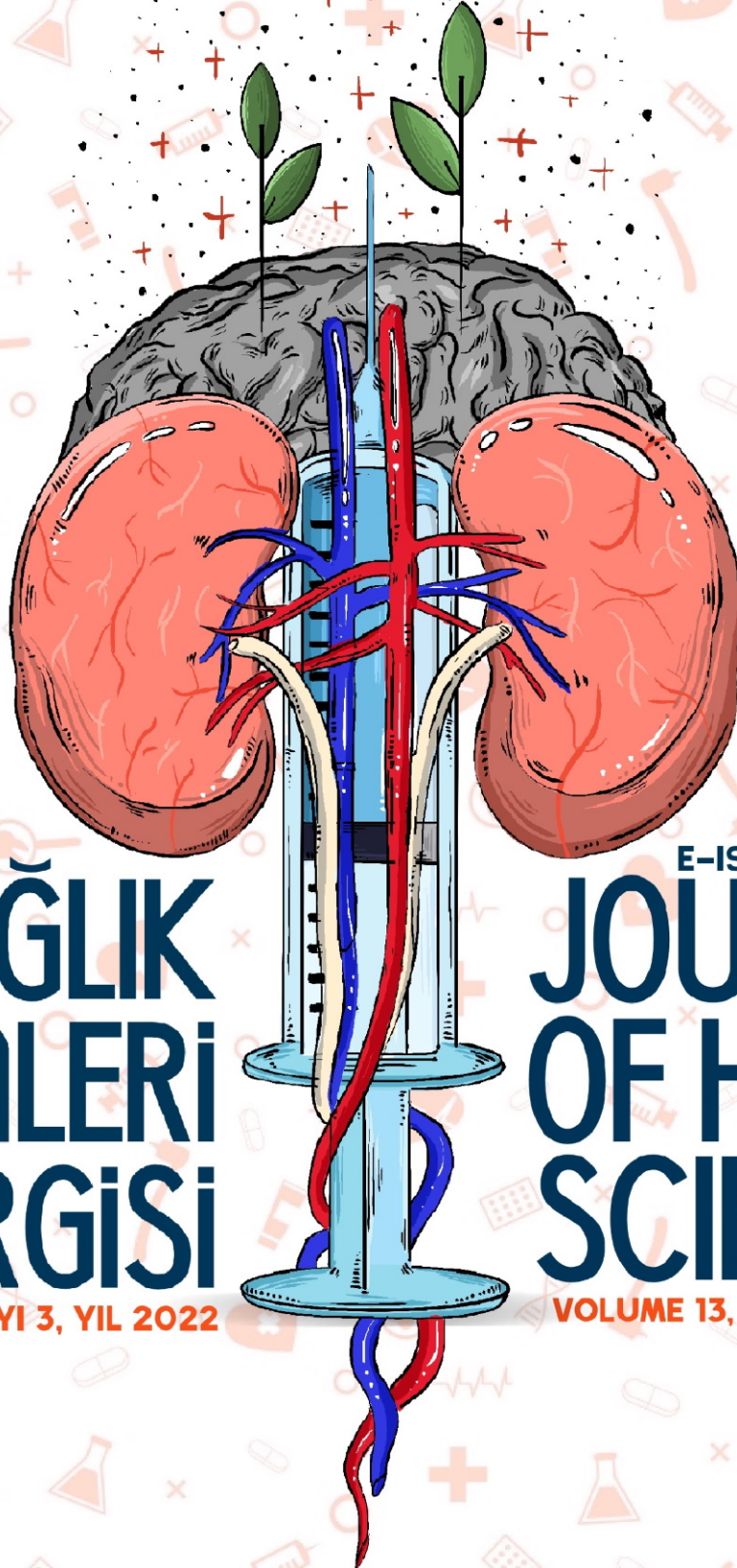




• SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ •



E-ISSN: 2146-247X

SAĞLIK
BİLİMLERİ
DERGİSİ

CİLT 13, SAYI 3, YIL 2022

JOURNAL
OF HEALTH
SCIENCES

VOLUME 13, ISSUE 3, YEAR 2022



SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ DERGİSİ

Cilt 13, Sayı 3, Yıl 2022

SULEYMAN DEMIREL UNIVERSITY

JOURNAL OF HEALTH SCIENCES

Volume 13, Issue 3, Year 2022

e-ISSN: 2146-247X

DOI: 10.22312/sdusbed



İletişim / Contact SDÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü / ISPARTA

Telefon: 0246 211 87 71/72 Faks: 0246 237 03 63

E-posta: saglikbilimleridergisi@sdu.edu.tr

Web: <http://sdu.dergipark.gov.tr/sdusbed>

Kapak Tasarım/Mizanpaj:
Burcu DURDU

Baskı/Mizanpaj:
Esmâ SELÇUK



SAHİBİ

Prof. Dr. İlker Hüseyin ÇARIKÇI
Süleyman Demirel Üniversitesi Adına
(Rektör)

