany) ile QIAcube cihazı kullanılarak kit protokolüne uygun olarak izole edilmiştir. Hastaların başlangıçta DNA konsantrasyonu 40-70 ng/ µL aralığında ölçülmüştür. Hastalarda NGS testi için sophia genetics, Clinical Exome Solution (CES) kiti kullanılmıştır. Yaklaşık 4490 gen içeren bu kit Next Seq 550®(Illumina, USA) cihazında çalışılmıştır. Sekanslamadan sonra elde edilen veriler analiz için Sophia DDM yazılımı (Sophia Genetics SA, Switzerland) kullanılmıştır. Bu yazılım ham verilerin analizinin yanında hem CNV hem de SNV analizi sağlayan bir ara yüzdür. CNV analizinde kullanılan MUSKAT platformu 200 bp çözünürlüğe kadar olan değişimlerin saptanmasını sağlar. CNV analizi hedef bölgelerin kapsama seviyeleri aynı çalışma içinde numuneler arasında analiz edilerek gerçekleştirilir. Her numune için algoritma kapsama modellerinin benzerliğine bağlı olarak aynı çalışmadan bir dizi referans numunesini otomatik olarak seçer. Ayrıca referans numuneler kullanılarak kapsama numune ve hedef bölge tarafından normalleştirilir, Hidden-Markov-model algoritması kullanarak CNV analizini gerçekleştirilir. Analiz sırasında SNV listesi ve CNV'de tespit edilen genleri, düşük alel frekanslı varyantları siliko araçlarda patojenik skorlara sahip varyantları içerecek şekilde özel olarak filtrelenmiştir. Ekzom testleri hedef bölgede %90 prob sekansına ve 20X kapsamı %97'sine sahiptir.

Mikrodizin

CNV bulunan hastalar takip ve teyidi için mikrodizin çalışmaları, Illumina Infinium® HumanCytoSNP-12 v2.1 SNP-array çipleriyle Bluefuse® multi (v4.5) analiz programı ve Affymetrix® Cytoscan Optima çipleri Chromosome Analysis Suite (ChAS) 3.1 Thermo Fisher Scientific® programı yardımıyla analiz edilip, elde edilen veriler güncel veritabanları (Pubmed, OMIM, DGV, Clinvar, DECIPHER) kullanılarak değerlendirilmiştir.

MLPA

Teyit için multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) testi için Applied Biosystems® 3130 Genetic Analyzer cihazında SALSA MLPA probemix P089 TK2 kiti kullanılmıştır ve Coffalyser.NET (MRC-Holland, Amsterdam, Netherlands) analiz programı kullanılarak raporlanmıştır. Ayrıca MLPA yöntemi için veri normalizasyonunda kontrol DNA örneği kullanılmıştır. MLPA yönteminde kopya sayısı değişimlerinin tanımlanması için kullanılan eşik değerleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. RRM2B geni kopya sayısı değişimlerinde kullanılan eşik değerler.(SALSA® MLPA® Probemix P089-B2 TK2 kiti ürün bilgisi)

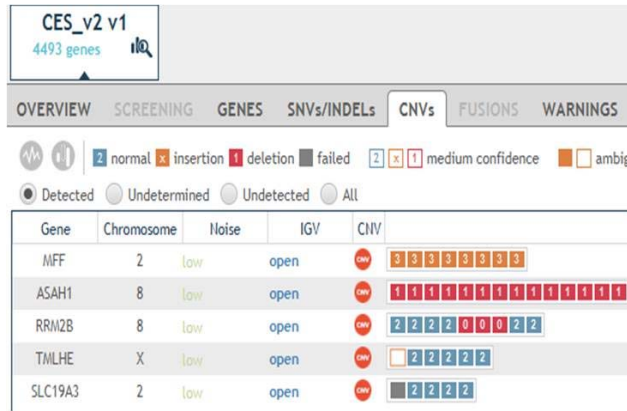
Kopya sayısı durumu	Dozaj Bölümü (Dosage quotient)
Normal	0.80<DQ<1.20
Homozigot delesyon	DQ=0
Heterozigot delesyon	0.40<DQ<0.65
Heterozigot duplikasyon	1.30<DQ<1.65
Heterozigot triplikasyon / homozigot duplikasyon	1.75<DQ<2.15
Belirsiz kopya sayısı	Diğer tüm değerler

BULGULAR

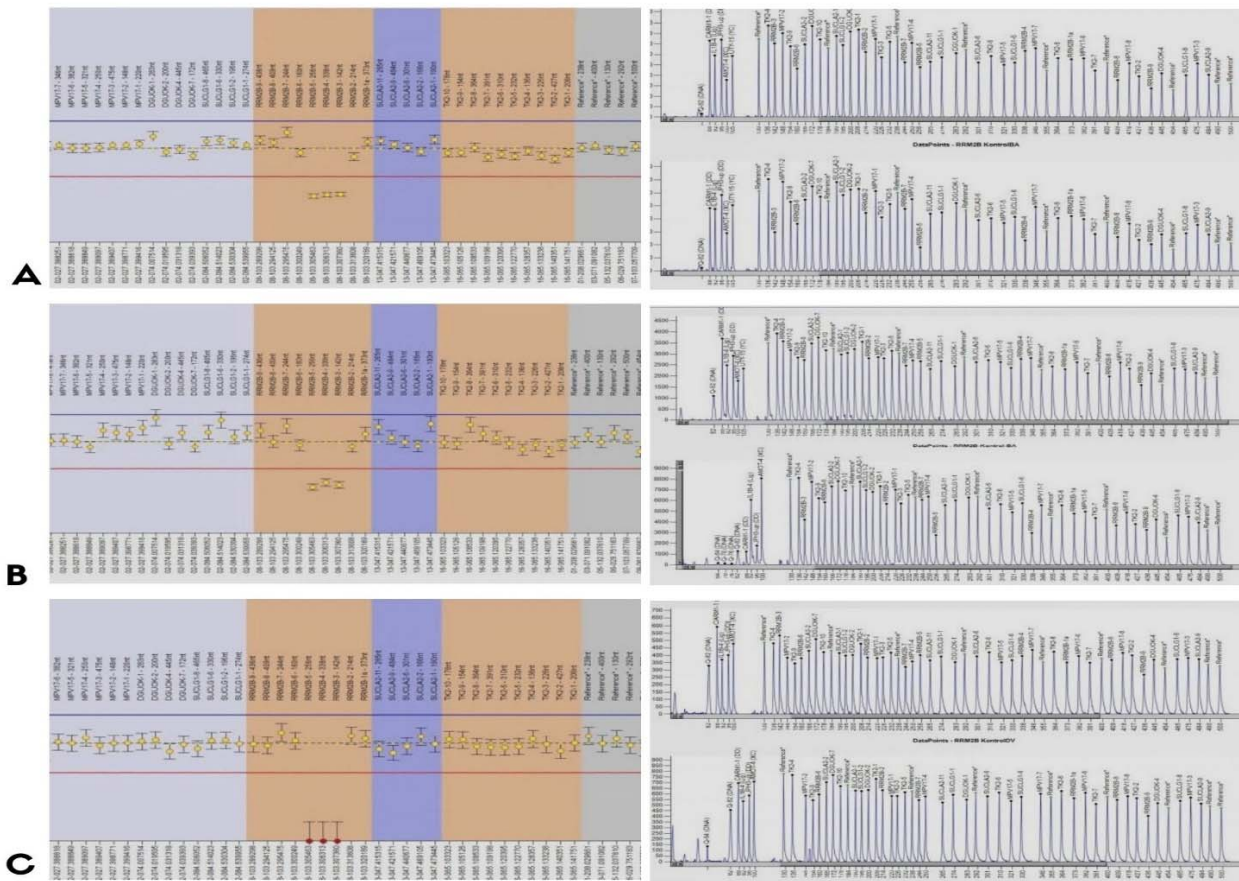
Bölümümüzde ekzom dizileme çalışılmış 30 hastanın verileri daha önceden değişikliklerin toplumda görülme sıklığına, aminoasit ve protein düzeyindeki etkisine, fonksiyonel etkilerine, evrimsel korunmuşluğuna, inhouse ve web tabanlı veri tabanlarında (Pubmed, Clinvar, HGMD, OMIM, EXAC, GnomAD, Varsome) bulunup bulunmamasına göre değerlendirilmiştir ve hastaların klinik bulgularına karşılık gelen panelde bulunan (potansiyel) patojenik küçük varyantlar için analiz edilmiştir. Tanısı konulamamış bu hastaların ekzom tabanlı CNV çalışması tekrar değerlendirilmeye alınmış ve bu hastalardan 4 vaka da tanı açısından yol gösterici sonuçlar bulunmuştur. Bulunan değişimler ikinci bir yöntem ile doğrulanmıştır ve hastaların tanılarına katkıda bulunmuştur.

Vaka 1

1 yaşında kız hasta, 22 yaşında annenin ilk ve tek çocuğu, anne ile baba arasında 3. derece akrabalık mevcuttu. Sezaryen ile 37 haftalık 3000 gr olarak doğum ve ailede bilinen bir hastalık öyküsü bulunmamaktaydı. Muayenede aksiyel hipotonisite, baş traksiyonda iken geride kalıyordu ve hastada dilde fasikülasyon yoktu. Ekokardiyografide patent foramen ovale tespit edildi, abdominal ultrasonografi normal, kranial mr normal olarak sonuçlandı. Hipotonisite nedeni araştırılırken laktat yüksekliği saptandı. Göz muayenesi bilateral nonspesifik hipopigmente fundus olarak değerlendirildi. İdrar organik asit sonucu mitokondriyal hastalık lehine sonuçlandı. Hastanın kas biyopsi sonucu mitokondriyal hastalık ile uyumlu olarak raporlandı. Dış merkezde mitokondriyal hastalık paneli çalışılmış ve normal olarak sonuçlanmıştı. Hasta nükleer genom kaynaklı mitokondriyal hastalık için NGS çalışmasına alındı. Hastanın kliniğini açıklayacak herhangi bir varyant bulunamadı. Sonraki değerlendirmede hastanın ekzom tabanlı CNV analizinde RRM2B geninin ekzon 3-5 bölümünün homozigot olarak okunmadığı görüldü (Şekil 1) ve teyit etmek için MLPA çalışıldı. Hastada MLPA sonucu RRM2B geni ekzon 3-5 homozigot delesyon olarak teyit edildi (Şekil 2). Hastamız 18 aylıkken ex oldu. Aile taramasında anne ve baba heterozigot taşıyıcı olarak saptandı (Şekil 2).



Şekil 1: Vaka 1 CNV analizi Sophia DDM. RRM2B geni ekzon 3-5 okunmamış olarak görülmektedir.

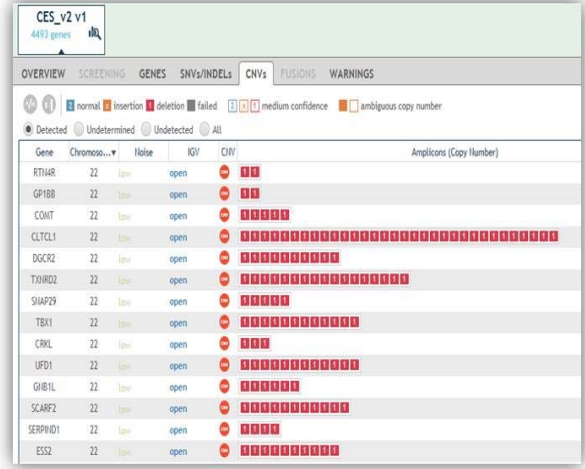


Şekil 2: A Hastanın annesinin RRM2B geni ekzon 3-5 heterozigot delesyon MLPA sonucu. B Hastanın babasının RRM2B geni ekzon 3-5 heterozigot delesyon MLPA sonucu. C Hastanın RRM2B geni ekzon 3-5 homozigot delesyonu görülmektedir.

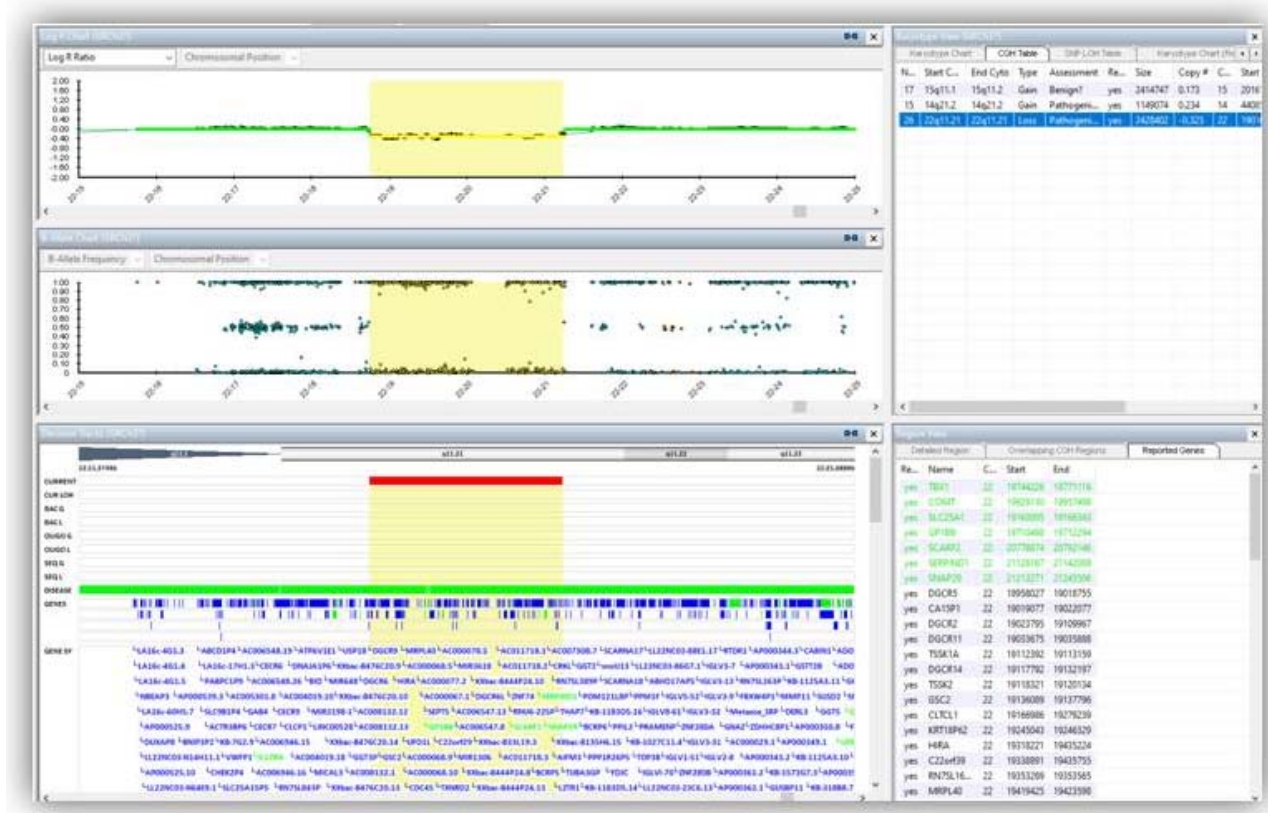
6 Ekzom sekans CNV analiz

Vaka 2

18 aylık kız hasta, 21 yaşındaki anneden ilk ve tek çocuk olarak normal vajinal yol ile 2475 gr olarak miadında doğum, anne ile baba arasında akrabalık bulunmamaktaydı. Fizik muayenede retrognati, yuvarlak yüz yapısı, periorbital dolgunluk, ince ve küçük ağız yapısı mevcut olup ekokardiyografide sekundum ASD tespit edildi. Karyotip analizi 46,XX olarak gelen hastadan muayene bulguları eşliğinde Pierre Robin sendromu ön tanısı düşünülerek NGS çalışıldı ve verilerinin incelenmesinde klinikle ilişkilendirilebilecek herhangi bir varyanta rastlanmadı. Daha sonraki ekzom tabanlı CNV analizinde 22q11.21 kromozomunda art arda gelen genlerde bir kopya kaybı tespit edildi(şekil 3). Teyit için mikrodizin analizi yapıldı arr[GRCh37]22q11.21(19016663-21445064)x1 delesyon saptandı ve delesyonun 2428 kb büyüklüğünde olduğu bulundu(şekil 4). Mevcut sonuç ile hasta Di George sendromu (DGS) tanısı konuldu.



Şekil 3: Vaka 2 CNV analizi Sophia DDM. Hastada 22. kromozom üzerinde ard arda gelen genlerde tek kopya okuma görülmektedir.

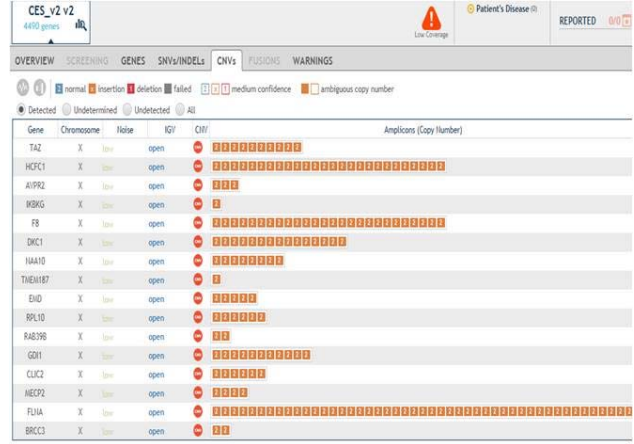


Şekil 4: Vaka 2 Illumina mikrodizin analizi arr[GRCh37]22q11.21(19016663-21445064)x1 bölgesinde 2428 kb delesyon

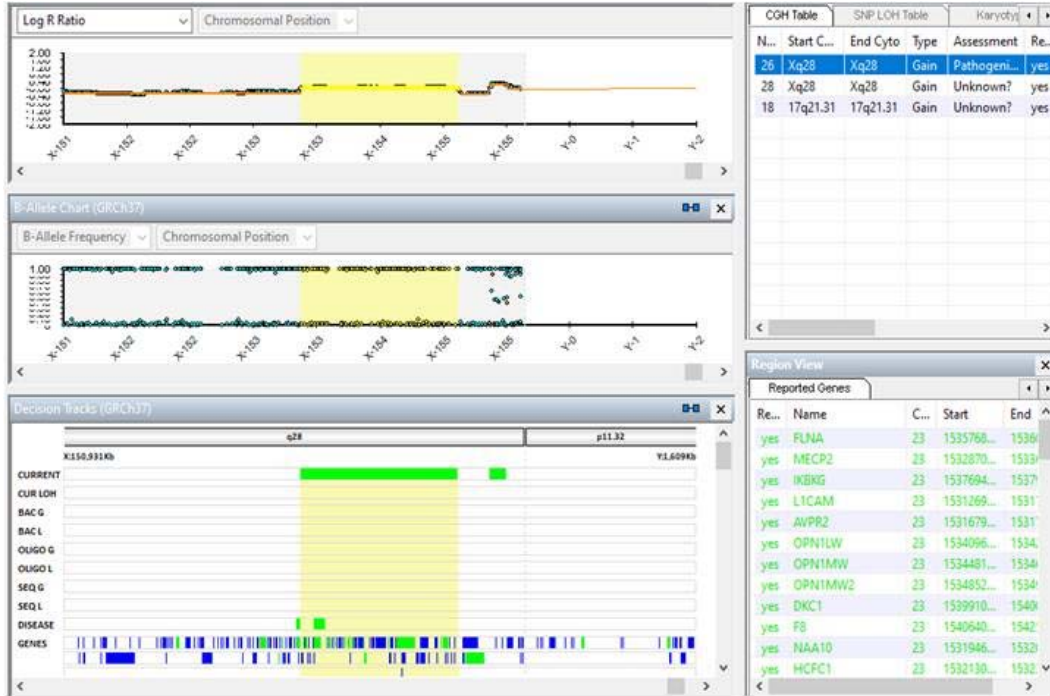
Vaka 3

5 yaşında erkek hasta hipotoni, mental retardasyon, febril konvülsiyon nedeniyle değerlendirilmeye alındı. 23 yaşında anneden ilk ve tek çocuk olarak ve normal vajinal yol ile hastanede 2960 gr olarak doğum olmuş, doğduğunda ağlama olmamış solunum sıkıntısı nedeniyle 9 gün küvezde kalmıştı. Anne ile baba arasında akrabalık yoktu. Muayenede hipotelorizm, gözler derin yerleşimli, kaşlar ortada seyrek, columella düşük, gaga burun yapısı, üçgen ağız, yüksek damak, kulaklar belirgin olarak bulundu. Hastadan kromozom analizi çalışıldı 46,XY olarak raporlandı. Frajil X için CGG tekrar sayısı bakıldı ve normal sayıda çıktı. Hastanın dış merkezde yapılmış array sonuç raporu normal olduğu için NGS çalışmasına alındı. NGS çalışmasının analizinde kliniği açıklayacak herhangi bir varyant bulunamadı. Sonraki değerlendirmede ekzom tabanlı CNV analizinde Xq28 bölgesindeki art arda gelen genlerin duplike olduğu görüldü ve mikrodizin çalışıldı (Şekil 5). Mikrodizin sonucu arr[GRCh37] Xq28(153162037-154649082)x2 olarak raporlandı ve 1487 kb büyüklüğünde

duplikasyon saptandı (Şekil 6). Hastaya Xq28 duplikasyon sendromu tanısı konuldu.



Şekil 5: Vaka 3 CNV analizi Sophia DDM. X kromozomu üzerinde art arda gelen genlerde 2 okuma olduğu görülmektedir.



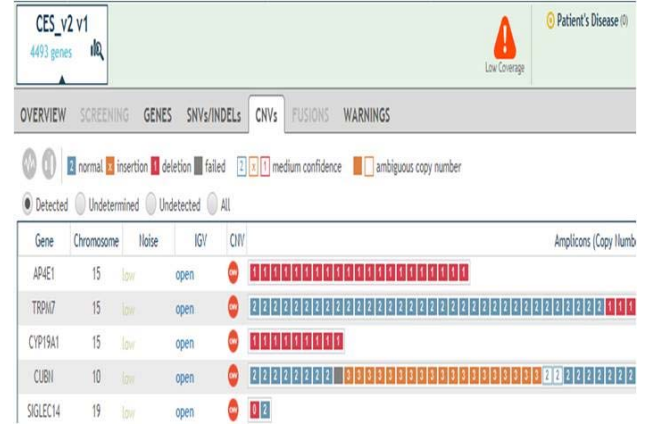
Şekil 6: Vaka 3 Illumina mikrodizin analizi arr[GRCh37] Xq28(153162037-154649082)x2 ve 1487 kb büyüklüğünde duplikasyon

8 Ekzom sekans CNV analiz

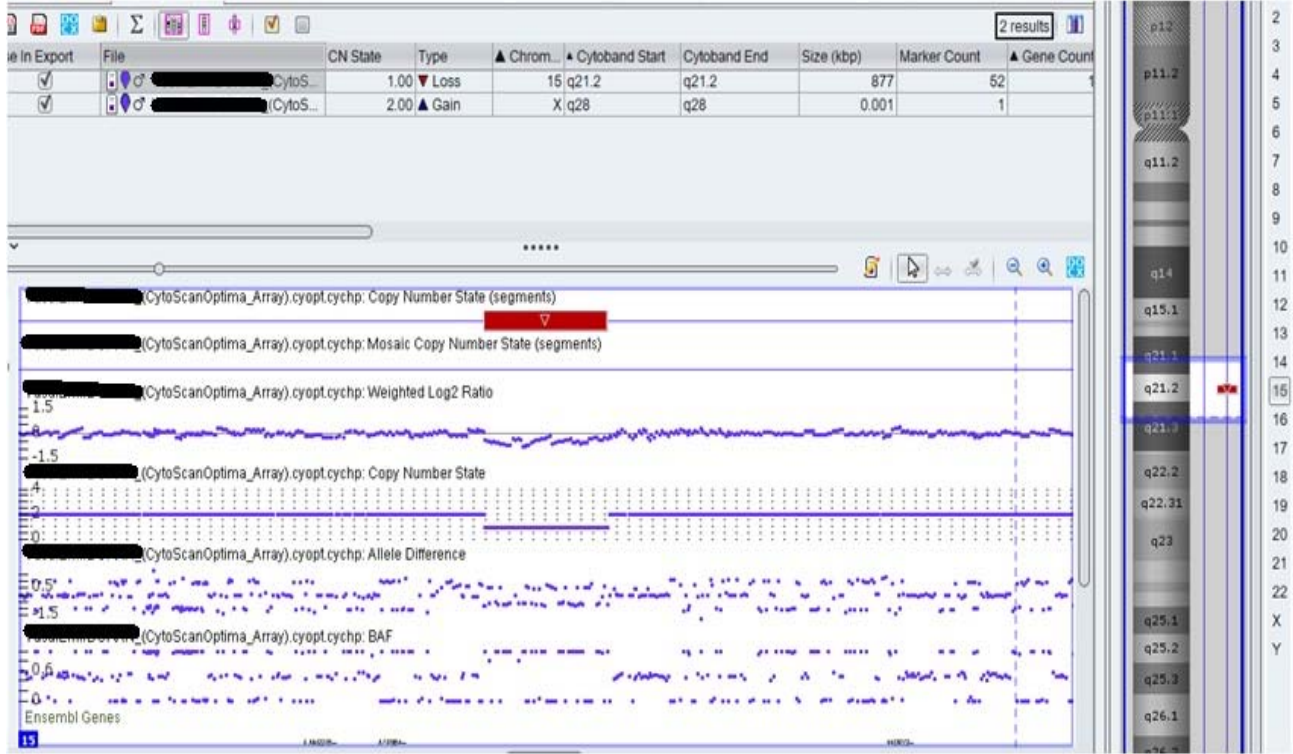
Vaka 4

Epilepsi tanısı nedeniyle değerlendirilen 33 aylık erkek hasta, 20 yaşında 3 çocuğu olan anneden 2. doğan olarak normal vajinal yol ile zamanında, 3560 gr olarak doğum olmuş ve 1 yaşında başlayan febril konvülsiyon öyküsü mevcuttu. Anne ile baba arasında akrabalık yoktu. Ailede amcada, babaannede febril konvülsiyon öyküsü vardı. Abdominal ultrasonda sol böbrek toplayıcı sistemde grade 1 hidronefroz, beyin mr normal, EEG normal olarak bulundu. Hasta CES çalışmasına alındı ve epilepsi gen panelinde anlamlı bir varyant bulunamadı ancak sonraki ekzom tabanlı CNV analizinde 15. kromozomda bazı genlerde 1 kopya okuma olduğu görüldü ve array çalışıldı (Şekil 7). Mikrodizin sonucunda arr[GRCh37] 15q21.2 (50938977-51815643)x1 bölgesinde 877 kb'lık delesyon saptandı (Şekil 8). Ancak az sayıda hastada saptanmış olmasından ve bulunan varyant için yeterli sayıda sağlıklı

hasta verisi olmadığından klinik önemi bilinmeyen değişiklik olarak değerlendirildi.



Şekil 7: Vaka 4 CNV analizi Sophia DDM.15. kromozom üzerinde bazı genlerin tek kopya okunduğu görülmektedir



Şekil 8: Vaka 4 Affymetrix mikrodizin analizi arr[GRCh37] 15q21.2 (50938977-51815643)x1 bölgesinde 877 kb'lık delesyon

TARTIŞMA

Dünya’da nadir hastalıkların tanısı ve tanı koyma süresinin uzaması hastaların değerlendirilmesinde profesyonel yaklaşımın önemini vurgulamaktadır. Nadir hastalıkların %80’ini genetik hastalıklar oluşturmaktadır. Hastaların yaklaşık olarak sadece %50’sine tanı konabilmektedir (17). Bu durumu genetikte güncel test ve analiz programlarının teknolojik olarak hızla ilerlemesi arttırmaktadır.

Yapılan çalışmalarda verilerin yeniden değerlendirilmesi sırasında ilk analiz sırasındaki varyant sınıflamalarının değiştiği, bilinen hastalıklarla ilişkili yeni varyantların tanımlandığı ve henüz herhangi bir hastalıkla ilişkilendirilmemiş genlerin zamanla yeni hastalıklara yol açtığı gösterilmiştir (18). Bu çalışmalar sonucunda dizileme verilerinin sistematik retrospektif analizin tanı oranlarını arttıracığı ortaya konulmuştur. Bu nedenle günümüzde hastalardan elde edilen yüksek genom ölçekli genetik verilerinin belirli aralıklar yeniden değerlendirilmesi önerilmektedir (3).

Bu çalışmada NGS analizinde CNV değerlendirmesi ve sonrasında bulunan sonuçların mikrodizin ya da MLPA yöntemi ile teyidi yapıldı. Amaç, teşhis veriminin artması için ekzom tabanlı CNV analizinde kullanılabilirliğini göstermektir. Bazı yayınlar önceden tahmin edilen ekzom tabanlı CNV analizinin yanlış negatif veya yanlış pozitif oranlarının farklı olduğunu göstermektedir (19).

NGS verilerini iyi geliştirilmiş yazılımlarla analiz etmenin birçok avantajı vardır. Özellikle bazı durumlarda hem SNV hem de CNV verilerini birlikte değerlendirebilen yazılım, klinik vakaların çözümüne yardımcı olur. Teknolojideki gelişmeler daha iyi sonuçlar veren yazılım araçlarının geliştirilmesine yol açmaktadır. Her geçen gün yeni programlar yeni yazılımlar bu konuda önümüzü açmaktadır. Bulunan bir resesif kalıtım gösteren bir varyant için genin diğer allelinde delesyon ya da duplikasyon olması hastalığın tanısını kolaylaştırmaktadır ve analiz sırasında süre ve zaman açısından fayda sağlamaktadır.

Vaka 1’de RRM2B geninde ekzom CNV değerlendirmesinde ekzon 3-5 homozigot delesyon

saptanmış ve MLPA ile teyit edilmiştir. RRM2B geni 8q22.3 bölgesinde bulunur. Otozomal resesif (OR) veya otozomal dominant (OD) geçiş gösteren mitokondriyal hastalığa sebep olmaktadır. OR geçişli olan formda ebeveynler heterozigot ve asemptomatik taşıyıcıdır. Etkilenen bir bireyin her kardeşinin %25 etkilenme şansı, %50 asemptomatik taşıyıcı olma ve %25 etkilenmeme şansı vardır. OD kalıtım gösteren formunda ise genelde etkilenmiş bir ebeveyn bulunmaktadır. Denovo geçiş tam olarak bilinmemektedir. RRM2B ilişkili mitokondriyal hastalık tanısında %95 sekans analizi ile tanı konulmaktadır. Delesyon duplikasyon oranı tam bilinmemektedir (20, 21). Hastamızın anne ve babası sağlıklı olup heterozigot taşıyıcı olarak bulunduğu ve hastada homozigot formda olduğu için OR geçişli olarak kabul edilmiştir.

Vaka 2 de saptanan 22q11delesyonu Di George sendromu (DGS) bölgesidir. DGS, paratiroid bezi ve timüsün konjenital yokluğu, tekrarlayan enfeksiyon ile giden bir sendromdur. 22. kromozomun delesyonu sıklığı 4000 canlı doğumda birdir. Kraniofasial ve gelişimsel anomaliler ile birlikte kardiyak anomalilerin önemli bir sebebidir (22). Tanı alan hastaların hayatlarının farklı evrelerinde değişik problemlerle karşılaşacağı bilindiğinden, hasta ve ailesine genetik bilgi verilmiştir.

Bu makalede geçen hastalardan vaka 3 için dış merkez mikrodizin normal raporunun olması hastayı NGS yöntemleri ile incelememiz gerektiği yönünde bir karar aldırttı. Mikrodizin yönteminde bu tür tanı atlamalarına prob yerleşim sıklığı, prob sıklığının azaldığı bölgelerde CNV’ler hakkında bilgi alamama, özellikle bakılmak istenen bölgede prob olup olmadığı ve analiz yapan uzmanın tecrübesi gibi durumlar sonucun çıkmamasına ya da gözden kaçmasına neden olabilmektedir. Ayrıca mikrodizin yönteminde dengeli translokasyonlar, halkasal kromozomlar, inversiyonlar tespit edilememektedir. Hastanın NGS CNV analizi sonrasında görülen Xq28 duplikasyonu mikrodizin analizi sonucunda teyit edildi. Xq28 duplikasyonunda davranışsal ve psikiyatrik sorunlar, dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu, öğrenme güçlüğü, otizm spektrum bozukluğu, kognitif bozukluk görülebilmektedir. Hastalarda belirgin yüz bulguları olmaktadır bunlar geniş alın yapısı, geniş burun köprüsü,

kalın alt dudak yapısıdır(23). Hastamız dismorfik bulguları ile birlikte değerlendirildiğinde tanısı Xq28 duplikasyon sendromu tanısını almıştır.

Vaka 4 de saptanan delesyon az sayıda hastada saptanmış olması ve bulunan varyant için yeterli sayıda sağlıklı hasta verisi olmadığından klinik önemi bilinmeyen değişiklik olarak değerlendirilmiştir. Ancak ilerleyen zamanlarda bulunan delesyonun benzer klinikte olan hastalarda saptanması bulunan varyantın hastalık yapıcı bir değişim olduğunu gösterebilir.

Farklı merkezlerde metabolik ve nörogelişimsel hastalık, iskelet displazisi ve göz hastalıkları grubunda yer alan hastaların hali hazırda dizilenmiş olan verileri kullanılarak tekrar değerlendirme yapıldığında tanı koyma oranlarının yaklaşık %10 - %15 oranında arttığı görülmüştür (1, 2, 3). Bu çalışmada 30 hasta tekrar değerlendirilmiş ve 3 hastada kliniği açıklayan değişiklik bulunmuş ve literatüre uygun olarak %10 tanı koyma oranını arttırdığı görülmüştür.

Bununla birlikte, genetik bozuklukların çoğu için ekzom dizilemenin SNV ve CNV tespitini bir arada yapabilmesi tanı oranını arttırmaktadır. Bir çalışma ile klinik ekzom tabanlı CNV taramasının genetik testte uygulanabilirliği ile CNV analizinin, şimdiye kadar genel olarak SNV'ye odaklanmış olan ekzom dizilemenin tanısallığını % 6'ya kadar (ortalama% 2) artırır. Bu artış doğrudan herhangi bir laboratuvar maliyeti olmadan elde edilir (16). Bulgularımızın gelecekteki araştırmalarda klinik olarak benzer başka hastalar içinde değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.




KAYNAKLAR

1. Baker SW, Murrell JR, Nesbitt AI, Pechter KB, Balciuniene J, Zhao X, et al. Automated Clinical Exome Reanalysis Reveals Novel Diagnoses. *J Mol Diagn.* 2019;21:38-48.
2. Liu Z, Zhu L, Roberts R, Tong W. Toward Clinical Implementation of Next-Generation Sequencing-Based Genetic Testing in Rare Diseases: Where Are We? *Trends Genet.* 2019;35:852-67.
3. Bruel AL, Nambot S, Quéré V, Vitobello A, Thevenon J, Assoum M, et al. Increased diagnostic and new genes identification outcome using research reanalysis of singleton exome sequencing. *Eur J of Hum Genet.* 2019;27:1519-31.
4. Pang AW, MacDonald JR, Pinto D, Wei J, Rafiq MA, Conrad DF, et al. Towards a comprehensive structural variation map of an individual human genome. *Genome Biol.* 2010;11:R52.
5. Cooper GM, Coe BP, Girirajan S, Rosenfeld JA, Vu TH, Baker C, et al. A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet.* 2011; 43:838-46.
6. Hochstenbach R, van Binsbergen E, Engelen J, Nieuwint A, Polstra A, Poddighe P, et al. Array analysis and karyotyping: workflow consequences based on a retrospective study of 36,325 patients with idiopathic developmental delay in the Netherlands. *Eur J Med Genet.* 2009; 52:161-9.
7. Lee C, ve Scherer S W, The Clinical Context of Copy Number Variation in The Human Genome. *Expert Rev Mol Med.* 2010; 9;12:e8.
8. Glessner JT, Bick AG, Ito K, Homsy JG, Rodriguez-Murillo L, Fromer M, et al. Increased frequency of de novo copy number variants in congenital heart disease by integrative analysis of single nucleotide polymorphism array and exome sequence data. *Circ Res.* 2014;115:884-96.
9. Orange JS, Glessner JT, Resnick E, Sullivan KE, Lucas M, Ferry B, et al. Genome-wide association identifies diverse causes of common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2011; 127:1360-7.
10. de Ligt J, Boone PM, Pfundt R, Vissers LE, Richmond T, Geoghegan J, et al. Detection of clinically relevant copy number variants with whole-exome sequencing. *Human Mutat.* 2013; 34:1439-48.
11. Tan R, Wang Y, Kleinstein SE, Liu Y, Zhu X, Guo H, et al. An evaluation of copy number variation

- detection tools from whole-exome sequencing data. *Human Mutat.* 2014;35:899-907.
12. Krumm N, Sudmant PH, Ko A, O'Roak BJ, Malig M, Coe BP, et al. Copy number variation detection and genotyping from exome sequence data. *Genome Res.* 2012;22:1525-32.
 13. Zarrei M, MacDonald JR, Merico D, Scherer SW. A copy number variation map of the human genome. *Nat Rev Genet.* 2015;16:172-82
 14. Nussbaum, R, McInnes R, Willard H. Thompson & Thompson Genetics in Medicine, ed 8, Canada, Elsevier Inc, 2016: 1-105.
 15. Jähn JA, von Spiczak S, Muhle H, Obermeier T, Franke A, Mefford HC, et al. Iterative phenotyping of 15q11. 2, 15q13. 3 and 16p13. 11 microdeletion carriers in pediatric epilepsies. *Epilepsy Res.* 2014;108:109-16
 16. Pfundt R, Del Rosario M, Vissers LE, Kwint MP, Janssen IM, De Leeuw N, et al. Detection of clinically relevant copy-number variants by exome sequencing in a large cohort of genetic disorders. *Genet Med.* 2017;19(6):667-75.
 17. Boycott KM, Hartley T, Biesecker LG, Gibbs RA, Innes AM, Riess O, et al. A diagnosis for all rare genetic diseases: the horizon and the next frontiers. *Cell.* 2019; 177: 32-7.
 18. Deignan JL, Chung WK, Kearney HM, Monaghan KG, Rehder CW, Chao EC. Points to consider in the reevaluation and reanalysis of genomic test results: a statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med.* 2019;21:1267-70.
 19. Retterer K, Scuffins J, Schmidt D, Lewis R, Pineda-Alvarez D, Stafford A, et al. Assessing copy number from exome sequencing and exome array CGH based on CNV spectrum in a large clinical cohort. *Genet Med.* 2015;17: 623-9.
 20. Gorman GS, Taylor RW. RRM2B-Related Mitochondrial Disease. 2014 Apr 17. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Mirzaa G, Amemiya A, editors. *GeneReviews*[®] [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2021. [Erişim tarihi: 25.08.2020]] Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK195854>
 21. Chen YF, Lin IH, Guo YR, Chiu WJ, Wu MS, Jia W, et al. Rrm2b deletion causes mitochondrial metabolic defects in renal tubules. *Sci Rep.* 2019;9: 1-12.
 22. Göktürk B, Reisli İ. DiGeorge Syndrome. *Asthma Allergy Immunol.* 2017;14:129-42.
 23. Ballout RA, El-Hattab AW, Schaaf CP, Cheung SW. Adam MP, Ardinger HH, et al. Xq28 duplication syndrome, Int22h1/Int22h2 mediated. 2016 Mar 10. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Mirzaa G, Amemiya A, editors. *GeneReviews*[®] [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2021. [Erişim tarihi: 25.08.2020]] Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK349624>

Prevalence and predictors of fear of childbirth in unselected pregnant women: A cross-sectional study

GEBELERDE DOĞUM KORKUSU PREVALANSI VE RİSK FAKTÖRLERİ: KESİTSEL BİR ÇALIŞMA

 Naime Meric KONAR¹,  Beyzanur ÖZCAN²,  Ahmet TAŞ²,  Ezgi YAĞRINCALI²,  Ece KAPLAN²,  Alperen ERDURAN²,  Beria Binnaz KUZU²,  Tala AKBARİ²,  Selda SONGUR DAGLI³

¹Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı, Kırşehir

²Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kırşehir

³Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Kırşehir

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to determine the prevalence of fear of childbirth (FOC) during pregnancy and to investigate the factors affecting FOC in pregnant women.

Materials and Methods: This cross-sectional study included 150 pregnant women who admitted to Kırşehir Ahi Evran University Faculty of Medicine Gynecology and Obstetrics Polyclinic between January-March 2019. It was carried out using W-DEQ Scale and General Information Form prepared by the researchers.

Results: Fear of childbirth in the whole group was found to be 50.97±25.773 according to W-DEQ score. The mean age and gestational week of the pregnant women were 27.8±6.072 years and 27.16±10.788 weeks, respectively. FOC was determined in 18.7% of the participants (W-DEQ≥85). Parity (p=0.047) and a concern of disorder in the baby after delivery (p=0.004) were identified to be significant factors for FOC. No association was found between FOC and maternal age, gestational week or delivery mode (p>0.05). The rate of receiving training about pregnancy and the level of trust in healthcare professionals about the birth process were found to be low.

Conclusion: The prevalence of training about pregnancy and the level of trust to healthcare staff related with childbirth process may be associated with each other. Thus, it is recommended to provide trainings to reduce the fears that may occur during pregnancy and to elevate the knowledge about pregnancy process by the Polyclinic of Gynecology and Obstetrics.

Keywords: tokophobia, prevalence, pregnant, predictor, fear of childbirth

ÖZ

Amaç: Bu çalışmanın amacı, gebelerde doğum korkusu prevalansını belirlemek ve gebelikte doğum korkusuna etki eden faktörleri araştırmaktır.

Naime Meric KONAR

Kırşehir Ahi Evran University,
Faculty of Medicine, Department of
Biostatistics and Medical Informatics,
40100, Kırşehir, TURKEY

E-posta: nmerickonar1@gmail.com

 <https://orcid.org/0000-0002-6593-7617>

Gereç ve Yöntem: Bu kesitsel çalışma Ocak ve Mart 2019 arasında Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniği'ne başvuran ve çalışmaya katılmayı kabul eden 150 gebe ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma, W-DEQ Doğum Korkusu Ölçeği ve araştırmacılar tarafından oluşturulan Genel Bilgi Formu ile yürütülmüştür.

Bulgular: Tüm grupta, W-DEQ skoruna göre gebelikte doğum korkusu düzeyi $50,97 \pm 25,773$ olarak elde edilmiştir. Yaş ve gebelik haftası sırasıyla $27,8 \pm 6,072$ yıl ve $27,16 \pm 10,788$ hafta olarak bulunmuştur. Çalışmaya katılan gebelerin %18,7'sinde korku varlığı saptanmış (W-DEQ ≥ 85), gebelik sayısı ($p=0,047$) ve bebekte doğum sonrasında bir rahatsızlık oluşacağı düşüncesi ($p=0,004$) korku düzeyini etkileyen faktörler olarak bulunmuştur. Doğum korkusu ile anne yaşı, gebelik haftası ve doğum tipi arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p>0,05$). Gebelik ile ilgili eğitim alma oranı ve doğum süreci ile ilgili sağlık personeline duyulan güven düzeyi düşük bulunmuştur.

Sonuç: Gebelik ile ilgili eğitim alma oranı ve doğum süreci ile ilgili sağlık personeline duyulan güven düzeyi birbiri ile ilişkili olabilir, bu nedenle Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniği tarafından gebelik süresince oluşacak korkunun azaltılabilmesi ve gebelikle ilgili bilgilerin artırılması için gerekli eğitimlerin verilmesi önerilmektedir.

Anahtar Sözcükler: tokofobi, prevalans, gebe, risk faktörü, doğum korkusu

Tokophobia has been defined as a psychological phenomenon in the pregnant women who feel intense fear of childbirth (FOC) (1). Even though pregnancy is a milestone in the lives of the women, it is also accompanied with many fears about the pregnancy process, worry about baby death during childbirth, worry about occurrence of potential complications during childbirth, worry about presence of genetic disorder in the baby, feeling unconfident about healthcare staff, worry about physical conditions of the hospital, worry about being alone during childbirth, deficiency of adequate information about childbirth, feeling unprepared for unplanned pregnancy and deficiency of familial or spousal support during childbirth (2 – 4).

The studies have shown that the prevalence of FOC in the pregnant women ranges between the countries. Its prevalence varies between 1.9% and 14.2% in the European countries (5) while that was found to be 31.1% in Australia (6). The global prevalence of tokophobia was detected to be 14% according to the results of a meta-analysis involving 29 studies and 853 988 subjects (7). The results of BIDEN study that comprised Belgium, Iceland, Denmark, Estonia, Norway and Sweden showed that the primiparous pregnant women with the lowest and the highest prevalence of tokophobia were reported respectively in

Belgium (4.5%) and Estonia (15.6%) while the multiparous pregnant women with the lowest and the highest prevalence of tokophobia were reported respectively in Iceland (7.6%) and Sweden (15.2%) (8). Beside this, the prevalence of tokophobia were assessed to be 19.29% (9), 9.1% (10), 42.9% (11), 9.5% (12) and 15.6% (13) in United States of America, Canada, Iran, Italy and Turkey, respectively. The evidence from the mentioned studies demonstrated that pregnant women preferred giving childbirth via cesarean delivery rather than vaginal delivery because of the high prevalences of global FOC.

Numerous studies reported various risk factors related to FOC over the years, including low educational level, unemployment, lack of social support (2), previous negative delivery experience, voluntary infertility, postpartum depression, obstetric complications, low self-esteem (3) and miscarriages (4). Moreover, self-efficacy and trait anxiety level were recorded as psychosocial predictors for Turkish pregnant sample (14) On the other hand, another study that was held in Turkey reported unplanned pregnancies and lack of knowledge as related factors of FOC (15).

The purposes of the present study are primarily to investigate the relationship between FOC with maternal

age, delivery mode, gestational week and to determine the factors affecting FOC and to determine the prevalence of FOC in randomly selected pregnant women. The research questions for this study can be listed as follows:

- What is the prevalence of FOC in unselected pregnant women in Kırşehir Province, Central Anatolia Region, Turkey?
- Is FOC related to maternal age, delivery mode and gestational week in this pregnant group?
- What are the risk factors of FOC in this unselected group?

MATERIAL and METHODS

This cross-sectional study included 150 pregnant women that accepted to participate the study among those who applied to Kırşehir Ahi Evran University Faculty of Medicine Gynecology and Obstetrics Polyclinic between January-March 2019. Inclusion and exclusion criteria were defined as the pregnant women over and below 18 years of age, respectively. W-DEQ (Wijma Delivery Expectancy Questionnaire) Scale was used to assess FOC in the pregnant women while the factors affecting FOC were determined using the General Information Questionnaire prepared by the researchers based on the review of the current literature. The form includes questions regarding sociodemographic (age, educational level, occupation) as well as obstetric (unplanned pregnancy, fear of bleeding during delivery, concern for disorder in baby after delivery) and social-related (social-media effect, fear of not being able to return to former social life after delivery) questions. The questions /risk factors in the form were prepared as up-to-date as well as different from existing literature. In this way, it is aimed to bring in originality to this research. The W-DEQ is a 6-point Likert scale questionnaire comprising 33 questions whose total score ranges between minimum 0 and maximum 165 points [16]. Some of the questions in the scale (2, 3, 6, 7, 8, 11, 12, 15, 19, 20, 24, 25, 27 and 31) are reverse-scored in calculation of the sum score to make them compatible with other questions. Higher W-DEQ Scores indicate more severe level of FOC. The original W-DEQ scores can be classified as mild, moderate, severe and clinical if the scores are ≤ 37 , between '38-64', '65-84' and ≥ 85 , respectively. Widely accepted cut-

off value of this scale is 85, and this value is used as a threshold value in the current study. Hence, even though four different category can be formed, the classifications in this current study are based classical cut-off value ($W-DEQ \geq 85$) and two different categories were created in this research. The form and the scale were applied to participants during the polyclinic appointment. Participants were informed about this study via printed Consent Form, which was given with W-DEQ Scale and General Information Form. This study was conducted with the volunteer participants who gave the consent. Some participants did not answer all of the questions in the form, and it yielded missing values as a result. Questions, which have missing values, were indicated below the tables. The validity and reliability studies of the Turkish version of W-DEQ Scale were carried out by Korukcu et al. (17). Cronbach's Alpha coefficient of the present study was found to be 0.884. The present study was approved by The Non-interventional Clinical Research Ethics Committee of Kırşehir Ahi Evran University Faculty of Medicine with Approval Date: 08-01-2019 and Approval Number: 2019-01/11.

Statistical Analysis

The quantitative variables were expressed as mean and standard deviation while categorical variables were presented in terms of frequency and percentage (%) values. The normality assumption was tested by Kolmogorov-Smirnov Test. For normally-distributed variables (variables with normality test result have $p > 0.05$), Independent Samples t-test and the one-way analysis of variance (ANOVA) were used for the comparison between the independent groups while Chi-Square test was used for analysis of the categorical variables. Multiple binary logistic regression analysis was used to determine factors affecting FOC, Odds Ratios (OR) and their 95% Confidence Intervals (CI) were reported. Variables with a p value less than 0.20 in the univariate regression analysis was used in the final regression analysis. Backward Wald method was implemented as the variable selection method. The discrimination power of the regression model was determined via Area Under Curve (AUC) statistic and its 95% Confidence Interval (CI). Cronbach's alpha coefficient was calculated to determine the internal consistency

coefficient. $p < 0.05$ value was accepted as statistically significant in all the statistical analyses. All analyses were performed using the R software (3.6.1).

RESULTS

The study included 150 pregnant women that accepted to participate and completed the scales/questionnaire. The overall FOC was found to be 50.97 ± 25.773 while mean age and gestational week of the

pregnant women were 27.8 ± 6.072 years and 27.16 ± 10.788 weeks, respectively. Prevalence of FOC was determined as 18.7% of the participants ($W-DEQ \geq 85$). Most of the pregnant women (82%) were found to be below 35 years of age, in the 3rd trimester (59%) as gestational week, nulliparous (40%) and receiving no training about pregnancy (91.3%). The basic descriptive statistics of the participants were presented in Table 1

Table 1. Socidemographic and clinical characteristics of the study sample

Variable	n	%	
Education*	Primary	23	15.4
	Secondary	26	17.5
	High School	60	40.3
	University / College	40	26.8
Occupation	Housewife	109	72.6
	Employee	7	4.7
	Officer	28	18.7
	Self-employment	6	4.0
Planned Pregnancy	Yes	89	59.3
	No	61	40.7
Parity	1	59	39.3
	2	43	28.7
	3	31	20.7
	4+	17	11.3
Number of Alive Children	0	60	40.0
	1	52	34.7
	2	27	18.0
	3+	11	7.3
Having any problem during this current pregnancy	Yes	27	18.0
	No	123	82.0
Receiving training programs about pregnancy process for this current pregnancy	Yes, I did	10	6.7
	Yes, I'm taking	3	2.0
	No	137	91.3
Fear of unqualified healthcare staff	Yes	89	59.3
	No	61	40.7
Fear of inability to return to previous social life after childbirth*	Yes	46	31.7
	No	99	68.3

Fear of not being able to provide the optimal life standard for your baby*	Yes	70	48.6
	No	74	51.4
Fear of abundant bleeding during delivery*	Yes	69	48.3
	No	74	51.7
Fear of any disorder (Down syndrome, mental retardation etc.) after the delivery in your baby*	Yes	92	63.4
	No	53	36.6
Fear of chemicals that you have had before the pregnancy or during the pregnancy to cause damage on your baby*	Yes	44	30.3
	No	101	69.7
Having any problems on former pregnancies**	Yes	26	28.9
	No	64	71.1
Does social media effect increase your fear?*	Yes	66	44.0
	No	84	56.0

*: Questions were not answered by all pregnant women. Hence, they have missing values.

** : Sample size in this question indicates number of pregnant women who have former pregnancies.

According to the results of the group comparisons, higher FOC Scores were encountered in the pregnant women below 35 years of age (early pregnancy), 3rd trimester and those with a previous childbirth via cesarean delivery in the history whereas similar tokophobia levels were identified regarding maternal age ($\chi^2=0.293$; p value= 0.74), gestational week ($\chi^2=0.908$; p value= 0.635) and delivery type ($\chi^2= 3.334$; p value= 0.189)

The group comparisons demonstrated that FOC scores were statistically significantly higher in the pregnant women with fear of inability to return to previous social life after childbirth (p=0.038), fear of abundant bleeding during

childbirth (p=0.004), those who reported the impact of the information about childbirth process obtained from social media (p=0.002) and worried about any disorder in baby after delivery (p<0.001). Besides, high FOC scores were identified in the university-graduate pregnant women, working pregnant women and those with no experience of complication in her previous pregnancy and unplanned pregnancy. Although no statistically significant difference was detected between the groups regarding these mentioned variables, it would be possible to evaluate the differences between the groups with respect to clinical aspects (Table 2).

Table 2. Results of W-DEQ score comparisons across groups

Variable	Mean \pm SD		p-value
Education	Primary	50.7 \pm 23.511	0.920
	Secondary	49.58 \pm 23.82	
	High School	49.42 \pm 26.048	
	University / College	52.9 \pm 27.158	
Occupation	Housewife	49.08 \pm 24.742	0.538
	Employee	57.43 \pm 35.123	
	Officer	55.43 \pm 27.208	
	Self-employment	57 \pm 28.341	
Planned Pregnancy	Yes	47.84 \pm 25.267	0.072
	No	55.54 \pm 26.028	
Parity	1	50.41 \pm 27.732	0.073

18 Prevalence and predictors of fear of childbirth

	2	56.51 ± 25.347	
	3	41.48 ± 25.309	
	4+	56.24 ± 28.166	
Number of Alive Children	0	50.08 ± 24.65	0.588
	1	53.6 ± 27.393	
	2	46.04 ± 25.901	
	3+	55.55 ± 24.736	
Having any problem during this current pregnancy	Yes	48.37 ± 26.101	0.564
	No	51.54 ± 25.773	
Having training programs about pregnancy process for this current pregnancy	Yes, I did	47.1 ± 27.791	0.866
	Yes, I'm taking	48 ± 29.513	
	No	51.32 ± 25.737	
Fear of unqualified healthcare staff	Yes	51.9 ± 25.849	0.597
	No	49.62 ± 25.815	
Fear of inability to return to previous social life after childbirth	Yes	57.76 ± 25.167	0.038*
	No	48.19 ± 25.827	
Fear of not being able to provide the optimal life standard for your baby	Yes	49.76 ± 26.613	0.485
	No	52.8 ± 25.473	
Fear of abundant bleeding during delivery	Yes	57.97 ± 26.18	0.004*
	No	45.68 ± 24.332	
Fear of any disorder (Down syndrome, mental retardation etc.) after the delivery in your baby	Yes	58.33 ± 26.062	<0.001**
	No	38.91 ± 20.687	
Fear of chemicals that you'd had before the pregnancy or during the pregnancy to cause damage on your baby	Yes	51.3 ± 32.53	0.986
	No	51.2 ± 22.637	
Maternal Age	Early Pregnancy (Age < 35)	51.23 ± 25.742	0.448
	Late Pregnancy (Age ≥ 35)	46.83 ± 26.455	
Gestational Week	First Trimester	49.90 ± 18.558	0.679
	Second Trimester	48.05 ± 27.012	
	Third Trimester	52.36 ± 26.694	
Delivery Mode	Formerly cesarean – current mode will be cesarean	53.04 ± 29.052	0.786
	Nulliparous	50.08 ± 24.65	
	Formerly vaginal	49.73 ± 23.448	
Does social media effect increase your fear?	Yes	58.29 ± 26.726	0.002*
	No	45.23 ± 23.602	
Having any problems on former pregnancies	Yes	44.65 ± 29.463	0.117
	No	54.38 ± 25.07	

*:p<0.05; **:p<0.001

Multiple binary logistic regression analysis model was developed to assess the factors related to FOC. Parity (parity: 3 vs parity: 2) (p -value=0.047) and fear for development of a postnatal disorder in baby (p -value=0.004) were reported as the factors affecting FOC in

the pregnant women. The discriminative ability of the model was determined to be AUC = 0.753 (95% CI= 0.651–0.855). The results of the regression analysis were presented in the Table 3.

Table 3. Results of multiple logistic regression analysis

Variable	β	Standard Error (β)	Odds Ratio	p-value	95% Confidence Interval for Odds Ratio	
					Lower	Upper
Parity: 2 (Reference Category)	-	-	1.00	-	-	-
Parity: 3	-1.299	0.655	0.273	0.047	0.076	0.985
Parity: 4+	0.774	0.724	2.169	0.285	0.525	8.965
Fear of Disorder in Baby	2.076	0.725	7.971	0.004	1.924	33.023
Constant	-2.253	0.717	0.105	0.002	-	-

DISCUSSION

The prevalence of FOC (W -DEQ \geq 85) was obtained to be 18.7% in our study. This prevalence was lower than those of FOC identified in the studies performed in USA (9), Iran(11), Australia (6) and Malawi(18) whereas it was higher than prevalences ranging between 4.5% and 15.6% reported in the other studies (8, 12, 13).

In our study, no statistically significant association was found between the scores of FOC and gestational week, maternal age and delivery mode. Similarly, some other studies in the literature have determined insignificant associations between the scores of FOC and gestational week (19, 20), mode of delivery (2, 3), and maternal age (2, 18, 20, 21) with the outcomes of the present study. On the other hand, there are also some studies in the literature that have found the scores of FOC related with gestational week (22) and mode of delivery (18, 22). The multiparous women were ascertained to have a higher level of FOC compared with the nulliparous women. Similar (20, 23) and different (3, 21, 24, 25) findings have been reported in literature in this regard.

In the present study, high level of FOC was found to be associated with impact of social media, fear of inability to return to previous social life after childbirth, concerns

about abundant bleeding during childbirth, consideration about development of a postnatal disorder in baby. In addition to these, several factors such as prolonged childbirth process, use of forceps and vacuum extractor (19), reduction in social and familial support (8, 26, 27) were also recorded to be associated with higher FOC scores.

According to the regression analysis model developed in the study; parity and consideration about development of a postnatal disorder in baby were determined to be factors affecting FOC in rural area of Turkey. Differently from this result, no significant correlation was monitored between FOC and parity whereas tokophobia was identified to be significantly related with presence of health problem and training status about childbirth in the prenatal period in a study conducted in Turkey (28). The previous studies have specified the factors affecting FOC such as number of the previous births and the factors associated with the previous labor pains(19), CES-D (Center for Epidemiological Studies Depression Scale) scores (1), preferred delivery mode, adequate financial income, nonparticipation to preparation training courses for childcare (2), unplanned pregnancy, the first painful sexual intercourse, physical activity shorter than 30 minutes per week and low health level (20).

Additionally, there are also some studies in the literature that evaluated the moods experienced by the pregnant women during pregnancy in Turkey. One study in Turkey has stated that the pregnant women have high levels of anxiety (29), while the other study has investigated the impact of the preparation training courses for childbirth on tokophobia and reported that no significant difference was encountered between the degrees of FOC in the pregnant women before and after the preparation-training course (30).

The results of the present study has shown that approximately 1 out of 5 (18.7%) pregnant women had clinical level of FOC. The highest level of FOC were documented in pregnant women with a consideration of a disorder after delivery in the baby. Nonetheless, lowest level of FOC were encountered in the pregnant women without such consideration.

The present study has some limitations. The primary limitations of the study are its single-center and questionnaire - based study design. Therefore, possible bias due to those types of study designs should be beard in mind. Nevertheless, more reliable evidence can be obtained by larger sampling sizes. Moreover, the design of this study is cross-sectional therefore; casual relationships could not be analyzed. Hence, the associations found in this study cannot be assessed as in the form of casual nature. Further researches should be performed in order to examine that kind of relationship. On the other hand, to the best of our knowledge, it is the first study to determine the FOC prevalence of unselected pregnant women in Kirsehir, Turkey. This current study could also be considered as unique in identifying the related factors of FOC in Kirsehir province. Furthermore, for the first time, relationships between FOC and different risk factors from the existing literature were investigated in the present study. In this aspect, this research could also be thought as unique.

In conclusion, a comprehensive study was conducted on the factors affecting FOC and the prevalence of participation to the trainings related with pregnancy process was found very low while the level of the confidence to the healthcare staff related with childbirth process was determined to be lower than expected. Since it

may be estimated that those with low level of knowledge about pregnancy and childbirth processes feel less confidence to the healthcare staff, it can be supposed that these two circumstances may be associated with each other. Thus, various training courses can be organized in order to reduce the potential tokophobia that may develop during pregnancy and to elevate the knowledge level about childbirth and pregnancy process in the pregnant women. In the current study, neither the relationship between FOC and quality life of pregnant women nor their anxiety levels of unselected pregnant women and their possible effects on FOC were investigated. Therefore, such relationships along with the determination of the risk factors of FOC should be included into the further studies for the better evaluation of the topic. Moreover, it is recommended to carry out multi-centered research studies to assess the prevalence of tokophobia in the pregnant women more precisely.

REFERENCES

1. Demšar K, Svetina M, Verdenik I, Tul N, Blickstein I, Velikonja VG. Tokophobia (fear of childbirth): prevalence and risk factors. *J Perinat Med.*2018;46:151-54.
2. Beiranvand SP, Moghadam ZB, Salsali M, Majd HA, Birjandi M, Khalesi ZB. Prevalence of fear of childbirth and its associated factors in primigravid women: A cross-sectional study. *Shiraz E Med J.* 2017;18.
3. Phunyammalee M, Buayaem T, Boriboonhirunsarn D. Fear of childbirth and associated factors among low-risk pregnant women. *J Obstet Gynaecol Res.*2019;39:763-67.
4. Calderani E, Giardinelli L, Scannerini S, Arcabasso S, Compagno E, Petraglia F, et al. Tocophobia in the DSM-5 era: Outcomes of a new cut-off analysis of the Wijma delivery expectancy/experience questionnaire based on clinical presentation. *J Psychosom Res.*2019;116:37-43.
5. Ayers S. Fear of childbirth, postnatal post-traumatic stress disorder and midwifery care. *Midwifery.* 2014;30:145-48.

6. Haines H, Pallant, JF, Karlström A, Hildingsson, I. Cross-cultural comparison of levels of childbirth-related fear in an Australian and Swedish sample. *Midwifery*. 2011;27:560-67.
7. O'Connell MA, Leahy-Warren P, Khashan AS, Kenny LC, O'Neill SM. Worldwide prevalence of tocophobia in pregnant women: systematic review and meta-analysis. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2017;96:907-20.
8. Lukasse M, Schei B, Ryding EL. Prevalence and associated factors of fear of childbirth in six European countries. *Sex Reprod Healthc*. 2014;5:99-106.
9. Lowe NK. Self-efficacy for labor and childbirth fears in nulliparous pregnant women. *J Psychosom Obstet Gynaecol*. 2000;21:219-24.
10. Spice K, Jones SL, Hadjistavropoulos HD, Kowalyk K, Stewart SH. Prenatal fear of childbirth and anxiety sensitivity. *J Psychosom Obstet Gynaecol*. 2009;30:168-74.
11. Matinnia N, Faisal I, Hanafiah Juni M, Herjar A, Moeini B, Osman Z. Fears related to pregnancy and childbirth among primigravidae who requested caesarean versus vaginal delivery in Iran. *Matern Child Health J*. 2015;19:1121-30.
12. O'Connell MA, Leahy-Warren P, Kenny LC, O'Neill SM, Khashan AS. The prevalence and risk factors of fear of childbirth among pregnant women: A cross-sectional study in Ireland. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2019;98:1014-23.
13. Aksoy AN, Ozkan H, Gundogdu G. Fear of childbirth in women with normal pregnancy evolution. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2015;42:179-83.
14. Çıtak Bilgin N, Coşkun H, Coşkuner Potur D, İbar Aydın E, Uca E. Psychosocial predictors of the fear of childbirth in Turkish pregnant women. *J Psychosom Obstet Gynaecol*. 2020;1-9. doi: 10.1080/0167482X.2020.1734791.
15. Kaya D, Evcili F. The affecting factors of childbirth fear for pregnant women admitted to a health center and university hospital in Turkey. *J. Health Res*. 2020;34:393-97.
16. Wijma K, Wijma B, Zar M. Psychometric aspects of the W-DEQ; a new questionnaire for the measurement of fear of childbirth. *J Psychosom Obstet Gynaecol*. 1998;19:84-97.
17. Korukcu O, Kukulu K, Firat MZ. The reliability and validity of the Turkish version of the Wijma Delivery Expectancy/Experience Questionnaire (W-DEQ) with pregnant women. *J. Psychiatr. Ment. Health Nurs* 2012;19:193-202.
18. Khwepeya M, Lee GT, Chen SR, Kuo SY. Childbirth fear and related factors among pregnant and postpartum women in Malawi. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2018;18:391.
19. Mazúchová L, Škodová Z, Kelčíková S, Rabárová A. Factors Associated with Childbirth-Related Fear among Slovak Women. *Cent. Eur. J. Nurs. Midwifery*. 2017;8:742-48.
20. Mortazavi F, Agah J. Childbirth fear and associated factors in a sample of pregnant Iranian women. *Oman Med J*. 2018;33:497-505.
21. Nieminen K, Stephansson O, Ryding EL. Women's fear of childbirth and preference for cesarean section—a cross-sectional study at various stages of pregnancy in Sweden. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2009;88:807-13.
22. Rouhe H, Salmela-Aro K, Halmesmäki E, Saisto, T. Fear of childbirth according to parity, gestational age, and obstetric history. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 2009;116:67-73.
23. Larsson B, Karlström A, Rubertsson C, Hildingsson I. The effects of counseling on fear of childbirth. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2015;94:629-36.
24. Adams SS, Eberhard-Gran M, Eskild A. Fear of childbirth and duration of labour: a study of 2206

- women with intended vaginal delivery. BJOG.2012;119:1238-46.
25. Toohill J, Fenwick J, Gamble J, Creedy DK. Prevalence of childbirth fear in an Australian sample of pregnant women. BMC Pregnancy Childbirth.2014;14:275.
 26. Saisto T, Halmesmäki E. Fear of childbirth: a neglected dilemma. Acta Obstet Gynecol Scand.2003;82:201-8.
 27. Laursen M, Hedegaard M, Johansen C. Fear of childbirth: predictors and temporal changes among nulliparous women in the Danish National Birth Cohort. BJOG. 2008;115:354-60.
 28. Körükcü Ö, Deliktaş A, Aydın R, Kabukcuoğlu K. Gebelikte psikososyal sağlık durumu ile doğum korkusu arasındaki ilişkinin incelenmesi. Clin Exp Health Sci.2017;7:159-65.
 29. Sel G, Barut A, Solak S, Uslu S, Gedik Y, Uzunoğlu S, et al. Gebelerde anksiyeteye etkisi bulunan faktörler. STED.2019;28:334-39.
 30. Mete S, Çiçek Ö, Aluş Tokat M, Çamlıbel M, Uludağ E. Doğuma Hazırlık Sınıflarının Doğum Korkusu, Doğum Tercihi ve Doğuma Hazır Oluşluğa Etkisi. Türkiye Klinikleri J Nurs Sci. 2017;9:201-6.

2009-2018 arasında Türkiye'de intihar hızı ve ilişkili özellikler

THE CRUDE INCIDENCE RATE OF SUICIDE AND RELATED FACTORS IN TURKEY BETWEEN 2009 AND 2018

 Elif Nur YILDIRIM ÖZTÜRK¹,  Mustafa ÖZTÜRK²

¹Konya Akşehir İlçe Sağlık Müdürlüğü

²Konya Akşehir Devlet Hastanesi

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada 2009-2018 yılları arasında Türkiye'de meydana gelen intiharların tanımlanması ve on yıllık süreç içindeki eğilimin incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Araştırma tanımlayıcı türde bir epidemiyolojik çalışmadır. Araştırmada veri kaynağı olarak Türkiye İstatistik Kurumu'nun yayımladığı intihar ve Türkiye geneli nüfus konulu istatistiklerden 2009-2018 yılları arasında ait olanlar kullanılmıştır. Araştırmada ilgili yıla ait nüfus, intihar sayısı, ülke genelinde ve illere göre kaba intihar hızı, intihar yöntemi, intihar nedeni, yaş grupları, cinsiyet, eğitim durumu, yasal medeni durum, mevsim ve yıl değişkenleri kullanılmıştır. Verilerin özetlenmesinde frekans dağılımları ve yüzdeliklerden yararlanılmıştır. Kategorik veriler arası ilişkiler Ki-kare testi ile değerlendirilmiş olup $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular: 2009 yılı için kaba intihar hızı yüz binde 4,02 iken; 2018 için 3,88'dir. On yıllık süreçte intiharların en sık gözlemlendiği cinsiyet erkek ve en sık gözlemlendiği yaş aralığı 15-24'tür. En sık kaydedilen intihar nedeni, "neden bilinmiyor"dur. Bilinen nedenler arasında ilk sırada hastalık yer almaktadır. En sık başvurulan yöntem asıdır. İntiharların en sık izlendiği mevsimler ilkbahar ve yazdır.

Sonuç: Türkiye'nin kaba intihar hızı on yıllık süreç içerisinde yüz bin kişide 3,50-4,00 arasında değerler almıştır.

Anahtar Sözcükler: intihar, kaba intihar hızı, halk sağlığı

ABSTRACT

Objective: The aim of this study is to define suicides that occurred in Turkey between 2009 and 2018 and to examine the trend in the ten-year period.

Materials and Methods: The research is a descriptive epidemiological study. Suicide and population statistics that is published between the years 2009-2018 by Turkey Statistical Institute is used as a data source in the study. In the research, the population of the relevant year, number of suicides, crude suicide rate of the country and provinces, suicide method, suicide reason, age groups, gender, education level, legal marital status, season and year variables are used. Frequency distributions and percentages are used to summarize the data.

Elif Nur YILDIRIM ÖZTÜRK

Akşehir İlçe Sağlık Müdürlüğü
Seyran Mah. Sağlık Sok. No: 12/2
Akşehir/Konya
E-posta: elifnyildirim@hotmail.com

 <https://orcid.org/0000-0003-1447-9756>

Relationships between categorical data are evaluated using the Chi-square test and $p < 0.05$ is considered significant.

Results: The crude suicide rate for 2009 is 4.02 per hundred thousand; for 2018, it is 3.88. The gender most frequently observed in suicide during the ten-year period is male and the most common age range is 15-24. The most frequently recorded cause of suicide is "unknown". Among the known causes, the disease ranks first. The most commonly used method is hanging. The seasons in which suicides are most frequently watched are spring and summer.

Conclusion: Turkey's crude suicide rate has taken values between 3.50 and 4.00 per hundred thousand people in ten-year period.

Keywords: Suicide, crude suicide rate, public health.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), şiddeti kişinin kendisine yönelik şiddet, kişiler arası şiddet ve gruplar arası şiddet olarak üç grupta ele almaktadır. Kendine yönelik şiddet kavramı içerisinde intihar, intihar girişimi ve kişinin kasıtlı olarak kendini yaralama davranışı bulunmaktadır (1). İntihar; kişinin istemli olarak yaşamına son vermesi olup, bireyin kendisine yönelmiş bir saldırganlık ve yok etme eylemi olarak tanımlanmaktadır (2).

İntihar önemli ve öncelikli bir halk sağlığı sorunudur. Her yıl yaklaşık sekiz yüz bin insan intihar nedeniyle yaşamını kaybetmektedir. Bu rakam her kırk saniyede bir kişinin intihar nedeniyle kaybedilmesi anlamına gelmektedir. Ayrıca her ölümlerle sonuçlanan intihara karşılık, yirmi intihar girişimi yaşanmaktadır (3). İntihardan ölümler Dünya çapında tüm yaş grupları için 18. sıklıkta (3); 15-29 yaş grubu için 2. sıklıktadır (4). 2016 yılı için Dünya genelinde kaba intihar hızı her iki cinsiyet için yüz binde 10,6, erkeklerde 13,5 ve kadınlarda 7,7 olarak açıklanmıştır (5). Türkiye'de 2017 yılı için kaba intihar hızı yüz binde 3,94 ve 2018 yılı için 3,88'dir (6).

Bir kişinin intihar girişiminde bulunmasında rol oynayan faktörler çeşitlidir. Bu faktörler; bireysel etkenler, ilişki durumları, toplumsal ve sosyal faktörlerin bir kombinasyonundan meydana gelir. Genç yaşta olmak, yalnız (bekâr veya boşanmış) olmak, birini/bir şeyi kaybetmek, işsizlik ve kötü ekonomik durum, ailede intihar öyküsü, ailede çocuklara kötü davranma öyküsü, önceki intihar girişimleri, başta depresyon olma üzere psikiyatrik hastalıklar, alkol ve madde bağımlılığı, alkol ve madde bağımlılığına bağlı damgalanma, umutsuzluk, dürtüsel veya agresif eğilimler, kültürel ve dini inanışlar,

yerel intihar salgınları, diğer insanlardan izolasyon, psikiyatrik hastalık tedavisine erişim sorunları, tedavisi zor olan veya mümkün olmayan bedensel hastalık sahibi olmak, kronik ağrı, ölüm yöntemlerine kolaylıkla erişebilme bu faktörlerdendir (7, 8).

Dünya çapında intiharların yaklaşık olarak %20'si kırsal tarım alanlarında meydana gelen pestisit ilişkili olgulardır. Ası ve ateşli silah kullanımı ise diğer yaygın intihar yöntemleridir (7).

Bu çalışmada 2009-2018 yılları arasında Türkiye'de meydana gelen intiharların tanımlanması ve on yıllık süreç içindeki eğilimin incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırma kamuya açık sunulan veriler aracılığıyla yapılmış olan tanımlayıcı türde bir epidemiyolojik çalışmadır.

Araştırma kapsamında kullanılan veriler bütün kamunun erişimine açık olduğundan ve araştırma sürecinde insanla doğrudan temas bulunmadığından etik veya resmi herhangi bir izin alınmamıştır.

Araştırmada veri kaynağı olarak Türkiye İstatistik Kurumu'nun (TÜİK) yayımladığı intihar ve Türkiye geneli nüfus konulu istatistiklerden 2009-2018 yılları arasına ait olanlar kullanılmıştır (6, 9). TÜİK'in yayımladığı intihar istatistiklerinden araştırmanın yapıldığı tarihte en son yayımlanmış olanın tarihi 2018'dir. On yıllık eğilimi izleyebilmek amacıyla 2009 – 2018 yılları arasına ait veriler araştırmaya dâhil edilerek incelenmiştir.

Araştırmada ilgili yıla ait nüfus, intihar sayısı, ülke genelinde ve illere göre kaba intihar hızı, intihar yöntemi,

intihar nedeni, yaş grupları, cinsiyet, eğitim durumu, yasal medeni durum, mevsim ve yıl değişkenleri kullanılmıştır. Kullanılan veri içinde intihar yöntemleri asi, kimyasal madde kullanma, yüksekten atlama, suya atlama, ateşli silah, kendini yakma, kesici alet, doğalgaz-tüpgaz kullanma, motorlu aracın önüne atlama ve diğer olarak; intihar nedenleri hastalık, aile geçimsizliği, geçim sıkıntısı, ticari başarısızlık, gönül ilişkisi, öğrenim başarısızlığı ve neden bilinmiyor olarak gruplanmıştır. Yaş grupları 15 yaş altı, 15 – 19, 20 – 24, 25 – 29, 30 – 34, 35 – 39, 40 – 44, 45 – 49, 50 – 54, 55 – 59, 60 – 64, 65 – 69, 70 – 74, 75 yaş üzeri ve bilinmeyen şeklinde; cinsiyet kadın ve erkek şeklinde; yasal medeni durum hiç evlenmedi, evli, eşi öldü, boşandı ve bilinmiyor şeklinde belirtilmiştir.

Veri girişi, analiz ve rapor yazım işlemleri bilgisayar ortamında gerçekleştirilmiştir. Verilerin özetlenmesinde frekans dağılımları ve yüzdelliklerden yararlanılmıştır.

Kategorik veriler arası ilişkiler Ki-kare testi ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

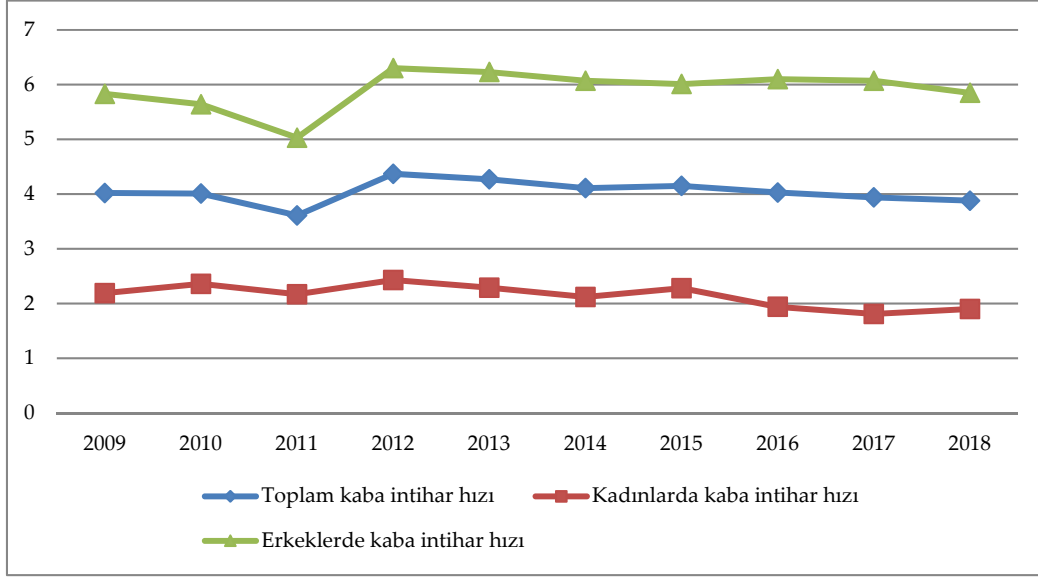
BULGULAR

2018 yılı için toplam intihar eden kişi sayısı 3.161 ve toplam kaba intihar hızı yüz binde 3,88'dir. Yıllara göre nüfus, intihar sayısı ve kaba intihar hızı bilgileri Tablo 1'de ve yıllara göre kaba intihar hızı değişimleri Şekil 1'de sunulmuştur.

On yıllık süreç içinde intiharların en sık izlendiği yaş grubu olarak 15-24 yaş aralığı kaydedilmiştir. Ki-kare testi ile intiharların meydana geldiği yaş grupları ile cinsiyet arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,05$). İntiharların yaş gruplarına ve cinsiyete göre dağılımları Tablo 2'dedir.

Tablo 1. 2009-2018 yılları arasında nüfus, intihar sayısı ve kaba intihar hızı (yüz binde) (6, 9)

Yıllar	İlgili yıla ait yıl ortası nüfus	Toplam intihar sayısı	Toplam kadın intiharları	Toplam erkek intiharları	Toplam kaba intihar hızı	Kadınlarda kaba intihar hızı	Erkeklerde kaba intihar hızı	Ki-kare	p
2009	72.561.312	2.898	787	2.111	4,02	2,19	5,83	0,199	0,656
2010	73.722.988	2.933	860	2.073	4,01	2,36	5,64		
2011	74.724.269	2.677	801	1.876	3,61	2,17	5,03		
2012	75.627.384	3.287	910	2.377	4,37	2,43	6,30		
2013	76.667.864	3.252	870	2.382	4,27	2,29	6,23		
2014	77.695.904	3.169	817	2.352	4,11	2,12	6,07		
2015	78.741.053	3.246	888	2.358	4,15	2,28	6,01		
2016	79.814.871	3.193	767	2.426	4,03	1,94	6,10		
2017	80.810.525	3.168	723	2.445	3,94	1,81	6,07		
2018	82.003.882	3.161	770	2.391	3,88	1,90	5,85		



Şekil 1: Kaba intihar hızının yıllara göre değişimi (2009-2018)

Tablo 2. On yıllık süreçte meydana gelen intiharların yaş gruplarına ve cinsiyete göre dağılımları (2009-2018) (6, 9)

Yaş Grupları	Cinsiyet				Toplam		Ki-kare	p
	Kadın		Erkek		n	%		
	n	%	n	%				
<15	477	5,8	441	1,9	918	3,0	418,439	0,001
15-24	2620	32,0**	4474	19,7	7120	23,0		
25-34	1543	18,8	4794	21,1	6337	20,5		
35-44	1135	13,9	4053	17,8	5188	16,7		
45-54	845	10,3	3649	16,0	4494	14,5		
55-64	628	7,7	2571	11,3	3199	10,3		
65-74	456	5,6	1382	6,1	1838	5,9		
>75	457	5,6	1260	5,5	1717	5,5		
Bilinmeyen*	32	0,4	141	0,6	173	0,6		
Toplam	8193	100,0	22791	100,0	30984	100,0		

*Yaşı bilinmeyenler analize dâhil edilmemiştir. **Farkın kaynaklandığı gruba işaret etmektedir.

İntiharlar yasal medeni duruma göre incelendiğinde; kadınlarda yalnız yaşayanlarda (hiç evlenmedi, eşi öldü, boşandı) ve erkeklerde evli kategorisindekilerde sıklık fazladır. Ki-kare testinde, yalnız yaşayan kadınlarda intihar sıklığının fazla olmasından kaynaklanan bir anlamlılık belirlenmiştir (Tablo 3).

İntiharlar en sık olarak ilköğretim mezunlarında izlenmiştir. Ki-kare testi ile intiharların gerçekleştiği eğitim durumları ile cinsiyet arasında ilköğretim mezunu erkeklerden kaynaklanan anlamlılık bulunmuştur ($p < 0,05$) (Tablo 4).

Tablo 3. On yıllık süreçte meydana gelen intiharların yasal medeni duruma ve cinsiyete göre dağılımları (2009-2018) (6, 9)

Medeni Durum	Cinsiyet				Toplam		Ki-kare	p
	Kadın		Erkek		n	%		
	n	%	n	%				
Yalnız yaşıyor	4491	54,8**	10580	46,4	15071	48,6	167,229	0,001
Evli	3603	44,0	11881	52,1	15484	50,0		
Bilinmiyor*	99	1,2	330	1,4	429	1,4		
Toplam	8193	100,0	22791	100,0	30984	100,0		

*Medeni durumu bilinmeyenler analize dâhil edilmemiştir. **Farkın kaynaklandığı gruba işaret etmektedir.

Tablo 4. On yıllık süreçte meydana gelen intiharların eğitim durumu ve cinsiyete göre dağılımları (2009-2018) (6, 9)

Eğitim Durumu	Cinsiyet				Toplam		Ki-kare	p
	Kadın		Erkek		n	%		
	n	%	n	%				
Okuma yazma bilmeyen	600	7,3	371	1,6	971	3,1	786,533	0,001
Okuma yazma bilen fakat okul bitirmeyen	1063	13,0	1448	6,4	2511	8,1		
İlkokul mezunu	2343	28,6	6759	29,7**	9102	29,4		
Ortaokul-ilköğretim mezunu	2226	27,2	6291	27,6	8517	27,5		
Lise ve dengi okul mezunu	1061	13,0	4596	20,2	5657	18,3		
Yüksek öğretim mezunu	560	6,8	2314	10,2	2874	9,3		
Bilinmeyen*	340	4,1	1012	4,4	1352	4,4		
Toplam	8193	100,0	22791	100,0	30984	100,0		

*Eğitim durumu bilinmeyenler analize dâhil edilmemiştir. **Farkın kaynaklandığı gruba işaret etmektedir.

2009-2018 yılları arası on yıllık süreç içinde en sık intihar nedeni bilinmiyor olarak kaydedilmiştir. Bilinen nedenler arasında hastalık ilk sırada yer tutarken; oransal olarak ticari başarısızlığa bağlı intiharlar erkeklerde, öğrenim başarısızlığına bağlı intiharlar kadınlarda daha sık ortaya çıkmıştır. Ki-kare testinde kadınlarda hastalık nedeniyle ortaya çıkan intiharlara bağlı istatistiksel anlamlılık belirlenmiştir ($p < 0,05$). Tablo 5'te yıllara göre intihar nedenleri ve cinsiyete göre dağılımları ve ki-kare analiz sonucu sunulmuştur.

On yıllık süreç içinde en sık başvurulan üç intihar yöntemi sırasıyla ası, ateşli silah ve yüksekten atlama olarak kaydedilmiştir. Hem kadın ve hem erkek cinsiyet için en sık izlenen üç intihar yöntemi; ası, ateşli silah ve yüksekten atlama olmakla beraber, yüksekten atlama ve kimyasal madde kullanma kadın cinsiyette, ateşli silah ise erkek cinsiyette daha fazladır. İntiharların yöntem ve cinsiyete göre dağılımları arasındaki ilişki ki-kare testi ile araştırıldığında kadınlarda ası sıklığının fazla oluşundan kaynaklı anlamlılık saptanmıştır ($p < 0,05$). Kadın ve erkek cinsiyette intihar yöntem seçimi Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 5. On yıllık süreçte meydana gelen intiharların nedene ve cinsiyete göre dağılımları (2009-2018) (6, 9)

Neden	Cinsiyet				Toplam		Ki-kare	p
	Kadın		Erkek		n	%		
	n	%	n	%				
Bilinmeyen*	4246	51,8	11007	48,3	15253	49,2	825,676	0,001
Hastalık	1932	23,6**	4335	19,0	6267	20,2		
Aile geçimsizliği	741	9,0	1549	6,8	2290	7,4		
Geçim zorluğu	145	9,7	2438	10,7	2583	8,3		
Ticari başarısızlık	9	0,1	399	1,8	408	1,3		
Gönül ilişkisi	279	3,4	795	3,5	1074	3,5		
Öğrenim başarısızlığı	46	0,6	71	0,3	117	0,4		
Diğer	795	9,7	2197	9,6	2992	9,7		
Toplam	8193	100,0	22791	100,0	30984	100,0		

*İntihar nedeni bilinmeyenler analize dâhil edilmemiştir. **Farkın kaynaklandığı gruba işaret etmektedir.

Tablo 6. On yıllık süreçte meydana gelen intiharların yöntem ve cinsiyete göre dağılımları (2009-2018) (6, 9)

Yöntem	Cinsiyet				Toplam		Ki-kare	p
	Kadın		Erkek		n	%		
	n	%	n	%				
Ası	4099	50,0*	11178	49,1	15277	49,3	1304,018	0,001
Ateşli silah	1262	15,4	7014	30,8	8276	26,7		
Yüksekten atlama	1449	17,7	1846	8,1	3295	10,6		
Kimyasal madde kullanma	748	9,1	985	4,3	1733	5,6		
Diğer	635	7,8	1763	7,7	2403	7,8		
Toplam	8193	100,0	22791	100,0	30984	100,0		

*Farkın kaynaklandığı gruba işaret etmektedir.

2009'dan 2018'e intiharların en sık yaşandığı mevsimler ilkbahar ve yazdır. Ki-kare testinde, kadınlarda ilkbahar mevsiminde intiharlara daha sık rastlanmış olmasından kaynaklı farklılık belirlenmiştir ($p<0,05$) (Tablo 7).

2018 yılı için kaba intihar hızının en yüksek olduğu iller Burdur, Isparta ve Muğla'dır. Kaba intihar hızına göre sık intihar yaşanan iller Tablo 8'dedir.

Tablo 7. On yıllık süreçte meydana gelen intiharların mevsimlere ve cinsiyete göre dağılımları (2009-2018) (6, 9)

Mevsimler	Cinsiyet				Toplam		Ki-kare	p
	Kadın		Erkek		n	%		
	n	%	n	%				
İlkbahar	2167	28,4*	6115	26,8	8282	26,7	16,410	0,001
Yaz	2327	26,4	5975	26,2	8302	26,8		
Sonbahar	1899	23,2	5385	23,6	7284	23,5		
Kış	1800	22,0	5316	23,3	7116	23,0		
Toplam	8193	100,0	22791	100,0	30984	100,0		

*Farkın kaynaklandığı gruba işaret etmektedir.

Tablo 8. 2009-2018 yılları arasında intiharların sık izlendiği iller (6, 9)

Yıllar	Kaba intihar hızı en yüksek il (Yüz binde hız)	Kaba intihar hızı en yüksek 2. İl (Yüz binde hız)	Kaba intihar hızı en yüksek 3. İl (Yüz binde hız)
2009	Tunceli (12,98)	Aydın (8,43)	Bilecik (7,59)
2010	Tunceli (16,27)	Karaman (8,18)	Iğdır (8,15)
2011	Ardahan (11,27)	Tunceli (7,42)	Aydın (6,94)
2012	Uşak (8,80)	Ardahan (8,41)	Kastamonu (8,06)
2013	Karaman (9,30)	Ardahan (8,59)	Bingöl (7,58)
2014	Tunceli (11,63)	Bingöl (9,78)	Edirne (8,26)
2015	Kars (9,17)	Ardahan (8,00)	Karaman (7,05)
2016	Tunceli (10,70)	Ardahan (9,11)	Burdur (8,47)
2017	Isparta (9,29)	Tunceli (8,50)	Burdur (7,22)
2018	Burdur (8,23)	Isparta (7,77)	Muğla (7,76)

TARTIŞMA

Türkiye'nin kaba intihar hızının on yıllık süreç içerisinde yüz bin kişide 3,50-4,00 arasında değerler aldığı ancak trend ki-kare analizine göre yıllar arasındaki kaba intihar hızlarında izlenen azalmaların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. 2016 yılı için Litvanya'da kaba intihar hızı yüz binde 31,9 ile Dünya çapındaki en yüksek değere sahiptir. Antigua ve Barbuda isimli ada yüz binde 0,5 ile Dünya'daki en düşük intihar hızına sahiptir. Rusya'da 31, Amerika Birleşik Devletleri'nde 15,3, Hindistan'da 16,3, Çin'de 9,7, Almanya'da 13,6, Fransa'da 17,7, İspanya'da, İtalya'da 8,2, İngiltere'de 8,9, Yunanistan'da 5, İran'da 2,9 ve Mısır'da 4'tür (5). Görüldüğü gibi kaba intihar hızı Dünya'nın değişik yerlerinde farklılıklar göstermektedir. Bu durum öncelikle tutulan intihar kayıt ve istatistiklerinin durumuyla ilişkilendirilebilir. Kayıt ve istatistikler dışında ülkelerin ekonomik durumu, gelişmişlik düzeyi, kültürel yapısı, yaşam tarzları, dini inançları, coğrafik konumu, iklimi ve hava durumu gibi pek çok özelliği, bu hızların belirlenmesinde rol oynuyor olabilir.

On yıllık süreç içinde erkeklerin kadınlara kıyasla 2-3 kat daha fazla intihar ettikleri belirlenmiştir. Tamamlanmış intihar oranlarının erkeklerde ve intihar girişimi oranlarının kadınlarda daha yüksek olduğu bilinmektedir (10, 11). Bu durum ülkemizin toplumsal cinsiyet eşitsizliğinin hâkim olduğu bir yapısı olmasıyla ve

bu yapının kadınlar kadar erkeklerin sağlığını da olumsuz etkilemesiyle açıklanabilir (12, 13). Ayrıca Dünya çapında erkekler arasında cinayet gibi şiddet olaylarına bağlı ölümlerin yaygın olduğu bir gerçektir (14). İntihar da şiddetin bireyin kendisine yönelmiş bir türü olduğundan, erkeklerin şiddete daha eğilimli oldukları ve bu nedenle daha yüksek intihar oranlarına sahip oldukları da söylenebilir.

Ülkemizde on yıllık süreç içinde bilinen nedenler içerisinde en sık kaydedilen intihar nedenleri hastalık, geçim sıkıntısı ve aile geçimsizliğidir. Burada hastalık olarak geçen ifadenin başta depresyon olmak üzere intihara yol açabilecek psikiyatrik bir hastalık mı olduğu; tedavisi zor olan veya mümkün olmayan bedensel bir hastalık mı olduğu veya kişinin kendi hastalığı mı sevdiği/yakın gördüğü birinin hastalığı mı olduğu açık değildir. Her iki türlü hastalık durumunun da intiharı artırıcı etkileri olduğu bildirilmiştir (7, 8, 15). Hastalık, geçim sıkıntısı ve aile geçimsizliği, kişileri umutsuz ve çaresiz bir ruh haline sokarak intihara sebebiyet veriyor olabilir.

Türkiye'de on yıllık süreç içinde en sık başvurulan üç intihar yöntemi sırasıyla ası, ateşli silah ve yüksekten atlama olarak kaydedilmiştir. Gümüş ve arkadaşlarının Türkiye'deki 2002-2009 yılları arasındaki süreci değerlendirdikleri araştırmalarında ilk sırada tercih edilen yöntemin ası olduğu bulunmuştur (16). Dünya çapında

intihar metotlarında bölgeler arasında farklılıklar izlenmektedir (17). Afrika'da ve Asya'da önde gelen yöntemler ası ve kendini zehirlemedir (17, 18). Amerika'da ateşli silah en sık başvurulan yöntemdir. Avrupa'da ası ve yüksekten düşme, Avustralya'da ası ön plandadır (17). İntihar metodu seçiminde bölgelere göre gelenekselleşmiş yöntemler söz konusu olmakla birlikte yöneme ulaşım kolaylığı da metot seçiminde önemli bir etkidir. Ayrıca metot seçimi ile cinsiyet arasında da bir bağ olabileceği düşünülmektedir. Kadınlar erkeklerle kıyasla daha fazla intihar girişiminde bulunurken; erkekler kadınlara kıyasla daha fazla intihardan ölüm oranlarına sahiptir (10). Bu durum kadınların daha az ölümcül yöntemleri tercih etmeleriyle ilişkilendirilebilir.

On yıllık süreç içinde intihar eden grup içinde bulunan kadınların en sık olarak kaydedilen yasal medeni durumu "yalnız yaşıyor" iken; erkeklerinki "evli"dir. Bekâr, boşanmış ve dul olmanın yani yalnız yaşıyor olmanın intihar riskini arttırdığı bilinmektedir (7, 8, 19). TÜİK verilerini kullanarak yaptığımız çalışmada kadınlar için bu sonuç geçerli olmakla beraber erkekler için geçerli değildir. Bu durum tesadüfi bir bulgu olarak yorumlanabileceği gibi, evliliğin erkekler üzerindeki etkileri ile de açıklanabilir. Bir ailenin maddi sorumluluğunu alma ve aile huzuru ile ilişkili nedenler bu etkilerdendir. Bu noktada ülkemizdeki ataerkil aile yapısının ve toplumsal cinsiyet eşitsizliklerinin de rolü olabilir.

Ülkemizde on yıllık süreç içinde intiharların en sık olarak 15-24 yaş arasındaki genç nüfusu etkilediği görülmüştür. Dünya çapında intihar nedenli ölümlerin 15-29 yaş grubu için 2. sıklıktaki ölüm nedeni olduğu bilinmektedir (4). Okul ve sınav stresi, meslek edinme ve iş bulma kaygıları, evlenme ve çocuk sahibi olma, erkekler için askerlik gibi yaşama yön veren olayların bu yaş grubu içerisinde gerçekleştiği söylenebilir. Batı Malezya'da yapılmış bir çalışmada genç yaş grubundaki intiharlara neden olarak kız-erkek ilişki sorunları, ailevi ve okul problemleri gösterilmiştir (20). Ayrıca genç yaş grubundaki insanların yaşama dair deneyim eksikliği söz konusu olabilir ve bu eksiklik kriz anlarını yönetmede başarısızlığa yol açabilir. Bütün bu sayılan nedenler intihar davranışının genç yaş grubundaki sıklığının nedenlerini açıklayabilir.

Türkiye'de on yıllık süreç içinde intiharların en sık izlendiği mevsimler ilkbahar ve yazdır. Öztürk ve arkadaşlarının Konya'da 135 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada tamamlanmamış intiharların ilkbahar ve yaz aylarında yoğunlaştığı sonucuna ulaşılmıştır (21). Deisenhammer ve arkadaşlarının araştırmasında intiharların ilkbahar ve yaz aylarında artış gösterdiği bulunmuştur (22). Galvao ve arkadaşlarının sistematik derlemesinde ilkbahar ve erken yaz mevsimi intihar sıklığının arttığı mevsimler olarak belirlenmiştir (23). Sıcaklık artışıyla şiddete eğilimin arttığını bildiren araştırma bulguları vardır (24, 25). İntiharların ilkbahar ve yaz aylarında daha sık görülüyor olması sıcaklık artışıyla ilişkilendirilir. Sıcaklık artışı uykusuzluğu, yorgunluğu ve stresi arttırıyor olabilir. Ayrıca mevsim değişimleri nörotransmitter salınımında değişikliklere yol açarak intiharları arttırıyor olabilir. Bunlara ek olarak durumun tahmin edilemeyen başka boyutları da söz konusu olabilir.

Ülkemizde kaba intihar hızının yüksek olduğu iller içinde Tunceli, Ardahan, Karaman ve Burdur gibi her yıl birbirini tekrar eden iller olduğu dikkat çekmektedir. Bu illerde kaba intihar hızı Türkiye ortalamasının çok üzerindedir. Bahsi geçen illerin demografik yapısı, intiharı arttıran özellikleri barındıran nüfusun bu illerde yoğun bulunabilme ihtimali gibi sosyal, ekonomik ve kültürel pek çok özellik durumun nedeni olabilir.

Araştırma sonucunda Türkiye'nin kaba intihar hızının on yıllık süreç içerisinde yüz bin kişide 3,50-4,00 arasında değerler aldığı görülmüştür. Bilinen nedenler içerisinde en sık kaydedilen intihar nedenleri hastalık, geçim sıkıntısı ve aile geçimsizliğidir. En sık başvurulan üç intihar yöntemi ası, ateşli silah ve yüksekten atlamadır. Bununla beraber yüksekten atlama ve kimyasal madde kullanma kadınlarda, ateşli silah ise erkeklerde daha fazladır. On yıllık süreç içinde intihar eden grup içinde bulunan kadınların en sık olarak kaydedilen yasal medeni durumu "yalnız yaşıyor" iken; erkeklerinki "evli"dir. Ülkemizde intiharlar asıl olarak 15-24 yaş arasındaki genç nüfusu etkilemektedir. İntiharların en sık izlendiği mevsimler ilkbahar ve yazdır. Ülkemizde kaba intihar hızının yüksek olduğu belli başlı iller mevcuttur.

Risk altında olarak kabul edilebilecek 15-24 yaş aralığındakiler, psikiyatrik hastalığı olanlar, ağır hastalığı olanlar, kaba intihar hızının yüksek olduğu şehirlerde yaşayanlar gibi belli başlı gruplar birinci basamakta belirli aralıklarla intihar riski açısından taranmalıdır.

Öncelikli bir halk sağlığı sorunu olan intiharların incelenmesi önemli olmakla beraber, genel bir öneri olarak intihar belirtilerinin ebeveynler, sağlık çalışanları ve öğretmenler başta olmak üzere tüm toplum tarafından bilinmesi intiharların önlenmesinde rol oynayabilir. Toplum içerisinde bireylerin ihtiyaç duyduğunda destek araması teşvik edilmeli ve başvuracağı yerler herkesin göreceği/duyacağı biçimde ilan edilmelidir. Bireylerin sosyal olarak desteklenecekleri yapılar oluşturulmalıdır.

Araştırmanın Kısıtlılıkları ve Üstün Yönleri

Araştırma primer olarak TÜİK tarafından toplanmış verilerin sekonder olarak işlenmesini içeren tanımlayıcı bir çalışmadır. Tanımlayıcı çalışmaların doğası gereği bir araştırmada herhangi bir hipotez test edilmemiş ve elde edilen sonuçlar genellenmemiştir. Ayrıca araştırma kapsamında tek tek bireylerin verisi yerine toplumun verisi kullanılmıştır. Elde birey bazında veri olmadığından çalışma sınırlı sayıda değişkenle yapılmış ve analitik yaklaşımlar yeterince gerçekleştirilememiştir. Bunlar araştırmanın kısıtlılıklarıdır.

Araştırma yerel bazda veri yerine, ulusal bazda veri içermektedir. Araştırma verileri TÜİK tarafından düzenli ve sistematik olarak toplanan veriler olduğundan, veri kalitesinin yüksek olduğu düşünülmektedir. Bunlar çalışmanın üstünlükleridir.

KAYNAKLAR

1. Krug EG, Dahlberg LL, Mercy JA, Zwi AB, Lozano R. (Editors) World Report on Violence and Health, Geneva, World Health Organization, 2003.
2. Deniz İ, Günindi Ersöz A, İldeş N, Türkarlan N. 1995 - 2000 Yılları Resmi Kayıtlarından Batman'da Gerçekleşen İntihar ve İntihar Girişimleri Üzerine Bir İnceleme. Aile ve Toplum. 2001;4:24-48.
3. WHO Mental Health Suicide Data. [Erişim tarihi: 30.05.2020]. Erişim adresi: https://www.who.int/mental_health/prevention/suicide/suicideprevent/en/
4. WHO The Global Health Observatory Causes of Death. [Erişim tarihi: 30.05.2020]. Erişim adresi: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/causes-of-death/GHO/causes-of-death>
5. WHO Crude Suicide Rate 2016. [Erişim tarihi: 30.05.2020]. Erişim adresi: <https://apps.who.int/gho/data/node.sdg.3-4-viz-2?lang=en>
6. Türkiye İstatistik Kurumu İntihar İstatistikleri 2009-2018. [Erişim tarihi: 13.05.2020]. Erişim adresi: <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=115&locale=tr>
7. WHO Fact Sheet Suicide. [Erişim tarihi: 30.05.2020]. Erişim adresi: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/suicide>
8. CDC-Injury Center-Violence Prevention-Suicide-Risk and Protective Factors. [Erişim tarihi: 11.06.2020]. Erişim adresi: <https://www.cdc.gov/violenceprevention/suicide/riskprotectivefactors.html>
9. Türkiye İstatistik Kurumu Nüfus İstatistikleri 2009-2018. [Erişim tarihi: 13.05.2020]. Erişim adresi: <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=95&locale=tr>
10. Beautrais AL. Women and suicidal behavior. Crisis. 2006; 27: 153-6.
11. Turecki G, Brent DA. Suicide and Suicidal Behaviour. The Lancet. 2016;387:1227-39.
12. Yıldırım Öztürk EN, Uyar M. Kadın ve erkek cinsiyetin doğumda beklenen yaşam süresinin ve doğumda beklenen sağlıklı yaşam umudunun Küresel Cinsiyet Uçurumu Endeksi ve Toplumsal Cinsiyet Eşitsizliği Endeksi ile ilişkisinin değerlendirilmesi. DEU Tıp Fakültesi Dergisi. 2020;34:17-23.

13. Akın A, Demirel S. Toplumsal cinsiyet kavramı ve sağlığa etkisi. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2003; 25: 73-82.
14. WHO The Global Health Observatory Homicide Estimates by Country. [Erişim tarihi: 09.07.2020]. Erişim adresi: <https://apps.who.int/gho/data/view.main.VIOLE NCEHOMICIDEv>
15. Joshi K, Billick SB. Biopsychosocial causes of suicide and suicide prevention outcome studies in juvenile detention facilities: A review. *Psychiatr Q*. 2017;88: 141-53.
16. Gümüş B, Özer B, Yıldırım A, Çetin İ. TÜİK verilerine göre Türkiye'de intihar olgularının değerlendirilmesi. *Adli Tıp Bul*. 2010;15:104-9.
17. Bachmann S. Epidemiology of suicide and the psychiatric perspective. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15:1425.
18. Mars B, Burrows S, Hjelmeland H, Gunnell D. Suicidal behaviour across the African continent: A review of the literature. *BMC Public Health*. 2014; 14:606.
19. Bernal M, Haro JM, Bernert S, Brugha T, de Graaf R, Bruffaerts R, Lepine JP, de Girolamo G, Vilagut G, Gasquet I, Torres JV, Kovess V, Heider D, Neeleman J, Kessler R, Alonso J. Risk factors for suicidality in Europe: Results from the ESEMED study. *J Affect Disord*. 2007;101:27-34.
20. Kok JK, Gan JJ, Goh LY. Youths talk about Death: Causes for suicide. *IJSSH*. 2011;1:145-9.
21. Öztürk M, Köylü R, Köylü Ö, Yıldırım Öztürk EN. İntihar Girişimi Nedeniyle Takip Edilen Hastaların Sosyodemografik Özellikleri, Laboratuvar Bulguları ve Tıbbi Durumları ile Depresyon Skorunun Değerlendirilmesi. *Medical Records*. 2020; 283: 70-5.
22. Deisenhammer EA, Stiglbauer C, Kemmler G. Time-related aspects of suicides-suicide frequency related to birthday, major holidays, day of the week, season, month of birth and zodiac signs. *Neuropsychiatr*. 2018;32: 93-100.
23. Galvao PVM, Silva HRSE, Silva CMFP. Temporal distribution of suicide mortality: A systematic review. *J Affect Disord*. 2018;228:132-42.
24. LH Schinasi, Hamra GB. A time series analysis of associations between daily temperature and crime events in Philadelphia, Pennsylvania. *J Urban Health*. 2017;94:892-900.
25. Luan G, Yin P, Wang L, Zhou M. Associations between ambient high temperatures and suicide mortality: A multi-city time-series study in China. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2019;26:20377-85.

Efficacy of metformin therapy in obese children with insulin resistance

İNSÜLİN DİRENCİ OLAN OBEZ ÇOCUKLARDA METFORMİN TEDAVİSİNİN ETKİNLİĞİ

 Gizem ATAKUL¹,  Hale TUHAN²,  Ayhan ABACI²,  Ece BÖBER²

¹Dokuz Eylül Üniversitesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD

²Dokuz Eylül Üniversitesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD, Çocuk Endokrinoloji Bilim Dalı

ABSTRACT

Objective: Obesity and insulin resistance is an important problem of general public health as well as pediatric endocrinology due to the disorders it causes. Metformin, a well-known oral antidiabetic, is increasingly being a common choice in treatment of obese and insulin resistant children. In this study, it was aimed to retrospectively evaluate the subjects who used metformin treatment due to insulin resistance and exogenous obesity in our clinic and to assess the effects of metformin on anthropometric and metabolic variables.