BAŞ EDITÖR

Prof. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY
Süleyman Demirel Üniversitesi
(Enstitü Müdürü)

EDİTÖR KURULU

Dr. Öğr. Üyesi Zehra ÜSTÜN
Süleyman Demirel Üniversitesi
(Enstitü Müdür Yardımcısı)
Dr. Öğr. Üyesi Giray KOLCU
Süleyman Demirel Üniversitesi
(Enstitü Müdür Yardımcısı)
Prof. Dr. Mine ÖZTÜRK TONGUÇ
Süleyman Demirel Üniversitesi
Prof. Dr. Özlem FENTOĞLU
Süleyman Demirel Üniversitesi
Doç. Dr. Araz ASKEROĞLU
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Doç. Dr. Mümtaz Cem ŞİRİN
Süleyman Demirel Üniversitesi
Dr. Öğr. Üyesi Fuat İNCE
Süleyman Demirel Üniversitesi
Dr. Öğr. Üyesi Emel DEMİRBAĞ
Süleyman Demirel Üniversitesi
Dr. Öğr. Üyesi Olcay SALİCİ
Süleyman Demirel Üniversitesi
Dr. Öğr. Üyesi İbrahim Kubilay TÜRKAY
Süleyman Demirel Üniversitesi
Dr. Öğr. Üyesi Başak GÖKÇE
Süleyman Demirel Üniversitesi
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet DURAY
Süleyman Demirel Üniversitesi
Dr. Öğr. Üyesi Şerife TUTAR GÜVEN
Süleyman Demirel Üniversitesi

TEKNİK EDİTÖRLER

Arş. Gör. Tahir KESKİN
Süleyman Demirel Üniversitesi
Arş. Gör. Rumeysa ATEŞ
Süleyman Demirel Üniversitesi
Esmâ SELÇUK
Süleyman Demirel Üniversitesi
Burcu DURDU
Süleyman Demirel Üniversitesi

DANIŞMA KURULU

Prof. Dr. Serpil SAVAŞ
Süleyman Demirel Üniversitesi
Prof. Dr. Ayşe Diljin KEÇECİ
Süleyman Demirel Üniversitesi
Prof. Dr. Vedat Ali YÜREKLİ
Süleyman Demirel Üniversitesi
Prof. Dr. Fatma Yeşim KIRZIOĞLU
Süleyman Demirel Üniversitesi
Prof. Dr. R. Banu ERMIŞ
Süleyman Demirel Üniversitesi
Prof. Dr. Kurtuluş ÖNGEL
Katip Çelebi Üniversitesi
Prof. Dr. Mustafa Özgür PİRGON
Süleyman Demirel Üniversitesi
Prof. Dr. Zuhâl KIRZIOĞLU
Süleyman Demirel Üniversitesi
Prof. Dr. S. Hakan TUNA
Süleyman Demirel Üniversitesi
Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK
Süleyman Demirel Üniversitesi
Prof. Dr. Zuhâl YETKİN AY
Süleyman Demirel Üniversitesi
Doç. Dr. Seyfullah KAN
Süleyman Demirel Üniversitesi
Doç. Dr. Müge ÇINA
Süleyman Demirel Üniversitesi
Doç. Dr. Mehmet GÜMÜŞTAŞ
Ankara Üniversitesi
Doç. Dr. Mustafa SAYGIN
Süleyman Demirel Üniversitesi
Doç. Dr. Derya YILDIRIM
Süleyman Demirel Üniversitesi
Doç. Dr. Faruk KILIÇ
Süleyman Demirel Üniversitesi
Doç. Dr. Hakan KORKMAZ
Süleyman Demirel Üniversitesi
Dr. Öğr. Üyesi Adnan KARABRAHİMOĞLU
Süleyman Demirel Üniversitesi
Dr. Öğr. Üyesi Nihat ŞENGEZE
Süleyman Demirel Üniversitesi
Dr. Öğr. Üyesi M. Hilmi BÜYÜKÇAVUŞ
Süleyman Demirel Üniversitesi
Dr. Öğr. Üyesi Neslihan Ebru ŞENİŞİK
Süleyman Demirel Üniversitesi
Dr. Öğr. Üyesi Osman GÜRDAL
Süleyman Demirel Üniversitesi
Öğr. Gör. Dr. Ozan KARACA
Ege Üniversitesi



Araştırma Makaleleri / Research Articles

P. Aeruginosa Bakterisinin Vitamin B Kompleksi ve Kırmızı Lazer Kullanılarak İnaktive Edilmesi <i>Inactivation Of P. Aeruginosa Bacteria Using Vitamin B Complex and Red Laser</i> Asiye GÖK YURTTAŞ, Kamil ÇINAR	353-363
Tıp Fakültesi Öğrencilerinde Koku ve Uyku Kalitesi İlişkisinin Araştırılması <i>Investigation of the Relationship between Smell and Sleep Quality in Medical Faculty Students</i> Arzu YALÇIN, Ülker TUNCA, Mustafa SAYGIN, Önder ÖZTÜRK, Sadettin ÇALIŞKAN, Yücel KURT	364-373
Üçüncü Basamak Bir Hastanede Sağlık Çalışanlarının COVID-19 Enfeksiyonu ve Aşılması Hakkındaki Yaklaşım ve Davranışları <i>Approach and Behaviors of Healthcare Professionals in a Tertiary Hospital About COVID-19 Infection and Vaccination</i> Zeliha SALMAN, Hakan SALMAN, Mustafa AKÇAM	374-381
Hemşirelerin Mesleki İmaj Algılarının Belirlenmesi: Tanımlayıcı-Kesitsel Bir Araştırma <i>Determining Nurses' Professional Image Perceptions: A Descriptive Cross-Sectional Study</i> Merve TARHAN, Pınar DOĞAN, Esengül ELİBOL	382-392
Bilgisayarlı Tomografi Görüntülerinde Rastlantısal Olarak Belirlenen Baş ve Boyun Bölgesi Yumuşak Doku Kalsifikasyonlarının ve Ossifikasyonlarının Değerlendirilmesi <i>The Evaluation of Incidentally Detected Head and Neck Region Soft Tissue Calcifications and Ossifications on Computed Tomography Images</i> Ezgi TÜRK, Veysel Atilla AYYILDIZ, Özlem GÖRMEZ	393-401
COVID-19 Hastalarında Dalak Boyutu ve Hematolojik Parametrelerinin Klinik Önemi <i>Clinical Significance of Spleen Size and Hematological Parameters in COVID-19 Patients</i> Pınar YÜRÜK ATASOY, Engin BEYDOĞAN	402-409
Brucella Enfeksiyonuna Bağlı Osteoartritli Hastalarda Biyobelirteç Olarak Serum Metalloproteinaz-2 ve Doku İnhibitörü Metalloproteinaz-1 Seviyeleri <i>Serum Metalloproteinase-2 and Tissue Inhibitor Metalloproteinase-1 Levels As a Biomarker in Patients With Osteoarthritis Due To Brucella Infection</i> Mustafa GÜZEL, Orhan AKPINAR, Veysel Atilla AYYILDIZ, Mümtaz Cem ŞİRİN	410-418
Lateral Epikondilitli Hastalarda Fizyoterapi Yaklaşımlarının Kısa Dönem Etkinliğinin Karşılaştırılması <i>A Comparison of the Short-Term Efficacy of Physiotherapy Approaches in Patients with Lateral Epicondylitis</i> Şahin ÇAKIR, Ayşenur TUNCER, Muhammed Furkan ARPACI, Mine ARĞALI DENİZ	41-431
Göz Yüzeyinden Elde Edilen Bakterilerin Oluşturduğu Biyofilme Karşı Probiyotik Bakterilerin Hücresiz Filtratlarının Antibiyofilm Etkilerinin Araştırılması <i>Investigation Of The Antibiofilm Effects Of Cell-free Supernatants Of Probiotic Bacteria Against The Biofilm Formed By Bacteria Obtained From The Ocular Surface</i> Sertaç Argun KIVANÇ, Berna AKOVA, Merih KIVANÇ	432-44
Tüketime Sunulan Çiğ Sütlerde Escherichia coli O157:H7 Araştırılması <i>Investigation of Escherichia coli O157:H7 in Raw Milk Offered for Consumption</i> Cansu ÖNLEN GÜNERİ, Suna KIZILYILDIRIM	441-447
Rotenon'un İnsan Lenfositlerinde İn Vitro Genotoksitesisi <i>In Vitro Genotoxicity of Rotenone in Human Lymphocytes</i> Dilek AŞCI ÇELİK, Vehbi Atahan TOĞAY	448-455
Burdur Ağız ve Diş Sağlığı Merkezi'nde Periodontal Bulguları Olan Hastalarda Entamoeba gingivalis ve Trichomonas tenax'ın Araştırılması <i>Investigation of Entamoeba gingivalis and Trichomonas tenax in Patients with Periodontal Findings in Burdur Oral and Dental Health Center</i> Burcu ÖZDEMİR ÖĞRÜ, M. Zeki YILDIRIM, Onur KÖSE	456-463