Materials and Methods: The medical records of the 36 patients, who were started metformin therapy due to obesity and insulin resistance and were followed-up in the Pediatric Endocrinology Department of Dokuz Eylül University Medical Faculty between 2005-2015, were retrospectively evaluated. The anthropometric and metabolic variables of these individuals at the sixth month of treatment were compared with basal values.

Results: Statistically significant decrease was detected after six months of metformin treatment in weight SDS (Standard Deviation Score) (mean 2.29 to 1.8), BMI (mean 31.3kg/m² to 29.8kg/m²), and BMI SDS (mean 2.2 to 1.9) (p<0.001). A mean reduction of 2.41±1.93kg/m² was present in BMI values of study subjects (p<0.001). Statistically significant reductions were found in post-treatment fasting insulin, fasting glucose/insulin ratio, HOMA-IR and Quick index values (p<0.05).

Conclusion: Metformin is one of the treatment options in obese adolescents with insulin resistance. In our study, it was observed that improvement in anthropometric measurements and metabolic parameters was achieved without any serious side effects in patients who received metformin treatment.

Keywords: adolescent, insulin resistance, metformin, obesity

ÖZ


Amaç: Obezite ve insülin direnci, yol açtığı bozukluklar nedeniyle pediatrik endokrinolojinin yanı sıra genel toplum sağlığının önemli bir sorunudur. Bilinen eski bir oral antidiyabetik olan Metforminin obez ve insülin direnci olan çocuklarda kullanımı her geçen gün yaygınlaşmaktadır. Bu çalışmada kliniğimizde obezite ve insülin direnci için metformin tedavisi alan olguların tedavi öncesi ve sonrası antropometrik ve metabolik parametreleri karşılaştırılarak tedavi etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gizem ATAKUL

Dokuz Eylül Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı,

Çocuk Alerji ve İmmünoloji Bilim Dalı
35340 İzmir-TÜRKİYE

E-posta: drgizematakul@gmail.com

 <https://orcid.org/0000-0002-3508-1360>

Gereç ve Yöntem: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Endokrinoloji Bilim Dalında 2005-2015 yılları arasında obezite ve insülin direnci nedeniyle Metformin tedavisi alan 36 olgunun tedavi öncesi ve sonrasındaki antropometrik ve metabolik verileri karşılaştırılarak tedavi etkinliği incelendi.

Bulgular: Olgularda tedavinin 6. ayında ağırlık SDS (Standart Deviasyon Skoru) (ort. 2.29'dan 1.8'e), VKİ (vücut kitle indeksi) (ort. 31.3kg/m² den 29.8kg/m² ye) ve VKİ SDS (ort 2.2'den 1.9'a) değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı düşüş (p<0,001); VKİ değerinde 2.41±1.93kg/m² düşüş saptandı (p<0,001). Tedavi sonrasında açlık insülin, glukoz/insülin oranı; HOMA-IR ve QUICK indeksinde istatistiksel olarak anlamlı düzelme saptandı (p<0,05).

Sonuç: Metformin, obezite ve insülin direnci olan hastalarda 6 aylık tedavide ciddi yan etki olmaksızın ağırlık SDS, VKİ ve VKİ SDS değerlerinde ve bazı metabolik parametrelerde düzelme sağlamıştır.

Anahtar Sözcükler: adölesan, insulin direnci, metformin, obezite

Obesity and insulin resistance may cause hyperandrogenism, premature adrenarche, oligomenorrhea, polycystic ovary syndrome (PCOS), and hepatic steatosis in childhood and adolescence. It also increases the risk of premature death by causing metabolic syndrome, hypertension and cardiovascular diseases in adulthood (1). Some studies showed that insulin resistance and type 2 diabetes (T2DM) can be prevented by lifestyle changes and metformin treatment in adults (2-5). Metformin, is approved by the US Food Drug Administration to treat T2DM in adults and in children aged > 10 years and is recommended for medical care of adult patients with obesity (6). Metformin, is a biguanide-derived drug and stimulates activated protein kinase and suppresses hepatic glucose production, reduces intestinal glucose absorption, improves insulin sensitivity by increasing glucose uptake and use in peripheral tissues; inhibits lipogenesis in fat cells (7). Emerging evidence shows weight loss to be associated with metformin in both diabetic and non-diabetic individuals. Metformin can lead weight loss by decreasing food intake. We aimed to show the effect of metformin on weight loss, dyslipidemia and insulin resistance in a group of non-diabetic obese adolescents retrospectively.

MATERIAL and METHODS

Patients from 12 to 18 years of age who were admitted to the Pediatric Endocrinology outpatient clinic with obesity and clinical and laboratory findings compatible with insulin resistance were identified. Study

patients selected whose weight control and insulin resistance data could not be improved at the end of the sixth month with the suggestions of nutrition education, exercise and lifestyle changes and Metformin treatment was used minimum six months included the study. Patients with primary endocrine pathology, syndromic obesity, who used metformin treatment for type 2 DM or impaired glucose tolerance, were excluded. The study was approved by the ethics committee of Dokuz Eylul University in light of the Helsinki Declaration (approval number; 2014/24-03). The written informed consent form was collected from parents.

The age, gender, presence of comorbidities and family history of diabetes were obtained from the file records. Tanner stage 2 breast development in girls; in boys, testicular volumes measured by orchidometers of 4 ml or more were considered as puberty. Menarche, menstrual disorder, oligomenorrhea status, acantosis nigricans and hyperandrogenism findings were recorded in the physical examination. The heights of the cases were measured by using Harpenden stadiometer to the nearest 0.1 cm and the weight was measured with SECA scale to the nearest 0.1 kg. Obesity accepted above 95 percentile for age and sex according to Turkish children (8). Blood pressure values were evaluated as percentile according to age and it was examined whether or not >95p (9). Oligomenorrhea was accepted when fewer than four periods a year in the postpostmenarcheal year and fewer than six periods a year during the second year (10). Hepatic steatosis was accepted

according to ultrasound finding or /and mild elevated ALT elevations (11). Hirsutismus was accepted score >10 according to Ferriman-Gallwey system (12). Premature adrenarche was defined as to have pubic hair before 8 year-old in girls and before 9 year-old in boys (13). Height, weight, body mass index (BMI) and standard deviation scores (SDS) of the patients were calculated before treatment and at the 3rd and 6th months of treatment (14, 15). Fasting and postprandial glucose, fasting insulin, lipid profile, thyroid functions, AST and ALT values were recorded. ISPAD criteria were used for the diagnosis of type 2 diabetes or impaired glucose tolerance (16). Insulin resistance was accepted as in the prepubertal period, HOMA-IR was 2.5 or more 4 in puberty; <0.3328 for the Quick index and <5.6 for the insulin sensitivity index (17). Fasting plasma total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) levels and low-density lipoprotein (LDL) were determined based on age and sex > 95 percentile values (18) and metabolic syndrome criteria were used for high density lipoprotein (HDL) (19). Metformin dose, duration of use, drug-related side effects (nausea, vomiting, abdominal pain, lactic acidosis, etc.) were recorded.

Metformin treatment was initiated in 80 cases in our clinic. 28 cases were excluded with at least one of the exclusion criteria and 16 patients were excluded due to incomplete file records. The data of the remaining 36 cases were recorded, and the data of 23 patients who used the treatment regularly were evaluated before and after the treatment.

Statistical Analysis

Data were evaluated with SPSS 21.0 program. Descriptive statistical method was used for the mean of group data and chi-square test was used for comparison of group rates. Pre and post treatment data of the group were compared with non-parametric Wilcoxon test. Data were

given as mean +/- SD or median, $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

The study consisted of a population of 36 patients with 72.2% (n= 26) girls and 22.8 % (n= 10) boys. The mean age was 13.8 ± 1.8 years (12-17.8 years). On admission, all of the patients had obesity and insulin resistance, and had oligomenorrhea (n=7), hepatic steatosis (n= 5), hirsutismus (n= 3), and premature adrenarche (n= 1). All patients had normal fasting glucose normal postprandial glucose and/or normal oral glucose tolerance test (OGTT).

In 14% of the cases, parents and/or their siblings, 39% had a history of Type 2 DM in grandparents. In two cases (5.6%), the mother had a history of gestational diabetes. Acanthosis nigricans was found in 50% (n= 18) of the patients on physical examination. 72.2% of the patients with acanthosis were girls. However, no statistical difference was found according to gender ($p > 0.05$). Blood pressure was normal in all cases. 94.4% (n= 34) of the cases were more advanced than stage 1 puberty. Of the 14 menarche cases, 78.6% (n= 11) had menstrual irregularity.

The anthropometric measurement data of the cases before and after the treatment are shown in Table 1. The patients' weight had decreased by an average of 3.6 kg during the treatment. Mean weight, weight SDS, BMI, BMI percentile and BMI SDS were improved significantly (Table 1).

Fasting insulin levels, fasting glucose/insulin ratio, HOMA-IR index and Quick index values without decreasing glucose levels improved significantly in all cases with metformin treatment (Table 1). Insulin resistance, which was present according to at least two parameters in all patients before treatment, showed a significant improvement after treatment (Table 2).

Table 1. Comparison of the characteristics of the patients before and after treatment

	Pre-treatment (n= 23)	Post-treatment (n= 23)	p*
Weight SDS	2.2 ±0.8 (2.29)	1.9± 0.9 (1.8)	<0.001
Height SDS	0.4 ± 1.5 (0.7)	0.3 ± 1.5 (0.50)	0.130
BMI (kg/m²)	32.3 ± 6.0 (31.3)	29.9 ± 6 (29.8)	<0.001
BMI SDS	2.1 ± 0.4 (2.2)	1.8 ± 0.6 (1.9)	<0.001
Fasting glucose (mg/dL)	84.4 ± 11.8 (87)	86.3 ± 8.6 (87)	0.465
Fasting insulin (µIU/mL)	26.3 ± 13.2 (22.8)	18.1 ± 8.0 (15.4)	0.005
Fasting glucose/ fasting insulin	3.9 ± 1.6 (3.7)	5.7 ± 2.5 (5.5)	0.004
HOMA-IR	5.6 ± 3.2 (4.7)	4.0 ± 2.0 (3.4)	0.015
Quick index	0.30 ± 0.02 (0.3)	0.32 ± 0.02 (0.3)	0.014

Data are given as mean ± SD (median). *Wilcoxon test

BMI, Body mass index

Table 2. Rate of insulin resistance

	Pre-treatment	Post-treatment	p*
Fasting glucose/ fasting insulin	% 91.7	% 33.3	0.021
HOMA-IR	% 69.4	% 39.1	0.039
Quick indeks	% 91.7	% 38.9	0.039

*McNemar test

Pre and post treatment values of 14 patients with complete lipid profile data were compared. Before treatment, high plasma TG was found in 36% (n= 5), high TC in 14% (n= 2), and LDL level above 95 percentile in 14% (n= 2); HDL level was low in 21% (n= 3). In the sixth month

of treatment, high plasma TG was found in 36% (n= 5), high TC in 14% (n= 2), and LDL levels above 95 percentile in 7% (n= 1); HDL level was low in 28% (n= 4) cases. The differences observed in all four parameters were not statistically significant (p> 0.05) (Table 3).

Table 3. Lipid profile of cases

	Pre-treatment (n= 14)	Post-treatment (n= 14)	p*
TG (mg/dL)	125,8±66.7 (102.5)	122.8±73.8 (90)	0.777
TC (mg/dL)	169.9±27.2 (162.5)	166.1±31 (153)	0.300
LDL Chol (mg/dL)	99.4±21.0 (91)	96.3±23.9 (91.5)	0.232
HDL Chol (mg/dL)	43.9±10 (42.5)	45.1±8.3 (43.5)	0.683

Data are given as mean ± SD (median). *Wilcoxon test

TG, triglyceride; TC, total cholesterol; LDL Chol, low density lipoprotein cholesterol; HDL Chol, high density lipoprotein cholesterol.

There were no significant differences in ALT and AST levels in the 5 patients with hepatic steatosis before treatment ($p > 0.05$). There was no significant change in the hepatic steatosis stage detected by ultrasonography before treatment. There was no significant change in thyroid function tests before and after treatment.

Metformin treatment was started at 500 mg/day and the maximum dose was given as 2000mg/day with an increase of 500 mg weekly. It was determined that 38% (n=22) of the patients discontinued their treatment before three months and 55% of the patients continued their treatment for 12 months or more. No serious side effects were observed in any of the cases. One patient who received 2x250 mg had abdominal pain and nausea; in one case, diarrhea was observed while taking 2x1000 mg but resolved without stopping the treatment.

DISCUSSION

The high number of female patients in the study group was consistent with the fact that most of the patients who presented to our clinic with obesity were female. The reason may be that girls and their families are more disturbed by the body perception caused by obesity and that girls are less involved in out-of-home life and sports activities due to sociocultural habits. Majority of the cases had a family history of T2DM. In the literature, the presence of T2DM in the family has been shown to correlate with insulin resistance. In the study of Arslanian et al. (20) lower insulin sensitivity was found in patients with T2DM in the

family by hyperinsulinemic euglycemic clamp test. In a study conducted in adults, fasting insulin levels and HOMA IR values were found to be higher in patients with familial T2DM (21).

Acanthosis nigricans is a skin finding of insulin resistance, was present in 50% of our cases. It is related duration and severity/intensity of insulin resistance. In a randomized controlled study on obese children and adolescents with insulin resistance, the authors were defined 58.9 % in study group and 52.9 % in control group presented acanthosis nigricans (22) it has been reported in the literature that the risk of T2DM is increased in patients with acanthosis nigricans (23). Ice et al. (24) demonstrated the presence of three criteria of metabolic syndrome (insulin resistance, increased BMI, high blood pressure or dyslipidemia) in 49% of children with acanthosis nigricans.

In our study, 34 of 36 cases were in puberty. It is known that there is a decrease in insulin sensitivity up to 25% -50% in puberty, especially during pubertal growth spurt (25). In a longitudinal study, Goran et al. (26) showed a 32% decrease in insulin sensitivity in children reaching Tanner stage 3.

The relationship between obesity and insulin resistance with oligo-amenorrhea, polycystic ovary and infertility is well known (27). We thought that menstrual cycle irregularity, which was detected in 78.6% of our cases, could be related to maturation of ovulation cycle in puberty as well as obesity and insulin resistance.

In our study, we found statistically significant decrease in weight SDS, BMI and BMI SDS values after six months of metformin treatment. The mean BMI value decreased by $2.41 \pm 1.93 \text{ kg/m}^2$. There are many randomized controlled trial and meta-analysis regarding the effects of metformin in pediatric obesity. Some of them claimed no effect on insulin resistance and BMI (28) but many other randomized controlled studies showing a decrease of 0.16 - 3.2 kg/m^2 with metformin treatment in obese children and adolescents (29-33). The successful outcome in our study may be related to case selection and treatment adherence. In literature, major changes seen in BMI were reported in the third and fourth months of treatment and the change was less between sixth and twelfth months (30, 31). In a long-term following study (36 months) authors claimed lack of compliance and insufficient dose may explain the differences in long-term effects between adolescents and adults (34).

Recently, the growth differentiation factor-15 (GDF-15), a member of the transforming factor beta superfamily, has been identified as a key mediator of metformin-induced weight loss. Metformin increases the secretion of GDF-15, which binds exclusively to glial cell-derived neurotrophic factor family receptor alpha-like. This gut-brain cytokine works as a prominent player in reducing food intake and body weight in health and disease, like anorexia nervosa and cancer (35).

There was a significant decrease in fasting insulin levels without decrease in fasting blood glucose levels in our patients who received metformin treatment and a statistically significant improvement was observed in all three parameters evaluating insulin resistance. In other words, insulin resistance improved in all patients with insulin resistance according to at least two parameters prior to treatment, in more than half of the patients after the sixth month of treatment. In the literature, many placebo-controlled studies have clearly demonstrated the effect of metformin on fasting insulin levels (30). In contrast, there is a study that does not find a significant decrease in HOMA-IR index (31).

Triglyceride and total cholesterol levels of our treated patients decreased slightly with treatment and

increased HDL levels, but these changes were not statistically significant. Metformin, which is known to inhibit lipogenesis in fat cells, may have a direct effect on lipid profile or may be this effect associated with weight loss. Several studies have shown that total cholesterol levels decreased slightly with metformin treatment (30, 34-36). Some studies showing limited or significant decrease in triglyceride levels but they had lower quality of evidence. In our study group, the number of patients with dyslipidemia decreased after metformin treatment, but the difference was not statistically significant. This may be related to the small number of cases.

Metformin is usually well tolerated. However, transient mild gastrointestinal adverse effects such as nausea, vomiting, abdominal pain, flatulence, and diarrhea are common especially during the initiation of metformin therapy (30, 31). In our study, no serious side effects were observed in our patients who used metformin treatment. Metformin is well tolerated in most patients, but moderate gastrointestinal side effects such as nausea, constipation and abdominal pain were observed. These effects are reported to occur between the ages of 6-12 and in the first month of treatment (30). Cases of lactic acidosis reported in the literature have occurred after large amounts of suicidal intake (37). In a ten years retrospective analysis from an intensive care unit of University of Lille, France, authors find forty-two patients; 13 voluntary intoxication and 29 incidental overdoses (38). The incidence of Metformin-Associated Lactic Acidosis (MALA) is rare. The estimated rate of MALA is 2 to 9 case per 100.000 person-years (39). The high rate of discontinuation of treatment is probably due to these transient mild gastrointestinal side effects. We should educate our patients more about the side effects and can tolerate over time when starting treatment.

In conclusion, Metformin was found to be effective in increasing insulin sensitivity by decreasing fasting insulin levels in obese children and especially adolescents with insulin resistance, and limited but significantly effective in weight loss.

Limitations of the study

Metformin has no approval use for obesity in pediatric age group without T2DM or impaired glucose

tolerance. For this reason, the study design was retrospective and sample size was small. Our results should be confirmed by additional research involving more patients in childhood.

REFERENCES

1. Must A, Jacques PF, Dallal GE, Bajema CJ, W H Dietz Long-term morbidity and mortality of overweight adolescents. A follow-up of the Harvard Growth Study of 1922 to 1935. *N Engl J Med* 1992;327:1350–5.
2. Pan XR, Li GW, Hu YH, Wang JX, W Y Yang, Z X An, et al. The Da Quing IGT and diabetes study: effects of diet and exercise in preventing NIDDM in people with impaired glucose tolerance. *Diabetes Care* 1997;20:537–44.
3. Tuomilehto J, Lindström J, Eriksson JG, Valle TT, H Hämäläinen, P Ilanne-Parikka, et al. Prevention of type 2 diabetes by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 2001;344:1343–50.
4. Diabetes Prevention Program Research Group, Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 2002;346:393–403.
5. Ratner RE, The Diabetes Prevention Programme Research Group. An update on the diabetes prevention program. *Endocr Pract* 2006;12: 20–4.
6. Garvey WT, Mechanick JI, Brett EM, Garber AJ, Hurley DL, Jastreboff AM, et al. American Association of Clinical Endocrinologists and American Collage of Endocrinology Comprehensive Clinical Practice Guidelines For Medical Care of Patients with Obesity. *Endocr Pract*. 2016;22 Suppl 3:1-203.
7. Dumitrescu R, Mehedintu C, Briceag I, Purcărea VL, Hudita D. Metformin-clinical pharmacology in PCOs. *J Med Life*. 2015;8(2): 187-192
8. Neyzi O, Günöz H, Furman A, Bundak R, Gökçay G, Darendeliler F. Türk çocuklarında vücut ağırlığı, boy uzunluğu, baş çevresi ve vücut kitle indeksi referans değerleri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*. 2008;51:1-14.
9. No authors listed. Update on the 1987 Task Force Report on High Blood Pressure in Children and Adolescents: a working group report from the National High Blood Pressure Education Program Working Group on Hypertension Control in Children and Adolescents. *Pediatrics* 1996;98:649-58.
10. Sperling MA, Majzoub JA, Menon RK, Stratakis CA. *Sperling Pediatric Endocrinology*. 5th ed. Philadelphia:PA. Elsevier; 2020; Section III; 565.
11. Byrne CD, Targher G. NAFLD: a multisystem disease. *J Hepatol*. 2015;62:47-64.
12. Sperling MA, Majzoub JA, Menon RK, Stratakis CA. *Sperling Pediatric Endocrinology*. 5th ed. Philadelphia:PA. Elsevier, 2020; Section III;590.
13. Kliegman R, Stanton B, St Geme J, Schor N, Behrman R. *Nelson Textbook of Pediatrics*. 19 th ed. Elsevier Saunders, 2011; Chapter 556: 1886.
14. Bundak R, Furman A, Gunoz H, Darendeliler F, Bas F, Neyzi O. Body mass index references for Turkish children. *Acta Paediatr*. 2006;95:194-8.
15. Neyzi O, Furman A, Bundak R, Gunoz H, Darendeliler F, Bas F. Growth references for Turkish children aged 6 to 18 years. *Acta Paediatr*. 2006;95:1635-41.
16. Phil Zeitler, Junfen Fu, Nikhil Tandon, Kristen Nadeau, Tatsuhiko Urakami, Timothy Barrett et al. International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2014 Compendium Type 2 diabetes in the child and adolescent. *Pediatr Diabetes*. 2015;16:392.
17. Zimmet, P., Alberti, G., Kaufman, F., Tajima, N., Silink, M., Arslanian, S, et al. The metabolic syndrome in children and adolescents. *Lancet*. 2007;369: 2059-61.

18. Stephen R. Daniels and Frank R. Greer; Lipid Screening and Cardiovascular Health in Childhood. *Pediatrics*.2008;122:198.
19. Valerio, G, Licenziati MR, Iannuzzi A, Franzese A, Siani P, Riccardi G, et al. Insulin resistance and impaired glucose tolerance in obese children and adolescents from Southern Italy. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2006;16:279-84.
20. Arslanian SA, Bacha F, Saad R, N Gungor. Family History of Type 2 Diabetes Is Associated With Decreased Insulin Sensitivity and an Impaired Balance Between Insulin Sensitivity and Insulin Secretion in White Youth. *Diabetes Care*. 2005; 28: 115-9.
21. Thejaswini KO, Dayananda G, Chandrakala SP. Association of Family History of type 2 Diabetes Mellitus with Insulin Resistance. *IJBMS*. 2012;5:155-9
22. Stagi S, Ricci F, Bianconi M, Sammarco MA, Municchi G, Toni S, et al. Retrospective Evaluation of Metformin and/or Metformin Plus a New, Polysaccharide Complex in Treating Severe Hyperinsulinism and Insulin Resistance in Obese Children and Adolescents with Metabolic Syndrome. *Nutrients*. 2017;9:524.
23. Ten S, Maclaren N. Insulin resistance syndrome in children. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:2526-39.
24. Ice CL, Murphy E, Minor VE. Metabolic syndrome in fifth grade children with acanthosis nigricans: results from the CARDIAC project. *World J Pediatr*. 2009;5:23-30.
25. Moran A, Jacobs DR, Steinberger J, Hong CP, Prineas R, Luepker R, et al. Insulin resistance during puberty: results from clamp studies in 357 children. *Diabetes* 1999;48:2039-44.
26. Goran MI, Gower BA, Longitudinal Study on Pubertal Insulin Resistance. *Diabetes*. 2001;50: 2444-50.
27. Rowland AS, Baird DD, Long S, Wegienka G, Harlow SD, Alavanja M, et al. Influence of medical conditions and lifestyle factors on the menstrual cycle. *Epidemiology* 2002;13:668-74.
28. Sun J, Wang Y, Zhang X, He H. The effects of metformin on insulin resistance in overweight or obese children and adolescents: A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98:e14249
29. Freemark M, Bursey D. The effects of metformin on body mass index and glucose tolerance in obese adolescents with fasting hyperinsulinemia and a family history of type 2 diabetes. *Pediatrics*. 2001;107:e55
30. Atabek ME, Pirgon O. Use of metformin in obese adolescents with hyperinsulinemia: a 6-month, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2008;21: 339-48.
31. Yanovski JA, Krakoff J, Salaita CG, McDuffie JR, Kozlosky M, Sebring NG, et al. Effects of metformin on body weight and body composition in obese insulin-resistant children: a randomized clinical trial. *Diabetes*. 2011;60:477-85.
32. Clarson CL, Mahmud FH, Baker JE, Clark HE, McKay WM, Schauteet VD, et al. Metformin in combination with structured lifestyle intervention improved body mass index in obese adolescents, but did not improve insulin resistance. *Endocrine*. 2009;36:141-6.
33. Lustig RH, Mietus-Snyder ML, Bacchetti P, Lazar AA, Velasquez-Mieyer PA, Christensen ML. Insulin dynamics predict body mass index and z-score response to insulin suppression or sensitization pharmacotherapy in obese children. *J Pediatr*. 2006;148:23-29.
34. Lentferink YE, van der Aa MP, van Mill EGAH, Knibbe CAJ, van der Vorst MM. Long term metformin treatment in adolescents with obesity

- and insulin resistance, results of an open label extension study. *Nutr Diabetes* 2018;8:47.
35. Quyang J, Isnard S, Lin J, Fombuena B, Peng X, Chen Y and Routy J-P. GDF-15 as a Weight Watcher for Diabetic and Non-Diabetic People Treated with Metformin. *Front Endocrinol.* 2020; 11:581839.
 36. Park MH, Kinra S, Ward KJ, White B, Viner RM. Metformin for obesity in children and adolescents: a systematic review. *Diabetes Care* 2009;32:1743–5.
 37. Elmezughi K, Ekpebegh C. Metformin-associated lactic acidosis treated successfully by peritoneal dialysis in a resource limited setting: case report. *Pan Afr Med J.* 2019;32:112.
 38. Seidowsky A, Nseir S, Houdred N, Fourrier F. Metformin-associated lactic acidosis: a prognostic and therapeutic study. *Crit Care Med.* 2009;37: 2191-96.
 39. De Fronzo R, Fleming GA, Chen K and Bicsak A. Metformin-associated lactic acidosis: Current perspectives on causes and risk. *Metabolism.* 2016; 65:20-9.

İnsan göbek kordonu Wharton jölesinden mezenkimal kök hücrelerin eldesinde izolasyon yöntemlerinin ve antioksidatif kültür koşullarının etkisi

THE EFFECT OF ANTIOXIDANT CULTURE CONDITIONS AND ISOLATION METHODS IN OBTAINING MESENCHYMAL STEM CELLS FROM THE WHARTON'S JELLY OF HUMAN UMBILICAL CORD

 Tuğba ŞAN¹,  Uğur BORA¹,  Özge SAYIN²,  Mehmet Emin GÜNEŞ³,  Deniz ÖZTEKİN⁴,  Bekir Uğur ERGÜR⁵,  Kemal BAYSAL⁶,  Pınar AKAN²

¹Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sinirbilimleri Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

²Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

³Çiğli Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği, İzmir, Türkiye

⁴Bakırçay Üniversitesi, Çiğli Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği, İzmir, Türkiye

⁵Girne Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Girne, Kıbrıs

⁶Koç Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ÖZ

Amaç: Günümüzde, insan kök hücrelerin eldesi ve kültür ortamında çoğaltılması rejeneratif tıp uygulamalarının ilk aşamalarından biridir. Terapötik amaçlar için in vitro hücre çoğaltmada, mezenkimal kök hücreleri (MKH)'nin muhtemelen oksidatif stresi içeren erken yaşlanmaya hızla girmeleri önemli bir sorundur. Klinikte tedavide en yaygın kullanılan hücreler, kemik iliği MKH (Kİ-MKH) olmakla birlikte, göbek kordonu çevresinde yer alan Wharton jölesi MKH (WJ-MKH)'nin invaziv olmayan şekilde elde edilebilmeleri, doku reddine yol açan proteinleri eksprese etmemeleri ve immünosupresif özellikleri nedeni ile Kİ-MKH'nden daha kullanışlı olabilecekleri ileri sürülmektedir. Çalışmamız ile WJ-MKH'nin eldesi ve çoğaltılmasında kullanılan izolasyon yöntemlerinin etkinliğinin karşılaştırılması ve anti-oksidatif kültür koşullarının hücre canlılığı ve kök hücrelere özgü yüzey antijen ekspresyonlarına etkisinin belirlenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya dahil etme kriterlerine uyan toplam 17 sağlıklı gebeden doğum sonrası kordon örnekleri alındı. Wharton jölesinden enzimatik ve eksplant yöntemi ile kök hücreler elde edilerek, hücre canlılıkları ve proliferasyon kapasiteleri karşılaştırıldı.

Bulgular: Kök hücrelerin, osteoblastlara, kondrositlere ve adipositlere farklılaşma kapasiteleri immunohistokimyasal olarak gösterildi. Hücrelerin çoğaltılması sürecinde CD44, CD73, CD90, CD105 yüzey antijenlerinin dördüncü pasaja kadar anlamlı değişmeden eksprese edildiği saptandı.


Tuğba ŞAN

Dokuz Eylül Üniversitesi,

Sağlık Bilimleri Enstitüsü,

Sinirbilimleri Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

E-posta: ttugbasan@gmail.com

 <https://orcid.org/0000-0003-0692-3423>

Antioksidan moleküller N-asetil sistein ve askorbik asit ilavesi ile sağlanan kültür koşullarının hücre canlılığı ve hücre yüzey antijen ekspresyonları üzerine etkisi gösterildi.

Sonuç: Wharton jölesinden MKH'lerin izolasyonunda eksplant yönteminin yüzey antijen ifadeleri anlamlı değişmeksizin, daha kısa zaman diliminde elde edilen toplam hücre sayısı nedeni ile enzimatik yöntemle göre daha avantajlı olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: Wharton jeli, izolasyon yöntemleri, antioksidanlar, mezenkimal kök hücre, hücre canlılığı

ABSTRACT

Objective: Obtaining and growing human stem cells are the first stages of regenerative medicine applications. During cell proliferation for therapeutic purposes, mesenchymal stem cells (MSCs) rapidly undergo premature aging, possibly involving oxidative stress. Bone marrow MSCs (BM-MSCs) are the most clinically used cells. It is suggested that Wharton-jelly MSCs (WJ-MSCs) located around the umbilical cord may be more useful than BM-MSCs due to non-invasive acquisition, lack of expression of proteins which cause tissue rejection, and their immunosuppressive properties. It was aimed to compare the efficiency of the isolation methods used in the reproduction of WJ-MSCs and to determine the effect of anti-oxidative culture conditions on cell viability and expression of cell-surface antigens.

Materials and Methods: Postnatal cord samples were obtained from 17 healthy pregnant women who met the inclusion criteria. Stem cells were obtained from Wharton jelly using enzymatic and explant methods and cell viability and proliferation capacities were compared.

Results: The differentiation capacity of stem cells into osteoblasts, chondrocytes and adipocytes was demonstrated immunohistochemically. The expression of CD44, CD73, CD90, CD105 surface antigens remained unchanged until the fourth passage during the proliferation process. The effect of culture conditions achieved by addition of anti-oxidant molecules N-acetyl cysteine and ascorbic acid on cell viability and cell surface antigen expressions were demonstrated.

Conclusion: The explant method in the isolation of MSCs from Wharton jelly was more advantageous than the enzymatic method due to the total number of cells obtained in a shorter time period, without significantly changing the surface antigen expressions.

Keywords: Wharton jelly, isolation methods, antioxidants, mesenchymal stem cells, cell viability

Kök hücreler, uzun süre devam eden bölünme yeteneğine sahip ve kendini yenileyebilen hücreler olmaları ve çeşitli uyarımlar aracılığı ile vücutta bulunan farklı karakteristiklere sahip özelleşmiş hücrelere farklılaşabilme kapasiteleri ile diğer hücre tiplerinden ayrılırlar (1). Embriyonik kök hücreler pluripotent kök hücrelerdir, rejeneratif tıp için önemli bir potansiyele sahip olmalarına rağmen embriyodan elde ediliyor olması ve kötüye kullanılabilme ihtimali etik kaygılara yol açmaktadır(2, 3). İlk olarak Friedenstein tarafından kemik iliğinde belirlenen yetişkin (somatik) dokulardan köken

alan mezenkimal kök hücreler (MKH), yüzeye tutunup koloni oluşturan ünitelere çoğalabilen, multipotent özellik gösteren, fibroblast benzeri stromal hücrelerdir. Belirli koşullarda farklılaşarak, osteojenik, kondrojenik, myojenik, adipojenik ve diğer hücre türlerine dönüşebildiği, çok sayıda çalışmada gösterilmiştir (4 - 7). MKH' in plastisite yeteneği, alloreaktivite eksikliği ve akut advers reaksiyonun olmaması gibi faydalı özellikleri sayesinde hücre tedavilerde ve rejeneratif tıpta hücre kaynağı olarak kullanımları giderek artmaktadır (8).

Göbek kordonu çevresinde yer alan Wharton jölesi mezenkimal kök hücreleri (WJ-MKH)'nin ise doku reddine yol açan proteinleri eksprese etmemeleri yanı sıra immün sistem baskılayıcı/düzenleyici fonksiyonları, non-invaziv koşullarda donörden elde edilmeleri ve daha az etik kaygı sunmaları nedenleri ile erişkin kemik iliği mezenkimal kök hücre (Kİ-MKH)'lerine göre üstün olabilecekleri ileri sürülmektedir (9 - 11). Wharton jölesinden elde edilen kök hücre transplantasyonunun intervertebral disk dejenerasyonu gibi klinik durumlarda olumlu etkileri gösterilmiştir (12). Ayrıca WJ- MKH'lerin dopaminerjik ve asetilkolinerjik nöronlar gibi fonksiyonel hücelere farklılaşması için yönetsel çalışmalar araştırmacıların ilgi odağı oluşturmuştur (13 - 16).

İnsan kök hücrelerine dair rejeneratif tıp uygulamalarının önemli aşamalarından biri orijinal dokudan kök hücrelerin izolasyonu ve primer hücre kültürüdür. Genel olarak izolasyon yöntemleri enzimatik yöntemler ve eksplant kültür yöntemi olarak iki ana teknik olarak kategorize edilmektedir. Enzimatik yöntemlerde, hücrelerin dokudan ayrılması için bir, iki veya bazı işlemlerde üç proteolitik enzim kullanılır; tek hücre süspansiyonu daha sonra hücre proliferasyonu için uygun ortamda kültürlenir. Eksplant yönteminde ise enzim kullanılmaz; orijinal doku, kültür kaplarına veya şişelerine yerleştirilecek şekilde küçük parçalar halinde kesilir ve hücre kültür kabına tutunmaları sağlanan doku parçalarından hücreler dışarı çıkmaya ve çoğalmaya başlar (17). Primer kültür için dokuların ayrışmasını sağlayan teknikler, izole edilen hücrelerin miktarını ve kalitesini etkileyebilir. Kök hücre biyolojisi çalışmalarında standardizasyon için karşılaşılan başlıca problemlerden biri, kullanılan hücre kültür ortamları ve hücre dışı sinyal faktörleri nedeni ile homojen elde edilemeyen transkripsiyonel profil farklılıklarıdır (18). Diğer taraftan terapötik amaçlar için in vitro hücre çoğaltmada, MKH'lerin hızla muhtemelen oksidatif stresi içeren erken yaşlanmaya girdikleri ileri sürülmektedir (19). WJ-MKH'lerin eldesinde ve çoğaltılmasında standardize ve sağlıklı hücre verim artırıcı protokollere ihtiyaç vardır.

Biz bu çalışma ile WJ-MKH'inin izolasyonunda kullanılan enzimatik ve eksplant yöntemlerinin kök hücrelerin çoğaltılması ve idamesi sürecinde etkinliğinin

karşılaştırılmasını, kültür ortamına antioksidan moleküllerin eklenmesinin hücrelerin çoğaltılması ve idamesi için gereken pasajlama sürecindeki hücre canlılığı, proliferasyonu ve kök hücreye özel yüzey antijen ifadelerine etkilerini belirlemeyi amaçladık. Ayrıca kendi laboratuvar koşullarımızda uygulanabilir, etkin ve standardize bir protokolün oluşturulmasını hedefledik.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma için yapılabilmesi için Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Etik Kurulu'ndan 17.11.2016 tarihli 2016/28-18 numaralı kararı ile onay alınmıştır. Kök hücre eldesi için çalışmaya T.C. Sağlık Bakanlığı İzmir Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tepecik Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Kadın Doğum Kliniği'ne başvuran 18-40 yaş arası miat (37-40 haftalık) sezeryanla doğum yapan ve gönüllü onam veren 17 gebeden alınan örnekler dâhil edilmiştir.

Donör Dışlama Kriterleri

Çoğul gebelikler, yardımcı üreme teknikleri yoluyla elde edilen gebelikler, bilinen genetik ve yapısal anomalisi olan fetüsler, diyabet, tiroit hastalıkları gibi annenin bilinen ek hastalığı olduğu durumlar ve sürekli ilaç kullanımı gerekli haller, intrauterin gelişme geriliği (fetal ağırlık <2500 gr) olan gebeler çalışma dışı bırakılmıştır.

Göbek Kordonunun Temini

Doğumun gerçekleşip bebeğin doğumunu takiben çocuk doktoruna verilmesinin ardından plasenta ile kordon arasına 3. bir klemp konularak plasenta ile birlikte göbek kordonu uterustan alındı. Operasyon sırasında umbilikal kord, fetal uca yakın bölümünden yaklaşık 10-20 cm uzunluğunda kesildi. Kordonun üzerindeki kan aseptik koşullarda silinerek birkaç dakika içinde steril, 5 g/l glukoz, 50 µg/ml gentamisin, 2.5 µg/ml amfoterisin B, 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin eklenmiş, +4°C de bekletilen fosfat tamponuna (PBS) yerleştirildi. Kordonun ~2 saat içinde Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya hücre kültürü laboratuvarına transferi sağlandı ve bekletilmeden kök hücrelerin enzimatik ve eksplant yöntemleri ile eş zamanlı izolasyonuna başlandı.

Kök Hücrelerin İzolasyonu

Alınan kordonlar örnekleri, steril bir kabın içerisine bir miktar soğuk fosfat buffer saline (PBS) ile birlikte yıkanarak üzerlerindeki pıhtı kalıntıları ve kan tamamen temizlendi. Tüm kordon önce boyuna kesildi ve kordon içerisindeki iki arter ve bir ven özenle disekte edilip Wharton jeli bölgesi ortaya çıkarıldı. Daha sonra aşağıda detayları verilen enzimatik ve eksplant yöntemleri ile mezenkimal kök hücreler izole edildi.

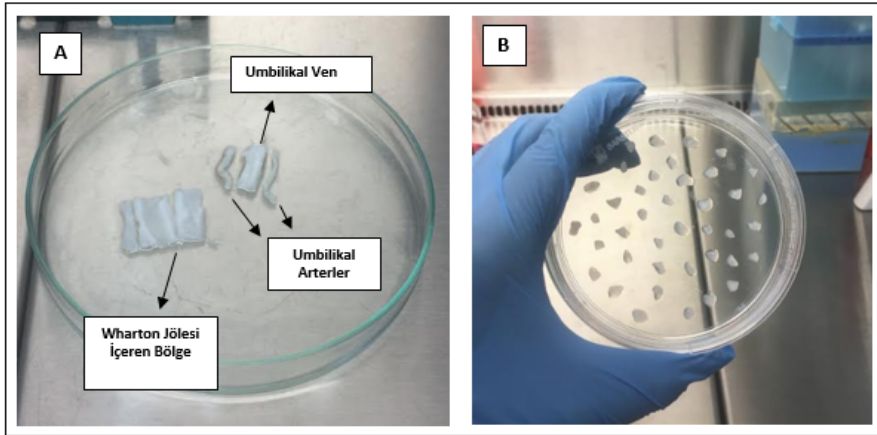
Enzimatik Yöntem

Çalışma kapsamında enzimatik yöntem ile WJ-MKH eldesi için kollajenaz (ThermoFisher Scientific 17104019) ve tripsin (ThermoFisher Scientific 25300-054) enzimleri kullanıldı. Steril taşıma solüsyonu (%0,1 penisilin/streptomisinli PBS) içinde soğuk bir şekilde hücre kültürü laboratuvarına transfer edilen kordonlar, laboratuvar koşullarında steril PBS ile birkaç kez daha yıkanarak etrafındaki ve iç kısmındaki fazla kandan arındırıldı. Kordon steril bistüri yardımıyla boylamasına disseke edilerek damarlarından ayrıştırıldı. Geriye kalan jelatinöz kısım (Wharton jölesi) yaklaşık 0,5 cm³ lük parçalara ayrıldıktan sonra serumsuz DMEM/F12 ile karıştırılıp 250g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra pellet kollajenaz enzimi ile 37°C'de 18 saat muamele edildi.

İnkübasyon sonrası mukoz pellet steril PBS ile yıkandıktan sonra %2,5 tripsin ile 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde enzimli pelletlerin üzerine %10 FBS'li DMEM/F12 büyüme ortamı eklenerek enzimin nötralizasyonu sağlandı. Ardından bu karışım tekrardan santrifüj edilerek oluşturulan süpernatant kısmı steril kültür kaplarına aktarılarak doku parçalarından enzimatik yöntemle ayrıştırılan hücrelerin kültür kabının yüzeyine tutunmaları ve çoğalmaları sağlandı (8).

Eksplant Yöntemi

Wharton jeli içerisinde bulunan mezenkimal doku 0,5 cm³lik parçalara ayrılarak parçalar, petri kabı ve/veya altı kuyucuklu plaklara her kuyucuğuna jel bölümü yüzeyle temas edecek şekilde yerleştirildi. Parçalar kurumaması için PBS içerisinde bırakıldı. Parçalar 30-40 dakika inkübe edilerek yüzeye tutunmaları sağlandı. eksplantlara % 10 fetal sığır serumu (Fetal Bovine Serum; FBS), 100 µg/ml streptomisin, 100 U/ml penisilin ve 2 mM L-Glutamin içeren DMEM/F-12 kültür ortamı eklendi. Hücreler %5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C'de tutularak ve büyüme ortamı haftada iki kez yenilenerek hücrelerin dokudan çıkması ve çoğalmaları beklendi (Şekil 1). Eksplantlar her gün ışık mikroskobu yardımıyla izlenerek hücre çıkışı gözlemlendi 21-23 günden sonra hiçbir şekilde hücre çıkışı gözlemlenmeyen eksplantlar deney dışı bırakıldı (12).



Şekil 1: Göbek kordonundan eksplant yöntemi ile mezenkimal kök hücre izolasyonu Wharton jelini bulunduran fetal bölgeye yakın alınan göbek kordonu içerisinde wharton jölesi içeren bölge, umbilikal arterler ve umbilikal ven görülmektedir (A), Göbek kordonundan elde edilen eksplantlar küçük boyutlarda petri kabına yerleştirilerek kültür kabına tutunmaları sağlandı (B).

Kök Hücre Kültürü ve Antioksidan Molekül Uygulaması

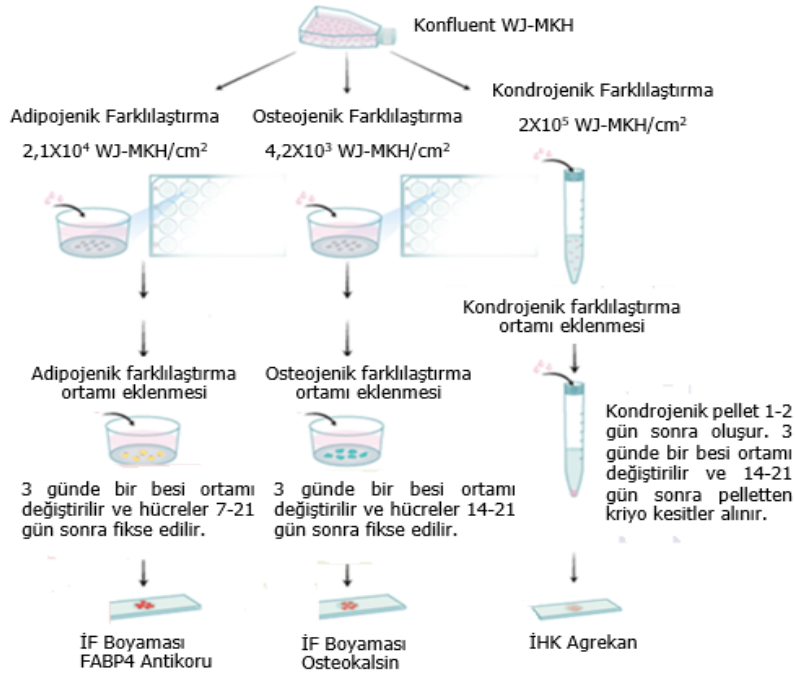
Etrafındaki alanı dolduracak kadar hücre çıkışının gözlemlendiği eksplantlar, akütaz (Sigma A6964) enzimi ile muamele edilerek, WJ-MKH'leri toplandı ve 6 kuyucuklu ve/veya 25 cm²'lik kültür kaplarına pasajlanarak, %10 FBS, 100 µg/ml streptomisin, 100 U/ml penisilin ve 2 mM L-Glutamin içeren komplek DMEM/F-12 kültür ortamı ile %5 CO₂ içeren inkübatörde kök hücre idamesine devam edildi. Her gün hücreler inkübatörden alınarak ışık mikroskobu yardımıyla gözlemlenerek durumları değerlendirildi.

Antioksidan özellikle kimyasal maddelerin hücre canlılığı ve kök hücre yüzey antijeni ekspresyonlarına etkisini belirlemek için, N-asetil sistein (NAC, Sigma A7250), Askorbik Asit-2-Fosfat (AA-2P, Sigma 49752) kullanıldı. Her üç günde bir yenilenmek üzere NAC (0,50-3 mM), AA-2P (100-300 µM) konsantrasyonlarda antioksidan madde içeren taze ortamlar (%10 FBS'li DMEM/F12) ile WJ-MKH'ler 7 gün süresince beslendi. Konsantrasyon grupları kendi içinde en az beş tekrarlı çalışıldı.

Kök Hücre Karakterizasyon Deneyleri

WJ-MKH'LERİN OSTEOJENİK, KONDROJENİK VE ADİPOJENİK HÜCRELERE FARKLILAŞTIRILMASI

Araştırmalarımız boyunca izole edilen WJ-MKH'lerin mezenkimal kök hücre kriterlerini sağladıklarını göstermek amacıyla "İnsan MKH fonksiyonel tanımlama kiti(R&D Systems, Cat:SC006)" kullanıldı ve WJ-MKH'ler kemik, kıkırdak ve yağ dokusu hücrelerine farklılaştırıldı. Farklılaştırma prosedürü için erken pasaj numarasında (maksimum 3 pasaj sayısı) kültür edilen WJ-MKH'lerden 12 kuyucuklu kültür plaklarında bulunun poli-D-lisin kaplı lameller üzerine ve 15mL hacim kapasitesine sahip falkon tüplerine kit prosedüründe belirtilen hücre sayıları göre ekim yapıldı. Ekilen hücreler, %5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C'de osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşma prosedürleri için kit protokolünde tanımlanan süreler ve koşullara göre inkübe edildi (Şekil 2).



Şekil 2: İnsan WJ-MKH fonksiyonel tanımlama protokolü

Uygulanan protokollerin bitiminde osteojenik ve adipojenik hücrelere farklılaştırılan gruplara buz üzerinde soğutulmuş saf metanol ile fiksasyon işlemi uygulandı. İşlem sonucunda fikse edilmiş hücrelere oil red ve alizarin red histokimyasal boyamaları ve immünofloresan boyama yapıldı. Sonuçlar ışık mikroskobu ve floresan mikroskobu kullanılarak değerlendirildi. Süspanse kültür ortamında inkübasyonu gerçekleştirilen ve pellet formunda bulunan kondrojenik farklılaşma grubu hücreleri ise inkübasyon süresi bitiminde fikse edilip agara gömüldü. Gömülen pelletten kriyo kesitler alınarak alsiyen mavisi boyaması ile histokimyasal olarak boyandı ve ışık mikroskobu ile veriler elde edildi.

İMMÜNİFLORESAN (İF) BOYAMA

İzole edilmiş WJ-MKH'lerin kök hücre kriterlerini sağlayıp sağlamadığını belirlemek için CD44 ve CD90 kök hücrelere özgü yüzey antijenleri için antikorlar kullanılarak immünofloresan işaretleme gerçekleştirildi. CD90 birincil antikor Abcam (ab225), CD44 birincil antikor Abcam (ab6124), DAPI CST (8961S), Anti-fare ikincil antikor Jackson Immuno Research (115-095-003), Anti-tavşan ikincil antikor Jackson Immuno Research (111-095-003) kullanıldı.

Öncelikle 12 kuyucuklu hücre plaklarının içerisine steril 18mm çapında lameller yerleştirildi. İşlem sonrasında her kuyucuğa 4×10^3 hücre ekildi ve inkübe edildi. Inkübasyon sonrası fiksasyon için -20°C 'de soğutulmuş metanol kuyucuk başına 1ml olarak eklendi ve plak 30 dakika boyunca -20°C 'de inkübe edildi. Süre sonunda soğuk PBS kullanılarak yıkama yapıldı. Lameller temiz bir pens yardımıyla hücre fikse edilen yüzeyleri yukarıda kalacak şekilde kuyucuklardan alındı. Permeabilizasyon işlemi için her lamel üzerine $80 \mu\text{l}$ %0,2'lik TritonX-100 içeren PBS eklenip 5 dakika bekletildi. PBS solüsyonu ile 3 kez yıkama yapılmasının ardından her lamel üzerine $80 \mu\text{l}$ %1 Bovin Serum Albumin (BSA) içeren PBS eklenerek 30 dakika bekletildi böylece bloklama işlemi gerçekleştirildi. Lameller PBS kullanılarak 3 kez yıkandı. Yıkama işleminin ardından 1:100 oranında bloklama tamponu ile dilüe edilmiş CD90 ve CD44 primer antikorları ile 2 saat boyunca inkübe edildi. Inkübasyon sonrası lameller PBS ile 3 kez

yıkandı. Daha sonra primer antikorlara uygun 1:100 oranında bloklama tamponuyla seyreltilmiş sekonder antikorlarla 1 saat boyunca karanlıkta inkübe edildi. Inkübasyon süresi bitiminde lameller PBS ile 3 kez yıkandıktan sonra $6 \mu\text{l}$ DAPI boyası damlatılmış temiz lameller üzerine hücre fiksasyonu yapılmış yüzeyler DAPI boyasıyla temas edecek şekilde yerleştirilip 1 gece boyunca karanlıkta bekletilerek kurumaları sağlandı. Olympus DP71 floresan mikroskobunda DP Controller ve DP Manager programları kullanılarak immünofloresans görüntüleri 10X, 20X ve 40X büyütmelemler kullanılarak elde edildi.

AKIŞ SİTOMETRİ ANALİZİ

Akış sitometrisi deneylerinde WJ-MKH'lerin hücre yüzey belirteçlerini değerlendirmek için BD Accuri C6 Cytometer cihazı ve bu cihazla uyumlu BD Stemflow Human MSC Analysis Kit (San Jose, CA, ABD) kullanıldı. Kit protokolüne göre hücreler, bir kazıyıcı yardımıyla kültür plaklarının yüzeyinden kaldırıldı ve hücrelerin peletlenmesi için 1300 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Pelete $600 \mu\text{L}$ PBS eklendi ve yeniden süspanse edildi. Hücreler, kit prosedürlerine göre dört farklı CDH (CD44, CD73, CD90 ve CD105) CD antijen antikorları ile etiketlendi. CD90 FITC (Klon: 5E10), CD105 PerCP-Cy5.5 (Klon: 266), CD73 APC (Klon: AD2) ve CD44 APC (Klon G44-26) ve CD34 APC (Klon 8G12) ile etiketlenen hücreler incelenmiştir. Negatif kontrol olarak herhangi bir antikor içermeyen hücre süspansiyonu kullanıldı. Inkübasyonun sonunda hücreler, bağlanmamış antikorları uzaklaştırmak için 1300 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi ve süpernatantları çıkarıldı ve aynı hacimde PBS eklenerek yeniden süspanse edildi. Daha sonra, etiketli hücreler sitometre tüplerine aktarıldı (son hacim $500 \mu\text{L}$ olacak şekilde) ve her numunenin CD antijen yüzdesi, negatif kontrol ve izotip kontrolüne göre BD Accuri C6 Sitometre cihazında geçirilerek analiz edildi.

HÜCRE CANLILIK VE PROLİFERASYON TESTİ

Antioksidan moleküllerin (NAC ve AA-2P) hücrelerin proliferasyon kapasiteleri üzerindeki etkisini analiz etmek için WST-1 testi (Dojindo, Cat:W201, Japonya) kiti kullanılarak, üreticinin önerileri doğrultusunda

yapıldı. Bu testler için 96 kuyulu hücre kültürü kaplarına kuyu başına 2×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapılarak deney başlatıldı. Deney süresi bitiminde kuyucuk başına 100 μ l DMEM/F12 ortamına 10 μ l WST-1 probu eklenecek şekilde oran hesabı yapılarak deney planlandı. Kuyucuklara WST-1 probu eklendikten sonra kültür kabı ışık görmeyecek şekilde 37°C 'de inkübe edildi. Probun çalışma prensibi kolorimetrik absorbans ölçümüne dayalı olup, inkübasyonun birinci saatinden sonra her saat başı (ikinci, üçüncü ve dördüncü saatlerde) 460 nm dalga boyunda plak okuyucuda absorbans ölçümü yapıldı. Sonuçlar kontrol grubuna %100 denilerek, %canlılık olarak hesaplandı.