Aile Hekimlerinin Evlilik Öncesi Yapılan Sağlık Taramaları Hakkındaki Tutum ve Davranışlarının İncelenmesi <i>Investigation of Family Physicians' Attitudes and Behaviors Regarding PreMarriage Health Screenings in Isparta</i> Şerife ÜNVER, Gökçe İŞCA, Funda YILDIRIM BAŞ	464-474
Timol Yüklü Diş İn Situ Jellerin Tasarımı; In Vitro Değerlendirilmesi <i>Design of Thymol Loaded Dental In Situ Gels; In Vitro Evaluation</i> Heybet Kerem POLAT, Sefa GÖZCÜ, Hüseyin AKŞİT	475-484
Genomik Veri Setlerinin LASSO ve Elastik Net Regresyon Yöntemleri ile Analizi <i>Analysis of Genomic Data Sets by LASSO and Elastic Net Regression Methods</i> Hikmet ORHAN, Merve VERGİLİ	485-496
Sağlıklı Gençlerde Kısa Dönem Tüm Vücut Vibrasyon Egzersizinin Esneklik, Endurans ve Dinamik Denge Üzerine Etkisinin İncelenmesi: Randomize Kontrollü Çalışma <i>Examination of the Effect of Short-term Whole Body Vibration Training on Flexibility, Endurance and Dynamic Balance In Healthy Young People: A Randomized Controlled Study</i> Elif GUR KABUL, Bilge BAŞAKCI ÇALIK, Ummuhan BAŞ ASLAN, Fatma TAŞKIN	497-509
Evde Yaşayan Yaşlı Bireylerde Yalnızlık ve Yaşam Doyumu İlişkisi <i>The Relationship between Loneliness and Life Satisfaction in Elderly People Living at Home</i> Fatma ARPACI, Ülkü POLAT, Giray KOLCU	510-521
Tragopogon oligolepis'in Fitokimyasal İçeriği, Antioksidan ve Antiquorum Sensing Özelliğinin Belirlenmesi <i>Determination of Phytochemical Profile, Antiquorum Sensing and Antioxidant Activities of Tragopogon oligolepis</i> Ahu REİS, Tuğba MAZLUM ŞEN, Ebru ÖNEM, Özlem SARAL, Mutlu GÜLTEPE	522-530
Kronik Servikal Miyofasyal Ağrı Sendromlu Hastalarda Lokal Anestezik Enjeksiyonu ve Egzersiz Tedavisi Sonuçlarının Karşılaştırılması <i>Comparison of Local Anesthetic Injection and Exercise Therapy Results in Patients with Chronic Cervical Myofascial Pain Syndrome</i> Handan ÇAĞLAR ÇAVDAR, Nihal BÜKER, Gülbüz SAMUT	531-539



Derlemeler / Reviews

Çocukluk Döneminde Vejetaryen Beslenme Güvenli mi? <i>Is a Vegetarian Diet Safe to Follow During Childhood?</i> Aslı YİĞİT, Gülhan SAMUR	540-550
Hemşirelik Öğrencileri için Geliştirilen COVID-19 Oyunlaştırılmış E-Öğrenme Modülünün Geliştirilme Basamakları <i>Development Steps of a COVID-19 Gamification E-Learning Module for Nursing Students</i> Afra ÇALIK, Rıdvan Bilal SAĞLA, Murat Gökhan KABAL, Betül ÇAKMAK, Bahar İNKAYA, Sevgisun KAPUCU	551-558
Birinci Mesajcılar ve Reseptörlerine Genel Bakış <i>Overview of Primary Messengers and Their Receptors</i> Esmâ SELÇUK, Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU	559-566

P. Aeruginosa Bakterisinin Vitamin B Kompleksi ve Kırmızı Lazer Kullanılarak İnaktive Edilmesi

Inactivation Of P. Aeruginosa Bacteria Using Vitamin B Complex and Red Laser

Asiye GÖK YURTTAŞ^{1,2*} , Kamil ÇINAR³ 

¹ İstanbul Sağlık ve Teknoloji Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

² İstanbul Teknik Üniversitesi, Elektrik ve Elektronik Mühendisliği Fakültesi, Biyosensör ve Biyorobotik Laboratuvarı, İstanbul, Türkiye

³ Gebze Teknik Üniversitesi, Temel Bilimler Fakültesi, Katıhal Fiziği Anabilim Dalı, Kocaeli, Türkiye



ÖZET

Son yıllarda anti-bakteriyel direnç olgusu, bakterilerin neden olduğu hastalıklarla mücadelede daha fazla sorun haline gelmiştir. Biz bu çalışmayla, açık yara ve yanıkların fırsatçı patojeni olan Pseudomonas aeruginosayı daha etkili bir yöntemle inaktive etmeyi ve fotodinamik inaktivasyon(PDI) gelişimine katkıda bulunmayı hedefledik. Pseudomonas aeruginosa bakterisini, vitamin B kompleksi ve lazer ile inaktive olduğunu spektrofotometrik ölçümler ve antimikrobiyal madde etkinliği analiz yöntemleriyle gösterdik. Ayrıca PDI'nin bakteri üremesi üzerindeki etkisi hem kalitatif hem de kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Escherichia coli ve Pseudomonas aeruginosa suşları karşılaştırılarak ölüm oranları belirlendi. Koloni oluşturma birimi oranlarında Escherichia coli bakteri suşlarının karanlık ve ışık deneyinde vitamin B kompleksinin 0,25 mg/mL ve 0,125 mg/mL konsantrasyonlarında % 20'lik bir ölüm oranı görülmüştür. Pseudomonas aeruginosa bakteri suşlarının karanlık deneyinde vitamin B kompleksinin 0,5 mg/mL ve 0,125 mg/mL konsantrasyonlarında çok az bir ölüm oranı görülürken lazer maruziyet sonrası ölüm oranları sırasıyla % 60 ve % 50 çıktığı görülmüştür. Bu ölüm oranlarını doğrulama amaçlı akış sitometresi canlılık deneyleri yapılmış ve çıkan sonuçlar birbiriyle paralellik göstermiştir. Bu çalışmadan elde edilen veriler ışığında; kırmızı lazer diyotun, vitamin B kompleksi ile birlikte Pseudomonas aeruginosa bakterisinin inaktivasyonu için uygun bir aday olduğunu öngörmekteyiz. Yaptığımız bu çalışma, bakteriyel enfeksiyonların tedavisi için hastane, tıp ve mikrobiyoloji alanlarında yapılacak alternatif tedavi yöntemlerine ışık tutacaktır.

Anahtar Kelimeler: Fotodinamik inaktivasyon, antibiyotik direnç, hastane enfeksiyonları, yara patojen bakterileri, lazer

Alınış / Received: 29.06.2022 Kabul / Accepted: 07.11.2022 Online Yayınlanma / Published Online: 20.12.2022



ABSTRACT

In recent years, the phenomenon of anti-bacterial resistance has become more of a problem in combating diseases caused by bacteria. With this study, we aimed to inactivate *Pseudomonas aeruginosa*, an opportunistic pathogen of open wounds and burns, with a more effective method and to contribute to the development of photodynamic inactivation (PDI). We have shown that *Pseudomonas aeruginosa* bacteria are inactivated by vitamin B complex and laser with verifications of both spectrophotometric measurements and antimicrobial agent activity analysis. Moreover, the effect of PDI on bacterial growth was evaluated both qualitatively and quantitatively. Mortality rates were determined by comparing *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* strains. In the dark and light experiment of *Escherichia coli* bacterial strains at colony forming unit rates, a mortality rate of 20% was observed at 0.25 mg/mL and 0.125 mg/mL concentrations of vitamin B complex. In the dark experiment of *Pseudomonas aeruginosa* bacterial strains, a very low mortality rate was observed at 0.5 mg/mL and 0.125 mg/mL concentrations of vitamin B complex, while mortality rates after laser exposure were 60% and 50%, respectively. Flow cytometer viability experiments were performed to confirm these mortality rates and the results exhibited consistency with each other. In the light of this study; We predict that the red laser diode, together with the vitamin B complex, is a suitable candidate for the inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* bacteria. This study will shed light on alternative treatment methods for the treatment of bacterial infections in the fields of hospital, medicine, and microbiology.

Keywords: Photodynamic inactivation, antibiotic resistance, nosocomial infections, wound pathogenic bacteria, laser



1. Giriş

Mikroorganizmaların fotodinamik inaktivasyon (PDI) kavramı 19. Yüzyılın başlarında denemeler sonucu ortaya çıkmış ve güçlü bir şekilde temeli atılmıştır. Fotodinamik inaktivasyon (PDI); *Paramecium spp.* ışığa duyarlı eksojen boyalar (akridin) varlığında ışıkla inaktivasyonunun keşfinden sonra asıl kesin tanımı oluşmuştur [1]. Çoğu mikroorganizma güneş ışınlarına (UVR) karşı duyarlıdır, buna virüsler, algler ve mantarlar da dâhildir [2]. *Saprofit Mycoplasma* türü bakterilerin yapısal zincirleri, görünür ışık, toluidin boyası ve singlet oksijen üçlüsü ile hızlı bir yıkıma uğradığı bildirilmiştir [3]. Koliform bakterileri metilen mavisi ve rose bengal varlığında 1 saat güneş ışığının etkisiyle su ve atık sularda tamamen inaktive olmaktadır, sonrasında eklenen bir boya olan bentonitin absorplamasıyla ortamdan alınır [4]. Teknik eksojenik fotosensitizer boyalar, havadaki oksijen ve güneş ışığı kullanımına dayanır ve bu sayede mısır sulama suyunun, işlenmiş atık suların vb. tekrar kullanılması gibi avantajlara sahiptir [5, 6].