NÖTRAL KIRMIZI BOYAMASI (NÖTRAL KIRMIZI TUTULUM DENEYİ)

WST-1 ve MTT gibi hücre canlılık testlerine alternatif olarak WJ-MKH'lerinin kültür şartlarındaki canlılık kapasitelerini ölçmek amacıyla nötral kırmızı tutulum deneyi yapıldı. Nötral kırmızı boyası canlı hücrelerin boyanmasında kullanılan bir boya olup, lizozomlarda tutularak bu hücrelerin kırmızı granüllü bir görünüm almasını sağlamaktadır (20). Farklı konsantrasyonlarda (2, 5 ve 7 mg/ 100 ml) nötral kırmızı çözeltisi hazırlanmış olup, WJ-MKH'leri için en uygun boya konsantrasyonunun 5 mg/100 ml olduğu saptandı. %5 FBS' li DMEM/ F12 ortamında son konsantrasyonu 5 mg/ml olacak şekilde boya çözeltisi hazırlanarak, 96-kuyucuklu plakta kuyucuk başına 200 μ l boya olacak şekilde hücreler %5 CO_2 'li inkübatörde 37°C 'de ortalama 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi bitiminde PBS ile yıkama basamağından sonra, %4 formaldehitte fiksasyon basamağında hücreler 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası formaldehit ortamdan uzaklaştırılıp, kuyucuklara 200 μ l destain (etil alkol, asetik asit ve distile su içeren) solüsyonu eklenerek, 420 nm'de plate okuyucuda spektrofotometrik ölçüm yapıldı.

İstatistiksel Analiz

Verilerin değerlendirilmesinde SPSS Windows 22.00 paket programı kullanıldı. Kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasındaki-kare testi ve gerektiğinde Fisher'in kesin ki-kare testi ve sürekli değişkenler bağımsız örneklem t-testi ve Mann-Whitney U testi kullanılarak

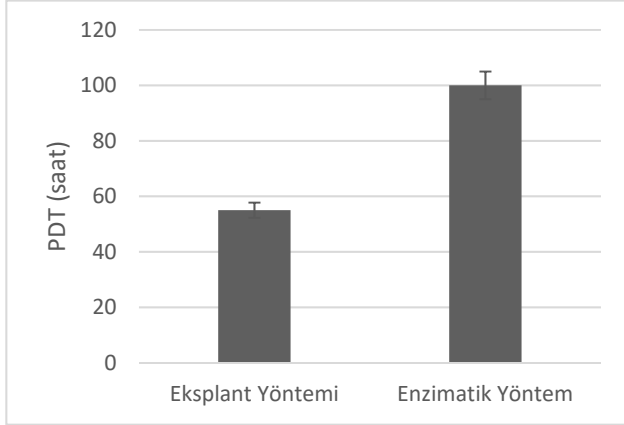
karşılaştırıldı. Sürekli değişkenler ortalama \pm standart sapma ve SEM, kategorik değişkenler ise yüzde olarak ifade edildi. Tüm analizlerde $p < 0.05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Hücre kültürü çalışmalarından elde edilen veriler, deney içi ve deneyler arası en az 3-9 kez tekrarlanarak elde edildi.

BULGULAR

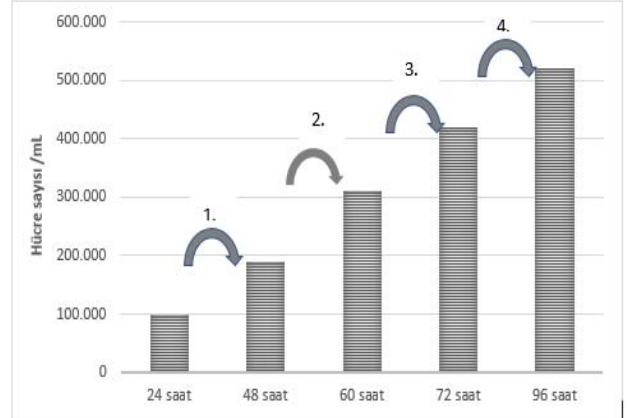
WJ-MKH'lerin İzolasyon Süreleri ve Proliferasyon Hızları

Eksplant yöntemi ve enzimatik yöntemle elde edilen WJ-MKH'lerin proliferasyon kapasiteleri karşılaştırıldığında, öncelikle ters faz ışık mikroskobu ile yaptığımız hücre sayımlarına göre eksplant yönteminin proliferasyon hızının daha yüksek olduğu görüldü. Eksplant yöntemi ile elde edilen WJ-MKH 'lerin iki katına çıkma zamanı (population doubling time; PDT) $\sim 59 \pm 12$ saat iken, enzimatik yöntem ile elde edilen hücrelerde ise $\sim 100 \pm 17$ saati bulduğu belirlendi (Şekil 3). Hücrelerin genel olarak proliferasyon hızının pasaj 2 ve 3'de en yüksek seviyede olduğu, pasaj 3'den sonra ise, proliferasyon hızının azaldığı gözlemlendi (Şekil 4).

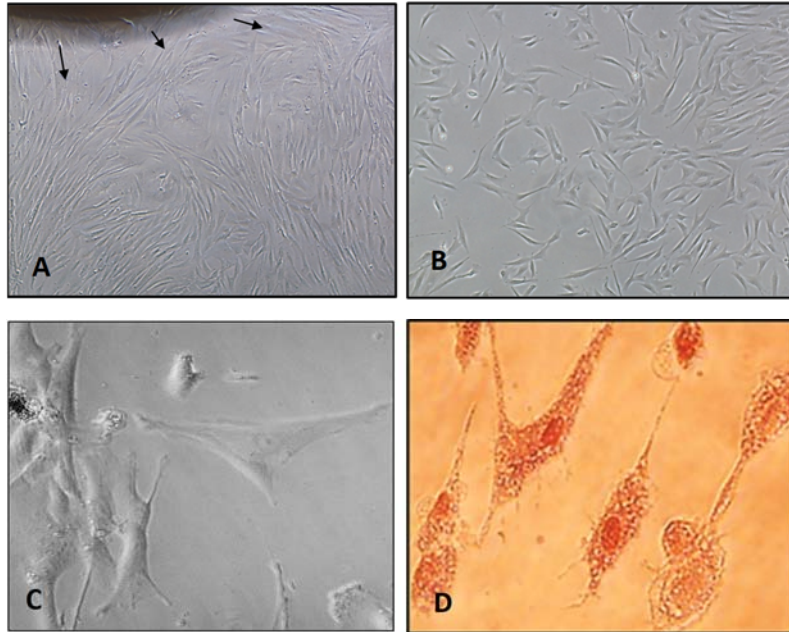
Bu değer enzimatik yöntem ile elde edilen kök hücreler için ortalama yaklaşık 830 hücre/saat olarak bulunmuştur. Eksplant yöntemi ile WJ-MKH'lerinin en erken 6. gün, en geç 21-22. günde eksplantlardan çıkmaya başladıkları gözlemlendi. Şekil 5'de kök hücrelerin 9-10. günde eksplantlardan ilk çıkışlarının ters faz ışık mikroskopik görüntüsü görülmektedir.



Şekil 3: Eksplant ve enzimatik yöntem ile elde edilen WJ-MKH sayılarının in-vitro kültür koşullarında iki katına çıkma zamanı (population doubling time; PDT). (Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak ifade edilmiştir) ($p < 0,05$, $n=7$)



Şekil 4: Eksplant yöntemi ile izole edilen WJ-MKH'lerinin periyodik zaman aralıklarında pasajlanması sonucu hücre sayısındaki değişimler (Her saat dilimi toplam 5 adet olacak şekilde ayrı pasajlardaki hücre sayılarını içermektedir)

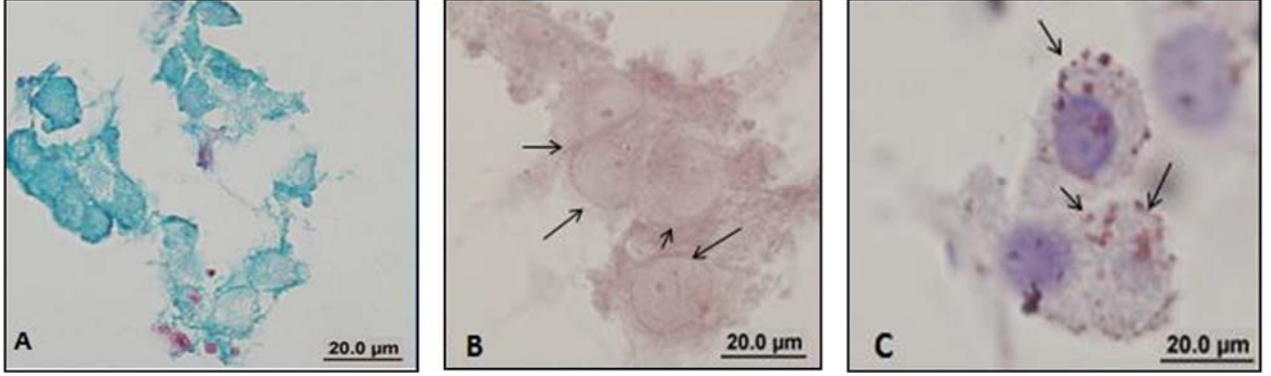


Şekil 5: Eksplant yöntemi ile elde edilen WJ-MKH'lerinin ters faz ışık mikroskopik görüntüsü (pasaj-0,10. Gün) 10X büyütme (A) 20X büyütme (B) 40X büyütme (C) Nötral kırmızı ile boyanan WJ-MKH'lerinin ters faz ışık mikroskopik görüntüsü (20X büyütme) (D) (Olympus Mikroskop, oklar eksplanttan hücre çıkış yönlerini göstermektedir).

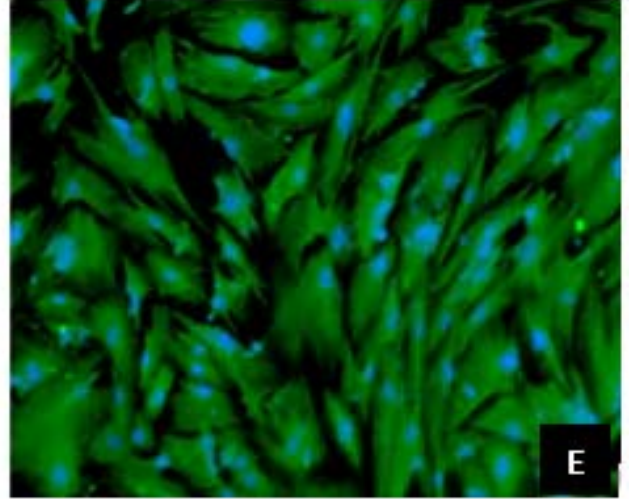
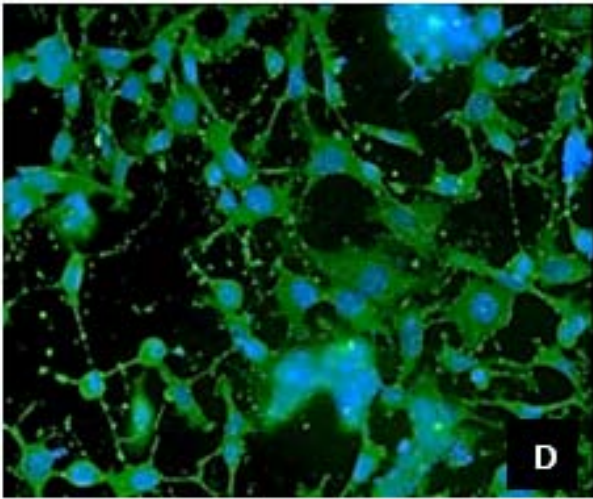
WJ-MKH'ların farklılaşma kapasitesi

Wharton jölesinden elde edilen kök hücrelerin kondrojenik, osteojenik ve adipojenik hücrelere

farklılaşabildiği fenotipik ve immunokimyasal boyama ile gösterilmiştir (Şekil 6).



Şekil 6 A-B-C. WJ-MKH'lerin insan MKH fonksiyonel tanımlama kiti prosedürüne uygun olarak kondrojenik, osteojenik ve adipojenik farklılaşma indüksiyonu sonrası elde edilen histokimyasal boyama görüntüleri (A: kondrojenik farklılaşma grubu (Alcian mavisi boyama); B: osteojenik farklılaşma grubu (Alizarin kırmızısı boyama); C: adipojenik farklılaşma grubu (Oil red boyama) (100X büyütme) Oklar farklılaşmış hücre grupları için ilgili boya tutulumlarını göstermektedir.

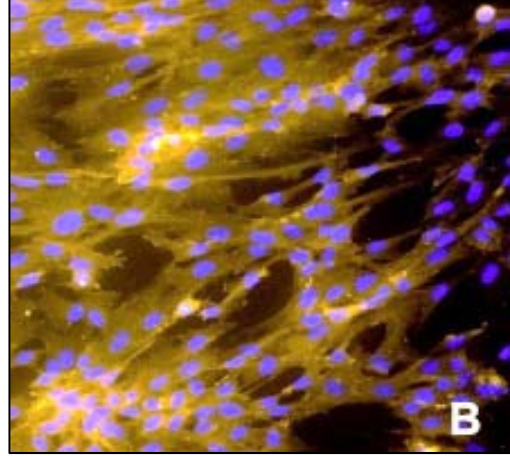
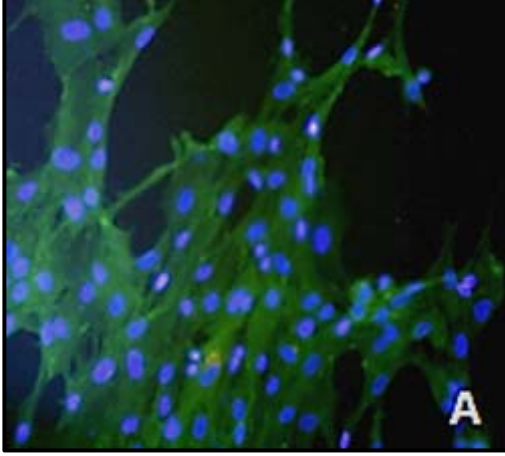


Şekil 6 D-E WJ-MKH farklılaşmasının immünofloresan boyama ile değerlendirilmesi. Osteojenik hücrelerde Florokrom etiketli osteokalsin antikorunun floresan görüntüsü (D), Adipojenik hücrelerde Florokrom etiketli FABP4 antikorunun Floresan ışınlama görüntüsü (E) (20X büyütme, Hücre çekirdekleri DAPI kullanılarak mavi olarak görünmektedir.)

WJ-MKH Karakterizasyonu

MKH karakterizasyonu için erken pasaj ve geç pasaj hücreleriyle farklı deney setleri kurularak oluşturulan preparatların floresan görüntüleri alındı. WJ-MKH'lerinde pasaj sayısı ilerledikçe veya kültür koşulları

yetersizleştikçe kök hücre özelliklerini kademeli olarak kaybettikleri gözlemlendi. Düzenli bir şekilde idamesi yapılan WJ-MKH'lerinde, MKH'lere özgü olan CD90 ve CD44 gibi yüzey antijenlerinin yaptığı floresan ışımaya varlığı gösterilmiştir (Şekil 7).

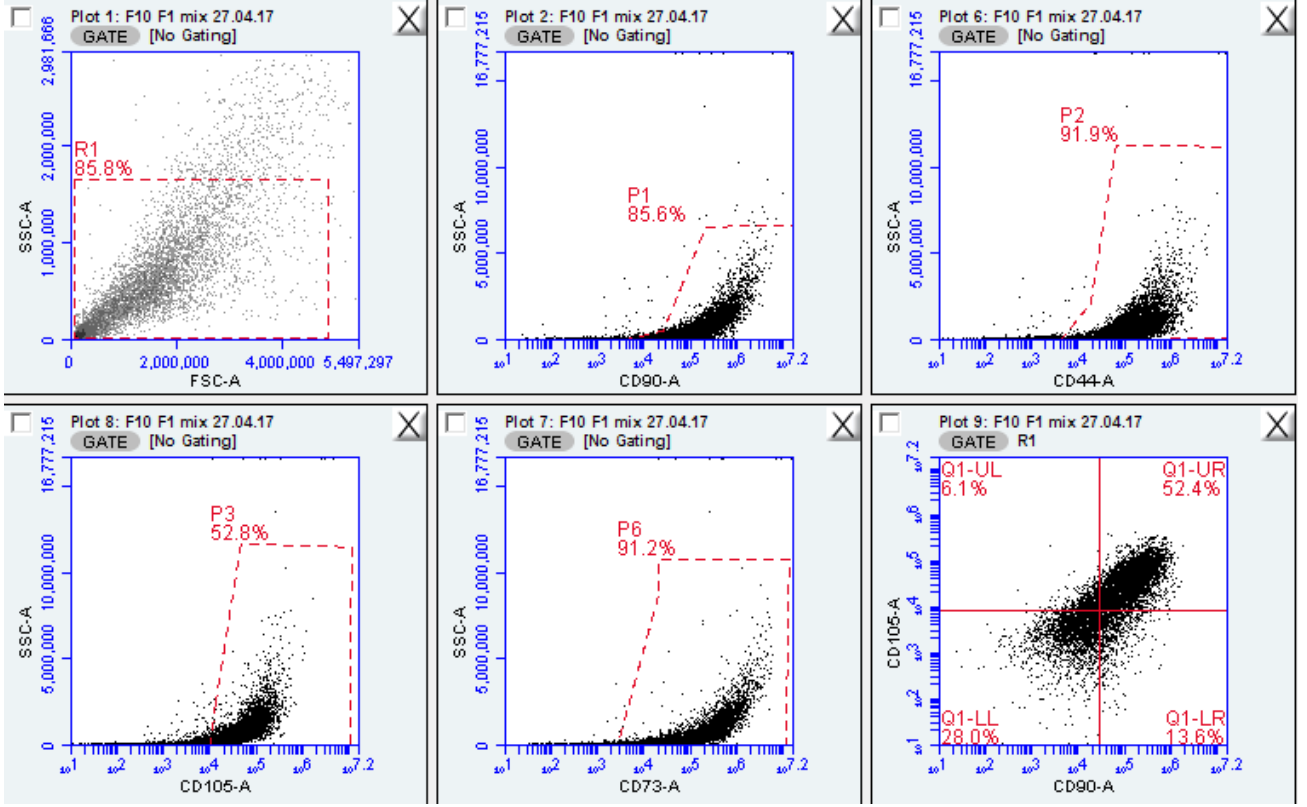


Şekil 7: WJ-MKH'lerinin karakterizasyonu için elde edilen hücre yüzey antijenlerin immunfloresans görüntüleri (A); FITC işaretli (yeşil) CD90 antikoruna ışımaya görüntüsü, nükleus (mavi), (B); Fikoeritrin işaretli (turuncu) CD44 antikoruna ışımaya görüntüsü, nükleus (mavi), (10X'lik büyütme)

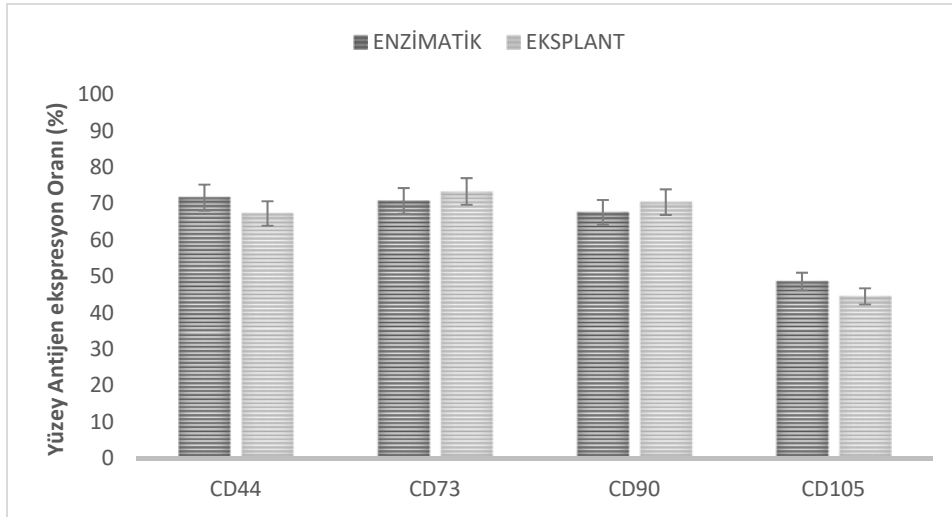
MKH'lere özgü hücre yüzey antijen oranları

MKH'lere özgü hücre yüzey antijen düzeyleri için örnek bir akış sitometri verisi Şekil 8A ve hücre yüzey antijen ekspresyon oranları Şekil 8B'de gösterilmiştir. Wharton jölesinden iki farklı yöntemle izole edilen hücrelerin mezenkimal kök hücrelere özgü CD90, CD73,

CD44 ve CD105 yüzey antijenlerini eksprese edebildikleri, CD34 için düşük ekspresyon sergiledikleri akış sitometrik olarak belirlenmiştir. Ekspant ve enzimatik yöntemi ile elde edilen kök hücrelerin akış sitometri ile değerlendirilen yüzey antijenleri oranlarında istatistiksel anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0,05$, $n=17$).



Şekil 8-A. Örnek bir akış sitometri verisi. Farklılaşmamış bir WJ-MKH örneğinde hücrelerde CD 90; %86, CD105; %56, CD73; %91 ve CD44; %92 oranında eksprese edilmektedir.

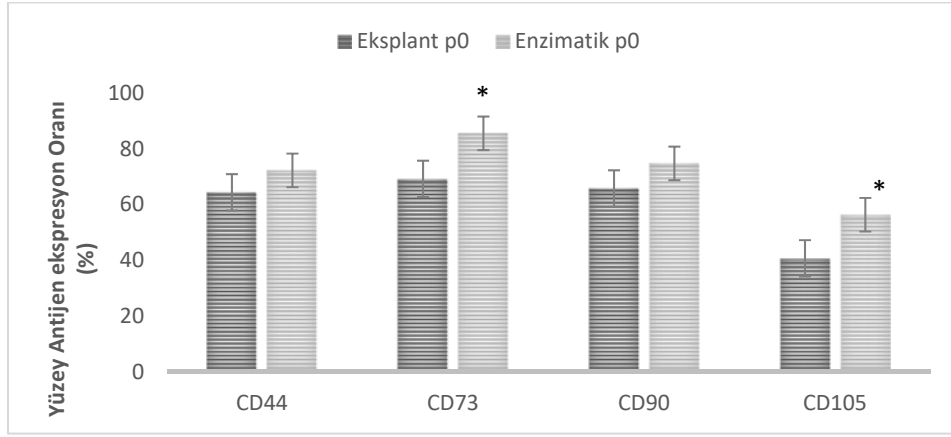


Şekil 8-B. Eksplant ve enzimatik yöntem ile elde edilen kök hücrelerin yüzey antijen ekspresyon oranları. Dördüncü pasaja kadar elde edilen tüm hücrelerin yüzey antijen ekspresyon oranlarının ortalaması alınarak, sonuçlar ortalama \pm SEM olarak ifade edilmiştir.

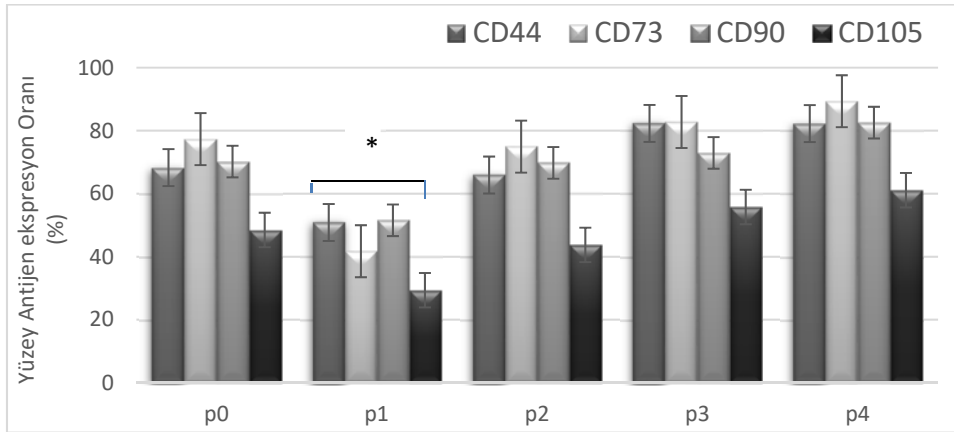
Ayrıca WJ-MKH'lerin kültüre edilerek çoğaltılmaları esnasında, pasajlamanın hücre yüzey antijen ifadelerine etkisi akış sitometri analizi ile değerlendirildi. Şekil 9'da eksplant ve enzimatik yöntem ile elde edilen hücrelerin pasajlanmadan önce (p0), hücre yüzey antijenlerini ifade oranları görülmektedir. Enzimatik yöntem ile elde edilen kök hücrelerin pasaj yapılmadan önce CD44 ve CD90 ifade oranlarının, eksplant yöntemi ile elde edilenlere göre daha yüksek olma eğiliminde oldukları gözlenmekle beraber, istatistiksel anlamlı bir farklılık

saptanmadı. CD73 ve CD 105 oranları ise pasaj yapılmadan önce enzimatik yöntem ile izole edilen hücrelerde daha yüksek bulundu ($p>0,05$).

Her iki izolasyon yönteminde de, ilk pasajlama işleminden sonra genel olarak hücre yüzey antijenlerini ifade oranlarının azaldığı gözlemlendi. Dördüncü pasaja kadar CD105 yüzey antijeni dışında ortalama %80 ve üstü hücre yüzey antijenlerinin eksprese edilebildiği belirlendi (Şekil 10).



Şekil 9: Eksplant ve Enzimatik yöntem ile elde edilen WJ-MKH'lerin pasajlama yapılmadan önce (p0) hücre yüzey antijeni ifade oranları. Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak ifade edilmiştir (n=7).

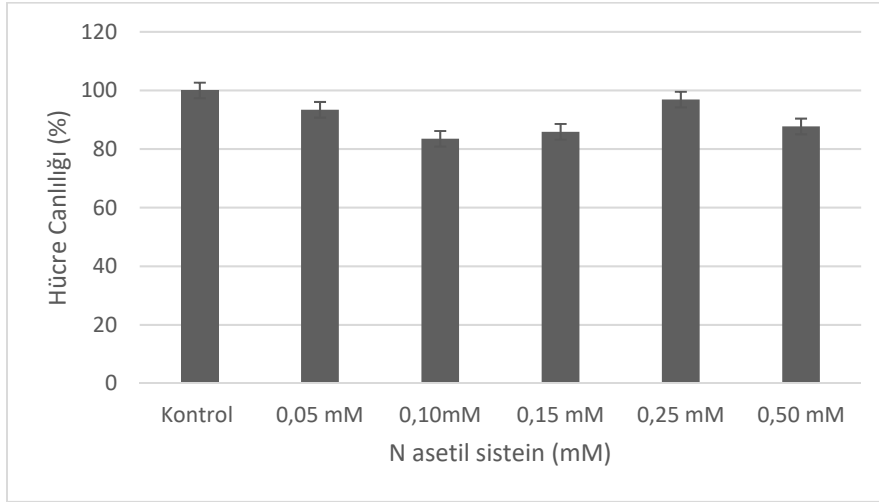


Şekil 10: WJ-MKH'lerinin çoğaltılması esnasında pasajlamanın hücre yüzey antijen ifadelerine etkisi Eksplant yöntemi ile elde edilen WJ-MKH'lerde yüzey antijen oranları ilk pasajlama sonrası (p1), pasajlama yapılmadan öncesine göre (p0) belirgin olarak düşük ifade edildi ($*p<0,05$, n=5). Dördüncü pasaja kadar CD105 yüzey antijeni dışında, diğer hücre yüzey antijenlerinin ~% 70-80 oranında eksprese edilebildiği belirlendi. Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak ifade edilmiştir.

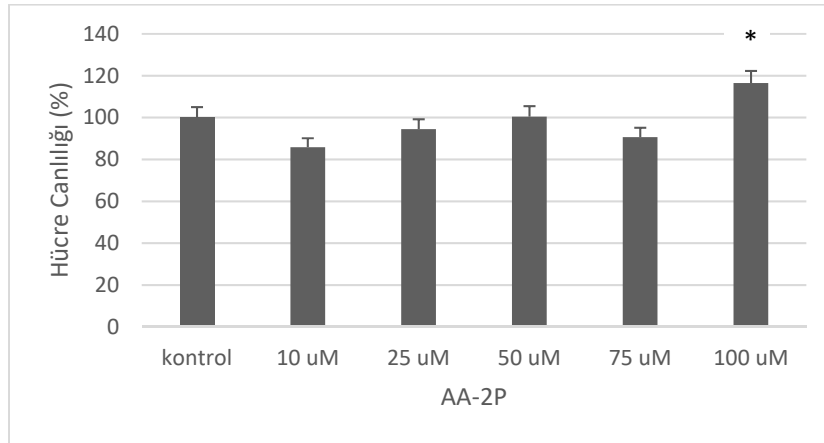
N-Asetil Sistein ve askorbik asit 2-fosfat ilavesi ile sağlanan kültür koşullarının hücre canlılığı üzerine etkisi

Üçüncü (3.) ve dördüncü (4.) pasajlama ile elde edilen kök hücrelerin idamesinde kültür ortamına eklenen antioksidan moleküllerin hücre canlılığı ve

proliferasiyonuna etkisi değerlendirildi. Yedi (7) gün süre ile N asetil sistein (NAC; 0,05-0,5 mM) doz aralığında WJ-MKH kültür ortamına uygulamasının hücrelerin canlılığı üzerine istatistiksel anlamlı bir etkisi saptanamadı ($p>0,05$). Diğer taraftan yedi (7) gün süre ile AA-2P uygulaması (100 μ M) kök hücre canlılığını anlamlı olarak artırdı ($p=0,017$). Hücre canlılık oranları Şekil 11 ve 12'de görülmektedir.



Şekil 11. WJ-MKH'lerinde kültür ortamına yedi (7) gün süre ile N-asetil sistein (NAC) uygulamasının doza bağlı hücre canlılığına etkileri. Nötral kırmızı tutulum deneyi elde edilen sonuçlar (deney grubu / kontrol grubu)x100 formülü ile (%)canlılık olarak hesaplandı ve sonuçlar ortalama± (SEM) olarak verildi (n=17).



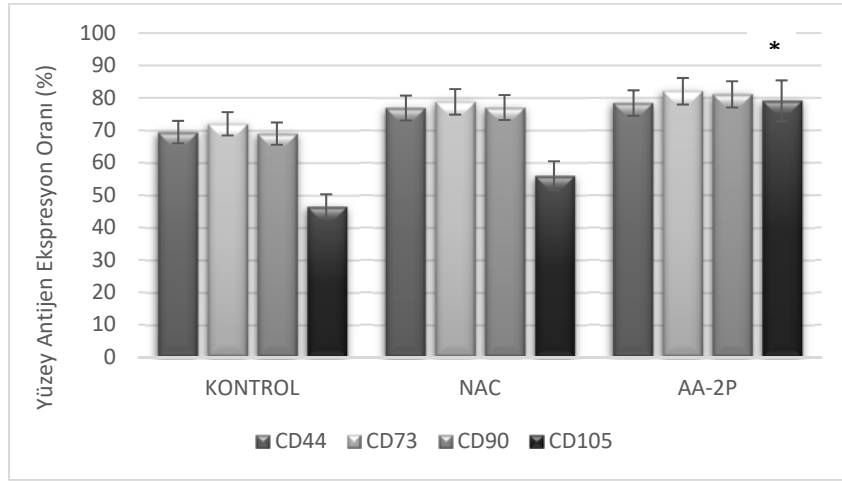
Şekil 12. WJ-MKH'lerinde kültür ortamına yedi (7) gün süre ile askorbik asit 2-fosfat (AA-2P) uygulamasının doza bağlı hücre canlılığına etkileri. Nötral kırmızı tutulum deneyi elde edilen sonuçlar (deney grubu / kontrol grubu)x100 formülü ile canlılık (%) ort± (SEM) olarak verilmiştir.(n=17) 100 uM AA-2P uygulaması kök hücre canlılığını anlamlı olarak artırmıştır (* $p=0,017$)

Kültür ortamına eklenen antioksidan moleküllerin hücre yüzey antijeni ifadeleri üzerine etkisi

Akış sitometri deneylerinden elde edilen verilere göre WJ-MKH'lerde kültürde hücre yoğunluğu %90'a ulaştığında, CD90, CD73 ve C105 protein ekspresyonları önemli ölçüde azaldığı ve daha sonra düşük yoğunluklu pasajlama yapılması bu durumu geri döndürmediği gözlemlendi. WJ-MKH'lerde pasaj 4'ün üzerindeki pasajlarda CD90, CD73 ve C105 protein ekspresyonları önemli ölçüde azaldığı belirlendi. Bu nedenlerle pasaj 4'ün üzerindeki hücreler çalışmaya alınmadı. WJ-MKH'lerde farklılaşma ortamı ile on günlük bir inkübasyon sonucunda CD90,

CD73 ve C105 protein ekspresyonları önemli ölçüde azalmaktadır. Bu azalma, CD105 ekspresyonunun %1'in altına inmesine yol açtığı değerlendirildi.

NAC uygulaması sonrası CD 44, CD73, CD90 ve CD105 yüzey antijenlerinde kontrol grubuna (antioksidan uygulama yapılmayan WJ-MKH göre) istatistiksel anlamlı bir artış olmamakla birlikte ortalama ~%2-5 artma eğilimi gözlemlenmiştir. AA-2P uygulaması da benzer şekilde CD44, CD73 ve CD90 istatistiksel anlamlı bir artış olmamakla birlikte CD105 yüzey antijen ifadesinde ~%25-30 oranında, kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı bir artış olduğu gözlemlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil 13).



Şekil 13 Antioksidatif kültür koşullarının hücre yüzey antijen ifadeleri üzerine etkisi

Erken pasaj dönemindeki (pasaj-2 ve pasaj-3) WJ-MKH'lerine 0,5 mM NAC ve 100µM askorbik asit 2-fosfat (AA-2P) uygulaması sonrası yüzey antijenlerinin değişimleri (%). AA-2P uygulaması CD105 antijen ekspresyonunu kontrol grubuna göre belirgin olarak artırmıştır ($*p<0,05$). Sonuçlar $\text{ort} \pm \text{SEM}$ olarak ifade edilmiştir ($n=12$).

Eksplant yöntemine göre izole edilip 0,5 mM NAC uygulaması yapılan pasaj-2 ve pasaj-3 WJ-MKH grupları kendi kontrol gruplarıyla kıyaslandığında, CD44, CD73 ve CD90 yüzey antijenlerinin 3. pasajda 2. pasaj hücrelerinde göre ~%20 oranında daha fazla bulunduğu gösterilmiştir. Bunun tam tersi olarak ise CD105 yüzey antijeni oranı önemli ölçüde azalmıştır. Enzimatik yöntem ile izole edilip 0,5 mM NAC uygulaması yapılan pasaj-2 ve pasaj-3 WJ-MKH grupları kendi kontrol gruplarıyla kıyaslandığında, 2. ve 3. pasaj hücre gruplarında CD105 yüzey antijeni azalmıştır. CD105 yüzey antijeninin oran olarak en düşük

bulduğu grup 2.pasaj kontrol grubu hücreleri olarak gözlemlenmiştir. Eksplant yöntemine göre izole edilip 100 µM AA-2P uygulaması yapılan pasaj-2 ve pasaj-3 WJ-MKH grupları kendi kontrol gruplarıyla kıyaslandığında, CD44, CD73 ve CD90 yüzey antijenlerinin 3. pasajda 2. pasaj hücrelerinde göre ~%20 oranında daha fazla bulunduğu belirlenmiştir. Enzimatik yöntem ile izole edilip 100 µM AA-2P uygulaması yapılan pasaj-2 ve pasaj-3 WJ-MKH gruplarının ise kendi kontrol gruplarıyla kıyaslandığında, yüzey antijenlerinin oran olarak en fazla bulunduğu grubun, AA-2P uygulaması yapılan 3. pasaj hücreleri olduğu gözlemlenmiştir (Veriler makalede gösterilmedi).

TARTIŞMA

MKH'ler kemik iliği yanı sıra yağ dokusu, periferik kan gibi yetişkin dokulardan elde edilebilirler (21). MKH karakterizasyon kriterleri olarak farklılaşma kapasitelerinin gösterilmesinin yanı sıra CD105, CD73, CD44 ve CD90 yüzey antijenleri için pozitif ekspresyon ve CD45, CD34, CD14, CD19 ve HLA-DR için negatif ekspresyon olması önerilmiştir (22). İnsan perinatal dokularında bulunan kök hücreler ekstra embriyonik multipotent mezankimal kök hücreler (EE-MKH) olarak tanımlanmışlardır. Bunlar; plasenta, amniyotik sıvı, amniyon, göbek kordonu kanı ve göbek kordonunda yer alabilmektedirler (23). Göbek kordonu kanından elde edilen MKH, hematopoetik kök hücre gereken tedavilerde sıklıkla kullanılmaktadır, ancak bu hücrelerin klinikte kullanılmasında en büyük sınırlamanın, kordondan izole edildiklerinde başlangıç sayılarının az olması nedeniyle, transplantasyon için gerekli toplam sayıya ulaşmadaki zorluk olduğu belirtilmektedir (24).

Göbek kordonundaki iki arter ve bir venin çevresinde koruyucu görevi olan bir doku olan Wharton jölesi (WJ) içinde bulunan MKH'ler ise, embriyolojik gelişim sırasında aort-gonad-mezonefroz bölgesine göç ederken kordon etrafında kalmış olan primitif MKH'lerdir (10)(25). Wharton jölesi ve plasentadan elde edilen hücrelerin genotip ve fenotip olarak fetal özellik gösterdikleri ve International Society for Cellular Therapy tarafından yayınlanan minimal kök hücre kriterlerini taşıdıkları belirtilmektedir (22). Bizim çalışmamızda insan göbek kordonu wharton jölesinden kök hücre elde edilmiş, bu hücrelerin kök hücre karakteri taşıyabildikleri, kemik, adipoz doku ve kırıldak hücrelerine dönüşebilme kabiliyetleri gösterilmiştir. Ayrıca bu hücrelerin CD90, CD73, CD44 ve CD105 yüzey antijenlerini eksprese edebildikleri, CD34 için düşük ekspresyon sergiledikleri akış sitometrik olarak belirlenmiştir.

Primer kültür için dokuların ayrışmasını sağlayan teknikler, izole edilen hücrelerin miktarını ve kalitesini etkileyebilir. Primer kültür için dokuların ayrışmasını sağlamada çeşitli teknikler günümüze kadar geliştirilmiştir. Uygulanan tekniklerin özellikleri izole edilen hücrelerin miktarını ve kalitesini etkileyebilir. Bizim

çalışmamızda enzimatik yöntem ve eksplant yöntemi ile primer dokudan kök hücre izolasyonunun etkinliği karşılaştırıldı. Salehinejad P.ve arkadaşlarının 2012 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada insan göbek kordonundan mezankimal kök hücrelerinin izolasyonu için dört izolasyon metodunu karşılaştırmışlardır (26). Çalışmada üç enzimatik yöntem; kollajenaz/hiyalüronidaz/tripsin, kollajenaz/tripsin ve tripsin ve eksplant yöntemlerinin sonuçları değerlendirmiştir. Kök hücreler, tüm yöntemler ile başarıyla izole edilmiş olmasına rağmen izolasyon yönteminin, izole edilmiş hücrelerin hücre sayısını ve çoğalma kapasitesini büyük ölçüde değiştirdiği gösterilmiştir. Akış sitometrisi analizi CD44, CD73, CD90 ve CD105'in tüm gruplarda eksprese edildiğini gösterilirken CD34 ve CD45 eksprese edilmediği gösterilmiştir. Enzimatik gruplarda C-kit ekspresyonu eksplant grubundakinden daha yüksek iken, Oct-4 ekspresyonu diğer gruplara kıyasla kollajenaz tripsin grubunda daha yüksek bulunmuştur. Kollajenaz/tripsin hücre izolasyonu yönteminin, diğerlerinden daha yüksek bir hücre yoğunluğu sağladığı ve bu hücrelerin, C-kit ve Oct-4 gibi pluripotent hücre markörlerinin daha yüksek bir oranını ifade ettiği belirlenmiştir. Eksplant yöntemi ise diğer yöntemlere kıyasla daha yüksek bir hücre proliferasyon hızı ve aktivitesi ile sonuçlanmıştır. Deriden keratinosit hücrelerinin elde edildiği bir diğer çalışmada da primer hücre kültür koşulları için eksplant yöntemi, enzimatik yöntemle göre daha verimli bulunmuştur (17). Bizim çalışmamızda da daha önceki çalışmalara benzer şekilde, eksplant yöntemi ile elde edilen hücrelerin proliferasyon hızlarının, kollajenaz/tripsin enzimlerinin kullanıldığı enzimatik yöntemle göre daha yüksek olduğu gözlemlendi. Bizim çalışmamızda doubling time eksplant yöntemi ile elde edilen hücrelerde ortalama ~3 gün iken, enzimatik yöntemle elde edilen hücrelerde bu süre ortalama ~5 günü bulmuştur. Eksplant yöntemi ile saatte 1.250 hücre/saat, enzimatik yöntemle elde edilen kök hücreler için ise ortalama ~830 hücre/saat olarak proliferasyon hızı bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, daha önce gerçekleştiren çalışmalara uyumlu olarak wharton jölesinden kök hücre izolasyonu için, eksplant yönteminin daha kısa zaman diliminde elde edilen toplam hücre sayısına göre enzimatik yöntemle göre daha avantajlı olduğu düşünüldü.

İnsan umbilikal kordonu yaklaşık olarak 50-60 cm uzunluğundadır ve literatürdeki mevcut çalışmalar göbek kordonunun hangi bölümü üzerinde çalışıldığına dair bazı bilgiler sağlamıştır. Göbek kordonunun üç anatomik segmentinden elde edilen WJ-KMH'leri karşılaştırmışlardır. Maternal ve fetal segmentlerden izole edilen WJ-MKH'lerin, daha fazla canlılık sergilediğini ve orta segmentten alınan hücrelere kıyasla daha yüksek proliferasyon oranına sahip olduğunu göstermişlerdir (27). Bu çalışmada immünofenotipleme, her üç segmentten türetilen WJ-MKH'lerin, MKH işaretleyicileri CD105, CD73, CD90, CD44, CD13 ve CD29'un yanı sıra HLA-ABC ve HLA-DR'yi ifade ettiğini, ancak hematopoietik işaretleyiciler CD14, CD34 ve CD45 için negatif olduğunu ortaya çıkarmıştır. Aynı zamanda bu çalışmada gerçekleştirilen embriyonik belirteçlerin analizi, her üç bölümün Nanog ve 3/4'ü gösterdiğini, ancak sadece maternal ve fetal segmentlerin SSEA 4 ve TRA-160'ı ifade ettiğini göstermiştir. Her üç segmentten alınan hücreler, diğer iki segmente kıyasla çok daha düşük farklılaşma potansiyeli gösteren orta segmentler ile kondrojenik, osteojenik ve adipojenik soylara farklılaşabilmiştir. Bizim çalışmamızda göbek kordonunun fetal segmentleri kullanılmıştır

MKH'ler, büyüme ortamına yanıt olarak dinamik olarak değişebilir ve izolasyon yöntemi ve çoğaltılmaları esnasında biyolojik işlevleri değişikliklere uğrayabilir (28)(29). Çalışmamızda hücrelerin çoğaltılması sürecinde CD44, CD73, CD90, CD105 yüzey antijen ifadelerinin dördüncü pasaja kadar anlamlı değişmediği akış sitometrik olarak belirlendi. Mezenkimal kök hücrelerde CD73 ifadesinin, elde edildiği dokuya ve kültür koşullarına göre değişebildiği ve anti-enflamatuar aktivitesi yoluyla onarıcı özellikleri belirleyebileceği ileri sürülmüştür. Perikardiyal yağ dokusundan türetilen MKH'lerinin CD73'ün heterojen ekspresyonu gösterilmiş, CD73 ile zenginleştirilmiş MKH'lerin anti-enflamatuar aktivite yoluyla kardiyak onarımı desteklediği gösterilmiştir (30). Bizim çalışmamızda pasajlama öncesi enzimatik yöntemle elde edilen MKH'lerde CD73 ekspresyonu akış sitometrik olarak daha yüksek bulundu. Bununla birlikte MKH'lerin çoğaltılması sırasında 4. pasaja kadar CD73 ifadesinde pasaj grupları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi.

Terapötik amaçlar için in vitro hücre çoğaltmada, MKH'lerin hızla muhtemelen oksidatif stresi içeren erken yaşlanmaya girdikleri ileri sürülmektedir (19). NAC ve AA eksojen ve non-enzimatik antioksidanlar olup, kemik eliğinden ve yağ dokusundan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin çoğaltılmaları üzerine etkileri çalışılmıştır (31)(32)(33). Bizim çalışmamızda anti-oksidatif özellikleri bilinen NAC ve AA'nin fosfatlı türevi AA-2P hücre kültür ortamına eklenmiş ve hücre proliferasyonuna etkisi değerlendirilmiştir. Yedi (7) gün süre ile hücre kültür ortamına AA-2P (100µM) ilavesinin hücre proliferasyonunu belirgin olarak artırmıştır ($p<0,05$). Ayrıca CD44, CD73 ve CD90 hücre yüzey antijen oranlarında istatistiksel anlamlı bir artış olmamakla birlikte, AA-2P uygulaması CD105 yüzey antijen ifadesinde ~%25-30 oranında, kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). Yedi (7) gün süre ile NAC uygulaması, hücre proliferasyonunu artırma eğilimi göstermekle beraber, NAC uygulaması yapılmayan WJ-MKH'lere göre istatistiksel anlamlı bir artış elde edilememiştir.

Sonuç olarak bu çalışma ile wharton jölesinden enzimatik ve eksplant yöntemi ile kök hücreler elde edilerek, hücre proliferasyon kapasiteleri karşılaştırıldı. Wharton jölesinden kök hücre izolasyonu için, eksplant yönteminin yüzey antijen ifadeleri anlamlı değişmeksizin daha kısa zaman diliminde elde edilen toplam hücre sayısına göre enzimatik yöntemle göre daha avantajlı olduğu düşünüldü. Diğer taraftan anti oksidan bir molekül olan AA-2P ilavesi ile sağlanan kültür koşullarının kök hücre canlılığını artırdığı gösterildi.

TEŞEKKÜR

Bu araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2017.KB.SAG.028 kodu ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. *Cell Stem Cell*. 2008;2:313–19.
2. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al.

- Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145-47.
3. Gilbert DM. The future of human embryonic stem cell research: Addressing ethical conflict with responsible scientific research. *Med Sci Monit*. 2004;10:RA99-103.
 4. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina LK. The Development of Fibroblast Colonies in Marrow and Spleen Cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970;3:393-403.
 5. Prockop DJ. Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): Controversies, myths, and changing paradigms. *Mol Ther*. 2009;17:939-46.
 6. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143-47.
 7. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: Paradoxes of passaging. *Exp Hematol*. 2004;32:414-25.
 8. Chen G, Yue A, Ruan Z, Yin Y, Wang R, Ren Y, et al. Comparison of biological characteristics of mesenchymal stem cells derived from maternal-origin placenta and Wharton's jelly. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6:228.
 9. Kalaszczynska I, Ferdyn K. Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells: Future of regenerative medicine? Recent findings and clinical significance. *BioMed Res Int*. 2015;2015:430847.
 10. Liao LL, Ruszymah BHI, Ng MH, Law JX. Characteristics and clinical applications of Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells. *Curr Res Transl Med*. 2020;68:5-16.
 11. Bieback K, Brinkmann I. Mesenchymal stromal cells from human perinatal tissues: From biology to cell therapy. *World J Stem Cells*. 2010;2: 81-92.
 12. Zhang Y, Tao H, Gu T, Zhou M, Jia Z, Jiang G, et al. The effects of human Wharton's jelly cell transplantation on the intervertebral disc in a canine disc degeneration model. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6:154.
 13. Paldino E, Cenciarelli C, Giampaolo A, Milazzo L, Pescatori M, Hassan HJ, et al. Induction of Dopaminergic Neurons From Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cell by Forskolin. *J Cell Physiol*. 2014;229(2):232-44.
 14. Zhang L, Tan X, Dong C, Zou L, Zhao H, Zhang X, et al. In vitro differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs), derived from Wharton's jelly, into choline acetyltransferase (ChAT)-positive cells. *Int J Dev Neurosci*. 2012;30:471-7.
 15. Liang J, Wu S, Zhao H, Li S lei, Liu Z xin, Wu J, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly differentiate into cholinergic-like neurons in vitro. *Neurosci Lett*. 2013;532:59-63.
 16. Fu Y-S, Cheng Y-C, Lin M-YA, Cheng H, Chu P-M, Chou S-C, et al. Conversion of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Wharton's Jelly to Dopaminergic Neurons In Vitro: Potential Therapeutic Application for Parkinsonism. *Stem Cells*. 2006;24(1):115-124.
 17. Orazizadeh M, Hashemitabar M, Bahramzadeh S, Dehbashı Fn, Saremy S. Comparison of the enzymatic and explant methods for the culture of keratinocytes isolated from human foreskin. *Biomed Rep*. 2015;3:304-8.
 18. Kozubenko N, Turnovcova K, Kapcalova M, Butenko O, Anderova M, Rusnakova V, et al. Analysis of in vitro and in vivo characteristics of human embryonic stem cell-derived neural precursors. *Cell Transplant*. 2010;19:471-86.
 19. Choo KB, Tai L, Hymavathees KS, Wong CY, Nguyen PNN, Huang CJ, et al. Oxidative stress-induced premature senescence in Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *Int J Med Sci*. 2014;11:1201-7.

20. Jain AK, Singh D, Dubey K, Maurya R, Mittal S, Pandey AK. Models and Methods for In Vitro Toxicity. In: *In Vitro Toxicology*. 2018;3:45-65.
21. Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal*. 2011;9:12.
22. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8:315-17.
23. Marcus AJ, Woodbury D. Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: Do not discard: Stem Cells Review Series. *J Cell Mol Med*. 2008;12:730-42.
24. Kelly SS, Sola CBS, De Lima M, Shpall E. Ex vivo expansion of cord blood. *Bone Marrow Transplant*. 2009;44:673-81.
25. Taghizadeh RR, Cetrulo KJ, Cetrulo CL. Wharton's Jelly stem cells: Future clinical applications. *Placenta*. 2011;32:311-315.
26. Salehinejad P, Banu Alitheen N, Ali AM, Omar AR, Mohit M, Janzamin E, et al. Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly. *Vitr Cell Dev Biol Anim*. 2012;48:75-83.
27. Lim J, Razi ZRM, Law J, Nawi AM, Idrus RBH, Ng MH. MSCs can be differentially isolated from maternal, middle and fetal segments of the human umbilical cord. *Cytotherapy*. 2016;18:1493-1502.
28. Tang J, Wang X, Tan K, Zhu H, Zhang Y, Ouyang W, et al. Injury-induced fetal reprogramming imparts multipotency and reparative properties to pericardial adipose stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9:218.
29. Sousa BR, Parreira RC, Fonseca EA, Amaya MJ, Tonelli FMP, Lacerda SMSN, et al. Human adult stem cells from diverse origins: An overview from multiparametric immunophenotyping to clinical applications. *Cytometry Part A*. 2014;85:43-77.
30. Tan K, Zhu H, Zhang J, Ouyang W, Tang J, Zhang Y, et al. CD73 expression on mesenchymal stem cells dictates the reparative properties via its anti-inflammatory activity. *Stem Cells Int*. 2019;2019:1-12.
31. Guo YL, Chakraborty S, Rajan SS, Wang R, Huang F. Effects of oxidative stress on mouse embryonic stem cell proliferation, apoptosis, senescence, and self-renewal. *Stem Cells Dev*. 2010;19:1321-31.
32. Tan DQ, Suda T. Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Homeostasis as Regulators of Stem Cell Fate and Function. *Antioxid Redox Signal*. 2018;29:149-168.
33. Lin TM, Tsai JL, Lin SD, Lai CS, Chang CC. Accelerated growth and prolonged lifespan of adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells in a medium using reduced calcium and antioxidants. *Stem Cells Dev*. 2005;14:92-102.