Antibiyotikler bakteriyel enfeksiyonu kontrol etmek, tedavi etmek veya önlemek için kullanılır, ancak son yıllarda anti-bakteriyel direnç olgusu, bakterilerin neden olduğu bulaşıcı hastalıklarla mücadelede daha fazla sorun haline gelmektedir [7]. Ortaya çıkan bu halk sağlığı sorununu sınırlamak için, mevcut antibiyotik tedavisinden daha etkili olan toksik olmayan bir tedavi geliştirmek önemlidir [8, 9]. Bu etkili yöntemlerden biri, bakteriyel inaktivasyon için Fotodinamik Terapi (PDT) veya yaygın olarak kullanılan terim Fotodinamik İnaktivasyon (PDI)'dir [10,11]. Ek olarak, PDI'nin çoklu dirençli bakterileri etkisiz hale getirmek için hızlı ve etkili bir yaklaşım sergilediği bildirilmiştir. In vitro çalışmalar, inkübasyon ve ışınlama sırasında saniyeler içinde $6 - \log_{10}^6$ CFU'ya kadar bakteriyel azalma olasılığını göstermiştir [12]. PDI ile bakteri inaktivasyonu, ışığa duyarlı materyali fotosensitizer (PS) ve görünür ultraviyole ışığın yanı sıra singlet oksijen (1O_2) ile ışınlama sırasında bakteri hücrelerinde fototoksik hasara sebebiyet vererek kullanan bir tedavidir [13, 14]. Singlet oksijen, PS temel durumunun uyarılmasına

yol açan belirli bir dalga boyuna (görünür veya UV ışığı) sahip uygun ışıkla ışınlandığında üretilebilir [15].

Bu çalışmada *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*), *Escherichia coli* (*E. coli*), kültürlerinde vitamin B kompleksi ve 660 nm dalgaboyunda kırmızı lazer ile PDI'nin etkinliğinin araştırılması yapılmıştır. *P.aeruginosa* hayatı tehdit eden enfeksiyonlara kadar çeşitli hastalıklara neden olan ve hastane kaynaklı enfeksiyonların ana nedenlerinden biri olarak kabul edilir [16]. *P. aeruginosa* özellikle, idrar yolları, solunum, yanıkların ve açık yaraların fırsatçı patojenidir. Ayrıca *P. aeruginosa* su kalitesinin kötü olduğu kirli küvet ve jakuziler kullanıldığında dermatite sebep olabilmektedir [17, 18].

Bu makalenin amacı, biyolojik deneylerde alternatif ışık kaynaklarından biri olan 660 nm dalgaboyunda lazer ışığı kullanılarak ve bunun vitamin B kompleksi'nin fotodinamik inaktivasyonunu üzerindeki etkisini araştırarak PDI gelişimine katkıda bulunmaktır. Ayrıca toksik olmayan ve kolay ulaşılabilir bir fotosensitizer olarak vitamin B kompleksi seçilmiştir. Hastane kaynaklı enfeksiyonların ana sebeplerinden olan *P. aeruginosa* bakterisinin daha etkin bir yöntemle inaktive edilmesi hedeflenmektedir.

2. Materyal ve Metot

Fotosensitizer ve Işık Kaynağı

Fotosensitizer olarak vitamin B kompleksi (B1:B6:B12), (Cas no:Sigma V2876 68-19-9), ışık kaynağı için merkezi dalga boyu 660 nm olan kırmızı sürekli lazer diyot kullanılmıştır. 0,2 cm²'lik bir alanı kapsayan hüzmeye genişliğine sahip olup yaklaşık Gaussian hüzmeye profilindedir. Lazerin ışın profili Gaussian ışın profilinin kuyrukları, numuneler üzerindeki maruz kalma acıcılığına ihmal edilebilir katkı nedeniyle hesaplamamızda hariç tutulmuştur ve lazer çıkışı uygulama alanına 5 mW'lık ışık gücü aktarmaktadır. Dozlama süresi olan 30 dakikada 45 J/cm² miktarında ışık enerjisi ilgili örnek yüzeyine aktarılmaktadır.

Bakteriyel Suşlar ve Kültür Koşulları

Deneylerde *Escherichia coli* (ATCC 25922) ve *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) bakterileri kullanıldı. Bakteriler Luria-Bertani (LB) agarda, stok kültür plakalarında -4°C'de buzdolabında saklandı. Deneylerden önce mikroorganizmalar, 37°C'de 15 saat boyunca LB sıvı besiyerinde üretildi, daha sonra santrifüjleme ile toplandı ve 1x10⁸ CFU/mL stok konsantrasyonunda % 0,85 salin içinde süspanse edildi.