Periampuller bölge tümörlerinde laparoskopi yardımcı pankreatikoduodenektomi

LAPAROSCOPIC ASSISTED PANCREATICODUODENECTOMY IN PERIAMPULLARY TUMORS

 Serkan ZENGER¹,  Uğur CAN¹,  Bülent GÜRBÜZ¹,  Çağrı BİLGİÇ¹,  Erman SOBUTAY¹,
 Orhan BİLGE^{1,2}

¹VKV Amerikan Hastanesi, Genel Cerrahi Kliniği, İstanbul, Türkiye

²Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ÖZ

Amaç: Teknolojideki gelişmeler doğrultusunda, morbidite oranlarını azaltmak amacıyla pankreas cerrahisinde de minimal invaziv girişimlerin sayısı giderek artmaktadır. Bu çalışmada, kliniğimizde periampuller bölge tümörlerinde laparoskopi yardımcı pankreatikoduodenektomi uyguladığımız hastaların sonuçlarını paylaşmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Nisan 2014 ile Ağustos 2020 yılları arasında periampuller bölge tümörü nedeniyle laparoskopi yardımcı pankreatikoduodenektomi uygulanan hastaların demografik ve klinik özellikleri, ameliyat verileri, postoperatif sonuçları ve patolojik verileri retrospektif olarak incelendi.

Bulgular: Çalışmaya dâhil edilen 30 hastanın 12'si (%40) kadın, 18'i (%60) erkek, ortalama yaşları 64 ± 14 idi. Beş (%13,3) hastada açık yönetime geçildi. Ortalama ameliyat süresi 378 ± 72 dakika ve ortalama hastanede kalış süresi ise 10 ± 4 gündü. Postoperatif dönemde, 7 (%23,3) hastada minor komplikasyon, 4 (%13,3) hastada ise major komplikasyon saptandı. Major komplikasyonlar; 3 hastada grade B pankreatik fistül ve 1 hastada ise karın içi apse idi. Hastaların patolojik tanuları; 20'sinde (%66,7) adenokarsinom, 6'sında (%20) intrapapiller müsinöz neoplazm, 2'sinde (%6,6) solid psödopapiller neoplazm, 1'inde (%3,3) nöroendokrin tümör ve 1'inde (%3,3) ise gastrointestinal stromal tümör idi. Ortalama çıkarılan lenf nodu sayısı $16,5 \pm 8,2$ idi.

Sonuç: Laparoskopi yardımcı pankreatikoduodenektomi, lokal komplikasyonları ve morbiditeyi azaltması, hastanede kalış süresini kısaltması gibi minimal invaziv girişimlerin sağladığı avantajlar nedeniyle uygulanabilir bir yöntemdir. Ancak laparoskopi yardımcı pankreatikoduodenektomi için, uygun hasta seçimi ile birlikte bu işlemin laparoskopi konusunda tecrübeli ekipler tarafından uygulanması gerektiği kanaatindeyiz.

Anahtar Sözcükler: Laparoskopi, periampuller tümör, pankreatikoduodenektomi, komplikasyon

ABSTRACT

Objective: In line with the developments in technology, the number of minimally invasive procedures in pancreatic surgery is increasing gradually in order to reduce the morbidity rates. We aimed to present the results of the

Serkan ZENGER

VKV Amerikan Hastanesi,
Genel Cerrahi Kliniği, İstanbul, Türkiye
E-posta: serkanzen@hotmail.com

 <https://orcid.org/0000-0003-2860-7413>

patients who underwent laparoscopic assisted pancreaticoduodenectomy for periampullary tumors in our clinic.

Materials and Methods: Data of the patients who underwent laparoscopic assisted pancreaticoduodenectomy for periampullary tumor between April 2014 and August 2020 were retrospectively analyzed. Demographic and clinical characteristics, surgical outcomes, postoperative results and pathological data of the patients were presented.

Results: Of the 30 patients, 12 (40%) were female, 18 (60%) were male, and the mean age was 64 ± 14 . Laparoscopy was converted to open technique in five (13.3%) patients. The mean operative time was 378 ± 72 minutes and the mean length of hospital stay was 10 ± 4 days. In postoperative period, seven (23.3%) patients had minor complications and four (13.3%) patients had major complications. Major complications were grade B pancreatic fistula in three patients and intraabdominal abscess in one patient. Pathological diagnosis of patients were adenocarcinoma in 20 (66.7%) patients, intrapapillary mucinous neoplasm in 6 (20%) patients, solid pseudopapillary neoplasm in 2 (6.6%) patients, neuroendocrine tumor in 1 (3.3%) patient and gastrointestinal stromal tumor in 1 (3.3%) patient. The mean number of harvested lymph nodes was 16.5 ± 8.2 .

Conclusion: Laparoscopic assisted pancreaticoduodenectomy is a feasible method due to the advantages of minimally invasive procedures such as reducing local complications, morbidity, and length of hospital stay. However, we believe that laparoscopic assisted pancreaticoduodenectomy should be performed by teams experienced in laparoscopy in selected patients.

Keywords: Laparoscopy, periampullary tumor, pancreaticoduodenectomy, complication

Periampuller bölge tümörlerinde tek etkin tedavi yöntemi pankreatikoduodenektomidir (PD). Ancak pankreasın anatomik yerleşimi ve önemli yapılara komşuluğu nedeniyle PD'ler morbidite ve mortalite oranları yüksek olan girişimlerdir. Laparoskopik pankreatikoduodenektomi (LPD) prosedürünün 1994 yılında Gagner ve Pomp (1) tarafından bildirilmesinden sonraki ilk on yıl boyunca, prosedür zor bir gelişim sürecinden geçmiştir (2, 3). Son zamanlarda, teknolojideki ilerlemeler ve laparoskopik tekniklerin daha da gelişmesiyle birlikte, cerrahlar arasında LPD konusuna ilgi de giderek artmaktadır (4-7).

Hasta sayılarındaki artış ve edinilen tecrübenin ameliyat ve sonrasındaki sonuçlarla önemli ölçüde ilişkili olduğu iyi bilinmektedir (8). Literatürde, LPD'nin açık pankreatikoduodenektomiye (APD) kıyasla daha az ağrı, daha hızlı iyileşme ve daha kısa hastanede kalış süreleri oluşturduğunu, bununla birlikte onkolojik açıdan iki grup arasında benzer sonuçlar elde edildiğini belirten birçok

çalışma yapılmıştır (9-11). LPD yöntemi ile yapılan çalışmalarda majör komplikasyon oranının % 4 - 12, minör komplikasyon oranının ise % 30 - 40 arasında değiştiği bildirilmiştir (12-14). Buna karşın, Dokmak ve ark.ları (15) LPD yönteminin şiddetli pankreatik fistül oranını arttırarak yüksek morbiditeye neden olduğunu belirtmiş ve çalışmalarında majör komplikasyon oranının %28 olduğunu bildirmişlerdir.

Pankreas cerrahisinde total laparoskopik PD, laparoskopi yardımcı PD, laparoskopi yardımcı robotik PD ve total robotik PD gibi minimal invaziv cerrahi yöntemler tanımlanmıştır (16). Kliniğimizde, laparoskopik diseksiyon ve eksizyon sonrasında küçük bir kesi ile açık rekonstrüksiyonlardan oluşan laparoskopi yardımcı pankreatikoduodenektomi (LYPD) tekniğini kullanılmaktadır. LYPD yönteminde, APD ile karşılaştırıldığında daha hassas mobilizasyon ve diseksiyon sağlanması, total LPD yöntemi ile kıyaslandığında ise daha güvenli rekonstrüksiyon ve

hemostaz sağlanması gibi potansiyel avantajlar olduğu belirtilmiştir (17).

Bu çalışmadaki amacımız, kliniğimizde periampuller bölge tümörleri nedeniyle laparoskopi yardımıyla pankreatikoduodenektomi uyguladığımız hastaların verilerini paylaşarak tekniğin etkinliğini değerlendirmektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma protokolü

Nisan 2014 ile Ağustos 2020 tarihleri arasında, Amerikan Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği'nde, periampuller bölge tümörleri nedeniyle pankreas cerrahisi uygulanan hastaların verileri retrospektif olarak incelendi. Laparoskopi yardımıyla pankreatikoduodenektomi uygulanan hastalar çalışmaya dâhil edildi. Açık yöntemle pankreatikoduodenektomi yapılan hastalar ve eş zamanlı ek organ cerrahisi uygulanan hastalar çalışma dışı bırakıldı. Dışlanma kriterleri sonrası çalışmaya 30 hasta dâhil edildi. Çalışmamız için Koç Üniversitesi Etik Kurul Komitesi'nden etik kurul onayı alındı (Onay numarası: 2020.449.IRB1.164) ve çalışma Helsinki Bildirgesi ilkelerine uygun olarak yürütüldü. Tüm hastalardan ameliyat için yazılı onam alındı.

Hastaların demografik ve klinik özellikleri, ameliyat verileri, postoperatif sonuçları ve patolojik verileri incelendi. Demografik ve klinik özellikler; yaş, cinsiyet, ASA (American Society of Anesthesiologists) skoru, vücut kitle indeksi (VKİ), preoperatif tümör lokasyonları olarak, ameliyat verileri; ameliyat süresi ve açığa geçilme oranları olarak, postoperatif sonuçlar; hastanede kalış süresi, komplikasyon durumu, perkütan drenaj gereksinimi ve tekrar yatış durumu olarak ve patolojik veriler ise; patolojik tanılar, ortalama çıkarılan lenf nodu sayıları olarak değerlendirildi.

Postoperatif sonuçlar; ameliyat sonrası 30 gün içinde olan mortalite, morbidite, yara yeri enfeksiyonu ve pankreas cerrahisine özgü Uluslararası Pankreas Çalışma Grubu'nun tanımladığı şekilde postoperatif pankreatik fistül (POPF) veya gecikmiş mide boşalması gibi komplikasyonlar retrospektif olarak kaydedildi (18, 19). POPF; radyolojik veya cerrahi ile yerleştirilmiş olan bir

drenden ölçülen amilaz değerinin normal üst sınırın 3 katından fazla olması durumu olarak tanımlandı. Eğer POPF durumu 3 haftadan kısa sürerse 'Biyokimyasal kaçak', 3 haftadan uzun sürer ve/veya endoskopik ya da perkütan yöntemle drenin yerinin değiştirilmesi gerekirse 'Grade B POPF' olarak tanımlandı. Minör komplikasyonlar; Clavien-Dindo sınıflamasına göre I. ve II. derece, majör komplikasyonlar ise; III., IV. ve V. derece komplikasyonlar olarak tanımlandı (20). Yara yeri enfeksiyonu, insizyondan pürülan akıntı olması veya insizyon altından aseptik olarak alınan sıvı veya doku kültürünün pozitif sonuçlanması olarak tanımlandı. Ameliyat süresi, ilk insizyondan cilt sütürü bitinceye kadar olan süre olarak ve hastanede kalış süresi ise ameliyat olunan günden taburcu olunan güne kadar geçen süre olarak tanımlandı.

Ameliyat öncesi değerlendirmede, tüm hastalara kontrastlı abdominal bilgisayarlı tomografi veya abdominal manyetik rezonans görüntüleme uygulandı. Ameliyatlar tek merkezde aynı cerrah tarafından yapıldı. Ameliyat tekniğine (laparoskopik veya açık) cerrahın preoperatif değerlendirmesi sonucunda karar verildi. VKİ'si <30 olan, geçirilmiş açık karın ameliyatı bulunmayan ve preoperatif dönemde damar invazyonu net olarak tespit edilmemiş hastalarda ilk planda laparoskopik cerrahi düşünüldü. Ayrıca pankreas başında yerleşim gösteren solid psödopapiller neoplazm, nöroendokrin tümör (NET) veya gastrointestinal stromal tümör (GIST) olgularındaki lezyonların ana pankreatik kanaldan ayırlamayacağı tespit edildiğinde de PD planlandı. Ameliyat piyesleri, hepatobiliyer patoloji konusunda deneyimli olan aynı patoloji ekibi tarafından değerlendirildi. Kanseri tanısı konan hastalarda evreleme Amerikan Kanseri Komitesi (AJCC) evreleme sistemine göre yapılmıştır (21).

Cerrahi teknik

Tüm hastalara rutin olarak venöz tromboembolizm profilaksisi ve cilt insizyonundan 30 dakika önce profilaktik intravenöz antibiyotik uygulandı. Nazogastrik tüp ve idrar kateteri rutin olarak yerleştirildi. Hastalar supin pozisyonunda ve bacakları açık olacak şekilde ameliyat pozisyonuna alındı. Ameliyatı gerçekleştirecek

cerrah hastanın bacak arasında yer alırken, kamerayı ve yardımcı aletleri kullanacak yardımcı cerrah ise hastanın sağ kısmında pozisyon aldı.

Göbek hizasından 1 adet 10 mm'lik trokar ve kamera yerleştirildi. Ardından göbeğin sağ lateral kısmı orta aksiller hat hizasından 1 adet 12 mm'lik, sol lateral kısmı orta aksiller hat hizasından ve sağ üst kadrandan da 1'er adet 5 mm'lik trokarlar yerleştirildi. Karın içinde yapılan detaylı eksplorasyon sonrası gastrokolik ligaman ultrasonik cihaz kullanılarak açıldı ve bursa omentalis girildi. Sağ gastroepiploik damarlar ligate edildikten sonra hepatik fleksura ve sağ kolon serbestleştirildi. Duodenum ve pankreas başı Kocher manevrası yapılarak serbestleştirildikten sonra, endoskopik lineer kesici/kapatıcı kullanılarak pilor koruyucu cerrahide duodenum pilorun 4-5 cm distalinden kesildi, tümör invazyon şüphesi veya yapışıklıklardan dolayı pilorun korunamadığı durumlarda ise mide antrum hizasından kesildi. Mide, sol üst karın bölgesine yerleştirilerek pankreas başı çevresinde daha iyi cerrahi görüş sağlandı. Kolesistektomi yapıldı, ana safra kanalı kliplenerek kesildi. Hepatik arter dönülerek askıya alındı, gastroduodenal arter çift kliplendi ve kesildi, suprapankreatik ve hepatik arter lenf düğümü diseksiyonu yapıldı. Treitz ligamanı ortaya konuldu, duodenum üçüncü ve dördüncü kısım serbestleştirildi. Proksimal jejunum kısmı laparoskopik bir zımbalama cihazı kullanılarak kesildi. Proksimal jejunum sağ üst kadrana alındı. Pankreas ile superior mezenterik ven ve portal ven arasındaki bağlantılar kesildi ve pankreas dönülerek askıya alındı. Daha sonra pankreas parenkimi ultrasonik makasla transekte edildi ve pankreas başı duodenum ile birlikte superior mezenterik ven ve superior mezenterik arterden tümüyle diseke edildi. Piyes safra kesesi ile birlikte en-blok olacak şekilde orta hattın yapılan 5-6 cm'lik kesiden karın dışına alındı. Aynı kesiden sırasıyla transmezokolik uç-yan duktomukoza pankreatikojejunostomi, hepatikojejunostomi ve antekolik çift kat üzerinden duodenojejunostomi veya gastrojejunostomi yapıldı. Ardından biliyer ve pankreatik anastomozların çevresine iki adet aspiratif dren yerleştirildi.

Postoperatif Takip

Ameliyat sonrası altıncı saatte su başlandı, tolere eden hastalara postoperatif birinci gün sulu gıda başlandı, bağırsak hareketlerinin durumuna göre diyetisyen eşliğinde kalori ihtiyacı da göz önünde bulundurularak her gün gıda alımı kademeli olarak artırıldı. Dren amilazı, dren içeriği ve miktarına göre genellikle postoperatif 4. veya 5. günde bakıldı. POPF saptanan hastalarda dren miktarı günlük 5 ml'nin altına indiği zaman dren çekildi ve hastalar yakın takip altına alındı.

Kanser tanısı tespit edilen hastalar tıbbi onkoloji bölümü tarafından National Comprehensive Cancer Network (NCCN) kılavuzuna göre takip edilmektedir. İlk iki yıl her 3-6 ayda bir klinik muayene, CA 19-9 bakılması ve gerekli durumlarda tomografi ile görüntüleme yapılması önerilir. İki yıldan sonra bu değerlendirmelerin yıllık yapılması önerilir.

İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler SPSS 24.0 sürümü kullanılarak gerçekleştirildi. Sürekli değişkenler ortalama \pm standart sapma, kategorik değişkenler ise sayı (%) şeklinde ifade edildi. Hastanede yatış sürelerini komplikasyon oluşma durumuna göre karşılaştırırken *independent samples t test* kullanıldı. Tüm analizler için p değerinin 0,05'in altında olduğu durumlar anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

PD ameliyatı yaptığımız 89 hasta analiz edildi, dışlanma kriterleri sonrası çalışmaya dâhil edilen 30 hastanın 12'si (%40) kadın, 18'i (%60) erkek idi. Hastaların ortalama yaşı 64 ± 14 ve ortalama VKİ'si 25.7 ± 3.9 idi. Preoperatif değerlendirmede; 8 (%26,7) hasta ASA I, 12 (%40) hasta ASA II, 8 (%26,7) hasta ASA III ve 2 (%6,6) hasta ASA IV idi (Tablo 1). Tümör yerleşimi 17 (%56,6) hastada pankreas başında, 9'unda (%30) ampulla vateride, 3'ünde (%10) duodenumda ve 1'inde (%3,3) ise koledokta idi.

Tablo 1. Laparoskopik yardımcı pankreatikoduodenektomi hastalarının demografik özellikleri

	n (%)
Cinsiyet	
Kadın	12 (40)
Erkek	18 (60)
Yaş, yıl *	64 ± 14
VKİ, kg/m ² *	25,7 ± 3,9
ASA	
I	8 (26,7)
II	12 (40)
III	8 (26,7)
IV	2 (6,6)

* ortalama ± standart sapma; VKİ, vücut kitle indeksi; ASA, American Society of Anesthesiologists

Beş (%16,6) hastada işleme laparoskopik devam edilemedi ve açığa geçildi. Bu hastalarda açığa geçilme nedenleri; 3'ünde damar invazyonu olması ve 2'sinde ise ileri derecede yapışıklık nedeniyle anatominin net olarak ortaya konamamasıydı. 27 (%90) olguya pilor koruyucu LPD ve 3 (%10) olguya ise klasik LPD uygulandı. Ortalama ameliyat süresi 378 ± 72 dakika ve ortalama hastanede kalış süresi ise 10 ± 4 gündü. Clavien-Dindo sınıflamasına göre 7 (%23,3) hastada minör komplikasyon, 4 (%13,3) hastada ise majör komplikasyon saptandı. Minör komplikasyonlar; 4 hastada yara yeri enfeksiyonu, 2 hastada gecikmiş mide boşalması, 1 hastada ise safra fistülü idi. Majör komplikasyonlar ise; 3 hastada grade B POPF, ve 1 hastada ise karın içi apse idi. Grade B POPF gelişen 3 hastaya perkütan drenaj uygulandı, dren takibi yapıldı ve ek bir problem olmadı. Ayrıca biyokimyasal kaçak saptanan 2 hasta da sorunsuz şekilde takip edildi. Postoperatif dönemde majör komplikasyon gelişen 4 (%13,3) hastaya perkütan drenaj uygulandı. Komplikasyon gelişen hastalarda hastanede yatış süresi komplikasyon gelişmeyen hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha uzun idi (13 ± 4 gün vs 7 ± 2 gün, p=0.001). Majör komplikasyon gelişen hastalarda hastanede yatış süresi minör komplikasyon gelişenlere göre daha uzundu ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (15 ± 4 gün

vs 12 ± 3 gün, p=0.13). Postoperatif 30 günlük takipte mortalite saptanmadı. Taburcu olduktan sonra 4 (%13,3) hasta tekrar yatırılarak takip edildi (Tablo 2).

Tablo 2. Laparoskopik yardımcı pankreatikoduodenektomi hastalarının cerrahi verileri ve postoperatif sonuçları

	n (%)
Tümör lokasyonu	
Pankreas başı	17 (56,6)
Ampulla vateri	9 (30)
Duodenum	3 (10)
Koledok	1 (3,3)
Ameliyat süresi, dakika*	378 ± 72
Açığa geçilen hasta sayısı	5 (16,6)
Damar invazyonu	3 (10)
Anatominin net ortaya konamaması	2 (6,6)
Komplikasyon	
Minor (Clavien-Dindo I/II)	7 (23,3)
Major (Clavien-Dindo III/IV/V)	4 (13,3)
Hastanede kalış süresi, gün*	10 ± 4
Perkütan drenaj	4 (13,3)
Tekrar yatış	4 (13,3)

* ortalama ± standart sapma

Patolojik tanı açısından değerlendirildiğinde, 20 (%66,7) hastada adenokarsinom, 6 (%20) hastada intrapapiller müsinöz neoplazi (IPMN), 2 (%6,6) hastada solid psödopapiller neoplazm, 1 (%3,3) hastada NET ve 1 (%3,3) hastada ise GİST saptandı. Adenokarsinom tanısı konan 3 (%15) hasta evre I, 15 (%75) hasta evre 2, 2 (%10) hasta ise evre 3 idi. Adenokarsinom tanısı konan 20 hastanın 16'sında R0 rezeksiyon sağlandı, 4 hastada ise retroperitoneal sınırın pozitif olduğu (R1 rezeksiyon) tespit edildi. Ortalama çıkarılan lenf nodu sayısı 16,5 ± 8,2 idi (Tablo 3).

Tablo 3. Laparoskopi yardımlı pankreatikoduodenektomi hastalarının patolojik verileri

Patolojik tanı	n (%)
Adenokarsinom	20 (66,7)
IPMN	6 (20)
Solid psödopapiller neoplazi	2 (6,6)
NET	1 (3,3)
GİST	1 (3,3)
Çıkarılan lenf nodu sayısı*	16,5 ± 8,2

IPMN, intrapapiller müsinöz neoplazi; NET, nöroendokrin tümör; GİST, gastrointestinal stromal tümör;

* ortalama ± standart sapma

TARTIŞMA

Bu çalışmada periampuller bölge tümörleri nedeniyle laparoskopi yardımlı pankreatikoduodenektomi uyguladığımız 30 hastamızın sonuçlarını paylaştık. Çalışmamızda, kendi serimizdeki 30 günlük tatmin edici perioperatif mortalite ve morbidite sonuçlarını bildirdik. Bu veriler doğrultusunda, periampuller bölge tümörlerinde LYPD'nin de akılda tutulması gereken bir ameliyat tekniği olabileceğini düşünmekteyiz.

LPD tekniği tanımlandıktan sonra yapılan ilk çalışmaların sonuçlarında, bu teknikte ameliyat sürelerinin uzun olması ve morbiditenin fazla tespit edilmesi nedeniyle PD işlemi için laparoskopinin avantajlı olmadığı belirtilmişti (1, 22). Ancak yıllar içinde teknolojideki gelişmelerin ve cerrahi tecrübenin artması ile birlikte LPD'nin uygulanma oranı ve popülaritesi de artmıştır (4, 5, 7).

Periampuller bölge tümörlerinin minimal invaziv cerrahi uygulamalarında total laparoskopik PD, laparoskopi yardımlı PD, laparoskopi yardımlı robotik PD ve total robotik PD gibi farklı yöntemler uygulanabilir (16). Kamarajah ve ark.larının (16) yaptığı meta-analizde, minimal invaziv teknikler arasında bazı farklılıklar bulunsa da, hem laparoskopik hem de robotik yaklaşımlar

sayesinde, onkolojik sonuçlardan ödün vermeden, cerrahi alan enfeksiyonları ve pulmoner komplikasyonları azaltarak daha kısa hastanede kalış süresi elde edilebildiği bildirilmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda, APD'ye kıyasla daha hassas mobilizasyon ve diseksiyon ve total LPD'ye kıyasla daha güvenli rekonstrüksiyon ve hemostazı içermesi ve daha sorunsuz bir postoperatif iyileşmeye yol açması nedeniyle LYPD gibi hibrit bir yöntemin daha uygun olabileceği belirtilmiştir (17, 23, 24). Biz de kliniğimizde laparoskopik diseksiyon ve eksizyon sonrasında küçük bir kesi ile açık rekonstrüksiyon olan LYPD tekniğini kullanmaktayız.

Son yıllarda, LPD'nin kısa ve uzun dönem sonuçları açısından APD'den farklı olmadığını bildiren birçok çalışma yayınlanmıştır (6, 25, 26). LPD ile APD'nin karşılaştırıldığı az sayıda randomize kontrollü çalışmalardan biri olan PADULAP çalışmasında, LPD'de daha kısa hastanede kalış süresi (13,5 vs 17 gün, P=0,024), daha uzun ameliyat süresi (486 vs 365 dakika, P=0,0001) ve açığa geçme oranının ise %23,5 olduğu bildirilmiştir (6). Aynı çalışmada majör komplikasyonların da LPD grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu bildirilmiştir (6). Periampuller kanserlerde, LPD ile APD'nin kıyaslandığı diğer önemli randomize kontrollü PLOT çalışmasında ise LPD grubunda hastanede kalış süresinin daha kısa (7 vs 13 gün, P=0,001), ameliyat süresinin daha uzun olduğu, postoperatif komplikasyonlar (gecikmiş mide boşalması, pankreatik fistül, kanama gibi), çıkarılan lenf nodu sayısı ve R0 rezeksiyon oranının ise APD grubu ile benzer olduğu raporlanmıştır (25). Klinik pratiğimizde ameliyat tekniğini belirlemeden önce mutlaka görüntüleme yöntemleri ile değerlendirme yapılmaktadır. Rezeksiyon gerektirecek net damar invazyonu veya ileri derecede yapışıklık olduğu tespit edilen hastalarda açık cerrahi ön planda tercih edilmektedir. Ancak radyolojik değerlendirmelere rağmen bazı hastalarda ameliyat esnasında ek damar invazyonları, yapışık olduğu bilinen damarın serbestleştirilememesi ya da yapışıklıklardan dolayı anatominin net olarak ortaya konamaması gibi durumlar olabilmektedir. Böyle durumlarda laparoskopiden açık cerrahiye geçiş yapılmıştır. Çalışmamızda, açığa geçme oranı %16, ortalama hastanede kalış süresi 10 gün ve ortalama ameliyat süresi 378 dakika

olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçların Kuesters ve ark.larının LYPD sonuçları ile uyumlu olduğu görülmektedir (24).

Song ve ark.larının (12) 500 hasta ile yaptıkları çalışmada, LPD sonrası minör komplikasyonlar % 32,4, majör komplikasyonlar % 4,8, klinik pankreatik fistül oranı ise %10,8 olarak raporlanmıştır. LPD yapılan 550 hastanın sonuçlarını bildiren Wang ve ark.larının (13) çalışmasında ise, Clavien Dindo III ve üzeri komplikasyon oranının %5,6, grade B/C pankreatik fistül oranının %7,4, gecikmiş mide boşalması oranının ise %14,5 olduğu belirtilmiştir. Zhou ve ark.ları (14) da LPD grubunda minör komplikasyon oranını %38, majör komplikasyon oranını ise %10,9 olarak bildirmişlerdir. Kuesters ve ark.ları (24) LPD grubundaki genel komplikasyon oranını %53,3 olarak raporlamışlardır. Bizim çalışmamızda, minör komplikasyon oranı %23,3 ve majör komplikasyon oranı ise %13,3 olarak tespit edilmiş ve literatür ile uyumlu olduğu saptanmıştır.

Çalışmamızın retrospektif olması ve küçük örneklem grubu içermesi gibi bazı limitasyonları bulunmaktadır. Ayrıca bu çalışmamızda, esas olarak kısa dönem sonuçlara odaklanmış olmamız, uzun dönem takip sonuçları, nüks ve sağkalım oranlarını belirtelememiş olmamız da bir diğer limitasyondur.

Sonuç olarak; LYPD, lokal komplikasyonları ve morbiditeyi azaltması, hastanede kalış süresini kısaltması gibi minimal invaziv girişimlerin sağladığı avantajlar nedeniyle uygulanabilir bir yöntemdir. Periampuller bölge tümörlerinde LYPD'nin akılda tutulması gereken bir ameliyat tekniği olabileceği ve ilerleyen yıllarda cerrahlar tarafından daha çok tercih edilebileceği kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Gagner M, Pomp A. Laparoscopic pylorus-preserving pancreatoduodenectomy. *Surg Endosc.* 1994;8:408-10.
2. Palanivelu C, Jani K, Senthilnathan P, Parthasarathi R, Rajapandian S, Madhankumar MV. Laparoscopic pancreaticoduodenectomy: technique and outcomes. *J Am Coll Surg.* 2007;205:222-30.
3. Pugliese R, Scandroglio I, Sansonna F, Maggioni D, Costanzi A, Citterio D, ve ark. Laparoscopic pancreaticoduodenectomy: a retrospective review of 19 cases. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech.* 2008;18:13-8.
4. Kendrick ML, Cusati D. Total laparoscopic pancreaticoduodenectomy: feasibility and outcome in an early experience. *Arch Surg.* 2010;145:19-23.
5. Khatkov I, Izrailov R, Tyutyunnik P, Khisamov A, Andrianov A, Fingerhut A. One hundred and forty five total laparoscopic pancreatoduodenectomies: A single centre experience. *Pancreatology.* 2017;17:936-42.
6. Poves I, Burdio F, Morato O, Iglesias M, Radosevic A, Ilzarbe L, ve ark. Comparison of Perioperative Outcomes Between Laparoscopic and Open Approach for Pancreatoduodenectomy: The PADULAP Randomized Controlled Trial. *Ann Surg.* 2018;268:731-9.
7. Langan RC, Graham JA, Chin AB, Rubinstein AJ, Oza K, Nusbaum JA, ve ark. Laparoscopic-assisted versus open pancreaticoduodenectomy: early favorable physical quality-of-life measures. *Surgery.* 2014;156:379-84.
8. Adam MA, Thomas S, Youngwirth L, Pappas T, Roman SA, Sosa JA. Defining a Hospital Volume Threshold for Minimally Invasive Pancreaticoduodenectomy in the United States. *JAMA Surg.* 2017;152:336-42.
9. Conrad C, Basso V, Passot G, Zorzi D, Li L, Chen HC, ve ark. Comparable long-term oncologic outcomes of laparoscopic versus open pancreaticoduodenectomy for adenocarcinoma: a propensity score weighting analysis. *Surg Endosc.* 2017;31:3970-8.
10. Shin SH, Kim SC, Song KB, Hwang DW, Lee JH, Lee D, ve ark. A comparative study of laparoscopic vs. open distal pancreatectomy for left-sided ductal adenocarcinoma: a propensity

- score-matched analysis. *J Am Coll Surg.* 2015;220:177-85.
11. Khaled YS, Fatania K, Barrie J, De Liguori N, Deshpande R, O'Reilly DA, ve ark. Matched Case-Control Comparative Study of Laparoscopic Versus Open Pancreaticoduodenectomy for Malignant Lesions. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech.* 2018;28:47-51.
 12. Song KB, Kim SC, Lee W, Hwang DW, Lee JH, Kwon J, ve ark. Laparoscopic pancreaticoduodenectomy for periampullary tumors: lessons learned from 500 consecutive patients in a single center. *Surg Endosc.* 2020;34:1343-52.
 13. Wang X, Cai Y, Jiang J, Peng B. Laparoscopic Pancreaticoduodenectomy: Outcomes and Experience of 550 Patients in a Single Institution. *Ann Surg Oncol.* 2020;27:4562-73.
 14. Zhou W, Jin W, Wang D, Lu C, Xu X, Zhang R, ve ark. Laparoscopic versus open pancreaticoduodenectomy for pancreatic ductal adenocarcinoma: a propensity score matching analysis. *Cancer Commun (Lond).* 2019;39:66.
 15. Dokmak S, Fteriche FS, Aussilhou B, Bensafta Y, Levy P, Ruszniewski P, ve ark. Laparoscopic pancreaticoduodenectomy should not be routine for resection of periampullary tumors. *J Am Coll Surg.* 2015;220:831-8.
 16. Kamarajah SK, Bundred JR, Marc OS, Jiao LR, Hilal MA, Manas DM, ve ark. A systematic review and network meta-analysis of different surgical approaches for pancreaticoduodenectomy. *HPB (Oxford).* 2020;22:329-39.
 17. Tian F, Wang YZ, Hua SR, Liu QF, Guo JC. Laparoscopic assisted pancreaticoduodenectomy: an important link in the process of transition from open to total laparoscopic pancreaticoduodenectomy. *BMC Surg.* 2020;20:89.
 18. Bassi C, Marchegiani G, Dervenis C, Sarr M, Abu Hilal M, Adham M, ve ark. The 2016 update of the International Study Group (ISGPS) definition and grading of postoperative pancreatic fistula: 11 Years After. *Surgery.* 2017;161:584-91.
 19. Wente MN, Bassi C, Dervenis C, Fingerhut A, Gouma DJ, Izbicki JR, ve ark. Delayed gastric emptying (DGE) after pancreatic surgery: a suggested definition by the International Study Group of Pancreatic Surgery (ISGPS). *Surgery.* 2007;142:761-8.
 20. Clavien PA, Sanabria JR, Strasberg SM. Proposed classification of complications of surgery with examples of utility in cholecystectomy. *Surgery.* 1992;111:518-26.
 21. Allen PJ, Kuk D, Castillo CF, Basturk O, Wolfgang CL, Cameron JL, ve ark. Multi-institutional Validation Study of the American Joint Commission on Cancer (8th Edition) Changes for T and N Staging in Patients With Pancreatic Adenocarcinoma. *Ann Surg.* 2017;265:185-91.
 22. Gagner M, Pomp A. Laparoscopic pancreatic resection: Is it worthwhile? *J Gastrointest Surg.* 1997;1:20-5; discussion 5-6.
 23. Pham H, Nahm CB, Hollands M, Pang T, Johnston E, Pleass H, ve ark. Hybrid laparoscopic pancreaticoduodenectomy: an Australian experience and a proposed process for implementation. *ANZ J Surg.* 2020.
 24. Kuesters S, Chikhladze S, Makowiec F, Sick O, Fichtner-Feigl S, Hopt UT, ve ark. Oncological outcome of laparoscopically assisted pancreatoduodenectomy for ductal adenocarcinoma in a retrospective cohort study. *Int J Surg.* 2018;55:162-6.
 25. Palanivelu C, Senthilnathan P, Sabnis SC, Babu NS, Srivatsan Gurumurthy S, Anand Vijai N, ve ark. Randomized clinical trial of laparoscopic versus open pancreatoduodenectomy for periampullary tumours. *Br J Surg.* 2017;104:1443-50.

26. Torphy RJ, Friedman C, Halpern A, Chapman BC, Ahrendt SS, McCarter MM, ve ark. Comparing Short-term and Oncologic Outcomes of Minimally Invasive Versus Open Pancreaticoduodenectomy Across Low and High Volume Centers. *Ann Surg.* 2019;270:1147-55.

The effect of general anesthesia and combined general and regional anesthesia on postoperative pain in arthroscopic rotator cuff surgery: a randomized controlled prospective study

ARTROSKOPİK ROTATOR MANŞET AMELİYATLARINDA GENEL ANESTEZİ İLE KOMBİNE GENEL VE REJİYONEL ANESTEZİ KULLANIMININ POSTOPERATİF AĞRIYA OLAN ETKİSİ: RANDOMİZE KONTROLLÜ ÇALIŞMA

 Mehmet Akif AKÇAL,  Ebru GÖKSU,  İlkay BAYAR,  Emel Ece ÖZKAN

Antalya Atatürk Devlet Hastanesi, Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği, ANTALYA

ABSTRACT

Objective: Postoperative pain seen in the first 48 hours after surgery, is an important problem and various methods are used in postoperative pain control. This study aims to investigate the effects of general anesthesia and combined general and regional anesthesia use on postoperative pain in arthroscopic rotator cuff repair operations.

Materials and Methods: Twenty-eight female patients who were planned for arthroscopic rotator cuff surgery were included. The patients were randomly divided into two groups. Scalene block was applied to patients in Group 1 (n=14) in addition to general anesthesia while the patients in Group 2 (n=14) received only general anesthesia. Pain levels of the groups at the sixth, 12th, and 24th hours were evaluated with the Visual Analogue Scale (VAS). The findings were analyzed with Student's-t test and Mann-Whitney U test using SPSS 18.0 statistical program.


Results: The average age of the Group 1 was 57 (45 ± 68); and the average age of the patients in Group 2 was 57.93 (47 ± 69). The postoperative pain levels of Group 1 was 1.57 (± 1.74) at the 6th hour; 2.57 (± 1.28) at the 12th hour, 2.71 (± 1.20) at the 24th hour; in Group 2 the 6th hour pain level was 8.00 (± 1.75); 12th hour level was 7.00 (± 1.52); and it was 6.00 (± 1.57) at the 24th hour. There was a statistically significant difference in all measurements in terms of VAS scores (p <0.001).

Conclusion: It is concluded that implementation of scalene block in addition to general anesthesia, increases the success of the operation in arthroscopic rotator cuff repair surgery.

Keywords: postoperative pain, analgesia, interscalene block, arthroscopic rotator cuff repair

Mehmet Akif AKÇAL

Antalya Atatürk Devlet Hastanesi,
Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği,
Muratpaşa, ANTALYA-TÜRKİYE
E-posta: akcalmd@gmail.com

 <https://orcid.org/0000-0002-3851-4256>

ÖZ

Amaç: Cerrahi sonrası özellikle ilk 48 saatte görülen postoperatif ağrı önemli bir problemdir ve postoperatif ağrı kontrolünde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu çalışmada artroskopik rotator manşet tamiri ameliyatlarında genel anestezi ile kombine genel ve rejijyonel anestezi kullanımının postoperatif ağrıya olan etkisini araştırmak amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Artroskopik rotator manşet cerrahisi planlanan 28 kadın hasta çalışmaya dâhil edildi. Hastalar randomize edilerek iki gruba ayrıldı. Grup 1’de yer alan hastalara (n=14) genel anesteziye ek skalen blok, Grup 2’de yer alan hastalara (n=14) genel anestezi uygulandı. Grupların postoperatif 6., 12. ve 24. saatteki ağrı düzeyleri Visuel Analog Skala (VAS) ile değerlendirildi. Bulgular SPSS 18.0 istatistik programı ile Student t testi ve Mann-Whitney U testi ile analiz edildi.

Bulgular: Çalışmaya katılan ve Grup 1’de yer alan hastaların yaş ortalamasının 57 (45±68); Grup 2’de yer alan hastaların yaş ortalamasının 57,93 (47±69) olduğu görüldü. Grup 1’de yer alan hastaların postoperatif 6. saat ağrı düzeylerinin 1,57 (±1,74); 12. saat 2,57 (±1,28); 24. saat 2,71 (±1,20) olduğu; Grup 2’de 6. saat ağrı düzeylerinin 8,00 (±1,75); 12. saat 7,00 (±1,52); 24. saat 6,00 (±1,57) olduğu görüldü. VAS skorları açısından tüm ölçümlerde istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır (p<0.001).

Sonuç: Genel anesteziye ek skalen blok uygulamasının artroskopik rotator manşet tamiri ameliyatlarında operasyonun başarısını artırdığı düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: postoperatif ağrı, analjezi, interskalen blok, artroskopik rotator manşet tamiri

Shoulder arthroscopy is one of the most common operations in orthopedics, including arthroscopic rotator cuff repair. It is frequently performed as day case surgery (1, 2), and severe pain is observed, especially in the first 48 hours after surgery (3-5). This pain should be managed effectively since the pain that occurs after the surgery generally affects the operation's success. After arthroscopy, early postoperative pain management provides early mobilization of the patient, accelerates functional and final recovery, and increases patient satisfaction (6, 7) Effective postoperative pain management is critical for recovery after shoulder arthroscopy, not only for early rehabilitation and discharge after surgery but also for reducing treatment costs (8, 9).

Many oral and intravenous drugs, regional nerve block applications, intralesional anesthesia, and multimodal anesthesia are recommended for effective postoperative pain management after arthroscopy (10, 11). Since the side effects of the opioids such as nausea, vomiting, itching, sedation, and respiratory distress are

reported. It is known that interscalene block application is the most effective regional block type in addition to general anesthesia to relieve pain after arthroscopic rotator cuff repair (12) and provides superior pain control, especially in the first few hours postoperatively (11, 13, 14).

Interscalene block is the technique of blocking the brachial plexus in the inter-scalenus space at the neck. Since it is a procedure with low side effects, easy to perform, high success rate, and postoperative analgesia, its use in the shoulder and upper extremity surgery is increasingly common. It is considered an effective way of providing anesthesia - analgesia clinically (12, 15). Despite optimal postoperative pain management and patient satisfaction, clinicians' risk of postoperative complications is still an important challenge. Many studies have been conducted to reveal which method is superior in postoperative pain control after arthroscopic rotator cuff operations (6, 10, 16-19). However, although the blocks performed at the surgical site and general anesthesia in shoulder arthroscopy are known to be safe, easy, and have lesser

complication rates, there are controversies about this method's effectiveness (12, 20).

This study aimed to investigate the effect of general anesthesia and combined regional and general anesthesia on postoperative pain in arthroscopic rotator cuff repair operations. We hypothesized that combined general and regional anesthesia would be effective on postoperative pain in arthroscopic rotator cuff surgery.

MATERIAL AND METHODS

Our study, planned as prospective and randomized controlled, was conducted after the ethics committee (27.04.2017: 8/08). Twenty-eight female patients between the ages of 45 - 69 were admitted to the Orthopedics and Traumatology outpatient clinic of a hospital affiliated to the Ministry of Health between 27.04.2017 – 31.12.2017, who was decided to treat with arthroscopic rotator cuff surgery. The study was homogenized in terms of gender to obtain more expressive results from the patient group.

Between the study dates, 50 patients underwent rotator cuff repair surgery with the arthroscopic method. Twenty-eight patients who met the inclusion criteria were randomly divided into general anesthesia + interscalene (n=14) and general anesthesia (n=14). All of the operations were performed by the principal author of the study. An anesthesiologist performed the blocking procedure of the patients in the scalene block group. After the first patient was selected to the general anesthesia + interscalene group, the other patient was necessarily appointed to the other group. An equal number of patients was taken into both groups. Male patients, those with co-existing diseases such as diabetes and (Chronic Obstructive Pulmonary Disease) COPD, and patients using opioids for more than six months were excluded from the study (n=22). Data on postoperative pain were collected by the nurse who was not in the study group at the sixth, 12th, and 24th hours using the VAS scale.

Statistical Analysis

SPSS 18 program (SPSS Inc. Released 2009. PASW Statistics for Windows, Version 18.0. Chicago: SPSS Inc.) was used to analyze the study's findings. The consistency of continuous variables to normal distribution was examined with the Kolmogorov-Smirnov test. To describe the example to define the sample, variables suitable for normal distribution were expressed as mean \pm standard deviation, and variables that were not suitable for normal distribution were indicated by median (minimum-maximum). When parametric test assumptions were provided, "Student's t-test" was used to differentiate the two independent groups' averages. In cases where parametric test assumptions were not provided, the non-parametric alternative "Mann-Whitney U" test was used. A 95% confidence interval (or $\alpha = 0.05$ margin of error) was used to determine the analysis's differences (Figure 1).

The minimum sample size of the study was determined by power analysis. The effect size value (d) was calculated using the standardized medium-level value (0.5), which Cohen decided (21). Accordingly, $d = 0.50$, $\alpha = 0.05$, $\beta = 0.80$ were taken, and the total number of patients was determined to be 28 so that the difference between the two groups could be found significant. Our study assumed that interscalene block procedure added to general anesthesia significantly reduced the pain in the period after arthroscopic rotator cuff repair surgery.

In the general anesthesia patient group, iv propofol was administered for induction, and 2-3 microgram/kg fentanyl rocuronium and remifentanyl were administered intraoperatively. Systolic blood pressure was adjusted around 90-110 mm Hg. In the general anesthesia + interscalene block patient group, before the general anesthesia induction, interscalene block was performed with 20 ml of 0.5% bupivacaine using a nerve stimulator. For postoperative pain control, paracetamol tablets 3x1 orally and contramal amp1x1 iv were administered until the 24th hour.

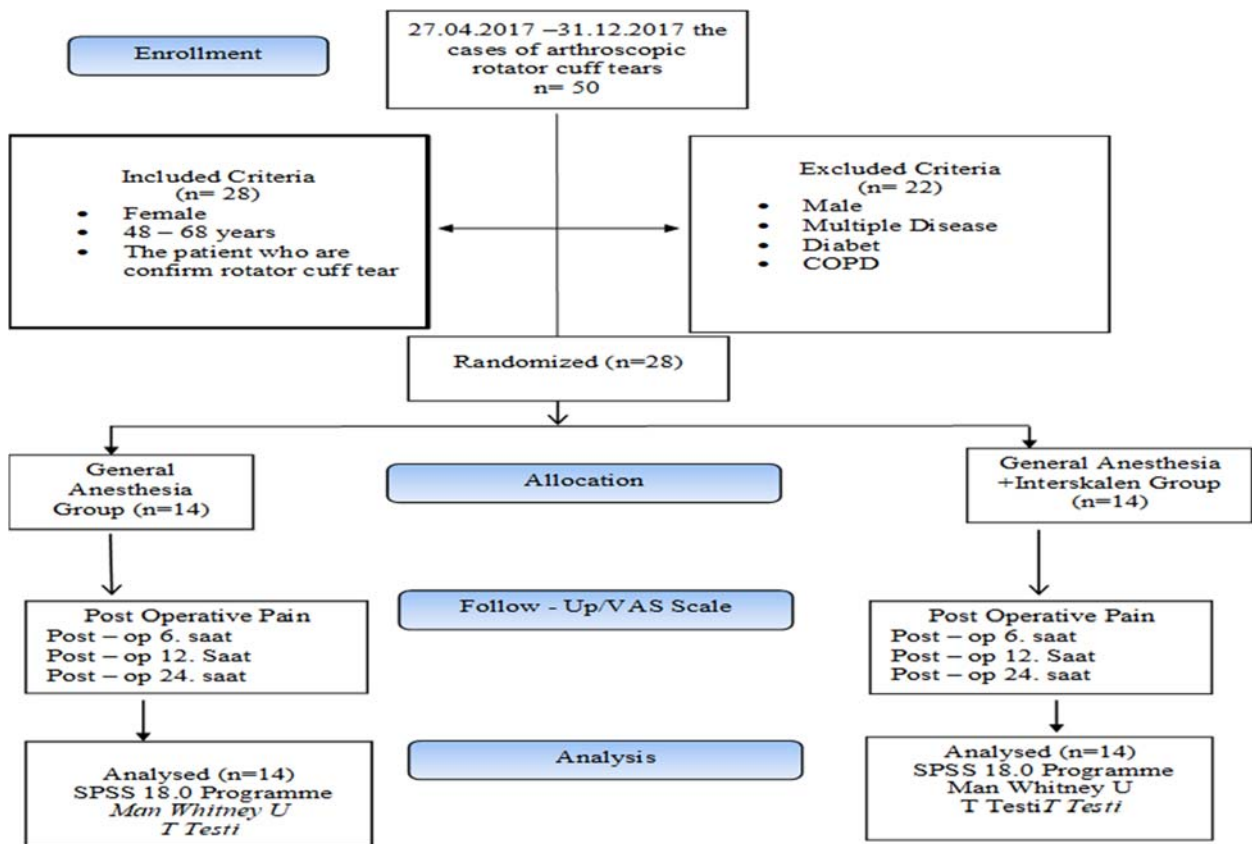


Figure 1: CONSORT Flow Chart

RESULTS

The mean age of the patients who participated in the study and the general anesthesia + scalene block group (Group 1) was 57, and the average age of the patients in the general anesthesia group (Group 2) was 57.93. The mean postoperative 6th-hour pain level of the patients in Group 1 was 1.57 (SD 1.74); the mean 12th-hour pain level was 2.57 (SD 1.28), and the 24-hour mean pain level was 2.71 (SD 1.20). The mean postoperative 6th-hour pain level of the patients in Group 2 was 8 (SD 1.75); the mean pain level at

the 12th hour was 7 (SD 1.52), and the 24-hour mean was 6 (SD 1.57). When the groups were compared in terms of VAS averages, the lowest level of pain in Group 1 was at the postoperative 6th hour, and the lowest level of pain in Group 2 was at the postoperative 24th hour. As a result of the statistical analysis regarding the groups, a statistically significant difference was obtained in 6th, 12th, and 24th-hour measurements in all patients' VAS scores ($p < 0.05$). In patients who had the scalene block in addition to general anesthesia, the pain scores were significantly reduced compared to the other group ($p < 0.05$). (Table 1).

Table 1. Age and VAS Scale

	Groups								
	1-General Anesthesia+Scalene Block(n=14)				2-General Anesthesia (n=14)				p*
	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max	
Age	57,00	7,62	45,00	68,00	57,93	7,51	47,00	69,00	0.747
VAS 6 th hour	1,57	1,74	0,00	6,00	8,00	1,75	4,00	10,00	<0.001
VAS 12 th hour	2,57	1,28	0,00	5,00	7,00	1,52	4,00	8,00	<0.001
VAS 24 th hour	2,71	1,20	0,00	4,00	6,00	1,57	4,00	8,00	<0.001

*To analyze with Mann Whitney U

When the VAS scores of the groups were examined, the patients in Group 1 were observed to have mild pain (0-4) at the sixth, 12th, and 24th hours; and the patients in Group 2 felt moderate to severe pain (5 - 10) at the 6th, 12th and 24th hours postoperatively (Figure 2).

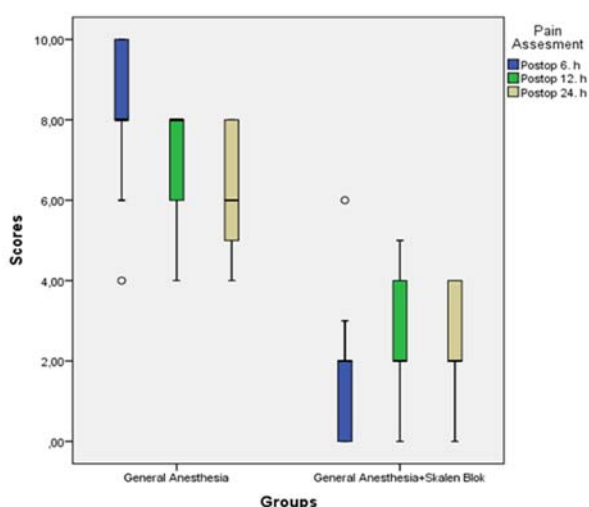


Figure 2: VAS Scale

DISCUSSION

Optimal postoperative pain management, patient satisfaction, and the risk of postoperative complications are still a significant challenge faced by clinicians. There is controversy over the effectiveness of the methods used to reduce postoperative pain.

Our study aimed to investigate the effect of general anesthesia and combined general and regional anesthesia on postoperative pain in arthroscopic rotator cuff repair operations. Our research conducted on two groups as general anesthesia + scalene block and general anesthesia concluded that interscalene block procedure performed preoperatively significantly reduced the pain at the sixth, 12th, and 24th postoperative hours.

When the methods applied to reduce postoperative pain in the literature are examined, it was found that the blocks are done in addition to general anesthesia to reduce pain in the immediate postoperative period (7, 11, 16, 19, 22-24). Our study also found that the general anesthesia + scalene block procedure reduced postoperative pain by more than 50% compared to the other group.

In our study, the VAS scale was preferred for postoperative pain assessment. Toyooka et al. (25) investigated the effects of interscalene block and multimodal drug injection in postoperative pain management after rotator cuff repair surgery. They concluded that the analgesic effect of performing interscalene block was significantly higher in the first 6 hours than the other group, according to the VAS scores. Our study concluded that the effectiveness of interscalene block application, which was done in addition to general anesthesia, was at the highest level in the postoperative 6th hour, according to VAS scores.

In the general anesthesia + interscalene block patient group in our study, the scalene block was performed with

20 ml of 0.5% bupivacaine and a nerve stimulator before the induction of general anesthesia. Sahu et al. (26) used a single-shot inter-scalene block with 20 mL of 0.5% ropivacaine, whereas other groups received the same with 10 mL. They found significantly lower VAS scores at the 1st, 4th, 6th, 12th 24th hours postoperatively. Our study also observed that there are results compatible with the results of this study.

Although our study's strength is a randomized controlled study, this study should be examined within the framework of certain limitations. The sample of our study was planned with a minimum number of samples. Our study consists of female patients only. In our study, an evaluation of the complications of scalene block application performed in addition to general anesthesia was not made. Despite these limitations, we think that our study reflects the effect of scalene block procedure on postoperative pain, which is performed in addition to general anesthesia after arthroscopic rotator cuff repair.

As a result of the study, it was observed that the scale block procedure added before general anesthesia in women who underwent arthroscopic rotator cuff repair significantly reduced postoperative pain compared to patients who underwent general anesthesia only. It is concluded that performing scalene block in addition to general anesthesia increases the success of the operation in arthroscopic rotator cuff repair surgery.