Spektrofotometrik % T Ölçümleri

Tüm deneyler iki grup halinde gerçekleştirilmiştir: bir grup ışığa maruz bırakılmış ve diğeri karanlıkta tutulmuştur [19]. Biri 400 µl inokulum ve 100 µl steril salin (pozitif kontrol) karıştırılarak, diğeri farklı konsantrasyonlarda 100 µl vitamin B kompleks ve steril 400 µl LB besiyeri (negatif kontrol) karıştırılarak iki farklı kontrol grubu hazırlanmıştır. Test grupları, 0,125 ila 1 mg/mL arasında değişen son konsantrasyonlar vererek, 24-kuyulu (2 cm çapında) steril polistiren plakalarda kalibre edilmiş 400 µL inokulaya farklı konsantrasyonlarda 100 µL vitamin B kompleks solüsyonu eklenerek hazırlanmıştır. Işık kaynakları numuneleri içeren kuyucukların üzerine dikey olarak yerleştirildi ve plakalar aydınlatılmıştır (her kuyu diyot lazer ışık ile muamele edildi), 25°C'de 30 dakika çalkalanmıştır. Aydınlatmadan sonra tüm numuneler tüplere aktarılmıştır, LB besiyeri ile 2 ml'lik son hacime seyreltildi ve 37°C'de inkübe edilmiştir. Büyüme oranı bir spektrofotometre ile nicelendirilmiştir ve 0., 2. ve 4. saatte 400 nm-1000 nm dalgaboyu aralığında geçirgenlik yüzdeleri (% T) ölçülmüştür [19]. *E. coli* ve *P. aeruginosa* örneklerinin 400 nm-1000 nm arası ışık tayfı geçirgenlik değerlerindeki değişimlerin yüzdesel farkı olan geçirgenlik değişimleri (δ %) hesaplanmıştır. Geçirgenlik değişim (δ %) grafikleri örneklerdeki ışık tayfındaki geçirgenliğin dalgaboyuna bağlı olarak nasıl değiştiğini nicel olarak göstermektedir.

PDI'nin Bakteri Üremesi Üzerindeki Etkisi

PDI'nin bakteri üremesi üzerindeki etkisini belirlemek için belirli konsantrasyonlarda vitamin B kompleksi ve 30 dakika diyot lazere maruz bırakılarak yapılmıştır. Işığa maruz bırakıldıktan hemen sonra hücreler toplandı ve santrifüjleme yoluyla salinle yıkandı ve salinle 10, 100, 1000 ve 10000 kez

seyreltildi ve her seyreltmeden 100 ul alınarak daha sonra LB agar içine yayma plak yöntemi ile kaplandı, 16-22 saat 37°C'de inkübe edildi ve tek koloniler sayılarak CFU'lar hesaplandı [7]. Tüm deneyler üç kez tekrarlanmıştır.

Antimikrobiyal Madde Etkinliğinin Test Edilmesi (Agar Disk Difüzyon Yöntemi)

Test mikroorganizmalarından *E. coli* ve *P. aeruginosa* bakteri suşları daha önceden hazırlanan taze sıvı kültürü (18-24 saatlik) yayma plak yöntemiyle yapıldı. 5-10 dk beklendikten sonra diskler yerleştirildi. 1-1,5 cm çapındaki kağıt diskler (filtre kağıtlarından hazırlanmış) kapalı kapta otoklavda sterilize edildi. Steril kağıt disklerden bir tanesi ise steril suya daldırıldı ve kontrol olarak agarlı besiyeri yüzeyine yerleştirildi. Bir tanesi de antibakteriyel bir ilaç kullanılarak pozitif kontrol olarak yerleştirildi. Diğer disklere de vitamin B kompleksinin 0,125 mg/mL konsantrasyonu emdirilerek yerleştirildi. Petri kutusu düz şekilde inkübatöre yerleştirildi ve test mikroorganizmasına uygun koşullarda inkübasyonu (örneğin 37 °C'de 24 saat) sağlandı. Şekil 5 da yapılan deneyde inhibisyon zonları inkübasyonun 24-48. saatlerinde ayrı ayrı incelemeye alınarak değerlendirildi ve zon oluşup oluşmadığına bakıldı [20,21].

Akış Sitometrisinde Canlılık Tayini

Vitamin B kompleksinin+lazer ışığının, *E. coli* ve *P. Aeruginosa* mikroorganizmalarının canlılığına etkileri Propidium iyodür (PI) ile boyanmaları ile belirlendi [22-24]. Mikroorganizmalar 1 mL (besiyeri+Pbs 1x) hacimlerinde 24 kuyucuklu plaklara ilave edildi. Ve vitamin B kompleksi belli derişimlerde ilave edilerek 15 dakika 37°C'de inkübe edildi sonrasında her bir kuyu 30 dk diyot lazere maruz bırakıldı. Belirlenen miktarlarda fotosensitizer (Vitamin B komplek) uygulanmasından ve ışık ile muamele edildikten sonra akış sitometrisi cihazı ile analiz edildi. Hücreler ependorflara toplandıktan sonra, iki kez soğuk PBS ile yıkandı. Daha sonra 5 dakika 1500 rpm (2 819 xg) de santrifüj edilip supernatant kısmı uzaklaştırıldı. Hücre pelletin konsantrasyonu 10⁶ hücre/mL olacak şekilde hazırlandı, içerisinde 100 µL (10⁵ hücre) alınıp üzerine 5µL PI eklendi, tüpler 15 dakika, oda sıcaklığında, karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 300 µL Pbs 1x eklenen tüpler akış sitometrisinde analizi gerçekleştirildi.