REFERENCES

1. Sir E, Orhan M, Eckert S, Özkan G, Purtuloğlu T, Atım A, Atik B, Kurt E. Comparison of Ultrasound and Peripheral Nerve Stimulator Guidance for Interscalene Brachial Plexus Block in Shoulder Arthroscopy Patients. *Muğla Med J.* 2019;6: 99-104.
2. Warrender WJ, Syed UAM, Hammoud S, Emper W, Ciccotti MG, Abboud JA, Freedman KB. Pain management after outpatient shoulder arthroscopy: a systematic review of randomized controlled trials. *Am J Sports Med.* 2017;45:1676-86.
3. Ganapathy S, Amendola A, Lichfield R, Fowler PJ, Ling, E. Elastomeric pumps for ambulatory patient-controlled regional analgesia. *Can J Anesth.* 2000;47:897-902.
4. Mather RC, Koenig L, Acevedo D, Dall TM, Gallo P, Romeo A, Tongue J. et al. The societal and economic value of rotator cuff repair. *J Bone Joint Surg Am.* 2013;95:1993 – 2000.
5. Boss AP, Maurer T, Seiler S, Aeschbach A, Hintermann B, Strebel S. Continuous subacromial bupivacaine infusion for postoperative analgesia after open acromioplasty and rotator cuff repair: preliminary results. *J Shoulder Elb Surg.* 2004;13: 630-34.
6. Oh JH, Kim WS, Kim JY, Gong HS, Rhee KY. Continuous intralesional infusion combined with interscalene block was effective for postoperative analgesia after arthroscopic shoulder surgery. *J. Shoulder Elb Surg.* 2007;16:295-99.
7. Cho CH, Song KS, Min BW, Jung GH, Lee YK, Shin HK. Efficacy of interscalene block combined with multimodal pain control for postoperative analgesia after rotator cuff repair. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2015;23:542-47.
8. Çelik H, Seçkin MF, Akman Ş. Complications of Rotator Cuff Surgery. *Eur Arc Med Res.* 2017;33:155-63.
9. Ilfeld BM, Morey TE, Wright TW, Chidgey LK, Enneking FK. Continuous interscalene brachial plexus block for postoperative pain control at home: a randomized, double-blinded, placebo-controlled study. *Anesth. Analg.* 2003;96:1089-95.
10. Uquillas CA, Capogna BM, Rossy WH, Mature SA, Rokita AS. Postoperative pain control after arthroscopic rotator cuff repair. *J Shoulder Elb Surg.* 2016;25:1204-13.
11. Saito M, Tsukada S, Fujita N, Rahman M, Morita W, Kitamura N. et al. Postoperative pain control following arthroscopic rotator cuff repair: peri-articular injection versus interscalene brachial plexus block. *Int Orthop.* 2019;43:1435-41.

12. Borgeat A, Kalberer F, Jacob H, Ruetsch YA, Gerber C. Patient-controlled interscalene analgesia with ropivacaine 0.2% versus bupivacaine 0.15% after major open shoulder surgery: the effects on hand motor function. *Anesth Analg.* 2001;92:218-23.
13. Gautier P, Vandepitte C, Ramquet C, DeCoopman M, Xu D, Hadzic A. The minimum effective anesthetic volume of 0.75% ropivacaine in ultrasound-guided interscalene brachial plexus block. *Anesth Analg.* 2011;113:951-5.
14. Salviz EA, Xu D, Frulla A, Kwofie K, Shastri U, Chen, J. et al. Continuous interscalene block in patients having outpatient rotator cuff repair surgery: a prospective randomized trial. *Anesth Analg.* 2013;117:1485-92.
15. Chelly JE, Greger J, Gebhard R, Coupe K, Clyburn TA, Buckle, R et al. Continuous femoral blocks improve recovery and outcome of patients undergoing total knee arthroplasty. *J Arthroplasty.* 2001;16:436-45.
16. Neuts A, Stessel B, Wouters PF, Dierickx C, Cools W, Ory JP et al. Selective suprascapular and axillary nerve block versus interscalene plexus block for pain control after arthroscopic shoulder surgery: a noninferiority randomized parallel-controlled clinical trial. *Reg Anesth Pain Med.* 2018;43:738-44.
17. Hadzic A, Williams BA, Karaca PE, Hobeika P, Unis G, Dermksian J. et al. For outpatient rotator cuff surgery, nerve block anesthesia provides superior same-day recovery over general anesthesia. *Anesthesiology.* 2005;102:1001-7.
18. Koltka AK, Büget M, Bingül ES, Erşen A, Küçükay S, Atalar AC. et al. Postoperative analgesia after arthroscopic shoulder surgery: a comparison between single-shot interscalene block and single-shot supraclavicular block. *Pain.* 2017;29:127-31.
19. Boddu C, Ginza A, McCann PD. Bridging multimodal pain management provides 48-hour pain control in patients undergoing total shoulder replacement. *J Shoulder Elb Surg.* 2018;27:65-9.
20. Ekinci M, Çatal B, Baysal PK, Gölboyu BE, Aksum M, Baysal Ö. et al. Omuz artroskopi ameliyatlarında interskalen blok ile tek doz eklem içi lokal anestezi uygulamasının postoperatif analjezik etkinliklerinin karşılaştırılması. *Bozok Med. J.* 2016;6:39-45.
21. Cohen J. The analysis of variance. In *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. Second ed, Lawrence Erlbaum Associates. 1988; 274-287.
22. Krone SC, Chan VW, Regan J, Peng P, Poate EM, McCartney C. et al. Analgesic effects of low-dose ropivacaine for interscalene brachial plexus block for outpatient shoulder surgery—a dose-finding study. *Reg Anesth Pain Med.* 2001;26:439-43.
23. Koga R, Funakoshi T, Yamamoto Y, Kusano H. Suprascapular nerve block versus interscalene block for analgesia after arthroscopic rotator cuff repair. *J Orthop* 2020;19:28-30.
24. Bingöl O, Deveci A, Başkan S, Özdemir G, Kiliç E, Arslantaş E. Comparison of local infiltration analgesia and interscalene block for postoperative pain management in shoulder arthroscopy: a prospective randomized controlled trial. *Turk J Med Sci.* 2021. Doi: 10.3906/sag-2008-57
25. Toyooka S, Ito M, Kakinuma A, Kayama S, Watanabe K, Miyamoto W. Et al. Periarticular multimodal drug injection does not improve early postoperative analgesia compared with continuous interscalene brachial plexus block after arthroscopic rotator cuff repair: A retrospective single-center comparative study. *J Orthop Sci,* 2020;25:405-9.
26. Sahu GK, Meena DS, Saini S, Aravindan A, Datta PK. Comparison of two different volumes of ropivacaine used in nerve stimulator guided interscalene block for arthroscopic shoulder surgery—A randomized controlled trial. *Anesth Essays Res.* 2018;12:786-91.

Retrospective single center evaluation of endosonographic features of ectopic pancreas cases

EKTOPIK PANKREAS OLGULARININ ENDOSONOĞRAFİK ÖZELLİKLERİNİN RETROSPEKTİF TEK MERKEZ DEĞERLENDİRİLMESİ

 Ali ŞENKAYA¹,  Ferit ÇELİK¹,  İlkçe AKGÜN KURTULMUŞ²,  Fatih TEKİN¹,  Nevin ORUÇ¹,  Ahmet AYDIN¹

¹Ege University Medical Faculty Department of Internal Medicine, Division of Gastroenterology, Izmir, Turkey

²Ege University Medical Faculty Department of Internal Medicine, Izmir, Turkey

ABSTRACT

Objective: Ectopic pancreas is defined as pancreatic tissue located outside the normal pancreas. The aim of the present study was to determine the sonographic characteristics of lesions considered as ectopic pancreas via endoscopic ultrasonography (EUS) examination.

Materials and Methods: This retrospective single-center study included 53 patients diagnosed with ectopic pancreas by EUS between March 2014 and March 2020.

Results: In the study, 32 (60.4%) patients were female and mean age was 44.7 ± 12.1 years. Thirty seven (69.8%) lesions were detected at the antrum greater curvature side, 10 (18.9%) at the antrum posterior wall, three (5.7%) at the corpus, two (3.8%) at the bulbus. EUS examination revealed that all lesions exhibited a heterogeneous pattern, 52 (98.1%) lesions had a hypochoic appearance, 45 (85%) lesion borders were regular, and 45 (85%) showed central umbilication. The lesions were most frequently located in the submucosa (90.6%). The mean long axis was 10.7 ± 3.5 mm, the mean short axis was 4.8 ± 1.0 mm, and long/short axis ratio was 2.4 ± 0.9 . No significant difference was observed between the dimensions and size ratios of lesions and the presence or absence of umbilication ($p = 0.550, 1.000$ and 0.583 , respectively).


Conclusion: In cases where the endoscopic ultrasonography examination revealed subepithelial lesions of submucosal origin that are <2 cm in size, exhibiting a heterogeneous pattern and hypochoic appearance, anechoic duct-like structures, and a long/short axis ratio of >1.5 along with central umbilication, the diagnosis of ectopic pancreas should be prioritized.

Keywords: Ectopic pancreas, endoscopic ultrasonography, subepithelial lesion
ÖZ

Amaç: Ektopik pankreas, normal pankreas dışında kalan pankreas dokusudur.

Ali ŞENKAYA

Ege Üniveristesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Gastroenteroloji Bilim Dalı, Izmir
E-posta: dr.senkaya@gmail.com

 <https://orcid.org/0000-0002-5787-3422>

Bu çalışmanın amacı, endoskopik ultrason incelemesi ile ektopik pankreas olduğu düşünülen lezyonların sonografik özelliklerinin belirlenmesidir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamız Mart 2014–Mart 2020 tarihleri arasında endoskopik ultrason incelemesi ile ektopik pankreas tanısı konulan 53 olgunun retrospektif tek merkezli değerlendirilmesini içermektedir.

Bulgular: Çalışmamızdaki olguların 32(%60,4)'si kadın ve yaş ortalaması $44,7 \pm 12,1$ yıl saptanmıştır. Lezyonların 37'si (%69,8) antrum büyük kurvaturda, 10'u (%18,9) antrum posterior, üçü (%5,7) korpus, ikisi (%3,8) bulbusta saptanmıştır. Endoskopik ultrason incelemesinde, lezyonların tamamının heterojen paternde, 52'sinin (%98,1) hipoekoik görünümde, 45'inin (%85) sınırlarının düzenli olduğu ve 45'inde (%85) santral umbilikasyon varlığı saptanmıştır. Lezyonların en sık (%90,6) submukoza yerleşimli olduğu görülmüştür. Lezyonların uzun aks ortalaması $10,7 \pm 3,5$ mm, kısa aks ortalaması $4,8 \pm 1$ mm ve uzun aks / kısa aks oranı $2,4 \pm 0,9$ olarak saptanmıştır. Umbilikasyon varlığı ile lezyonların boyutları ve boyut oranları arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır (sırasıyla $p = 0,550$, $1,000$ ve $0,583$).

Sonuç: Endoskopik ultrason incelemede; 2cm'den küçük, submukoza orijinli, heterojen ve hipoekoik paternli, anekoik kanal benzeri yapıların olduğu, santral umbilikasyonun eşlik ettiği, uzun aks / kısa aks oranı 1,5'den büyük olan subepitelyal lezyonların saptanması durumunda ektopik pankreas teşhisi ön planda tutulmalıdır.

Anahtar Sözcükler: Ektopik pankreas, endoskopik ultrasonografi, subepitelyal lezyon

Ectopic pancreas (EP), also known as pancreatic rest or aberrant pancreas, is defined as pancreatic tissue located outside the normal pancreas and containing its own duct and vascular supply (1). EP is typically located in the upper gastrointestinal (GI) tract adjacent to the pancreas, and in 90% of the cases, it is located in the stomach, duodenum, or proximal part of the jejunum (2). The frequency of EP is reportedly 0.6% – 13% in autopsies, 0.5% in laparoscopy, and 1% in panendoscopy (3, 4). Although EP is typically asymptomatic, it can infrequently cause dyspeptic complaints, abdominal pain, upper or lower GI bleeding, or acute abdomen (5). Typically, EP is detected as a subepithelial lesion (SEL) of <2 cm in size, which is incidentally found in the stomach antrum during endoscopy (6). Central umbilication, which is generally considered the location of a drainage channel, is observed in lesions of >5 mm in size (7). Although it is difficult to diagnose EP via endoscopic examination, EP can be defined as a hard, round SEL with central umbilication and depression that allows its distinction from normal submucosal tissue (8, 9) (Figure 1). However, central umbilication is not the definitive diagnostic marker for EP,

and it can be difficult to distinguish EP from leiomyoma, which is the most common SEL of the stomach (10). The most common endoscopically detected location of EP in the stomach is the posterior wall and greater curvature including the antrum and prepyloric region (11).



Figure 1: Endoscopic view of the ectopic pancreas. Submucosal lesion with central umbilication in the antrum, proximal to the pylorus, covered with normal mucosa.

There are two theories regarding the development of EP. The misplacement theory suggests that during rotation of the foregut, several elements of the primitive pancreas become separated and eventually form mature pancreatic tissue along the length of the GI tract (12). The metaplasia theory states that EP arises from areas of pancreatic metaplasia of the endoderm that migrate to the submucosa during embryogenesis (13).

The pathological diagnosis of EP is typically unachievable for two reasons. First, obtaining adequate tissue samples using endoscopic biopsy forceps is generally difficult; second, surgery or endoscopic resection is usually unnecessary for most asymptomatic patients (14). Conversely, imaging techniques assist in making an early and definitive differential diagnosis. Correlations between the sonographic and histopathological patterns of EP have previously been established in the literature (15, 16). It combines endoscopic ultrasonography (EUS), GI endoscopy, and ultrasonography and ensures a clear and nonsurgical visualization of various SELs in the upper GI tract (17-21). EUS has been used in several studies to evaluate EP, and sonographic characteristics can distinguish EP from other SELs (15, 22-28). The aim of the present study was to determine the endosonographic characteristics of lesions considered as EP via EUS examination.

MATERIAL AND METHODS

The present study includes a retrospective single-center evaluation of patients diagnosed with EP by EUS at the Gastroenterology & Endoscopy Unit between March 2014 and March 2020. Patients whose EUS reports were obtained following a search for the terms "ectopic pancreas" and "aberrant pancreas" from the endoscopy unit registry system were included. Patients aged <18 years were excluded. Age, sex, EUS characteristics of EP (localization, size, echogenicity, homogeneity, origin, borders, and presence of umbilication) of the patients were recorded in the case report form.

EUS examination was performed in patients with or without umbilication in whom SEL was detected and were accordingly referred. EUS examination was performed by

the gastroenterology faculty members of the same center, who are experienced in EUS, using the GU-UE160 Olympus (Tokyo, Japan) device. The local ethics committee approval was obtained for the study (Approval number: 20-11T/11).

The compliance of the variables to normal distribution was examined using visual (histogram) and analytical (Kolmogorov–Smirnov test) methods. Numerical data collected in the study were expressed as mean, median, standard deviation, and maximum–minimum value. Categorical data were expressed as ratio and percentage. The comparison of sizes of EP based on the presence of umbilication was performed using Mann–Whitney U test. The correlation between age and dimensions of EP was evaluated using the Spearman correlation test. A p-value of <0.05 was considered statistically significant. All statistical analysis and calculations were performed using the SPSS Statistics Ver. 22.0.

RESULTS

In the present study, 32 (60.4%) patients were female and the mean age was 44.7 ± 12.1 years. The detected EP cases were present at endoscopically different locations: 37 (69.8%) lesions were at the antrum greater curvature side, 10 (18.9%) at the antrum posterior wall, three (5.7%) at the corpus, two (3.8%) at the bulbus, and one (1.9%) at the antrum anterior wall. All lesions exhibited a heterogeneous pattern, 52 (98.1%) lesions had a hypoechoic appearance, 45 (85%) lesion borders were regular, and 45 (85%) showed central umbilication (Figure 2). The lesions were most frequently (90.6%) located in the submucosa. The presence of thin tubular structures was observed in all lesions. EUS examination of EP cases revealed that the mean long axis was 10.7 ± 3.5 mm, mean short axis was 4.8 ± 1 mm, and long/short axis ratio was 2.4 ± 0.98 (Table 1). There was no significant difference between the EP dimensions and size ratios in patients with or without umbilication ($p = 0.550$; 1.000 and 0.583, respectively) (Table 2). No significant correlation was observed between age and EP long axis, short axis, and long/short axis ratio (Spearman ρ : -0.221 , $p = 0.111$; ρ : -0.212 , $p = 0.127$; and ρ : 0.019, $p = 0.895$, respectively).

Table 1. Demographic and endoscopic ultrasonographic characteristics of patients

	n (%)
Sex	
Female	32 (60.4)
Male	21 (39.6)
Age (mean ± SD) (min–max) (years)	44.7 ± 12.1 (19–68)
Lesion location	
Antrum greater curvature	37 (69.8)
Antrum posterior	10 (18.9)
Corpus	3 (5.7)
Bulbus	2 (3.8)
Antrum anterior	1 (1.9)
Echogenicity	
Hypoechoic	52 (98.1)
Isoechoic	1 (1.9)
Homogeneity	
Heterogeneous	53 (100)
Layer	
Submucosa	48 (90.6)
Submucosa + muscularis propria	5 (9.4)
Borders	
Regular	45 (85)
Irregular	8 (15)
Presence of umbilication	
No	8 (15)
Yes	45 (85)
EUS long axis (mean ± SD) (min–max) (mm)	10.7 ± 3.5 (5–25)
EUS short axis (mean ± SD) (min–max) (mm)	4.8 ± 1 (2.3–10)
Long/short axis ratio (mean ± SD) (min–max)	2.4 ± 0.9 (1.4–8.3)

EUS: Endoscopic ultrasonography

DISCUSSION

The present study retrospectively evaluated the characteristics of 53 EP cases who underwent esophagogastroduodenoscopy for any reason and were incidentally detected to have SEL in the EUS examination.

**Figure 2:** Endoscopic ultrasound view of the ectopic pancreas. Heterogeneous hypoechoic structure, approximately 10 × 4.5 mm in size, with submucosal localization and containing thin tubular structures.**Table 2.** Evaluation of the correlation between the presence of umbilication and the sizes of ectopic pancreas

	Presence of umbilication		p
	No (n = 8)	Yes (n = 45)	
EUS long axis (mm)	12.1 ± 6.3	10.5 ± 2.8	0.550
EUS short axis (mm)	5.1 ± 2.5	4.8 ± 1.8	1.00
Long/short axis ratio	2.8 ± 2.3	2.3 ± 0.5	0.583

EUS: Endoscopic ultrasonography

Varying results have been reported in the literature in terms of sex distribution of patients with EP. Research has reported the male/female ratio as 3/1 (29); however, some studies have reported no significant difference in terms of sex of the patient (26, 28). In the present study, 60.4% of the

patients were female. In the literature, the ages of the patients reportedly range from 40 to 70 years (30). The mean patient age in our study was 44.7 ± 12.1 (19–68) years, which is consistent with the literature.

Typically, EP is <2 cm in size (6). In the present study, the mean long axis measured by EUS was 10.7 ± 3.5 (5–25) mm and the long/short axis ratio measured by EUS was 2.4 ± 0.9 (1.4–8.3). In the literature, a long/short axis ratio of >1.5 reportedly supports the diagnosis of EP (31). A ratio of <1.5 is indicative of mesenchymal tumor and can be evaluated in terms of distinguishing it from EP in EUS examination (25). EP can be encountered in every area of the GI system—from the esophagus to the colon—and it is frequently localized in the stomach antrum, duodenum, and proximal jejunum (32). Furthermore, it can be localized in the anterior or posterior wall of the stomach and is often located in the greater curvature (11, 13). In the present study, 90.6% of the EP cases was detected at the antrum, 5.7% at the corpus, and 3.8% at the bulbus, which is consistent with the literature. EP cases were most frequently detected on the antrum greater curvature.

Central umbilication, which is typically considered as the location of a drainage channel, is observed in EP of >5 mm in size (7). The presence of central umbilication is a characteristic feature in endoscopic examination and has been described in 35%–90% of the cases in the literature (6, 26, 28, 33). In the present study, central umbilication was detected in 85% of the cases, which is consistent with the literature.

Mesenchymal tumors, including gastrointestinal stromal tumors, leiomyomas, and schwannomas, are predominantly composed of muscularis propria (34). EP may occur in all layers of the GI tract wall. The submucosal (15%–70%) and muscularis propria (11%–80%) localizations of lesions are the most common, whereas mucosal or serosal localizations are rare. In the present study, 90.6% of the lesions were located in the submucosa. However, the layer involvement of EP greatly varies between case series (6, 15, 25, 26, 28, 35). This discrepancy may be owing to the relatively small sample sizes evaluated or different inclusion criteria. However, the most important confounding factor is probably the interobserver variation

in the interpretation of EUS images. Chak et al. showed that the assessment of EUS characteristics greatly varied between different pairs of experts (36). Moreover, the characteristics related to EUS appearance of EP differed between studies. Reportedly, a heterogeneous pattern is observed in 47%–100% of EP lesions, and a hypochoic appearance is observed in 69%–100% of EP lesions (6, 15, 28, 35). In the present case series, 98.1% of the EP lesions exhibited a heterogeneous pattern and 100% had a hypochoic appearance. Moreover, thin tubular structures were observed in all lesions.

EUS-fine needle aspiration (FNA) biopsy was not performed in any patient in our study. In the literature, performing EUS-FNA for typical EP cases (submucosal origin, heterogeneous echogenicity, long/short axis ratio of >1.5, and central umbilication) was not recommended (31). The limitations of our study were the absence of EUS-FNA and that of a final histopathological diagnosis.

Consequently, if the EUS examination revealed SELs of submucosal origin that were <2 cm in size exhibiting a heterogeneous pattern and hypochoic appearance, anechoic duct-like structures, and a long/short axis ratio of >1.5 along with central umbilication, the diagnosis of EP should be prioritized.

REFERENCES

1. Trifan A, Târcoveanu E, Danciu M, Huțanașu C, Cojocariu C, Stanciu C. Gastric heterotopic pancreas: an unusual case and review of the literature. *J Gastrointest Liver Dis.* 2012;21:209–12.
2. Burke GW, Binder SC, Barron AM, Dratch PL, Umlas J. Heterotopic pancreas: gastric outlet obstruction secondary to pancreatitis and pancreatic pseudocyst. *Am J Gastroenterol.* 1989;84:52–5.
3. Gupta MK, Karlitz JJ, Raines DL, Florman SS, Lopez FA. Clinical case of the month. Heterotopic pancreas. *J La State Med Soc.* 2010;162:310–3.
4. DeBord JR, Majarakis JD, Nyhus LM. An unusual case of heterotopic pancreas of the stomach. *Am J Surg.* 1981;141:269–73.

5. Yuan Z, Chen J, Zheng Q, Huang XY, Yang Z, Tang J. Heterotopic pancreas in the gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol.* 2009;15:3701-3.
6. Atwell A, Sams S, Fukami N. Diagnosis of ectopic pancreas by endoscopic ultrasound with fine-needle aspiration. *World J Gastroenterol.* 2015;21:2367-73.
7. Nebel OT, Farrell RL, Kirchner JP, Macionus RF. Aberrant pancreas: an endoscopic diagnosis. *Am J Gastroenterol.* 1973;60:295-300.
8. Sathyanarayana SA, Deutsch GB, Bajaj J, Friedman B, Bansal R, Molmenti E, et al. Ectopic pancreas: A diagnostic dilemma. *Int J Angiol.* 2012;21:177-80.
9. Elwir S, Glessing B, Amin K, Jensen E, Mallery S. Pancreatitis of ectopic pancreatic tissue: A rare cause of gastric outlet obstruction. *Gastroenterol Rep (Oxf).* 2017;5:237-40.
10. Perillo RP, Zuckerman GR, Shatz BA. Aberrant pancreas and leiomyoma of the stomach: indistinguishable radiologic and endoscopic features. *Gastrointest Endosc.* 1977;23:162-3.
11. Subasinghe D, Sivaganesh S, Perera N, Samarasekera DN. Gastric fundal heterotopic pancreas mimicking a gastrointestinal stromal tumour (GIST): a case report and a brief review. *BMC Res Notes.* 2016;9:185.
12. Armstrong CP, King PM, Dixon JM, Macleod IB. The clinical significance of heterotopic pancreas in the gastrointestinal tract. *Br J Surg.* 1981; 68:384-7.
13. Chandan VS, Wang W. Pancreatic heterotopia in the gastric antrum. *Arch Pathol Lab Med.* 2004;128:111-2.
14. Yoshida T, Sakamoto A, Kuroki K, Kojo A, Watanabe H, Tanaka K. Electrocoagulation biopsy of aberrant pancreas of the stomach. *Am J Gastroenterol.* 1976;66:554-8.
15. Matsushita M, Hajiro K, Okazaki K, Takakuwa H. Gastric aberrant pancreas: EUS analysis in comparison with the histology. *Gastrointest Endosc.* 1999;49:493-7.
16. Hase S, Nakazawa S, Yoshino J, Kojima Y, Niwa Y, Ohashi S. A study on gastric and small intestinal aberrant pancreas by endoscopic ultrasonography with special reference to comparison with histological appearance. *Jpn J Gastroenterol.* 1989;86:1684-91.
17. Geller A, Wang KK, Dimagno EP. Diagnosis of foregut duplication cysts by endoscopic ultrasonography. *Gastroenterology.* 1995;109:838-42.
18. Shen EF, Arnott IDR, Plevris J, Penman ID. Endoscopic ultrasonography in the diagnosis and management of suspected upper gastrointestinal submucosal tumors. *Br J Surg.* 2002;89:231-5.
19. Rosch T, Lorenz R, Dancygier H, Wichert AV, Classen M. Endosonographic diagnosis of submucosal upper gastrointestinal tract tumors. *Scand J Gastroenterol.* 1992;27:1-8.
20. Boyce GA, Sivak MV, Rosch T, Classen M, Fleischer DE. Evaluation of submucosal upper gastrointestinal tract lesions by endoscopic ultrasound. *Gastrointest Endosc.* 1991;37:449-54.
21. Zhou PH, Yao LQ, Zhong YS, He GJ, Xu MD, Qin XY. Role of endoscopic miniprobe ultrasonography in diagnosis of submucosal tumor of large intestine. *World J Gastroenterol.* 2004;10:2444-6.
22. Rösch T, Kapfer B, Will U, Baronius W, Strobel M, Lorenz R, et al. Accuracy of endoscopic ultrasonography in upper gastrointestinal submucosal lesions: a prospective multicenter study. *Scand J Gastroenterol.* 2002;37:856-62.
23. Karaca C, Turner BG, Cizginer S, Forcione D, Brugge W. Accuracy of EUS in the evaluation of small gastric subepithelial lesions. *Gastrointest Endosc.* 2010;71:722-7.

24. Changchien CS, Hsiaw CM, Hu TH. Endoscopic ultrasonographic classification of gastric aberrant pancreas. *Chang Gung Med J.* 2000;23:600–7.
25. Kim JH, Lim JS, Lee YC, Hyung WJ, Lee JH, Kim MJ, et al. Endosonographic features of gastric ectopic pancreases distinguishable from mesenchymal tumors. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008;23:e301–e307.
26. Chen SH, Huang WH, Feng CL, Chou JW, Hsu CH, Peng CY, et al. Clinical analysis of ectopic pancreas with endoscopic ultrasonography: an experience in a medical center. *J Gastrointest Surg.* 2008;12:877–81.
27. Watanabe K, Irisawa A, Hikichi T, Takagi T, Shibukawa G, Sato M, et al. Acute inflammation occurring in gastric aberrant pancreas followed up by endoscopic ultrasonography. *World J Gastrointest Endosc.* 2012;4:331–4.
28. Park SH, Kim GH, Park DY, Shin NR, Cheong JH, Moon JY, et al. Endosonographic findings of gastric ectopic pancreas: a single center experience. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011;26:1441–6.
29. Mulholland KC, Wallace WD, Epanomeritakis E, Hall SR. Pseudocyst formation in gastric ectopic pancreas. *JOP.* 2004;5:498–501.
30. Christodoulidis G, Zacharoulis D, Barbanis S, Katsogridakis E, Hatzitheofilou K. Heterotopic pancreas in the stomach: a case report and literature review. *World J Gastroenterol.* 2007;13:6098–100.
31. Gottschalk U, Dietrich CF, Jenssen C. Ectopic pancreas in the upper gastrointestinal tract: Is endosonographic diagnosis reliable? Data from the German Endoscopic Ultrasound Registry and review of the literature. *Endosc Ultrasound.* 2018;7:270–8.
32. Erkan N, Vardar E, Vardar R. Heterotopic pancreas: Report of two cases. *JOP.* 2007;8:588–91.
33. Gottschalk U, Casper B, Boden G. Ectopic pancreas presenting as a large gastric antral papilla. *Endoscopy.* 2003;35:547.
34. Wiech T, Walch A, Werner M. Histopathological classification of nonneoplastic and neoplastic gastrointestinal submucosal lesions. *Endoscopy.* 2005;37:630–4.
35. Chou JW, Cheng KS, Ting CF, Feng CL, Lin YT, Huang WH. Endosonographic features of histologically proven gastric ectopic pancreas. *Gastroenterol Res Pract.* 2014;2014:160601.
36. Chak A, Canto MI, Rösch T, Dittler HJ, Hawes RH, Tio TL, et al. Endosonographic differentiation of benign and malignant stromal cell tumors. *Gastrointest Endosc.* 1997;45:468–73.

Clinical evaluation of patients with classical Rett Syndrome and MECP2 gene analysis

KLASİK RETT SENDROMU OLAN HASTALARIN KLİNİK DEĞERLENDİRMESİ VE MECP2 GEN ANALİZİ

 Filiz HAZAN¹,  Semra GÜRSOY²,  Aycan ÜNALP³,  Ünsal YILMAZ³

¹Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Genetik Bölümü, İzmir

²Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Genetik Bölümü, İzmir

³Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Nöroloji Bölümü, İzmir

ABSTRACT

Objective: This retrospective study aims to evaluate the clinical manifestations in genetically confirmed classical Rett syndrome (RTT) patients.

Materials and Methods: Sixteen patients clinically diagnosed with classical RTT between 2010 and 2020 were evaluated according to diagnostic criteria for this syndrome. The results of pyrosequencing, Sanger sequencing, and multiplex ligation-dependent probe amplification of MECP2 gene were inspected.

Results: Besides the four main criteria of RTT which are necessary for the diagnosis of classical RTT, diurnal bruxism (16/16 patients), epilepsy (11/16; 68.7%) and microcephaly (11/16; 68.7%) were the most common features in the patients. Early onset epilepsy was detected in six patients (6/11; 54.5%). Four of them had drug-resistant epilepsy. Four out of 5 patients with late onset epilepsy had a good response to anticonvulsant treatment. Scoliosis, breathing problems, peripheral vasomotor disturbances and sleep problems were detected in 37.5%, 18.7%, 25% and 12.5% of the patients, respectively. Nine different MECP2 gene variants were identified in 16 patients. Nonsense variant was the most common variant type (7/16; 43.7%). The detected variants were p.Arg168Ter (n=5); p.T158M (n=2); p.R255X (n=2); p.Arg106Trp (n=1); p.Arg270GlufsTer19(n=1); p.Lys286ProfsTer2 (n=1); p.Leu386_Thr400delinsPro (n=1); Exon 4 del (n=2) and Exon 3-4 del (n=1).

Conclusion: The p.Arg168Ter variant is common in classical RTT patients in Turkey. Diurnal bruxism, microcephaly and epilepsy are common features in this syndrome. Epilepsy develops in more than half of the patients with classical RTT and especially early-onset epilepsy tends to be drug resistant in a substantial proportion of the patients.

Keywords: Rett Syndrome, MECP2 gene, epilepsy, diurnal bruxism, microcephaly, drug resistant

ÖZ

Amaç: Bu retrospektif çalışma, genetik tanı almış klasik Rett Sendromu (RTT) hastalarında, klinik bulguları değerlendirmeyi amaçlamaktadır.

Filiz HAZAN

Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Genetik Bölümü, İzmir
E-posta: filizhzn@gmail.com

 <https://orcid.org/0000-0002-0382-3446>

Gereç ve Yöntem: 2010-2020 yılları arasında, genetik polikliniğinde RTT tanısı almış 16 hasta, sendromun tanı kriterlerine göre değerlendirildi. Pyrosekans, Sanger sekans ve multipleks ligasyona bağlı prob amplifikasyonu analiz sonuçları incelendi.

Bulgular: Klasik RTT tanısı için gerekli olan 4 ana kritere ek olarak, hastalarda en sık saptanan bulgular; diurnal bruksizm (16/16; %100), epilepsi (11/16; %68,7) ve mikrosefali (11/16; %68,7) idi. Erken başlangıçlı epilepsi, 6 hastada saptandı (6/11; %54,5). Bu hastaların dördünde, ilaca dirençli epilepsi vardı. Geç başlangıçlı epilepsisi olan 5 hastanın 4'ü antikonvülsan tedaviye iyi yanıt verdi. Skolyoz, nefes alma problemleri, periferik vazomotor bozukluk ve uyku problemleri sırasıyla %37,5; %18,7; %25 ve %12,5 sıklıkta saptandı. 16 hastada, toplam 9 farklı MECP2 gen varyantı tanımlandı. Nonsense varyant, en sık varyant tipi idi (7/16 hasta; %43,7). Çalışmada saptanan varyantlar; p.Arg168Ter (n=5); p.Thr158Met (n=2); p.Arg255Ter (n=2); p.Arg106Trp (n=1); p.Arg270GluSer19 (n=1); p.Lys286ProfsTer2 (n=1); p.Leu386_Thr400delinsPro (n=1); Exon 4 del (n=2) ve Exon 3-4 del (n=1) idi.

Sonuç: p.Arg168Ter, patojenik varyantı, Türk klasik RTT hastalarında yaygındır. Diurnal bruksizm, mikrosefali ve epilepsi, bu sendromun sık bulgularındandır. Klasik RTT'li hastaların yarısından fazlasında epilepsi gelişir ve özellikle erken başlangıçlı epilepsi, hastaların önemli bir kısmında ilaca dirençli olma eğilimindedir.

Anahtar Sözcükler: Rett Sendromu, MECP2 geni, epilepsi, Diurnal bruksizm, mikrosefali, ilaç direnci

Rett syndrome (RTT; MIM #312750) is an early-onset neurological disorder, and is among leading genetic reasons for intellectual disability in female gender with a prevalence of 1:10000-15000 in female live births (1). There are two major clinical forms of RTT: 1- classical or typical, 2-variant or atypical (2). It is based on clinical evaluation with diagnostic criteria first described in 2002 (3). A revised diagnostic criterion have been reported in recent years to simplify the diagnosis of classical and atypical RTT (4). To diagnose classical RTT, history of regression should be present and the patients should have all of the main criteria and not have any exclusion criteria (Table 1). Minimum two of the main criteria and five of the eleven supportive criteria should be present in the patient for atypical RTT diagnosis.

RTT is an X-linked dominant disorder, with the most of the patients being caused by mutations or deletions in MECP2 gene. This gene is located on Xq28 and is coding for the methyl-CPG-binding protein 2 (5). The MECP2 gene is comprised of four exons and the protein contains five main domains: The N-terminal domain (NTD); a methyl-CpG-binding domain (MBD); a transcriptional repression domain (TRD); the C-terminal domain (CTD) and an

interdomain (ID) (6). The protein has two isoforms (MeCP2_e1 and MeCP2_e2). These proteins differ in N termini and relative expression levels in tissues. In the brain, MeCP2_e1 is the predominant isoform, and MeCP2_e2 is abundant in the liver, skeletal muscles and placenta (7, 8).

There is a high correlation between the mutations in MECP2 gene and RTT, particularly with its classical form, although they have been also detected in a small proportion of patients with intellectual disabilities and autism spectrum disorders (4-9, 11). About 800 different variants of MECP2 gene, including point mutations, insertions, duplications, small or large deletions, have been described (12). MECP2 gene mutations are responsible for 95-97% of classic and about 50-70% of atypical RTT (13, 14). The most common pathogenic variants in MECP2 gene are p.Arg106Trp, p.Arg133Cys, p.Arg306Cys, p.Thr158Met, p.Arg168Ter, p.Arg255Ter, p.Arg270Ter and p.Arg294Ter. These variants are responsible for nearly 50% of the patients with RTT (15). In this study, we aimed to evaluate the clinical manifestations in 16 genetically confirmed classical RTT patients.

Table 1. The Revised diagnostic criteria for RTT. Modified from Neul JL et al: Ann Neurol 2010;68:944-950.

Revised diagnostic criteria for RTT 2010		
Consider diagnosis when postnatal deceleration of head growth observed		
Required for typical RTT	1 A period of regression followed by recovery or stabilization 2 All main criteria and all exclusion criteria 3 Supportive criteria are not required, although often present in typical RTT	
Required for atypical RTT	1 A period of regression followed by recovery or stabilization 2 At least 2 out of the 4 main criteria 3 5 out of 11 supportive criteria	
Main Criteria	1 Partial or complete loss of acquired purposeful hand skills 2 Partial or complete loss of acquired spoken language 3 Gait abnormalities: Impaired (dyspraxic) or absence of ability 4 Stereotypic hand movements such as hand wringing/squeezing, clapping/tapping, mouthing and washing/rubbing automatisms	
Exclusion Criteria for typical RTT	1 Brain injury secondary to trauma (peri- or postnatally), neurometabolic disease, or severe infection that causes neurological problems 2 Grossly abnormal psychomotor development in first 6 months of life	
Supportive Criteria for atypical RTT	1 Breathing disturbances when awake 2 Bruxism when awake 3 Impaired sleep pattern 4 Abnormal muscle tone 5 Peripheral vasomotor disturbances	6 Scoliosis/kyphosis 7 Growth retardation 8 Small cold hands and feet 9 Inappropriate laughing/screaming spells 10 Diminished response to pain 11 Intense eye communication "eye pointing"

MATERIAL and METHODS

Patient Selection

16 female patients diagnosed with classical RTT according to the international criteria of RTT were included in the present study. Four patients were assessed at the Department of Medical Genetics, Pediatric Genetics and Pediatric Neurology of Behçet Uz Child Disease and Pediatric Surgery Training and Research Hospital, Izmir, Turkey. MECP2 gene screening of the patients was carried out by three different methods: pyrosequencing analysis, Sanger sequencing and MLPA. As a standard approach in our department, pyrosequencing analysis is used to detect eight common pathogenic variants including p.Arg106Trp, p.Arg133Cys, p.Arg306Cys, p.Thr158Met, p.Arg168Ter, p.Arg255Ter, p.Arg270Ter and p.Arg294Ter in patients clinically diagnosed with RTT. In patients with a normal

pyrosequencing analysis, further Sanger sequencing of all coding exons of MECP2 is used. However, if the result is normal, MECP2 MLPA analysis is done.

Clinical manifestations and molecular results were collected from the medical records of the patients. Informed written consents were taken from the parents of all participants. Ethical approval for this study was obtained by the institutional review board at Dr. Behçet Uz Children's Hospital, Izmir, Turkey.

Molecular Analysis

DNA isolation

Peripheral blood samples of 16 classical RTT patients were collected in EDTA tubes. Genomic DNA from the peripheral blood lymphocytes of all individuals was

extracted with QIAamp DNA mini kit (Qiagen, GMBH, Hilden, Germany) following the manufacturer protocol.

Pyrosequencing analysis

Eight target sequences encompassing p.Arg106Trp, p.Arg133Cys, p.Arg306Cys, p.Thr158Met, p.Arg168Ter, p.Arg255Ter, p.Arg270Ter and p.Arg294Ter pathogenic variants of MECP2 gene were amplified with PCR and sequenced with the pyrosequencing method (MECP2; ENST00000303391.6). PCR was performed using the PyroMark PCR Kit (Qiagen, Maryland, Germany). After the activation (15 min at 95°C), the DNA was amplified for 45 cycles under the following conditions: 30 secs at 94°C, 30 sec at 60°C and 30 sec at 72°C. Before pyrosequencing, PCR product was biotinylated binding to Streptavidin-coated sepharose beads captured with a vacuum tool. Once they were washed and denatured, single-stranded DNA was generated. This template DNA was released into the Pyrosequencing reaction plate. This plate included the sequencing primers. After primer annealing, this plate was inserted into the PyroMark instrument. Pyrosequencing reaction was conducted on the PyroMark Q24 instrument following manufacturer's instructions (PyroMark, Qiagen, Germany). PyroMark Q24MDx Software was used for the analysis of results.

Sanger sequencing analysis

All the coding exons and exon–intron boundaries of MECP2 gene were amplified using previously reported primers (16). The PCR products were purified and sequenced on an ABI PRISM 3500 automated DNA sequencer (Applied Biosystems). Each variation was confirmed by bidirectional sequencing. The standards and guidelines established by the American College of Medical Genetics were used for the classification of variants.

MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) analysis

Mutation-negative samples were tested for large deletions with SALSA MLPA P015 probe mix (MRC-Holland, Amsterdam, and The Netherlands) following manufacturer's instructions. The MLPA products were quantified with capillary electrophoresis and ABI PRISM® 3500xl (Applied Biosystems®, Invitrogen Life

Technologies, Carlsbad, CA, USA). Gene Mapper (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and Coffalyser Software (MRCHolland) was used for MLPA analysis.

RESULTS

MECP2 gene analyzes and clinical findings of the 16 patients with classical RTT were evaluated (Table 2, 3). The median age was 3.7 years (range; 1-12 years). The detailed clinical features of the patients with MECP2 pathogenic variants are presented in Table 3. Besides the four main criteria of RTT, diurnal bruxism (16/16 patients; 100%), microcephaly (11/16 patients; 68.7%) and epilepsy (11/16 patients; 68.7%) were the most common features (Table 3). When we evaluated the patients with epilepsy according to drug response, five out of them had drug-resistant epilepsy (5/11 patients; 45.4%). Early onset epilepsy which started before the age of three was detected in six patients (6/11 patients; 54.5%). Two of these six patients had also a good response to the anticonvulsant treatment. In five patients, seizures were seen in 3 years of age or older (5/11; 45.4%). Only one of them had drug-resistant epilepsy.

Seven different MECP2 gene variants were identified in 13 patients by both sequence analyses (pyrosequence or Sanger sequence) (81.2%). All identified variants are present in the Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>). Nonsense variant was the most common variant type with two different variants in seven patients (7/16 patients; 43.7%). The other identified variants were two missenses, two frameshifts and one insertion-deletion. The mutations that occur more frequently were p.Arg168Ter (n=5); p.T158M (n=2) and p.R255X (n=2) (Figure 1). Heterozygous exon 4 deletion (n=2) and exon 3-4 deletion (n=1) were detected by MLPA analysis (18.7%) (Table 2).

When we evaluate the clinical characteristics of the five patients with the most common pathogenic variant (p.Arg168Ter), in addition to the main criteria, microcephaly and diurnal bruxism were noted in all of them. While epilepsy, inappropriate laughing and screaming spells were noted in four patients, the other features were less common (Table 3).

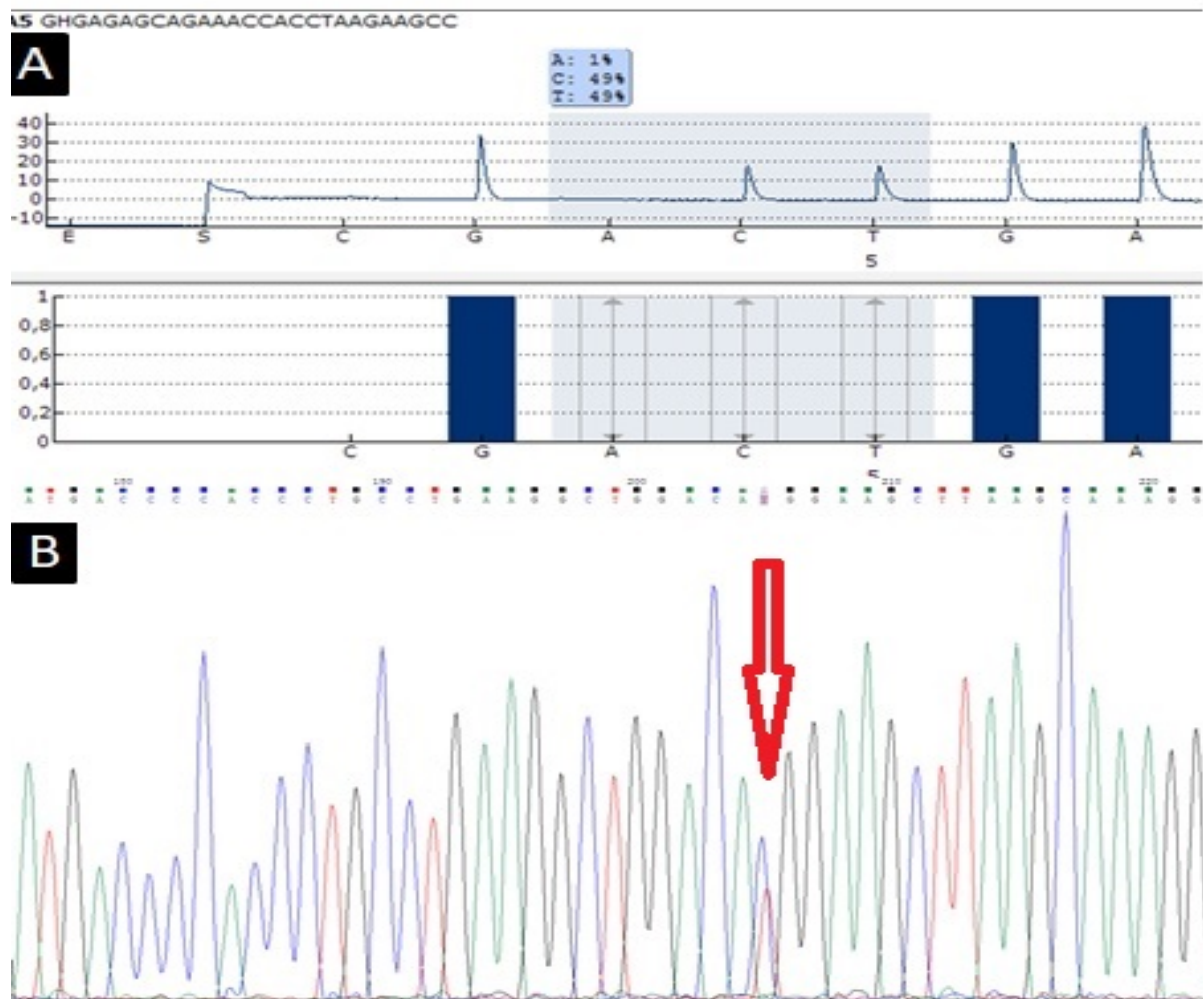


Figure 1. a-b: The Pyro and Sanger sequencing results of different patients (DAP, $\times 200$).

A: Pyrosequencing data shows a heterozygous c.502C>T (p.Arg168Ter) variant, B: Sanger sequencing result of c.316C>T (p.Arg106Trp) variant.

Table 2. Identified pathogenic variants of MECP2 gene

Patients	Age of RTT Diagnosis	Mutation in cDNA	Mutation in amino acid	Exon	Domain	Method of molecular analysis
P1	2	c.316C>T	p.Arg106Trp	3	MBD	Pyrosequencing
P2	4	c.473C>T	p.Thr158Met	4	MBD	Pyrosequencing
P3	5	c.473C>T	p.Thr158Met	4	MBD	Pyrosequencing
P4	2,5	c.502C>T	p.Arg168Ter	4	ID	Pyrosequencing
P5	1,5	c.502C>T	p.Arg168Ter	4	ID	Pyrosequencing
P6	12	c.502C>T	p.Arg168Ter	4	ID	Pyrosequencing
P7	2,5	c.502C>T	p.Arg168Ter	4	ID	Pyrosequencing
P8	4	c.502C>T	p.Arg168Ter	4	ID	Pyrosequencing
P9	5	c.763C>T	p.Arg255Ter	4	TRD	Pyrosequencing
P10	1,5	c.763C>T	p.Arg255Ter	4	TRD	Pyrosequencing
P11	2	c.808delC	p.Arg270GlufsTer19	4	TRD	Pyrosequencing
P12	4,5	c.856_859delAAAG	p.Lys286ProfsTer2	4	TRD	Sanger sequencing
P13	5	c.1157_1198del	p.Leu386_Thr400delinsPro	4	CTD	Sanger sequencing
P14	4	Exon 4 del		4		MLPA
P15	2	Exon 4 del		4		MLPA
P16	3	Exon 3-4 del		3-4		MLPA

MBD: methyl-CpG binding protein, TRD: transcription repression domain, ID: intervening domain

Table 3: Clinical manifestations of the classical RTT patients with MECP2 variants

Clinical Features	Patients with MECP2 mutations: N= 16 (%)	Patients with p.Arg168Ter N=5	Patients with p.Trp158Met N=2	Patients with p.Arg235Ter N=2	Patients with 6430G & del N=2	Patients with p.Arg270GlnTer* 19 N=1	Patients with p.Arg106Trp NA	Patients with c.856_g996delAAA C N=1	Patients with c1157_1196del NA	Patients with 6430G 3-4 del NA
Loss of acquired purposeful hand skills	16 (100%)	3	2	2	2	1	1	1	1	1
Loss of acquired spoken language	16 (100%)	3	2	2	2	1	1	1	1	1
Stereotypic hand movements	16 (100%)	3	2	2	2	1	1	1	1	1
Gait abnormalities	16 (100%)	3	2	2	2	1	1	1	1	1
Bruxism when awake	16 (100%)	3	2	2	2	1	1	1	1	1
Microcephaly	11(68.7%)	3	1	-	2	1	-	-	1	1
Epilepsy	11(68.7%)	4	2	1	2	-	-	1	1	-
Abnormal muscle tone	9 (56.2%)	2	2	-	2	1	-	-	1	1
Small cold hands and feet	6 (37.5%)	2	-	1	-	1	-	-	1	1
Inappropriate laughing/screaming spells	6 (37.5%)	4	-	1	-	-	-	-	-	1
Scoliosis or kyphosis	6 (37.5%)	2	1	1	-	1	-	-	1	-
Growth retardation	4 (25%)	1	-	-	1	1	-	-	1	-
Breathing disturbances when awake	3 (18.7%)	1	-	-	-	1	-	-	1	-
Intense eye communication - "eye pointing"	4 (25%)	1	-	1	1	-	-	-	1	-
Peripheral vasomotor disturbances	4 (25%)	1	-	-	-	1	-	-	1	1
Diminished response to pain	2 (12.5%)	1	-	-	-	-	-	-	1	-
Impaired sleep pattern	2 (12.5%)	-	-	-	-	-	1	-	-	1

DISCUSSION

In this study, we reported the results of the genetic analysis of MECP2 gene and clinical features in Turkish classical RTT girls. RTT syndrome caused by mutations in MECP2 gene is one of the most frequent reasons of mental retardation in females (5). DNA sequencing identifies pathogenic variants of MECP2 gene in about 80% of classic RTT patients (17). The eight most common pathogenic variants including p.Thr158Met, p.Arg168Ter, p.Arg255Ter, p.Arg270Ter, p.Arg306Cys, p.Arg294Ter, p.Arg133Cys and p.Arg106Trp account for 47% of all the variants in MECP2 gene (15). Deletions including one or more exons of MECP2 gene were reported in approximately 10% of suspected RTT patients including classic, atypical, and unclassified (17-19). However, the frequency of large exon deletions increases up to 28% in classic RTT (19). There is only one previous study, which investigated MECP2 variants in Turkish RTT patients. In that study, about half of the patients (7/16) had missense mutations. Moreover, p.Arg106Trp (3 patients) and p.Arg168Ter (3 patients) variants were reported as the most common variants. Additionally 7 out of 8 common mutations of MECP2 gene were detected in that study. Large deletion was reported in only one patient (20). In our study, we detected seven different pathogenic variants in 81.2% of the patients with both sequence analyses and this rate was compatible with the literature. The most common type of variant was nonsense change (7/16 patients; 43.7%). Missense mutations were noted in only three patients (18.7%). While the most common pathogenic variant was p.Arg168Ter, consistent with previous data, p.Arg106Trp was detected in only one patient. Two large deletion were detected in three patients. The p.Arg294Ter pathogenic variant was not detected in our study and in the other study conducted in Turkey (20). The reason for this can be that p.Arg294Ter may not be an MECP2 variant often seen in Turkey. Approximately, 70% of the pathogenic MECP2 gene variants have been described in TRD and MBD domains, which are located in the 3rd and 4th exons. Most of the mutations are in the form of nucleotide transition from cytosine to thymine (C>T) and this is consistent with the possibility of hypermutability at methylated CpG dinucleotides (5, 21). In our study, All of the variants,

except for deletions, had the same nucleotide transition (C>T) and were located in exon 3 and 4. Additionally, more than half of the variants were located in ID and TRD domains of MECP2 gene, which were also consistent with the literature.

There is a high variability in the clinical features of RTT. Amir et al. evaluated 78 classical RTT patients, and detected the relationship between truncating mutations and breathing abnormalities (22). Additionally, they reported that scoliosis was common in patients with missense mutations. Similarly, in our study, breathing abnormalities were detected in two patients with truncating mutations. Scoliosis was detected in six patients. Unlike the current literature, we found missense mutation in only one of them. The remaining five patients had nonsense (three patients) and frameshift (two patients) mutations. Diurnal bruxism, which was one of the supportive criteria for atypical RTT, was reported in 68 to 84 % of RTT patients (23, 24). Bebbington et al. reviewed 346 RTT patients with MECP2 variants and they have reported that common features of this syndrome including scoliosis, breathing problems, peripheral circulation problems and impaired sleep pattern were detected in 54.6%, 64.2%, 71.3% and 67.3% of RTT patients, respectively. In this study the mean age of the participants was >9 year of age and they were followed-up till adulthood. No significant relationships between these features and mutation types were found (25). In our study, besides major diagnostic criteria, diurnal bruxism was the most common feature, which was detected in all classical RTT patients. However, we noted scoliosis, breathing problems, peripheral vasomotor disturbances and sleep problems in 37.5%, 18.7%, 25% and 12.5% of the patients, respectively. The rates of these clinical features in our study were lower than those reported by Bebbington et al., it may be associated with the lower mean age of the participants (25).

The prevalence epilepsy was reported as 58 to 80% in RTT patients (25-27). Seizures started around four years of age in about half of RTT patients (28, 29). The results of studies investigating the relationship between epilepsy and mutation are conflicting. Pintuati et al. reported that epilepsy was commonly seen in patients with large gene

deletions and p.Arg294Ter variant of MECP2 gene. Patients with p.Arg168Ter and p.Arg255Ter variants started having seizures earlier than patients with large gene deletions (30). However, Jian et al. evaluated 288 patients and they reported that seizure rates were found low in patients with p.Arg294Ter and p.Arg255Ter variants (29). Similarly Glaze et al., revealed 493 patients with MECP2 variants and found lower rates of epilepsy in patients with p.Arg255Ter variant (31). Nevertheless, Halbach et al. evaluated 137 RTT patients and no relationship was found between epilepsy and mutation types (26). In that study, a history of epilepsy was reported in 61% of the RTT patients, but in only 1 patient, seizures started before 4 years of age. In 18% of the females, epilepsy was uncontrolled or poorly controlled by medication. In the present study, the rate of epilepsy (68.75%) was compatible with the literature. However, the frequency of early onset epilepsy (54.5%) and the incidence of epilepsy around four years of age (9/11 patients; 81.8%) were higher than the current literature (26, 28). Additionally, resistant epilepsy (5/11 patients; 45.4%) was more commonly detected when compared with the study authored by Halbach et al. (26). Nissenkorn et al. reported that late-onset epilepsy is a good prognostic factor for the disease (32). In our study, four out of five patients with late-onset epilepsy had a good response to the anticonvulsant treatment. In accordance with Pintuati et al. (2010), epilepsy was detected in two patients with large deletion. Four of the five patients with p.Arg168Ter had epilepsy, but there was no difference between the patients regarding the age of onset of epilepsy. Consequently, we could not find any relationship between MECP2 variants and the age of onset of epilepsy.

In conclusion, the p.Arg168Ter variant is common in classical RTT patients in Turkey. Besides the four main criteria of RTT, which are necessary for the diagnosis of classical RTT, diurnal bruxism, microcephaly and epilepsy are common features in this syndrome. Epilepsy, which can be treated using anti-epileptic medications, develops in more than half of patients with RTT and especially early-onset epilepsy tends to be drug resistant in a substantial proportion of the patients.

REFERENCES

1. Zahorakova D, Lelkova P, Gregor V, Magner M, Zeman J, Martasek P. MECP2 mutations in Czech patients with Rett syndrome and Rett-like phenotypes: novel mutations, genotype-phenotype correlations and validation of high-resolution melting analysis for mutation scanning. *J Hum Genet.* 2016;61:617-25.
2. Laurvick CL, de Klerk N, Bower C, Christodoulou J, Ravine D, Ellaway C, et al. Rett syndrome in Australia: a review of the epidemiology. *J Pediatr.* 2006;148:347-52.
3. Hagberg B. Rett syndrome: clinical peculiarities and biological mysteries. *Acta Paediatr.* 1995;84:971-6.
4. Hagberg B, Hanefeld F, Percy A, Skjeldal O. An update on clinically applicable diagnostic criteria in Rett syndrome. Comments to Rett Syndrome Clinical Criteria Consensus Panel Satellite to European Paediatric Neurology Society Meeting, Baden Baden, Germany, 11 September 2001. *Eur J Paediatr Neurol.* 2002;6:293-7.
5. Neul JL, Kaufmann WE, Glaze DG, Christodoulou J, Clarke AJ, Buisson NB, et al. RettSearch Consortium. Rett syndrome: revised diagnostic criteria and nomenclature. *Ann Neurol.* 2010;68:944-50.
6. Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi H Y. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nature Genetics.* 1999;3:185-8.
7. Psoni S, Sofocleous C, Traeger-Synodinos J, Kitsiou-Tzeli S, Kanavakis E, Fryssira-Kanioura H. Phenotypic and genotypic variability in four males with MECP2 gene sequence aberrations including a novel deletion. *Pediatr Res.* 2010; 67:551-6.
8. Mnatzakanian GN, Lohi H, Munteanu I, Alfred SE, Yamada T, Macleod PJM, et al. A previously unidentified MECP2 open reading frame defines a

- new protein isoform relevant to Rett syndrome. *Nat Genet.* 2004;36:339–41.
9. Kriaucionis S, Bird A. The major form of MeCP2 has a novel N-terminus generated by alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:1818–23.
 10. Yntema HG, Kleefstra T, Oudakker AR, Romein T, de Vries BBA, Nillesen W, et al. Low frequency of MECP2 mutations in mentally retarded males. *Eur J Hum Genet.* 2002;10:487–90.
 11. Grozeva D, Carss K, Spasic-Boskovic O, Tejada MI, Gecz J, Shaw M, et al. Targeted next generation sequencing analysis of 1000 individuals with intellectual disability. *Hum Mutat.* 2015;36:1197–204.
 12. Ehrhart F, Sangani NB, Curfs LMG. Current developments in the genetics of Rett and Rett-like syndrome. *Curr Opin Psychiatry.* 2018;31:103–8.
 13. Christodoulou J, Grimm A, Maher T, Bennetts B. RettBASE: the IRSA MECP2 variation database—a new mutation database in evolution. *Hum Mutat.* 2003;21:466–72.
 14. Percy AK, Lane JB, Childers J, Skinner S, Annese F, Barrish J, et al. Rett syndrome: North American database. *J Child Neurol.* 2007;22:1338–41.
 15. Gold WA, Krishnaraj R, Ellaway C, Christodoulou J. Rett Syndrome: A Genetic Update and Clinical Review Focusing on Comorbidities. *ACS Chem Neurosci.* 018;9:167-76.
 16. Lima FT, Brunoni D, Schwartzman JS, Pozzi MC, Kok F, Juliano Y, et al. Genotype–phenotype correlation in Brazillian Rett syndrome patients. *Arq Neuropsiquiatr.* 2009; 67(3A):577–84.
 17. Pan H, Li MR, Nelson P, Bao XH, Wu XR, Yu S. Large deletions of the MECP2 gene in Chinese patients with classical Rett syndrome. *Clin Genet.* 2006;70:418-9.
 18. Hardwick SA, Reuter K, Williamson SL, Vasudevan V, Donald J, Slater K, et al. Delineation of large deletions of the MECP2 gene in Rett syndrome patients, including a familial case with a male proband. *Eur J Hum Genet.* 2007;15:1218-29.
 19. Archer H, Whatley S, Evans J, Ravine D, Huppke P, Kerr A, et al. Gross rearrangements of the MECP2 gene are found in both classical and atypical Rett syndrome patients. *J Med Genet.* 2006;43:451-6.
 20. Zengin-Akkuş P, Taşkıran EZ, Kabaçam S, Şimşek-Kiper PO, Haliloğlu G, Boduroğlu K, et al. Clinical and molecular evaluation of 16 patients with Rett syndrome. *Turk J Pediatr.* 2018;60:1-9.
 21. Williamson SL, Christodoulou J. Rett syndrome: new clinical and molecular insights. *Eur J Hum Genet.* 2006;14:896-903.
 22. Amir RE, Van den Veyver IB, Schultz R, Malicki DM, Tran CQ, Dahle EJ, et al. Influence of mutation type and X chromosome inactivation on Rett syndrome phenotypes. *Ann Neurol.* 2000;47:670-9.
 23. Magalhães MH, Kawamura JY, Araújo LC. General and oral characteristics in Rett syndrome. *Spec Care Dentist.* 2002;22:147-50.
 24. Fuertes-González MC, Silvestre FJ. Oral health in a group of patients with Rett syndrome in the regions of Valencia and Murcia (Spain): a case-control study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2014;19:e598-604.
 25. Bebbington A, Anderson A, Ravine D, Fyfe S, Pineda M, de Klerk N, et al. Investigating genotype-phenotype relationships in Rett syndrome using an international data set. *Neurology.* 2008;70:868-75.
 26. Halbach NS, Smeets EE, van den Braak N, van Roozendaal KEP, Blok RMJ, Schrandt-Stumpel CTRM, et al. Genotype-phenotype relationships as prognosticators in Rett syndrome should be handled with care in clinical practice. *Am J Med Genet A.* 2012;158A:340-50.

27. Gold WA, Krishnaraj R, Ellaway C, Christodoulou J. Rett syndrome: a genetic update and clinical review focusing on comorbidities. *ACS chemical neuroscience*. 2017;9:167-76.
28. Jian L, Nagarajan L, de Klerk N, Ravine D, Bower C, Anderson A, et al. Predictors of Seizure Onset in Rett Syndrome. *J Pediatr*. 2006;149:542-7.
29. Jian L, Nagarajan L, de Klerk N, Ravine D, Christodoulou J, Leonard H. Seizures in Rett syndrome: an overview from a one-year calendar study. *Eur J Ped Neurol*. 2007;11:310-7.
30. Pintaudi M, Calevo MG, Vignoli A, Parodi E, Aiello F, Baglietto MG, et al. Epilepsy in Rett syndrome: clinical and genetic features. *Epilepsy Behav*. 2010;19:296-300.
31. Glaze DG, Percy AK, Skinner S, Motil KJ, Neul JL, Barrish JO, et al. Epilepsy and the Natural History of Rett Syndrome. *Neurology*. 2010;74:909-12.
32. Nissenkorn A, Gak E, Vecsler M, Reznik H, Menascu S, Zeev BB. Epilepsy in Rett syndrome- The experience of a National Rett Center. *Epilepsia*. 2010;51:1252-8.

Assessment of postoperative complications in a university hospital in Turkey: A retrospective cohort study

TÜRKİYE'DE BİR ÜNİVERSİTE HASTANESİNDE POSTOPERATİF KOMPLİKASYONLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ: RETROSPEKTİF KOHORT ÇALIŞMA

 Aslınur SAGÜN,  Mustafa AZİZOĞLU,  Handan BİRBIÇER

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı, Mersin

ABSTRACT

Objective: Postoperative anesthetic complications can be predicted by evaluating the conditions that occur during preoperative evaluation and perioperative follow-up. In addition, the type and duration of surgery as well as the anesthesia technique are also important for postoperative morbidity. With this study, it was aimed to determine the frequency and types of complications in the postoperative period and to guide the future studies for perioperative care improvement.

Materials and Methods: This study included the patients who had undergone operation and admitted to the postoperative recovery unit between 2016 and 2017. Demographic data, anesthesia method, surgery type and duration, comorbidities, recovery score, and type of postoperative complication were recorded via a study form which also included the cut-off values for possible complications. The data were assessed by SPSS 21 program.

Results: It was found that postoperative complications developed in 0.87% (n=105) of 12,051 patients. The mean age was 47.3 years, 57.1% women (n=60), 42.9% men (n=45), the average operation time was 2.1 hours, and the recovery score was 9.6 on average. General anesthesia was performed in 99% of patients. The most common postoperative complications respectively were found to be vomiting (32.4%), nausea (28.6%) and hypoxemia (27.6%).

Conclusion: Detailed evaluation in the preoperative period and improvement of the perioperative care is important to prevent postoperative complications. As a clinical strategy, recording and evaluating postoperative complications will be a guide for improving the pre- and intraoperative care conditions of prospective patients.

Keywords: Anesthesia, morbidity, Postoperative nausea and vomiting


ÖZ

Amaç: Postoperatif anestezi komplikasyonları, preoperatif değerlendirme ve perioperatif takip esnasında ortaya çıkan durumların değerlendirilmesi ile öngörülebilir. Buna ek olarak, ameliyatın türü, süresi, anestezi tekniği de

Aslınur SAGÜN

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim
Dalı, Mersin-TÜRKİYE

E-posta: aslinur_aslan@hotmail.com

 <https://orcid.org/0000-0002-7884-5842>

postoperatif morbidite için önemlidir. Bu çalışma ile postoperatif dönemde komplikasyonların sıklığı ile tiplerinin belirlenmesi ve gelecekteki peroperatif tiplerinin belirlenmesi ve gelecekteki peroperatif bakım iyileştirme çalışmalarına yön verilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışma, 2016-2017 yılları arasında cerrahi uygulanmış ve postoperatif derlenme ünitesine kabul edilmiş olan hastaları kapsamaktadır. Demografik veriler, anestezi yöntemi, cerrahi tipi ve süresi, komorbidite, derlenme skoru ve postoperatif komplikasyon tipi, olası komplikasyonlar ile ilgili kestirim değerlerinin de tanımlı olduğu, çalışma formuna kaydedildi. Veriler SPSS 21 programı ile değerlendirildi.

Bulgular: Toplam 12.051 hastanın %0,87'sinde (n=105) postoperatif komplikasyon geliştiği bulundu. Ortalama yaş 47,3 yıl, %57,1 kadın (n=60), %42,9 erkek (n=45), ortalama operasyon süresi 2,1 saat ve derlenme skoru 9,6 idi. Hastaların %99'una genel anestezi uygulandı. En sık gözlenen postoperatif komplikasyonlar sırası ile kusma (%32,4), bulantı (%28,6) ve hipoksi (%27,6) olarak saptandı.

Sonuç: Preoperatif dönemde detaylı değerlendirme ve peroperatif bakımın iyileştirilmesi postoperatif komplikasyonları önlemek için önemlidir. Klinik bir strateji olarak, postoperatif komplikasyonların kaydedilmesi ve değerlendirilmesinin, ileriye dönük hastaların ameliyat öncesi ve sırasındaki bakım koşullarının iyileştirilmesi için bir rehber olacağı görüşüdeyiz.

Anahtar Sözcükler: Anestezi, morbidite, postoperatif bulantı ve kusma

Physiological disorders that affect multiple organ systems may be observed during the recovery period from anesthesia (1). The most common of these are postoperative nausea-vomiting (PONV), hypoxia, hypothermia and cardiovascular instability, some of which can be detected during preoperative evaluation, some may occur in relation to the type, duration of surgery or anesthesia technique. Historically, it is thought that the application of anesthesia is important only during surgery, but today it is seen that preoperative evaluation and intraoperative follow-up methods are given great importance.

Respiratory, cardiac or cognitive dysfunction may occur in patients due to pain in the early postoperative period. In the treatment of postoperative pain, studies have proven that the multimodal approach is more effective than of opioid-based analgesia treatment (2). With this approach, complications such as nausea-vomiting, respiratory depression, decreased GIS motility, and urinary retention arising due to opioids are also prevented. Factors such as short-acting anesthetic agents and more frequent use of outpatient surgery make postoperative recovery faster and more trouble-free. At the same time, choosing a

short-acting agent for preoperative medication will also be effective in recovery from anesthesia.

It is known that the etiology of PONV is multifactorial. These factors are reported to be related to the patient, surgical procedure or anesthesia technique. In addition, PONV may occur not only in the early postoperative period but also in the later period. Hydration and antiemetic agents are recommended in the treatment, but there is no consensus on the routine application of these treatments to each patient and the creation of a treatment plan according to the patient is among the recommendations (3).

Due to reasons such as long waiting time in the preoperative waiting area, infusion of large amounts of unheated fluids in the intraoperative period, large surgical incision, tremor may be observed in patients, especially in the first hours after the operation. Measurement and follow-up of body temperature are important for early detection of hypothermia and prevention of shivering. However, patients should be warmed with warm covers or external heaters.

Monitoring the vital signs of each patient transferred to the postoperative recovery unit by the healthcare worker in charge will ensure early detection and prevention of possible complications. Along with monitoring, some scoring systems are also helpful in the decision to transfer patients from the postoperative recovery unit.

Our aim with this study is to improve the quality of peroperative applications by determining the frequency and types of complications seen in the postoperative period in our clinic.

MATERIAL and METHODS

A study form was prepared which included the demographic information of the patients, anesthesia method, type of operation, presence of additional disease, recovery score, and type of postoperative complications. The cut-off values for possible complications in the study were also defined on the form. Data was recorded for the patients who underwent surgery and anesthesia between 01.06.2016-01.06.2017 at the Mersin University Medical Faculty Hospital (Appendice 1).

Modified Aldrete Score (Table 1) was preferred as the postoperative recovery score. Patients who scored eight and above according to the Modified Aldrete Score were transferred to the relevant department services. If the patient's score is below eight, the patients were followed up by applying the necessary intervention. This form was filled in by the health officer or nurses working in the postoperative recovery unit.

In case of any complication in the patients, the anesthesiologist who applied anesthesia to that patient was informed and the necessary intervention (such as respiratory support, elimination of analgesic need, PONV treatment) was performed.

Oriented - cooperative patients between the ages of 18 and 75 years were included in the study, whereas patients who were <18 or >75 years of age, who were not oriented - who were not cooperated and were not admitted to the postoperative recovery unit were excluded from the study.

After the data were recorded in the SPSS 21 program, they were evaluated by the Mersin University Faculty of Medicine, Department of Biostatistics and Medical Informatics. Continuous variables were expressed as mean and standard deviation, and categorical variables as numbers and percentages. Comparisons were evaluated on frequency.

This study has been approved by the Ethics Committee for Clinical Research in Mersin University (date: 13.07.2017/ number: 206).

Table 1. Modified Aldrete Score Used in the Postoperative Recovery Unit

MODIFIED ALDRETE SCORE		
Activity	Four extremities (Four extremities are moving)	2
	Two extremities (Two extremities are moving)	1
	No movement	0
Breathing	Can breathe deeply and cough	2
	Dyspnea, superficial breathing	1
	Apnea and obstruction	0
Blood Pressure	Blood pressure \pm 20 mmHg of normal	2
	Blood pressure \pm 20-50 mmHg of normal	1
	Blood pressure more than \pm 50 mmHg of normal	0
Consciousness	Fully awake, orientated	2
	Arousable on calling	1
	Not responsive	0
Oxygen Saturation	100-98 %	2
	97-95 %	1
	< 95 %	0
Total Points		

RESULTS

17,460 patients were evaluated in the postoperative recovery unit on the specified dates. Of them 5,409 were excluded due to exclusion criteria. Totally 12,051 patients were included to the study.

Postoperative complications were detected in 167 (1.38%) of 12,051 patients who underwent operation. The average age of patients with complications, their distribution by gender, average operation duration, and recovery score averages are shown in Table 2. General anesthesia (totally both inhalational and intravenous anesthesia) was used as anesthesia method in 99% of the patients, and regional anesthesia was used in 1% in the patients whom the complications were occurred.

According to the American Society of Anesthesiology (ASA) scores, 78 patients were ASA 1 (46.7%), 68 patients were ASA 2 (40.7%) and 21 patients were ASA 3 (12.6%).

Complications detected in patients are shown in Table 3. Surgical types of the patients are shown in Table 4.

The ratio of the patients who developed postoperative hypoxia were 47.5% of ASA Score 1, 35% ASA Score 2, and 17.5% ASA Score 3. Postoperative hypoxia was observed most frequently (35%) after abdominal surgery, then orthopedic surgery (27.5%) and emergency surgery (5%), respectively.

When the distribution of postoperative nausea incidence by gender was examined, it was 61.4% (n: 35) in women and 38.6% (n: 22) in men. Postoperative vomiting was 63.6% (n: 35) in women and 36.4% (n: 20) in men.

The incidence of postoperative hypertension according to the type of surgery was 0% for emergency surgery, 18.1% for orthopedic surgery, 27.2% for abdominal surgery, and 54.5% for other types of surgery.

Table 2. Age, Gender, Operation time, and Recovery scores of the patients.

Demographic data		
Age (year) (mean±SD)		47.09±19.76
Gender (%)	Female (n=97)	58.1
	Male (n=70)	41.9
Operation time (hour) (mean±SD)		1.9±1.48
Recovery score (mean±SD)		9.6±0.84

Table 3. Distribution of complications observed in patients

Complications		(%)	(n)
Nausea		34.1	57
Vomiting		32.9	55
Airway obstruction	The tongue behind the pharynx	16.2	27
	Laryngospasm	4.2	7
	Glottic edema	4.2	7
	Blood, secretion in the airway	3.6	6
	External compression to trachea	0	0
Hypoxemia		24	40
Hypotension		4.2	7
Hypertension		6.6	11
Arrhythmia		4.8	8
Unconsciousness		0.6	1
Hypothermia		4.2	7

Table 4. Distribution of patients according to the types of surgery performed

Type of surgery	(n)	(%)
Emergency	4	2.4
Orthopedic surgery	41	24.6
Abdominal surgery	49	29.3
Others	73	43.7

DISCUSSION

According to the findings of our study, the most common postoperative complication was found to be nausea. In the second order, vomiting was found. Postoperative nausea-vomiting is still one of the most common postoperative complications (20-40%) despite all the studies conducted on this subject and the use of prophylactic antiemetics (1). Causes such as the type of surgery performed, the presence of previous nausea-vomiting history in the patient, female gender, duration of the operation, opioid use increase the risk of PONV (4). It was not surprising that nausea and vomiting were observed in the first place in the patients included in the study.

When the relationship between gender with nausea and vomiting was examined, the rate of both nausea and vomiting was found to be higher in women.

With the Modified Aldrete Score, which was first published in 1970 and revised in 1995, it was decided to leave the postoperative recovery unit and the complications that occurred were recorded. While a score of 10 out of 15 according to this scoring calculated by the patient's activity, respiration, circulation, consciousness and color assessment is considered sufficient for the patient to be discharged, there are publications suggesting that a minimum score of 9 will be sufficient (5,6). According to the findings in our study, the mean recovery score of the patients was determined as 9.6, which is suitable for discharging patients from the recovery unit.

Postoperative hypoxemia is resulted from many reasons. Often, it may occur due to the development of atelectasis during the operation, the administration of opioids for analgesia, the transfer of patients from the operating room to the recovery unit without completely reversing the muscle relaxant effect (4). In the study conducted by Sun et al. in 2015, it was reported that postoperative hypoxemia may lead to serious secondary problems such as brain dysfunction, dysrhythmia and myocardial ischemia (7). In our study, it was unexpected to find a high rate of postoperative hypoxemia, because before this study was started, the incidence was unknown. This result has greatly increased our awareness of this issue.

However, it was found that only 3 out of 40 patients who developed hypoxia developed arrhythmia, which was accepted because of the early application of hypoxia treatment without rhythm disturbance. The relationship between ASA Score and probability of re-intubation was studied before (8). When the relationship between the ASA score and the development of postoperative hypoxemia was examined in our study, it was found that the majority of patients with hypoxemia were evaluated as ASA I, the second was observed in patients who were evaluated as ASA II, and contrary to what was expected, the patients with the least hypoxemia were those evaluated as ASA III.

In the postoperative period, airway obstruction may occur due to tongue leaking into the posterior oropharynx, blood or secretion, laryngospasm, acute hemorrhage (9). Obstruction in the upper airway can cause many catastrophic situations (10). In our study, it was determined that the most common cause of airway obstruction was falling the tongue into the posterior oropharynx. The reason of this problem could be inadequate muscle strength, the insufficiency of reversal of neuromuscular blocking agents or early transfer from the operating room to the recovery room. This problem has been eliminated by applying various airway maneuvers and verbal stimulation. In addition, airway obstruction was observed in our patients due to other reasons; however, obstruction was resolved with the correction of the underlying cause. This finding has strengthened that patients were transferred from the operating rooms to the recovery unit before their muscle strength was fully restored but the neuromuscular monitoring was not applied to all the patients.

Cardiac problems may be encountered in addition to airway and oxygenation problems in the postoperative period. Factors such as hypermetabolism, sympathetic stimulation and hypoxemia play a role in the pathogenesis of postoperative cardiac complications (11). In the study conducted by Michard et al., development of both hypotension and hypertension in the postoperative period were found to be associated with increased morbidity and mortality (12). The most common cardiac complication in our study was hypertension. It was determined that this complication was followed by arrhythmia and hypotension

development, respectively. Postoperative blood pressure regulation is known to be a complex condition that is affected by the characteristics of the patient or the procedure performed and the perioperative care.

Although the incidence of postoperative hypertension varied between 5-20% after non-cardiac surgery, it was found to be associated with stroke, myocardial damage - infarction or bleeding. According to a recently published study, systolic blood pressure > 180 mmHg and diastolic blood pressure > 110 mmHg are signs of risk (13). "Acute postoperative hypertension" is defined as a significant high blood pressure that can lead to serious neurological, cardiovascular or surgical field complications in the early postoperative period. Patients who develop acute postoperative hypertension should be ensured of adequate ventilation and analgesia before being evaluated cardiologically. In the treatment of postoperative hypertension, it is recommended to first exclude the underlying cause (pain, urinary retention, hypoxemia, anxiety, etc.) and to initiate antihypertensive treatment if necessary (14). In our study, the development of hypertension was evaluated according to the types of surgery, but no clear result was obtained on this issue.

Postoperative hypotension can often occur due to hypovolemia. Especially in geriatric patients and patients with heart failure, it is recommended to be cautious in the treatment of hypotension. It is considered as an indicator of increased risk that postoperative systolic blood pressure < 90mmHg. It is known that if the patient has a history of preoperative hypertension, systolic blood pressure > 90mmHg is also a matter of concern, it means the values of systolic blood pressures accepted normal for non-hypertensive patients can be low for patients with hypertension (15). There is no consensus on the exact value of what the postoperative blood pressure should be.

In our study, the incidence of hypotension was found to be low, but only the values of the patients in the postoperative recovery unit were examined. However, there are studies showing that postoperative hypotension is detected at least once in approximately 20% of patients between 0 and 3 days (16). In our study, when the types of surgery and the development of hypotension were

evaluated, it was found that it mostly occurred after abdominal surgery. We think that fluid therapy applied in our clinic in abdominal surgery, which causes large fluid losses, may have increased the incidence of postoperative hypotension.

Arrhythmia in the postoperative period is also an important complication. Arrhythmia can occur due to causes such as hypothermia, electrolyte disturbance, pre-existing cardiac disease (congenital or acquired cardiac disease) (17). In our study, the rate of patients with arrhythmia in the postoperative period was found to be low, and the reason of arrhythmia were the preexisting cardiac diseases. In these patients, arrhythmia was treated by correcting the underlying cause.

The mechanism of postoperative neurological disorders is still not completely explained and is thought to be multifactorial (18). Postoperative unconsciousness can be seen from amnesia to delirium. In our study, unconsciousness was found in only one geriatric patient, and it was thought that the reason for the impaired consciousness in this patient was combination of opioid and prolongation of the effect of the anesthetic agent (thiopental sodium).

Hypothermia is considered to be a serious risk factor for patients undergoing surgery. It is known that postoperative hypothermia changes systemic and local physiology. It can lead to platelet dysfunction, coagulation disorders, increased incidence of postoperative infection and prolonged hospitalization, especially cardiac complications (such as myocardial damage, adrenergic response) (19). In our study, postoperative hypothermia was found in seven patients. Although a heated sheet was used for each patient admitted to the postoperative recovery unit, an external warming device was also used in addition to patients with hypothermia. No serious problems as abnormal heart rhythm or disturbances in vital signs related to hypothermia was encountered in these patients.

When all these findings were evaluated, decisions were made regarding the practices that could be performed in order to reduce the incidence of postoperative complications in our clinic.

It is known how important perioperative anesthesia management is in predicting and preventing problems that patients may encounter in the postoperative period. In the preoperative period, it is one of the primary tasks of the anesthesiologist to examine the patients in detail and optimize the situations that may pose risks. In this study, a higher rate of postoperative nausea and vomiting was found than reported in the literature. In order to optimize this result, routine prophylactic antiemetic application in specific surgeries (such as laparoscopic surgery, ear surgery), preoperative fasting period should not last longer than 6 hours, and patients should be given clear liquid orally 2 hours before the operation. In addition, the follow-up periods of patients with postoperative nausea and vomiting complaints were prolonged in the recovery unit. In order to prevent and / or reduce the hypoxia observed in the postoperative period, some changes have been implemented in the intraoperative ventilation strategy of the patients. These include practices such as minimizing the separation of patients' intubation tubes from the respiratory circuit, performing at least one recruitment maneuver in patients without contraindications, and avoiding high oxygen concentrations. In addition, it was ensured that the patients were not transferred to the recovery unit before the postoperative muscle strength was fully restored, and the use of the TOF device for muscle strength evaluation was increased. Another finding of us is the increased sensitivity in applying targeted fluid therapy to patients in order to reduce the incidence of hypotension in the postoperative acute period after abdominal surgery.

With all these findings and applications, we think that we emphasize the importance of the responsibility of the anesthesiologist in the postoperative recovery unit and raising the awareness of the team working together.

Main Points

- Close follow-up of patients admitted to the postoperative recovery room and recording their values are important in terms of detecting and resolving problems.
- Despite all developments in the field of anesthesiology, nausea and vomiting continue to be a serious problem that disrupts the quality of life. Factors that may cause PONV should be determined individually in

patients, and nausea and vomiting should be tried to be prevented and treated with appropriate treatment options.

- Failure to fully evaluate muscle strength during the termination of anesthesia may lead to life-threatening problems that may arise in the postoperative period. In order to prevent this situation, quantitative measurement of muscle strength should be evaluated in every patient, if possible.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Funda BARGU for her help in collecting study forms

REFERENCES

1. Nicholau TK. Chapter 96: The Postanesthesia Care Unit. In: Miller RD, Cohen NH, Eriksson LI, Fleisher LA, Wiener-Kronish JP, Young WL. *Miller's Anesthesia* 8th Edition. Elsevier; 2015: 2926.
2. Pogatzki-Zahna E.M., Segelcke D, Schug S.A. Postoperative pain—from mechanisms to treatment. *Pain Rep.* 2017;2: e588.
3. Kovac A L. Update on the Management of Postoperative Nausea and Vomiting. *Drugs.* 2013, 73:1525–47.
4. Kehlet H, Dahl J.B. Anaesthesia, surgery, and challenges in postoperative recovery. *Lancet* 2003; 362:1921–28.
5. Aldrete JA, Kroulik D. A postanesthetic recovery score. *Anesth Analg.* 1970;49:924-34.
6. Aldrete JA. The post-anesthesia recovery score revisited. *J Clin Anesth.* 1995;7:89-91.
7. Sun Z, Sessler DI, Dalton JE, Devereaux PJ, Shahinyan A, Naylor AJ et al. Postoperative Hypoxemia Is Common and Persistent: A Prospective Blinded Observational Study. *Anesth Analg.* 2015;121:709-15.
8. Brueckmann B, Villa-Urbe JL, Bateman BT, et al.: Development and validation of a score for prediction of postoperative respiratory

- complications. *Anesthesiology*. 2013; 118: 1276–85.
9. Eikermann M, Santer P, Ramachandran SK, Pandit J. Recent advances in understanding and managing postoperative respiratory problems. *F1000Research* 2019, 8 (F1000 Faculty Rev):197.
 10. Stige IH, Heian ST, Bremnes TA. Postoperative pulmonary oedema caused by upper airway obstruction. *Tidsskr Nor Laegeforen*. 2018;138. DOI: [10.4045/tidsskr.18.0139](https://doi.org/10.4045/tidsskr.18.0139)
 11. Jun IJ, Kim J, Kim HG, Koh GH, Hwang JH, Kim YK. Risk factors of postoperative major adverse cardiac events after radical cystectomy: implication of diastolic dysfunction. *Sci Rep*. 2019; 9:14096.
 12. Michard F, Biais M, Lobo SM, Futier E. Perioperative hemodynamic management 4.0. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2019;33:247-55.
 13. Mohammed Iddrisu S, Considine J, Hutchinson A. Frequency, nature and timing of clinical deterioration in the early post-operative period. *J Clin Nurs* 2018;27:3544-53
 14. Haas CE, LeBlanc JM. Acute postoperative hypertension: a review of therapeutic options. *Am J Health Syst Pharm* 2004;61:1661e73.
 15. McEvoy MD, Gupta R, Koepke EJ, Feldheiser A, Michard F, Levett D et al. Perioperative Quality Initiative consensus statement on postoperative blood pressure, risk and outcomes for elective surgery. *Br J Anaesth*. 2019;122:575-86.
 16. Roshanov PS, Rochweg B, Patel A, Salehian O, Duceppe E, Belley-Côté EP et al. Withholding versus continuing angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin II receptor blockers before noncardiac surgery: an analysis of the Vascular events in noncardiac Surgery patients cohort evaluation prospective cohort. *Anesthesiology* 2017;126:16-27.
 17. Fritz BA, Escallier KE, Ben Abdallah A, Oberhaus J, Becker J, Geczi K et al. Convergent Validity of Three Methods for Measuring Postoperative Complications. *Anesthesiology*. 2016;124:1265-76.
 18. Akelma H, Kilic ET, Salik F, Bicak EA, Kaya S. Postoperative cognitive dysfunction developed in donor nephrectomy- Case report. *Niger J Clin Pract*. 2019;22:877-80.
 19. Kleimeyer J P, Harris A H, Sanford J, Maloney W J, Kadry B, Bishop J A. Incidence and Risk Factors for Postoperative Hypothermia After Orthopaedic Surgery. *J Am Acad Orthop Surg* 2018;26:e497-e503.

Appendice-1: Study form to be filled in the postoperative recovery unit for the patients

COMPLICATIONS IN POSTOPERATIVE CARE UNIT: STUDY FORM

Name-Surname:

Age:

Gender:

Type of Operation: Emergency surgery

 Orthopedic surgery

 Abdominal surgery

 Others:

Anesthesia Method: Regional

 General Anesthesia

Recovery Score:

ASA Status:

Operation Time:

Postoperative Complications:

a) Nausea (or retching)

b) Vomiting (Once or more)

c) Airway obstruction:

 Falling the tongue to the posterior of the pharynx

 Laryngospasm

 Glottic edema

 Blood and secretions in the airway

 External compression of the trachea (neck hematoma)

d) Hypoxemia (SpO₂ < 90%): Yes No

e) Hypotension (Blood pressure < 90/50 mmHg)

f) Hypertension (Blood pressure > 140/80 mmHg)

g) Arrhythmia

h) Unconsciousness (Glasgow Coma Scale < 10)

i) Hypothermia (Body temperature < 35.5°C)

Mide metastazı yapan orbita malign melanomu: Olgu sunumu

ORBITAL MALIGN MELANOMA CAUSING GASTRIC METASTASIS, A CASE REPORT

Bartu BADAĞ, **Mustafa SALIŞ**, **İbrahim Emin TUNCER**

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Eskişehir, Türkiye

ÖZ

Malign melanom cilt kanseri vakalarının az bir kısmını oluşturmakla beraber cilt kanserine bağlı ölümlerin büyük çoğunluğundan sorumlu tutulmaktadır. Malign melanom, metastaz paterni olarak herhangi bir organı tutabilmektedir. Gastrointestinal sistem metastazları genellikle ince barsak seviyesinde olmakla beraber izole mide metastazları da nadir olarak görülebilmektedir. Hastalar, diğer gastrointestinal sistem tümörlerinde görülen karın ağrısı, kusma, halsizlik, disfaji, kabızlık, hematemez, melena, ince bağırsak tıkanması, perforasyon gibi klinik prezantasyonlarla başvurabilirler.

Bu olgu sunumumuzda; primer orbita malign melanomu nedeniyle takipli 57 yaşında erkek hastada mide metastazı tespit edilmesi ve lezyonun masif kanama tablosu ile başvurması üzerine palyasyon ve metastazektomi uygulanan bir hastayı sunmayı amaçladık.

Anahtar Sözcükler: orbita, malign melanom, gastrik metastaz

ABSTRACT

Although malignant melanoma constitutes a small part of skin cancer cases, it is hold responsible for the vast majority of skin cancer-related deaths. Malignant melanoma can involve any organ as a pattern of metastasis. Although the gastrointestinal systems metastases are usually at the level of the small intestine, isolated gastric metastases can also be seen rarely. Clinical presentations such as abdominal pain, vomiting, weakness, dysphagia, constipation, hematemesis, melena, small intestine obstruction, perforation are seen as in other gastrointestinal system tumors.

In this case report; we aimed to present a 57-year-old male patient with primary orbital malignant melanoma, who underwent palliation and metastasectomy upon detection of gastric metastasis and the lesion presented with massive bleeding.

Keywords: orbital, malignant melanoma, gastric metastasis

Bartu BADAĞ

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

Genel Cerrahi AD, Eskişehir

E-posta: drbartu@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0003-3465-8719>

Malign melanom, dermis kaynaklı kanserlerin yaklaşık %1-2 bölümünü oluşturmakla beraber, cilt kanserine bağlı ölümlerin büyük bir kısmından sorumlu tutulmaktadır (1). Malign melanom metastaz paterni olarak

vücutta herhangi bir organı tutabilmektedir (2). Gastrointestinal (GI) sistemin en sık görülen metastatik tümörlerindedir. En sık tutulan bölgeler arasında ince barsaklar, kolon ve rektum olmakla beraber nadiren de olsa

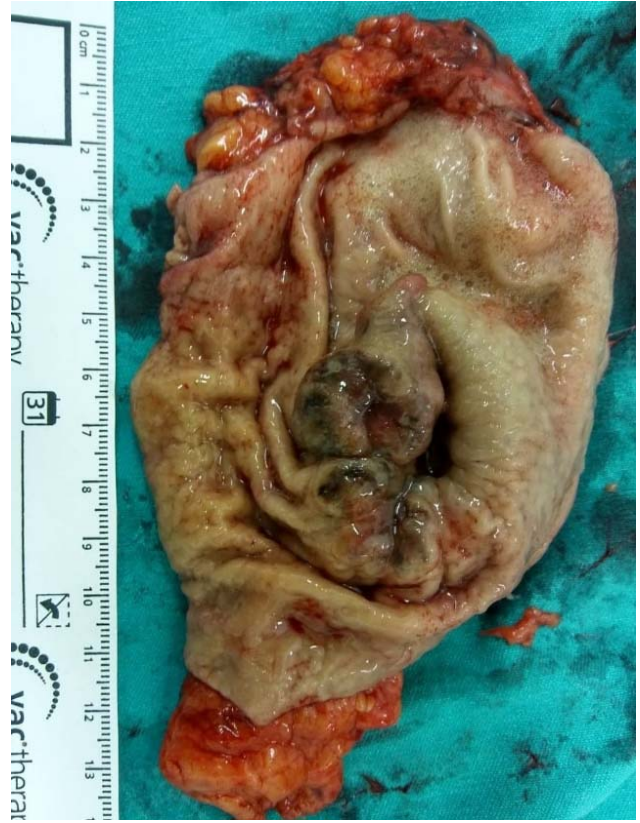
mide tutulabilmektedir (3). Hastalar diğer GI sistem tümörlerinde görülen karın ağrısı, kusma, halsizlik, disfaji, kabızlık, hematemez, melena, ince bağırsak tıkanması, perforasyon gibi nonspesifik semptomlarla kliniklere başvurabilmektedirler (4).

Bu olgu sunumumuzda; primer orbita malign melanomu nedeniyle takipli 57 yaşında erkek hastanın masif üst gastrointestinal kanama tablosu ile kliniğimize başvurusu üzerine cerrahi tedavi kararı verilip yapılan tetkikler ve ameliyat sonrası malign melanom mide metastazı saptanan olgumuzu sunmayı amaçladık.

OLGU SUNUMU

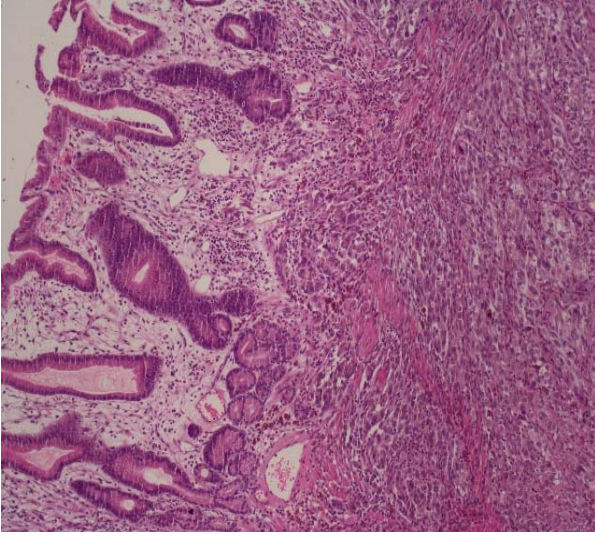
Elli yedi yaşında erkek hasta halsizlik, genel vücut ağrısı, koyu renkte dışkılama şikâyetleriyle kliniğimize başvurdu. Hastanın alınan anamnezinde üç yıl öncesine ait (2016) malign melanom nedeni sol göz enükleasyonu yapıldığı, ana spesmen patoloji raporunun evre pT4e, "Mikst Tip Malign Melanom" ile uyumlu olarak geldiği öğrenildi. Bu ameliyata ait dış merkez tetkik, operasyon ve histopatoloji preparatları incelendiğinde tümörün cerrahi sınırlarının ve optik sinir cerrahi sınırlarının intakt olduğu, neoplastik hücrelerin HMB45 pozitif olarak boyandığı bilgilerine ulaşılmıştır. Ameliyat sonrası patoloji sonucuyla göz hastalıkları polikliniğinde takip edilen hastaya yapılan vücut taramaları sonucunda adjuvan tedavinin düşünülmemiş olduğu ve 3 aylık poliklinik kontrolüne çağırılmış olduğu bilgilerine de sözel olarak ulaşılmıştır. Özgeçmişe yönelik olarak yapılan incelemede hastanın Ağustos 2016 tarihli dış merkez toraks ve abdomen kontrol bilgisayarlı tomografisinde (BT) metastazla uyumlu ya da anlamlı bir özellik bulunmadığı öğrenilmiştir. Ancak ameliyat sonrası genel durumu iyi olan ve herhangi bir şikâyeti olmayan hastanın 2017 ve 2018 yıllarında onkolojik takip amaçlı herhangi bir tetkik yaptırmadığı öğrenilmiştir. Sonrasında hasta Ağustos 2019 da vücut ağrısı, kaslarda güçsüzlük, halsizlik, koyu renkli dışkılama şikâyetiyle merkezimize başvurduğunda ileri derecede hemoglobinin düşüklüğü saptanması üzerine gerekli destek tedavileri verilmiş ve ardından Gastrointestinal sistem kanama odağına yönelik tarafımızca yapılan üst gastrointestinal sistem endoskopisinde mide antrumda incisura angularis seviyesinde polipoid kanamalı tümöral lezyon izlenmiştir.

Bu lezyondan alınan biyopsinin histopatolojik inceleme sonucu malign melanom metastazı ile uyumlu gelmiştir. Hastanın tetkik ve değerlendirmelerinin devam ettiği bu süreçte bir kez daha masif üst GİS kanamasının olması ve bu tablonun giderek kötüleşmesi nedeniyle hasta ve yakınlarının da onamı alınarak hem metastazektomi hem palyasyon amaçlı distal gastrektomi (Şekil 1) ve Roux N-Y anastomoz işlemleri uygulanmıştır.

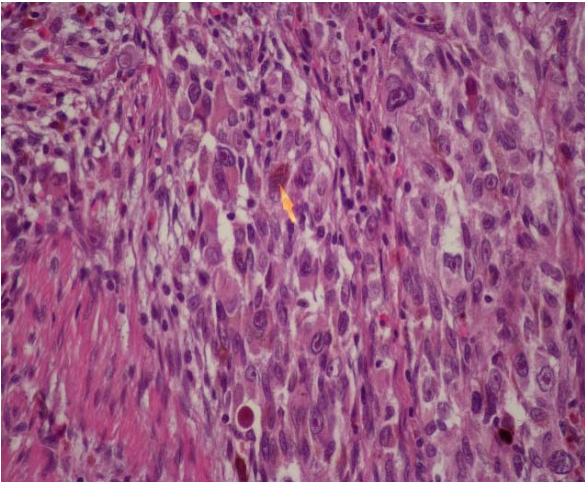


Şekil 1: Mide antrum-pilor bileşkesinde 5x4.5x2.5 cm lik gri-kahverengi renkte malign melanom metastazı ile uyumlu kitlesel lezyon-Distal Gastrektomi spesmeni.

Hastada ameliyat sonrası herhangi bir komplikasyonla karşılaşılmamış olup ameliyatı takip eden 6. günde genel cerrahi ve medikal onkoloji poliklinik kontrolü önerilerek tam şifa ile taburcu edilmiştir. Nihai histopatolojik inceleme sonuçları ise malign melanom metastazı, mide olarak raporlanmıştır. (Şekil 2-3)



Şekil 2: Solda mide mukozası izlenmektedir. Altta infiltratif tümör dokusu bulunmaktadır (Hematoksilen Eozin boyama x100 büyük büyütme)



Şekil 3: Tümör hücrelerinde belirgin nükleer pleomorfizm ve eozinofilik nükleol mevcuttur. Bazı hücrelerde sitoplazmik pigment birikimi (ok) gözlenmektedir (Hematoksilen Eozin boyama x400 büyük büyütme)

TARTIŞMA

Malign Melanom metastaz paterni olarak herhangi bir organa yayılabilmektedir. M1a bölgesel metastaz, M1b pulmoner sistem metastazı, M1c ise visseral organ

(gastrointestinal sistem, adrenal bezler, karaciğer) tutulumunu göstermektedir (2). Malign melanomların gastrointestinal sisteme metastazları sık görülmesine rağmen mide metastazları nadirdir (5). En sık tutulan bölgeler arasında ince barsaklar, kolon ve rektum bulunur. Mide metastazı nadir görülen bir durum olmakla beraber bizim olgumuzda hastada midede metastaz saptanmıştır (4). Gastrointestinal sistem metastazları primer tanı anında ya da yıllar sonra nüks belirtisi olarak ortaya çıkabilir. Olgumuzda mide metastazı orbita tedavi edildikten 3 yıl sonra ortaya çıkmıştır. Mideye metastatik melanom nadir görülen bir durumdur, kötü prognozu gösterir. Mideye metastaz yapan malign melanom olgularında beklenen survi genellikle 1 yılın altındadır (6). Klinik bulgular genellikle non-spesifiktir, ve çoğu hastada hastalık ileri evreye ulaşana kadar asemptomatik seyreder (7). Hastalar mide bulantısı kusma, gastrointestinal kanama, kilo kaybı semptomları gösterebilir, hatta akut perforasyon haliyle gelebilirler (7). Tanı radyografik çalışmalar ve endoskopik olarak yapılır. Olgumuzda non-spesifik gastrointestinal semptomlar ve kanlı dışkılama olması üzerine yapılan endoskopik incelemeyle tanı konulmuştur. BT'nin metastazları saptamada duyarlılığı %60-70 oranındadır (7). Gastrointestinal sisteme metastaz şüphesi varsa tarama amaçlı özofagogastroduodenoskopi, kolonoskopi ve gerekirse kapsül endoskopisi ile ince bağırsak incelemesi yapılmalıdır, bir lezyon tespit edildiği takdirde biyopsi alınmalıdır (8).

Metastatik mide MM'leri başta mide gövde ile fundusunda ve öncelikle büyük kurvatür tarafında izlenmektedir (5). Endoskopik olarak üç morfolojik görünüm bildirilmektedir. Birincisi ve en sık görüleni genelde tepesi ülserle melanotik nodüldür. İkincisi, yüzeiden kabarık ve ülserle submukozal kitle, üçüncüsü ise melanoz ve nekroz insidansı değişen kitlesel lezyondur (3).

Melanom tanısının doğrulanması, biyopsilerde S-100 proteini, premelanozom glikoprotein monoklonal antikoru HMB-45 ve melan-A pozitifliği ile doğrulanır (5, 9).

Tedavi seçenekleri cerrahi rezeksiyon, immünoterapi ve hedefe yönelik tedavidir. Cerrahi rezeksiyon semptomatik hastalarda palyatif amaçlı olarak

yapılabilir, bazı durumlarda bunun tümör yükünün azaltılmasına bağlı surviyeye katkı sağladığı görülmüştür (10). Olgumuzda lezyonun, kan transfüzyon ihtiyacı gerektirecek kadar kanamalı olması ve kanamanın tekrar etmesi nedeniyle cerrahi rezeksiyon kararı verilmiş ve uygulanmıştır.

Sonuç olarak karşılaştığımız olguda da olduğu gibi malign melanom vücutta birçok organı tutabilmekte, yıllar sonra başka bir organda nüks lezyon olarak karşımıza çıkabilmektedir. Malign melanom öyküsü olan hastalarda yeni gelişimli gastrointestinal sistem semptomları, kanama durumlarında üst gastrointestinal sistemin ülserlere lezyonları, primer tümörlerinin yanında malign melanom metastazları da akılda tutulmalı ve cerrahi tedavi seçeneği göz önünde bulundurulmalıdır.

Yazarların herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Hastadan 04.07.2020 tarihinde aydınlatılmış onam alınmıştır.

KAYNAKLAR

1. Eggermont AM, Spatz A, Robert C. Cutaneous melanoma. *The Lancet*. 2014;383:816-27.
2. Howard JH, Thompson JF, Mozzillo N, Nieweg OE, Hoekstra HJ, Roses DF, et al. Metastasectomy for distant metastatic melanoma: analysis of data from the first Multicenter Selective Lymphadenectomy Trial (MSLT-I). *Ann Surg Oncol*. 2012;19:2547-55.
3. Blecker D, Abraham S, Furth EE, Kochman ML. Melanoma in the gastrointestinal tract. *Am J Gastroenterol*. 1999;94:3427-33.
4. El-Sourani N, Troja A, Raab H-R, Antolovic D. Gastric metastasis of malignant melanoma: report of a case and review of available literature. *Viszeralmedizin*. 2014;30:273-5.
5. Goral V, Ucmak F, Yildirim S, Barutcu S, İleri S, Aslan İ, et al. Malignant melanoma of the stomach presenting in a woman: a case report. *J Med Case Rep*. 2011;5:1-4.
6. Liang KV, Sanderson SO, Nowakowski GS, Arora AS. Metastatic malignant melanoma of the gastrointestinal tract. *Mayo Clin Proc*. 2006;81:511-6.
7. Wong K, Serafi SW, Bhatia AS, Ibarra I, Allen EA. Melanoma with gastric metastases. *J Community Hosp Intern Med Perspectives*. 2016;6:31972.
8. Wornom 3rd I, Smith J, Soong S, McElvein R, Urist M, Balch CM. Surgery as palliative treatment for distant metastases of melanoma. *Ann Surg*. 1986;204:181.
9. Schuchter LM, Green R, Fraker D. Primary and metastatic diseases in malignant melanoma of the gastrointestinal tract. *Curr Opin Oncol*. 2000;12:181-5.
10. Hao XS, Li Q, Chen H. Small bowel metastases of malignant melanoma: palliative effect of surgical resection. *Jap J Clin Oncol*. 1999;29:442-4.

Üst havayolu obstruksiyonu sonrası negatif basınçlı pulmoner ödem gelişen bir çocuk olgu

CHILD CASE WITH NEGATIVE PRESSURE PULMONARY EDEMA AFTER UPPER AIRWAY OBSTRUCTION

İkbal TÜRKER, Rıza Dinçer YILDIZDAŞ, Özden Özgür HOROZ, Faruk EKİNCİ

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Yoğun Bakım Bilim Dalı, Adana

ÖZ

Özgeçmişinde bilinen bir hastalığı olmayan 5,5 aylık kız hasta uyku sonrası annesi tarafından kontrol edilirken yatağında yüzüstü baygın şekilde burnundan kan gelirken bulunmuş idi. Öykü, fizik muayene, laboratuvar sonuçları, akciğer grafisi ve klinik bulgularının negatif basınçlı pulmoner ödemle uyumlu düşünüldü. Hastaya rezervuarlı geri solumasız oksijen 15 L/dk ve ampirik sulperazon başlandı. Takibinde 24-48 saat içinde klinik bulguları düzeldi ve oksijen tedavisi kesildi. Tedavinin 3. Gününde takip ve tedavinin devamı için genel çocuk servisine devredildi. Çocuklarda negatif basınçlı pulmoner ödem nadir görülen fakat acil ve hayatı tehdit edebilen bir durumdur. Erken tanı ve tedavinin hayat kurtarıcı olup, hava yolunun korunup, oksijenasyonun sağlanması temel hedeftir.

Anahtar Sözcükler: akciğer ödemi, hava yolu tıkanıklığı, çocuk

ABSTRACT

A 5.5-month-old girl, who had no known disease, was checked by her mother after sleep, and was found in her bed while she was unconscious and bleeding from her nose. History, physical examination, laboratory results, chest x-ray and clinical findings were thought to be compatible with postobstructive pulmonary edema. The patient was started with reservoir, non-breathing oxygen 15 L/min and empiric sulperazone. Her clinical findings improved within 24-48 hours and oxygen therapy was discontinued. On the 3rd day of treatment, she was transferred to the general child service for follow-up and continuation of the treatment. Postobstructive pulmonary edema in children is a rare but urgent and life-threatening condition. Early diagnosis and treatment is life-saving, maintaining the airway and ensuring oxygenation is the main goal.

Keywords: pulmonary edema, airway obstruction, child

İkbal TÜRKER

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD,
Çocuk Yoğun Bakım Bilim Dalı, ADANA
E-posta: iturker33@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-6370-676X>

Negatif basınçlı pulmoner ödem, üst hava yolu obstrüksiyonunun bilinen ancak nadir görülen ve hayatı tehdit edebilen önemli komplikasyonlarından biridir.

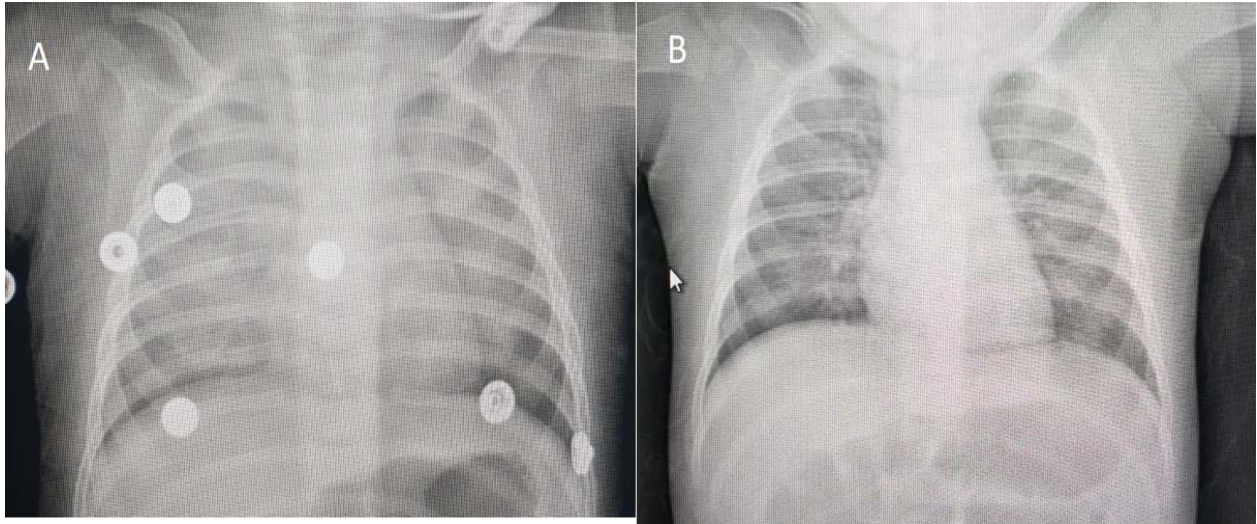
Etyolojik olarak iki farklı tipi tanımlanmıştır. Tip 1 sıklıkla üst hava yolu tıkanıklığı olan hastalarda, Tip 2 ise astım ya da uyku apne sendromu gibi kronik hava yolu tıkanıklığı

olan hastaların postoperatif ekstübasyonu sonrasında görülür (1). Literatürde sıklığı üst hava yolu tıkanıklığı olan vakalarda %7-12, entübasyon uygulanan alt hava yolu tıkanıklığı olan vakalarda %0,05-0,1 olarak bildirilmiştir (2, 3). Üst hava yolu tıkanıklığına bağlı gelişen pulmoner ödem için iki farklı mekanizma öne sürülmüştür. Birinci görüş, hasta tıkalı hava yolu ve kapalı glottise karşı nefes alma çabası gösterdiğinden göğüste intratorasik negatif bir basınç meydana gelir. Yüksek basınçtan (pulmoner venöz sistem) düşük basınçlı bölgeye (pulmoner interstisyel alan ve hava boşlukları) doğru hareket eden sıvı ile hidrostatik bir transpulmoner gradyan oluşması sonucu anlamlı sıvı geçişine dayandırılır. İkinci görüşte ise pulmoner ödemin alveolar epitel ve pulmoner mikrovasküler membranların şiddetli mekanik stres nedeniyle bozulması, kapiller geçirgenliğin artmasına bağlı olduğu düşünülür. Biz burada üst havayolu obstrüksiyonu oluşması sonrası negatif basınçlı pulmoner ödem kliniği gelişen, daha öncesinde sağlıklı olup, bilinen herhangi bir kronik hastalığı bulunmayan pediatrik bir olguyu sunduk.

OLGU SUNUMU

Özgeçmişinde bilinen bir hastalığı olmayan 5,5 aylık kız hasta uyku sonrası annesi tarafından kontrol edilirken yatağında yüzüstü baygın şekilde burnundan kan gelirken bulunmuş. Dış merkez başvurusunda asfiksi ve travma

düşünülen hastanın toraks tomografisinde pulmoner ödem saptanması üzerine çocuk yoğun bakım ünitemize sevk edildi. Geldiğinde genel durumu orta, vital bulgularında nabız: 140/dk, solunum sayısı: 40/dk, oksijen saturasyonu: %92, ateş: 37,2°C, kan basıncı: 80/50 mmHg idi. Fizik muayenesinde dinlemekle akciğer seslerinde bilateral yaygın ralleri mevcut idi. Diğer sistem muayeneleri doğal idi. Laboratuvar incelemelerinde arteriyel kan gazı pH: 7,26 PCO₂: 24,7 mmHg PO₂:89,8 mmHg HCO₃:13,1 BE: -14,9 laktat: 1,6 mmol/L beyaz küre: 5,9x10³/µL, Hb: 9,6 g/dL, plt: 354x10³/µL idi. Biyokimya testlerinde BUN: 6,1 mg/dL kreatinin: 0,2 mg/dL ALT: 50 U/L AST: 27 U/L, diğer laboratuvar bulguları normal idi. Akciğer grafisinde bilateral yaygın infiltrasyonu mevcut idi. (Şekil 1-a) Toraks tomografisinde ağırlıklı olarak sağda olmak üzere bilateral akciğer üst lob düzeyinde ve sağ akciğer orta lob düzeyinde buzlu cam dansitesi mevcuttu. Ekokardiyografi bulguları normal idi. Hastaya rezervuarlı geri solumasız oksijen 15 L/dk ve ampirik sulperazon tedavisi başlandı. Takibinde 24 – 48 saat içinde klinik bulguları düzeldi ve oksijen tedavisi kesildi. Tedavinin 3. gününde oda havasında oksijen saturasyonu %99 olan ve fizik muayenede akciğer seslerinde normale dönen hasta, takip ve tedavisinin devamı için genel çocuk servisine devredildi. Yatışının 3. günü çekilen akciğer grafisi normal idi. (Şekil 1-b)



Şekil 1 a. Başvuru anındaki akciğer grafisi pulmoner ödem için tipik olan merkezi ve bilateral simetrik bir patern ile bilateral pulmoner infiltrasyon **b.** Takibin 3. gününde normal görülen akciğer grafisi

TARTIŞMA

Solunum yolu obstrüksiyonu sonrasında gelişen akciğer ödemi kliniği ilk defa köpekler üzerinde yapılan bir çalışmada 1972 yılında gösterilmiştir. Olgu olarak ilk defa 1977 yılında yayınlamıştır (4).

Negatif basınçlı pulmoner ödemin etyopatogenezi tartışmalı olsa da tıkalı solunum yoluna karşı yapılan zorlu inspiriyum çabasının intraplevral negatif basıncı artırması primer olarak sorumlu tutulmaktadır. Negatif intraplevral basınçtaki bu artış sonucu, pulmoner interstisyel basınç azalır, sistemik venöz dönüş artar, sağ ve sol ventrikül fonksiyonları bozulur ve pulmoner ödem gelişir. Pulmoner kapiller basınçta meydana gelen hızlı yükseliş alveolokapiller bütünlüğü bozar, böylece pulmoner ödem gelişimini kolaylaştırır (5). Solunum yolu tıkanıklığında ortaya çıkan hipoksi ve hiperadrenerjik yanıt pulmoner prekapiller ve postkapiller rezistansı artırır pulmoner damarlarda vazokonstriksiyona neden olur, pulmoner vasküler basınçları yükseltir ve damar bütünlüğünü daha da bozulmasına yol açarak akciğer ödemi gelişimine katkıda bulunur. (6, 7, 8).

Negatif basınçlı pulmoner ödem her biri benzer klinik bulgulara sahip, ancak farklı etiyojolojiye sahip 2 tipte sınıflandırılmıştır. Tip 1'e, epiglottit veya krup gibi enfeksiyonlar, yabancı cisim etkisi, post-ekstübasyon sonrası gelişen subglottik ödem, post-ekstübasyon sonrası gelişen laringospazmın yanı sıra, ası boğulma, anatomik anomalilerin neden olduğu bildirilmiştir (9). Tip 2' ye ise kronik hava yolu obstrüksiyonu olan astımlı ya da obstrüktif uyku apne sendromlu hastaların entübasyondan sonraki postoperatif dönemde rastlanır (1).

Hastanın solunum yolu tıkanıklığı bulguları ve bunlarla birlikte hipoksemi, entübasyon sonrası oluşan pulmoner ödem ve akciğer grafisi tanıyı koymada yardımcıdır (10, 11). Akciğer grafisinde peribronşiyal gölgelenmelerde artış, Kerley çizgileri, diffüz alveoler infiltrasyonlar ve artmış opasiteler bulunabilir. Bizim hastamızda da benzer bulgular mevcut idi. Öyküsünde epistaksis olması, etiyojijide hipofarenkste biriken kanlı sekresyona bağlı olarak tetiklenen laringospazmın rol oynadığını düşündük. Louis ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada postobstrüktif pulmoner ödemin en sık

karşılaşılan nedeninin laringospazm olduğunu göstermişlerdi (12). Laringospazma neden olabilecek koyu ve miktarı fazla sekresyonlar (13), hematoma (12), zor entübasyona bağlı gelişen ödem (14), yabancı cisim aspirasyonunu (15), hıçkırık (16), krup (17) laringospazm gibi nedenlerin postobstrüktif pulmoner ödeme neden olabileceği gösterilmiştir. Negatif basınçlı pulmoner ödemin tedavisi genel olarak oksijen tedavisidir. Ağır olgularda yüksek akışlı nazal oksijen tedavisi, noninvazif ve invazif mekanik ventilasyon uygulanabilir. Olgumuz standart oksijen tedavisine çok iyi yanıt verdi.

Sonuç olarak, çocuklarda negatif basınçlı pulmoner ödem ender görülen fakat acil ve yaşamı tehdit edebilen bir durumdur. Erken tanı konulması ve yeterli oksijenizasyonun sağlanması çok önemlidir. O nedenle üst hava yolu obstrüksiyonları sonrası ani solunum sıkıntısı gelişen çocuk hastalarda negatif basınçlı pulmoner ödem akla gelmelidir.

KAYNAKLAR

1. Austin AL, Kon A, Matteucci MJ. Respiratory Failure in a Child Due to Type 2 Postobstructive Pulmonary Edema. *Pediatr Emerg Care*. 2016;32:23-4.
2. Galvis AG. Pulmonary edema complicating relief of upper airway obstruction. *Am J Emerg Med*. 1987;5:294-7.
3. McConkey PP. Postobstructive pulmonary edema--a case series and review. *Anaesth Intensive Care*. 2000;28:72-6.
4. Oswald CE, Gates GA, Holstrom FMG. Pulmonary edema as a complication of acute airway obstruction. *JAMA*. 1977;238:1833-5.
5. Buda AJ, Pinsky MR, Ingels NB Jr, Daughters 2nd GT, Stinson EB, Alderman EL. Effect of intrathoracic pressure on left ventricular performance, *N Engl J Med*. 1979;301:453e459
6. Lang SA, Duncan PG, Shephard DA, Ha HC. Pulmonary edema associated with airway obstruction, *Can J Anesth*. 1990;37:210e218.

7. Kollef MH, Pluss J. Noncardiogenic pulmonary edema following upper airway obstruction. *Medicine* 1991;70:91e98.
8. Tami TA, Chu F, Wildes TO, Kaplan M. Pulmonary edema and acute upper airway obstruction. *Laryngoscope*. 1986;96:506-9.
9. Fremont RD, Kallet RH, Matthay MA, Ware LB. Postobstructive pulmonary edema: a case for hydrostatic mechanisms. *Chest*. 2007;131:1742-46
10. Chen IC, Chen KH, Tseng CM, Hsu JH, Wu JR, Dai ZK. Croup-induced postobstructive pulmonary edema. *Kaohsiung J Med Sci*. 2010;26:567-70.
11. Gluecker T, Capasso P, Schnyder P, Gudinchet F, Schaller MD, Revelly JP et al. Clinical and radiologic features of pulmonary edema. *RadioGraphics*. 1999;19:1507-3.1
12. Louis PJ, Fernandes R. Negative pressure pulmonary edema. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002;93:4-6.
13. Fremont RD, Kallet RH, Matthay MA, Ware RB. Postobstructive pulmonary edema: a case for hydrostatic mechanisms. *Chest*. 2007;131:1742-6.
14. Timby J, Reed C, Zeilender S, Glauser FL. "Mechanical" causes of pulmonary edema. *Chest*. 1990;98:973-9.
15. Zulueta JJ, Gerblich AA. Upper airway obstruction due to inhalation of a tracheal T-tube resulting in pulmonary edema. *Chest*. 1992;102:644-5.
16. Stuth EA, Stucke AG, Berens RJ. Negative-pressure pulmonary edema in a child with hiccups during induction. *Anesthesiology* 2000;93:282-4.
17. Travis KW, Todres ID, Shannon DC. Pulmonary edema associated with croup and epiglottitis. *Pediatrics* 1977;59:695-8.

Düzelme

Erratum

Kolorektal kanser ve immünoterapi

COLORECTAL CANCER AND IMMUNOTHERAPY

 **Suna ÇOKMERT**¹,  **Zekiye ALTUN**²,  **İlhan ÖZTOP**³,  **Safiye AKTAŞ**²,  **Nur OLGUN**⁴

¹Medical Park Hastanesi, Tıbbi Onkoloji Bölümü, İstanbul

²Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, İzmir

³Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı, İzmir.

⁴Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Çocuk Onkolojisi Bilim Dalı, İzmir

Düzelme: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi otuzuncu cildinin üçüncü sayısında yer alan “Çokmert S, Altun Z, Öztıp İ, Aktaş S, Olgun N. Kolorektal kanser ve immünoterapi. DEÜ Tıp Derg 2016; 30(3): 131-137” referanslı makalede yazarlar tarafından “Teşekkür” bölümünde araştırmayı destekleyen kuruluşun belirtilmesi unutulmuştur. Yazarların bu durumu fark etmesi ve dergimize yaptıkları yazılı düzeltme talebi üzerine TEŞEKKÜR bölümü aşağıda sunulmaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi BAP koordinasyon Birimi tarafından (2016.KB.SAG.031 nolu proje) desteklenmiştir.

YAZARLARA BİLGİ

1. Derginin Kapsamı ve Temel İşleyiş
2. Yayın Hakkı ve Yazarlık
3. Etik Kurallar
4. Yazının Hazırlanması
 - a. Dil
 - b. Temel İlkeler
 - c. Makale türleri ve genel biçimleri
 - d. Makale bölümleri
5. Yazının Gönderilmesi
6. Kabul Sonrası

KAPSAM ve TEMEL İŞLEYİŞ

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi (DEU Tıp Derg), Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesinin yayın organı olup yılda üç kez yayınlanır. Dergi, tıbbın her alanından temel ve klinik araştırmaları, toplum temelli araştırmaları, güncel konularda derlemeleri, ender rastlanan tıbbi olguları, eğitim amaçlı kısa tıbbi bulmacaları, editör görüşlerini, alanında uzman hekimlerin deneyim ve yorumlarını içeren editöre mektupları yayımlar. Yayınlanması istenen makaleler elektronik ortamda <https://tip.deu.edu.tr/tr/tip-fakultesi-dergisi/> adresi üzerinden gönderilmelidir.

Dergide yayımlanmak üzere gönderilen yazıların daha önce elektronik ya da basılı olarak, başka bir yerde yayımlanmamış olması ya da gönderim zamanında başka bir derginin incelemesi altında olmaması gerekir. Yazı, bir tezden kaynaklanmakta ya da tezin bir bölümü ise veya daha önce bilimsel toplantılarda sunulmuş ise toplantının adı, düzenlendiği tarih ve şehir belirtilerek başlık sayfasında bilgi verilmelidir.

Dergide yayımlanan makalelerde sunulan veriler, görüşler ve ifadelerin bilimsel, etik ve hukuki sorumluluğu yazar(lar)a ait olup Editör, Yayın Kurulu üyeleri, Yayıncı ve Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi'nin bu konularda herhangi bir sorumluluğu yoktur.

Dergiye gönderilen tüm yazılar, Yayın Kurulu tarafından, dergi kapsamına ve yazım kurallarına uygunluğu açısından değerlendirir. Editörler, yazıyı danışman değerlendirmesine göndermeden önce red etme veya düzeltilmek üzere yazar(lar)a geri gönderme kararı verebilir.

DEU Tıp Derg, çift kör bir dergi olup, yazılar ilgili konuda uzman en az iki danışmana gönderilir. DEU Tıp Derg, makalenin dergiye gönderilmesinden itibaren 6-8 hafta içinde değerlendirme sonucu hakkında yazar(lar)a bilgi vermeyi hedefler. Editör, danışmanların önerilerini göz önüne alarak makalenin revizyonunu isteyebilir. Revizyon 8 hafta içinde tamamlanmalıdır. Yazının revize versiyonu zamanında dergiye gönderilmez ise, yazı yeni bir başvuru olarak değerlendirilecektir.

Makale ile ilgili nihai karar (kabul/red), editör tarafından yazara bildirilir.

Son karar aşamasına yakın dönemde, makul bir açıklama olmaksızın yapılan geri çekme istekleri reddedilir.

Tüm yazarlar, editörün temel anlamı değiştirmeden yapacağı düzeltmeleri kabul ederler.

DEU Tıp Derg, gönderilen yazıların değerlendirilmesi ve/veya basılması ile ilgili yazar(lar)dan herhangi bir ücret talep etmez.

YAYIN HAKKI ve YAZARLIK

DEU Tıp Derg'e gönderilmiş olan yazının tüm yerel ve uluslararası yayın hakları yazarların hepsinin imzaladığı "Yayın Hakkı Devir Formu" ile DEU Tıp Derg'e devredilir. (Ek 1).

Yazarların her birinin makaleye katkısı, form üzerinde açıkça belirtilmelidir.

Makale dergiye gönderildikten sonra, yazar ismi ekleme veya çıkarma ya da yazar sırasını değiştirme mümkün olmayacaktır. Derginin bu konudaki uygulamaları *International Committee of Medical Journal Editors-ICMJE* (<http://www.icmje.org>) ve *Council of Science Editors-CSE* (<https://www.councilscienceeditors.org>) kurallarına uygundur.

ETİK KURALLAR

DEU Tıp Derg, etik ve bilimsel standartlara uygun makaleleri yayımlar.

Yayın Kurulu, gönderilen tüm yazıları intihal ve yeniden yayınlama açısından inceler. Eğer etik bir sorun saptanır ise *Committee on Publication Ethics-COPE* (<https://publicationethics.org/guidance/guidelines>) rehberlerine uyulur.

Klinik araştırmalar için "WMA Helsinki Deklarasyonu-İnsanlar ile yapılan Tıbbi Araştırmalarda Etik İlkeler" (<https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/>), deney hayvanları ile yapılan çalışmalar için "Hayvanlar ile yapılan Biyotıp Araştırmalarında Uluslararası Rehber İlkeler" (<http://iclas.org/wp-content/uploads/2013/03/CIOMS-ICLAS-Principles-Final.pdf>) ve "Laboratuvar Hayvanlarının Kullanımı ve Bakımı için Kılavuz" (<https://grants.nih.gov/grants/olaw/guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>) ile uyumlu olarak ilgili Etik Kurul onayı alınmalıdır. Etik Kurul Onay Formunun bir kopyası başvuru sırasında sisteme yüklenmelidir.

Olgu sunumlarının hazırlanmasında; hastanın mahremiyetinin korunmasına özen gösterilmelidir. Hastaların kimliğini tanımlayıcı bilgiler ve fotoğraflar, hastane kayıt numarası ve tarihler kullanılmamalıdır. Olgu sunumları için, "Bilgilendirilmiş Onam" alınmalıdır.

DeneySEL hayvan çalışmalarında, ağrı ve huzursuzluğu en aza indirmek için yapılan işlemler yazının içinde açıklanmalıdır.

Yazar(lar), makalenin kaynaklandığı araştırma ile ilgili olarak resmi ya da özel kurumlardan aldıkları finansal destek, bağış veya her türlü ticari bağlantı hakkında editöre bilgi vermeli ve teşekkür bölümünde belirtmelidirler.

YAZININ HAZIRLANMASI

Yazı Dili

DEU Tıp Derg yazı dili, Türkçe ve İngilizce'dir. Gerek Türkçe, gerekse İngilizce yazılar diğer dilde başlık, öz ve anahtar sözcükleri içermelidir.

Temel İlkeler

DEU Tıp Derg, *International Committee of Medical Journal Editors-ICMJE* tarafından hazırlanmış olan, "Biyomedikal Dergilere Gönderilen Makalelerin Uyması Gereken Standartlar: Biyomedikal Yayınların Yazımı ve Baskıya Hazırlanması" (*Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication*) standartlarını (<http://www.icmje.org/recommendations>) kullanmayı kabul etmektedir.

Yazarların; randomize çalışmalar için CONSORT, gözlemsel çalışmalar için STROBE, tanısal/prognostik çalışmalar için STARD, sistematik derleme ve meta-analizler için PRISMA, deney hayvanları ile yapılan prelinik çalışmalar için ARRIVE, non-randomize davranışsal ve toplum sağlığı girişimsel çalışmaları için TREND ve olgu sunumları için CARE kılavuzlarına uymaları önerilir. Bu raporlama kılavuzlarına EQUATOR ağından (www.equator-network.org/home/) ve *National Library of Medicine-NLM* "Research Reporting Guidelines and Initiatives" başlıklı web sitesinden (www.nlm.nih.gov/services/research_report_guide.html) ulaşılabilir.

Yazı Türleri

Araştırma makalesi

Bir araştırma makalesinin temel özelliği gerçek orijinal araştırma içermesidir. Randomize çalışmalar, gözlemsel çalışmalar, tanısal/prognostik doğruluk çalışmaları, sistematik derlemeler ve meta-analizler, pre-klinik deneysel hayvan çalışmaları, randomize olmayan davranışsal ve toplum tabanlı çalışmalar araştırma makalesi olarak kabul edilirler.

Derleme makalesi

Derleme makalesi, bilgi birikimi ve deneyimi olan ve yetkin çalışmaları ile bilime katkıda bulunmuş uzmanlar tarafından hazırlanan, tıbbın özel bir alanındaki güncel bilgilerin kapsamlı olarak ele alındığı bir yazı türüdür. Editör, seçilen konuda özgün çalışmaları olan bilim adamlarından derleme yazısı talebinde bulunabilir.

Olgular sunumları

Olgular sunumları, az rastlanan ve tanı ve/veya tedavisi zor olan hastalar ile ilgili, tıp literatürüne yeni bilgi sağlayan makalelerdir.

Editöre mektuplar

Bu tür yazılar; daha önceden dergide yayınlanmış bir makalenin önemine, eksik kısımlarına veya gözden kaçan bir özelliğine vurgu yapmak üzere hazırlanır. Bu yazıda bahsedilen makalenin başlığı, yazar isimleri, yayın yılı, cildi, sayısı ve sayfa numaraları açıkça belirtilmelidir.

Dergiye başvuran makalelerin genel formatı

	Bölümler	Kelime Sayısı- Ana Metin *	Kelime Sayısı- Öz	Anahtar Sözcük Sayısı
Araştırma Makalesi	Başlık, Öz, Anahtar Sözcükler, Giriş, Gereç ve Yöntem, Bulgular, Tartışma, Kaynaklar	3500	250, yapılandırılmış: Amaç, Gereç ve Yöntem, Bulgular, Sonuç	3-6
Derleme Makalesi	Başlık, Öz, Anahtar Sözcükler, Ana Metin(alt başlıklar içerebilir), Kaynaklar	5000	250, yapılandırılmamış	3-6
Olgu Sunumu	Başlık, Öz, Anahtar Sözcükler, Giriş, Olgu, Tartışma, Kaynaklar	1500	150, yapılandırılmamış	3-6
Editöre Mektup	yapılandırılmamış	1000	-	-

*Ana metin: Başlık, Öz, Anahtar Sözcükler, Kaynaklar, Tablolar, Şekiller HARIÇ

*Yazının Bölümleri**Başlık (Title)*

Açık ve kapsayıcı olmalı ve makalenin en önemli yönlerini tanımlamalı. Başlık 150 harfi aşmamalı, yanısıra başlık sayfasında 50 harfi aşmayacak şekilde kısa başlık belirtilmelidir.

Öz (Abstract)

Araştırmanın içeriğini doğru olarak yansıtmalı; amaç, uygulanan başlıca yöntemler, başlıca bulgular ve temel sonuçlar belirtilmelidir. Kaynak kullanılmamalıdır.

Anahtar sözcükler (Key words)

Anahtar sözcükler; bilimsel yazının ana başlıklarını yakalamalı, makaleye erişimi ve indekslenmeyi sağlayacak nitelikte olmalıdır.

İngilizce anahtar sözcükler, *Index Medicus Medical Subject Headings (MeSH)* (<https://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>); Türkçe anahtar sözcükler, *Türkiye Bilim Terimlerine* (<https://www.bilimterimleri.com/>) uygun olarak seçilmelidir.

Giriş

Giriş bölümünde çalışmanın yapılmasını gerekli kılan ön bilgiler ve çalışmanın amacı ya da hipotezi kısa ve net olarak açıklanmalıdır.

Gereç ve Yöntem

Bu bölüm; çalışma grubuna ve kaynak topluma ilişkin özellikleri, yöntemlerin tanımlanmasını içeren teknik bilgiyi, cihazlar ve işlemler hakkında bulguların yeniden üretilebilmesini sağlayacak şekilde ayrıntılı açıklamaları, istatistiksel yöntemler hakkında çalışmaya uygunluğunu ortaya koyacak ve raporlanan bulguların okuyucu tarafından doğrulanabilirliğini sağlayacak şekilde ayrıntılı açıklamaları içermelidir.

İstatistiksel analiz için kullanılan yazılım (lar) ve versiyonları belirtilmelidir.

“Gereç ve Yöntem”, aynı zamanda çalışmanın etik onayına ve bilgilendirilmiş onama dair bilgileri içermelidir. Etik Kurul Onayı, tarih ve numara ile belirtilmelidir. İnsanlar ile yapılan araştırmalarda ve olgu sunumlarında, hastalardan ve gönüllülerden “Bilgilendirilmiş Onam” alındığını belirten bir ifade yazıda yer almalıdır.

Bulgular

Bulgular; metinde, tablolarda ve grafiklerde mantıklı bir sıra ile sunulmalıdır. Tablo ve grafiklerde yer alan tüm bulgular metinde tekrarlanmamalı, sadece önemli bulgular vurgulanmalı ve özetlenmelidir. Benzer şekilde, grafikler ve tablolar da birbirinin tekrarı olmamalı; grafikler çok sayıda veri barındıran tablolara alternatif olarak kullanılmalıdır.

Tablolar ve Tablo Başlıkları

Tablolar, ana metin içinde değil, her biri ayrı sayfalarda olmak üzere ayrı bir dosya halinde sisteme yüklenmelidir. Tablolar, metni tamamlayıcı ve açıklayıcı olmalı, metin içerisinde sunulan verilerin tekrarını içermemelidir. Tablolar açık ve anlaşılır biçimde düzenlenmelidir. Her bir tablo kısa ve açıklayıcı bir başlığa sahip olmalı, bu başlıklar tablonun üstünde yer almalıdır. Tablolar, metin içindeki geçiş sırasına uygun olarak Arabik (1,2,3,...) rakamlar ile numaralandırılmalı ve metinde parantez içinde yazılmalıdır.

Tabloların içinde kullanılan kısaltmalar, ana metin içinde tanımlanmış olsalar bile, tablonun hemen altında tanımlanmalıdır. Başka kaynaklardan veri alınmış ise, kaynak dipnot olarak belirtilmelidir. Dipnotlar için simgeler şu şekilde sıralanmalıdır: *, **, ***, †, ‡, §, ¶.

Şekiller ve Şekil Alt Yazıları

Şekil, resim, grafik ve fotoğrafların tümü "Şekil" olarak adlandırılmalı ve ayrı birer dosya olarak (TIFF veya JPEG formatında) sisteme eklenmelidir. Şekiller, en az 300 DPI çözünürlükte, net ve en az 100x100 mm boyutunda olmalıdır. Şekillerin üzerinde oklar, ok başlıkları, yıldız ve benzeri simgeler, şeklin alt yazısında yer alan açıklamaları desteklemek üzere, kullanılabilir. Şekillerin üzerinde, bir bireyi ya da kurumu belirten herhangi bir bilgi yer almamalıdır.

Şekiller, metin içinde geçiş sırasında uygun olarak Arabik rakamlar ile numaralandırılmalı ve metinde parantez içinde yazılmalıdır.

Şekillerin açıklamaları, ana metnin sonunda listelenmelidir. Şekillerin alt bölümleri var ise, şekil açıklamaları aşağıdaki formata uygun olarak yapılandırılmalıdır:

Örnek: Şekil 1. a-b. Lamina propria ve submukozada kalretininin immunohistokimyası. (DAP, x200). Ganglionik zon +++ (a), Hipoganglionik zon ++ (b).

Başka yerde yayınlanmış olan şekiller kullanıldığında, bu konuda izin alınmış olması yazarın sorumluluğundadır.

Tartışma

Tartışma; ana bulguların literatür eşliğinde yorumlanmasını içerir. Çalışmanın yenilik içeren ve önemli özellikleri yanısıra kısıtlılıkları da belirtilmelidir. Bu bölümde ayrıca; konu ile ilgili daha ileri çalışmalar/ klinik uygulamalar/izlenecek yöntemlere dair öneriler geliştirilmelidir. Tartışmanın son paragraf(lar)ı makalenin sonucunu özetlemelidir.

Teşekkür

Eğer varsa, destekleyen kişi ya da kurumlara ilişkin bilgi ve teşekkür bu bölümde yer almalıdır. Örneğin sadece teknik destek veren ya da makalenin yazılmasına yardımcı olan ancak yazarlık kriterlerini karşılamayan kişiler bu bölümde anılmalıdır. Finansal destek ve malzeme desteği de bu bölümde yer almalıdır.

Kaynaklar

Yazarlar, makale konusu ile doğrudan ilgili en güncel kaynakları kullanmalıdır.

Kaynaklar metindeki geçiş sırasına göre Arabik rakamlarla numaralandırılmalı ve dizilmelidir. Kaynak numarası, metnin içinde yazar adı belirtildi ise yazar adından hemen sonra, diğer durumlarda cümle sonunda parantez içinde belirtilmelidir.

Kaynak gösteriminde, Vancouver stili kullanılmalıdır.

Dergilerin kısa isimleri MEDLINE (www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals) stiline uygun olmalıdır. Altı ya da daha az sayıdaki yazara kadar tüm yazarlar yazılmalı, yedi ya da daha fazla yazar varsa ilk altı yazar yazılıp, Türkçe makalelerde "ve ark.", İngilizce makalelerde "et al." ibaresi kullanılmalıdır.

Kaynakların yazım stili ve noktalamalar ile ilgili olarak ayrıntılı bilgi ve örneklere https://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html web adresinden ulaşılabilir. En sık kullanılan kaynak türlerine dair örnekler aşağıda yer almaktadır

Dergi Makaleleri

- **Standart dergi makalesi (altı ya da daha az sayıda yazar):**

Kutcher S, Wei Y, Coniglio C. Mental health literacy: past, present, and future. Can J Psychiatry. 2016;61:154-8.

- **Standart dergi makalesi (yedi ya da daha fazla sayıda yazar):**

Zhou S, Ma Y, Shi Y, Tang L, Zheng Z, Fang F, et al. Mean platelet volume predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma. Hematol Oncol. 2018;36:104-9.

- **Ek sayı(supplement) da yer alan makaleler:**

Yoon RS, Patel JN, Liporace FA. Nail and Plate Combination Fixation for Periprosthetic and Interprosthetic Fractures. J Orthop Trauma 2019;33 (Suppl 6):S18-S20.

- **Editorial:**

Dirchwolf M, Marciano S, Martínez J, Ruf AE. Unresolved issues in the prophylaxis of bacterial infections in patients with cirrhosis. [Editorial] World J Hepatol. 2018;10:892-7.

- **Basım öncesi elektronik olarak yayımlanan makaleler:**

Stanojcic N, Hull C, O'Brart DP. Clinical and material degradations of intraocular lenses: A review. Eur J Ophthalmol. 2019 Aug 6: 1120672119867818. [Epub ahead of print]

Kitaplar ve Diğer Monograflar

- **Kitap:** Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, editors. Genetics in Medicine. 6th ed. Pennsylvania: WB. Saunders; 2001.
- **Kitap bölümü:** Kelly A, Stanley CA. Hyperinsulinism. In: Sarafoglu K, Hoffman GF, Roth KS, editors. Pediatric Endocrinology and Inborn Errors of Metabolism. 1st ed. New York: Mc Graw-Hill Companies; 2009:465-78.
- **Türkçe kitap bölümü:** Uysal S. Biyolojik Değişkenlik ve Referans Aralık. Tıbbi Laboratuvar Yönetimi (1) içinde Ed: Önvural B, Çoker C, Akan P, Küme T. Meta Basım, İzmir 2019; 301-307.

Elektronik Materyal

- **Sadece internet'de yer alan dergilerde yayımlanan makaleler:**

Rolfjord LB, Skjerven HO, Bakkeheim E, Berents TL, Carlsen KH, Carlsen KCL. Quality of life, salivary cortisol and atopic diseases in young children. PLoS One 2019 Aug 30;14(8):e0214040. doi:

10.1371/journal.pone.0214040. Erişim adresi:

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0214040>

- **Bir web sitesinin bir bölümü:** European Clinical Research Infrastructure Network [Internet]. Trial Management. [Erişim tarihi: 02 Eylül 2019]. Erişim adresi: <https://www.ecrin.org/activities/trial-management>.

YAZININ GÖNDERİLMESİ

Lütfen makaleleri tamamıyla “online” olarak <https://www.journalagent.com/deutip/> adresine gönderin. Bu adrese, derginin web sayfasından da (<https://tip.deu.edu.tr/tr/tip-fakultesi-dergisi/>) ulaşabilirsiniz.

İletişim kurulacak yazarın, tam iletişim adresi, telefon (iş, GSM) ve e-posta adresi dahil yer almalıdır.

Makaleyi göndermeden önce; lütfen aşağıdaki kurallara uyulduğundan emin olunuz:

- Kısaltmalar ilk kez kullanıldığı yerde açıklanır ve parantez içinde gösterilir. Başlık ve Özde kısaltma kullanımından kaçınılmalıdır.
- Metinde, tablolarda ve şekillerde ondalık kesirler Türkçe’de virgöl; İngilizce’de nokta ile ayrılmalıdır.
- Ölçüm sonuçları ve istatistiksel veriler, cümle başına denk gelmedikçe rakamlar ile yazılmalıdır. Birimi olmayan ve dokuza eşit ya da küçük sayılar yazı ile yazılmalıdır.
- Ölçüm sonuçları metrik birimler ile ifade edilmelidir. Laboratuvar sonuçlarının kullanılmakta olan yerel birimler yanısıra *International System of Units (SI)* ile ifade edilmesi uygundur.
- İlaçların ticari isimleri yerine jenerik isimleri kullanılmalıdır.
- Hastalıkların isimleri, Dünya Sağlık Örgütü’nün <https://www.who.int> adresindeki web sitesinde belirtilen başlıklara uygun olmalıdır.

Gönderimi tamamlamadan önce; aşağıdaki tüm dosyaların yüklendiğinden ve tüm bilgilerin girildiğinden emin olunuz:

- Başlık sayfası aşağıdakileri içermelidir:
 - Yazının başlığı ve kısa başlığı
 - Yazarların her birinin adı,soyadı, kurumu, bölümü ve akademik ünvanı
 - İletişim kurulacak yazarın e-posta adresi ve tüm iletişim bilgileri
 - Ana metnin ve özün kelime sayısı, tablo sayısı ve şekil sayısı, kaynak sayısı
 - Çalışma önceden tez ve/veya bildiri şeklinde sunuldu ise bilgilendirme

- Destek veren kurum ve/veya kişiler var ise bilgilendirme
- Çıkar çatışması beyanı
- Öz
- Ana metin
- Tablolar
- Şekiller
- Etik Kurul Onayı
- Yayın Hakkı Devir Formu
- Teşekkür (eğer gerekli ise)
- Tüm yazarların ORCID bilgileri

Revizyon gerektiği durumlarda yazar, yazının revize versiyonu yanısıra danışmanların belirttiği konuların her birinin nasıl ele alındığını ve/veya düzeltildiğini ayrıntılı olarak açıklayan bir “Danışmanlara Yanıt” belgesini sisteme yüklemelidir. Revize yazı üzerinde yapılan düzeltme ve değişiklikler işaretlenmiş olmalıdır.

KABUL SONRASI

Son kontrol (proof): Yayınlanmak üzere kabul edilen yazılar, dil bilgisi kuralları, noktalama ve format açısından gözden geçirilir; daha sonra PDF formatında iletişim yazarına son kontrol için gönderilir. Bu aşamada önemli değişiklikler yapılmaz. Yazarın bu son kontrolü, 2 gün içinde tamamlaması beklenir.

DOI numarası: Son kontrolün ardından, yazılara DOI numaraları alınır.

Basılan yazılar: Yazarlar, makalelerine PDF formatında, elektronik dosya olarak herhangi bir ücrete ödemededen ulaşabilirler.

İletişim:

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
DEU Tıp Derg Yayın Koordinatörlüğü
35340 – İZMİR

E posta: tipdergisi@deu.edu.tr

Tel: 0090 232 412 2263

Web adresi: <https://tip.deu.edu.tr/tr/tip-fakultesi-dergisi/>

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

1. Scope and Main Policies of the Journal
2. Copyright and Authorship
3. Ethical Guidelines
4. Preparation of the Manuscript
 - a. Language
 - b. Basic Principals
 - c. Types of Articles and General Format
 - d. Manuscript sections
5. Submission of the Manuscript
6. Post Acceptance

SCOPE and MAIN POLICIES

Journal of Dokuz Eylul University Medical Faculty (J DEU Med) is published by Dokuz Eylul University Medical Faculty three times a year. The journal publishes basic and clinical research articles from all fields of medicine, review articles on up-to-date topics, case reports, editorials and letters to the editor. Article submissions need to be made electronically (<https://tip.deu.edu.tr/tr/tip-fakultesi-dergisi/>).

It is essential for a submitted article to be non-previously published or under consideration in any other printed or electronic media. If a submitted manuscript has previously been presented at any meeting, the name, date and city in which the meeting was held should be stated in the title page. Besides, it should be mentioned whether a submitted manuscript is a preliminary study or part of a thesis.

The scientific, ethical and legal responsibility for data, opinions and statements of published articles belong to the author(s). The Editors, Editorial Board, Publisher and Dokuz Eylul University Medical Faculty disclaim any responsibility on these issues.

All manuscripts will pass through a pre-evaluation process by the Editorial Board as to whether a submitted manuscript is prepared in accordance with the journal's scope and manuscript preparation rules. The editors may decide to reject or request revision of the format before assigning the manuscript to reviewers.

J DEU Med is a double blind journal and the manuscripts are assigned to at least two reviewers selected among specialists in the related field. J DEU Med aspires to notify authors about the review decision within 6-8 weeks following submission. Considering the suggestions of the reviewers, the editor may request revision of the article. The revision should be completed within 8 weeks. If the revised version of the manuscript is not submitted within the allocated time, the manuscript will be evaluated as a new submission.

The authors will be informed about the final decision (rejection / acceptance) for the article by the editor.

Any requests for withdrawal of manuscripts close to the final decision, without reasonable explanation, will be rejected.

All authors of a manuscript accepted for publication should consent that editors could make corrections without changing the basic meaning of the text of the manuscript written.

No charge is requested from the author(s) regarding the evaluation and/or publication process of the manuscripts submitted to J DEU Med.

COPYRIGHT and AUTHORSHIP

The author(s) should transfer all their local and international copyrights of their submitted article to "J DEU Med" by the "Copyright Transfer Form" (FORM 1) signed by all authors.

The contribution of each author to the article should be clearly defined on the form.

Following the submission of the article, no change is possible concerning the names or order of the authors. Practices of the journal on this subject are in accordance with the rules of the *International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE)* (<http://www.icjme.org>) and *Council of Science Editors (CSE)* (<https://www.councilscienceeditors.org>).

ETHICAL GUIDELINES

J DEU Med, accepts articles in accordance with the ethical and scientific standards.

The Editorial Office inspects all submitted manuscripts concerning plagiarism and duplication. If an ethical problem is detected, the editorial office will act according to the *Committee on Publication Ethics (COPE)* (<https://publicationethics.org/guidance/guidelines>) guidelines.

For clinical research studies, the approval of Ethics Committee in accordance with "WMA Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects" (<https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/>); for studies involving animals the approval of Ethics Committee in accordance with "International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals" (<http://iclas.org/wp-content/uploads/2013/03/CIOMS-ICLAS-Principles-Final.pdf>) and/or "Guide for the care and use of laboratory animals" (<https://grants.nih.gov/grants/olaw/guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>) is required. A copy of the Ethics Committee Approval Form should be submitted online.

Case reports should be prepared with care for the patient privacy. Any kind of definitive information or photographs, hospital registry number or dates which will define the identity of the patient should not be used. Informed consent must also be obtained for case reports.

For experimental studies on animals, measures taken to reduce pain and discomfort should be clearly stated.

The authors should acknowledge and provide information to the Editor on grants or other financial interests or affiliations with institutions, organizations, or companies relevant to the manuscript.

PREPARATION OF THE MANUSCRIPT

Language

J DEU Med accepts the articles written in Turkish and in English. The Turkish as well as the English manuscripts should include title, abstract and keywords in both languages.

Basic Principles

J DEU Med uses the standards called “*Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication*” (<http://www.icmje.org/recommendations>) stated by ICMJE.

The authors are recommended to follow CONSORT guidelines for randomized trials, STROBE guidelines for observational studies, STARD for diagnostic/prognostic studies, PRISMA for systematic reviews and meta-analysis, ARRIVE for animal pre-clinical studies, TREND for non-randomized behavioral and public health intervention studies and CARE for case reports. The reporting guidelines are available at the EQUATOR Network (www.equator-network.org/home/) and the NLM’s “*Research Reporting Guidelines and Initiatives*” (www.nlm.nih.gov/services/research_report_guide.html) .

Types of articles accepted for submission

Research article

The main feature of a research article is that it contains substantial novel research. Manuscripts on randomized trials, observational studies, diagnostic/prognostic accuracy studies, systematic reviews and meta-analysis, animal pre-clinical studies, non-randomized behavioral and public health intervention studies are considered as research articles.

Review article

Review article is a comprehensive discussion of the recent knowledge on specific topics in medicine, prepared by experts with extensive knowledge and experience in the field who have contributed to the scientific literature. The editor may invite scientists with original research for review articles.

Case report

Case reports are articles about patients which are unique and difficult to diagnose and/or treat and provide new information for the medical literature.

Letter to the Editor

This type of manuscript discusses the importance, missing parts or an overlooked structure of a previously published article. Authors can also submit their comments to the editor on a subject which may be in the reader's field of interest especially on educational cases, in the Letter to the Editor form. Volume, year, issue, page numbers, title and author names of the article mentioned in a Letter to the Editor should be stated clearly.

General format and length of types of articles accepted for submission

	Sections	Word Count of the Main Text*	Word Count in Abstract	Number of Keywords
Research Article	Title, Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusion, References	3500	250, structured into: Objective, Materials and Methods, Results, Conclusion	3-6
Review article	Title, Abstract, Keywords, Main Text, References	5000, may include subheadings	250, unstructured	3-6
Case Report	Title, Abstract, Keywords, Introduction, the Patient, Discussion and References	1500	150, unstructured	3-6
Letter to the Editor	unstructured	1000	-	-

* the main text: excluding Title, Abstract, Keywords, References and Tables-Figures-Images

Manuscript Sections

Title (Başlık)

The title should be clear and comprehensive and should describe the most important aspects of the complete article. The title should not exceed 150 characters and the short title should not exceed 50 characters.

Abstract (Öz)

The abstract should accurately reflect the content of the article and include the aim of the study, basic procedures, main findings and fundamental conclusions. No references are used in the abstract.

Keywords (Anahtar sözcükler)

The key words are chosen to enable retrieval and indexing. Acronyms should be avoided. The keywords should be concordant with the *Index Medicus Medical Subject Headings (MeSH)* terms

(<https://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>). For Turkish “Anahtar Sözcükler” please follow *Türkiye Bilim Terimleri* (<https://www.bilimterimleri.com/>).

Introduction

The “Introduction” section explains briefly and clearly the background and the objective of, or the hypothesis tested by the study.

Materials and Methods

This section includes the description of the participants and the source population; technical information including the identification of methods, equipment and procedures in sufficient detail to allow others to reproduce the results; description of statistical methods with enough detail to establish the appropriateness for the study and to enable the verification of the reported results.

The statistical software package (s) and versions used for statistical analysis should be specified.

The information about the Ethics Committee Approval, including the date and number should be stated in the “Materials and Methods” section. For articles concerning research on humans, a statement should be included that shows Informed Consent of patients and volunteers was obtained .

Results

The results should be presented in logical sequence with the main or most important findings first.

Authors should take care not to repeat all the data in the tables or figures in the text. The text should include only the main findings. Similarly the data should not be duplicated in tables and graphs and graphs should be utilized as alternatives to tables with many entries.

Tables

Tables should be presented within the main document following the reference list with each table on a separate page. The tables should be explanatory for the text and should not duplicate the data given in the text. The tables should be numbered with Arabic numerals consecutively in the order they are referred to within the main text. A descriptive title should be provided for all tables and the titles should be placed above the tables. Abbreviations used in the tables should be defined below the tables even if they are defined within the main text. The symbols for footnotes may be aligned as: *, **, ***, †, ‡, §, ¶. Tables should be arranged clearly to provide an easy reading. If data has been obtained from other sources, it is the authors responsibility to obtain permission and the source should be indicated as a footnote.

Figures

The figures, graphics and photographs are all named as “Figure” and should be submitted as separate files (in TIFF or JPEG format). The minimum resolution of each submitted figure should be 300DPI, and the figures should be clear in resolution and large in size (minimum dimensions 100x100 mm). Thick and thin arrows, arrowheads, stars, asterisks and similar marks can be used on the images to support figure legends. Any information within the images that may indicate an

individual or institution should be blinded. The figures should be numbered with Arabic numerals consecutively in the order they are referred to within the main text. Figure legends should be listed at the end of the main document. When there are figure subunits, the figure legends should be structured in the following format:

Example: Figure 1. a-b. Immunohistochemistry of kalretinin in lamina propria and submucosa. (DAP, ×200). Ganglionic zone +++ (a), Hypoganglionic zone ++ (b).

It is the responsibility of the authors to acquire copyright permissions if any tables, figures and other images previously printed are used in their manuscript.

Discussion

The discussion contains the explanations of the main findings in the light of literature. The new and important aspects as well as the limitations of the study should be stated. The implications for future research/clinical practice/policy also need to be explored. The last paragraph(s) of the discussion should summarize the conclusions of the study.

Acknowledgements

This section includes information regarding the supporting institution(s) or person(s) if applicable. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help or writing assistance. Financial and material support should also be acknowledged.

References

The authors should use up-to-date references directly related to the subject of their article and take care to use Turkish references when sufficiently relevant.

References should be numbered with arabic numerals in the order of citation in the main text. References should be indicated in paranthesis at the end of the sentence or just after the author's name if mentioned in the text.

The references should follow the Vancouver style .

Abbreviations of journal titles should be done in accordance with journal abbreviations used in MEDLINE (www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals). For publications with 6 or fewer authors, a list of all authors is required, for publications with 7 or more authors, the first 6 authors should be listed, followed by "et al".

Detailed information about reference styles and punctuations with samples are available at https://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html. Please find below the examples for the most frequently used references:

Articles in Journals

- *Standard journal article (with six or less authors):*

Kutcher S, Wei Y, Coniglio C. Mental health literacy: past, present, and future. *Can J Psychiatry*. 2016;61:154-8.

- **Standard journal article (with seven or more authors):**

Zhou S, Ma Y, Shi Y, Tang L, Zheng Z, Fang F, et al. Mean platelet volume predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Hematol Oncol*. 2018;36:104-9.

- **Article in a supplement:**

Yoon RS, Patel JN, Liporace FA. Nail and Plate Combination Fixation for Periprosthetic and Interprosthetic Fractures. *J Orthop Trauma* 2019;33 (Suppl 6):S18-S20.

- **Editorial:**

Dirchwolf M, Marciano S, Martínez J, Ruf AE. Unresolved issues in the prophylaxis of bacterial infections in patients with cirrhosis. [Editorial] *World J Hepatol*. 2018;10:892-7.

- **Article published electronically ahead of the print version:**

Stanojic N, Hull C, O'Brart DP. Clinical and material degradations of intraocular lenses: A review. *Eur J Ophthalmol*. 2019 Aug 6: 1120672119867818. [Epub ahead of print]

Books and Other Monographs

- **Book with editor(s) as author:** Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, editors. *Genetics in Medicine*. 6th ed. Pennsylvania: WB. Saunders; 2001.

- **Chapter in a book:** Kelly A, Stanley CA. Hyperinsulinism. In: Sarafoglu K, Hoffman GF, Roth KS, editors. *Pediatric Endocrinology and Inborn Errors of Metabolism*. 1st ed. New York: Mc Graw-Hill Companies; 2009:465-78.

Electronic Material

- **Article only the internet:**

Rolfjord LB, Skjerven HO, Bakkeheim E, Berents TL, Carlsen KH, Carlsen KCL. Quality of life, salivary cortisol and atopic diseases in young children. *PLoS One* 2019 Aug 30;14(8):e0214040. doi: 10.1371/journal.pone.0214040. Erişim adresi:

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0214040>

- **Part of a homepage/Web site:** European Clinical Research Infrastructure Network [Internet]. Trial Management. [Erişim tarihi: 02 Eylül 2019]. Erişim adresi: <https://www.ecri.org/activities/trial-management>.

SUBMISSION of the MANUSCRIPT

Please submit manuscripts exclusively online at: <https://www.journalagent.com/deutip/> which is also available at the web site of the journal (<https://tip.deu.edu.tr/tr/tip-fakultesi-dergisi/>).

Before submitting the manuscript please ensure the following :

- The abbreviations must be defined the first time they are used and should be displayed in parentheses after the definition. Authors should avoid abbreviations in the title, abstract and at the beginning of the sentences.
- Decimal fractions in the text, tables and figures should be separated by decimals points in sections in English and commas in sections in Turkish.
- Measurements should be reported in metric units. It is appropriate to state the laboratory results in the International System of Units (SI) as well as the local units being used.
- Measurements and statistical data should be stated as numbers unless at the beginning of the sentence. Numbers with no unit and ≤ 9 should be stated in written form.
- Generical names of the drugs should be preferred instead of the commercial names.
- The names of the diseases should be in accordance with the Health Topics of World Health Organization stated at <https://www.who.int>.

Before ending the submission, please be sure that all files below are uploaded:

- Title page
 - o The title and short title
 - o The name, affiliation and academic degree of each author
 - o The e mail address and full contact information of the correspondence author
 - o The word count for the main text and the abstract
 - o Number of figures, tables and number of references
 - o The information about whether submitted manuscript has previously been presented at a meeting (name, date, city) and whether it is a preliminary study or part of a thesis
 - o Sources of support
 - o Conflict of Interest declaration
- Abstract
- Main text
- Figures
- Ethical approval and informed consent
- Transfer of Copyright Agreement Form
- Acknowledgements (if necessary)
- ORCID IDs of all authors

If a revision is required, along with the revised version of the manuscript, the author should submit a "Response to Reviewers" which states in detail how each issue raised by the reviewers has been covered. The revised manuscript should be marked and/or annotated regarding the revisions.

POST ACCEPTANCE

Proofs: Manuscripts accepted for publication are edited for grammar, punctuation and format; then a PDF proof is sent to the corresponding author to check for editing and type setting accuracy. Major changes to the articles as accepted for publication will not be considered at this stage. The author is expected to complete the proof check within 2 days.

DOI number: Following the proof check, the manuscripts are provided with a DOI number and published on the journal's webpage.

Offprints: The electronic files of typeset articles in Adobe Acrobat PDF format are provided free of charge.

Correspondance:

Dokuz Eylül University Medical Faculty

J DEU Med Editorial Office

35340 – İZMİR/TÜRKİYE

E mail: tipdergisi@deu.edu.tr

phone: 0090 232 412 2263

Web site: <https://tip.deu.edu.tr/tr/tip-fakultesi-dergisi/>