İstatistiksel Analiz

Verilerin karşılaştırılması, Graphpad Instat (GraphPad Software, San Diego, CA, ABD) kullanılarak yapıldı. GraphPad Software yazılımı ile bir ANOVA tek yönlü testi CFU sayısı kullanılarak bir Tukey testi yapıldı. Öldürme eğrilerinin eğimleri, regresyon analizi ile ölçülmüş ve öldürme eğrisi çizgisinin eğiminden D değerleri elde edilmiştir.

Tüm değerler tanımlayıcı istatistiklerde ortalama ± SD olarak rapor edildi. T testi, verilerin Gauss dağılımlarını takip eden popülasyonlardan örneklediğini varsayar. Bu varsayım, Kolmogorov ve Smirnov yöntemi kullanılarak test edilir. Eşleştirilmemiş iki değişkenin karşılaştırması, Welch düzeltmesi ile eşleştirilmemiş t testi ile yapıldı. İkidenden fazla parametrik olmayan değişkenin karşılaştırması Friedman Testi (Nonparametric Repeated Measures ANOVA) ile yapıldı ve bir post hoc testi için Dunn'in Çoklu Karşılaştırma Testi kullanıldı.

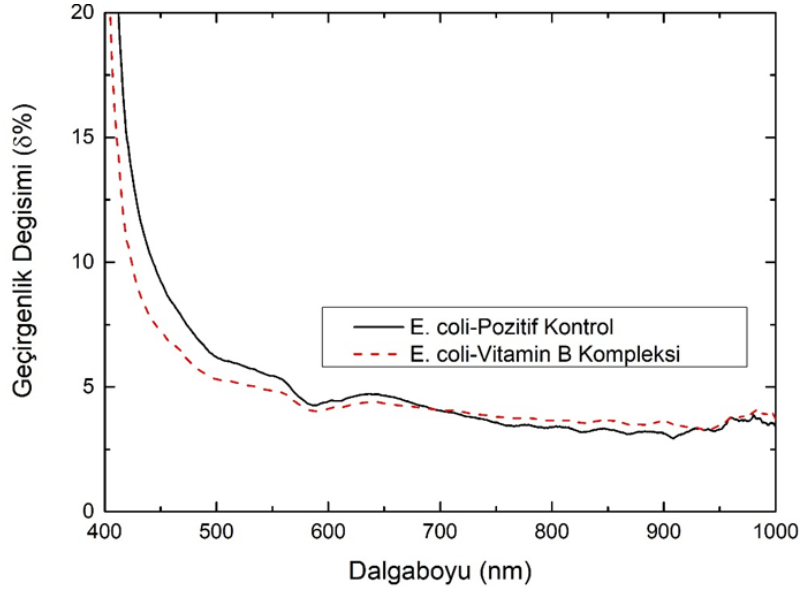
3. Bulgular

Spektrofotometrik % T Ölçümleri

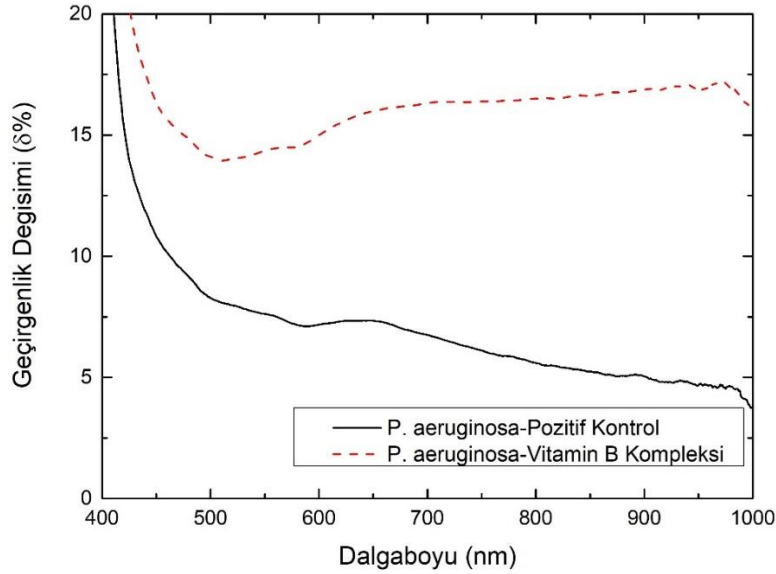
Büyüme oranı bir spektrofotometre ile nicelendirildi. 400 nm-1000 nm arasındaki dalgaboylarına tekabül eden ışık tayfı için geçirgenlik yüzdesi (% T) ölçüldü. Sonuçlar, mikrobiyal hücre büyümesinden kaynaklanan bulanıklığın bir fonksiyonu olarak % T olarak ifade edildi. Başlangıçta, tüm test tüpleri % 100 T idi ve bu nedenle artan bulanıklık % T ile ters orantılıydı. % 100 T'nin % 0 hücre büyümesini (bulanıklık yok) gösterdiğini ve % 20 T'nin % 100 hücre büyümesini (bulanıklık var) gösterdiğini veya hiç inhibisyon olmadığını göz önünde bulundurarak analizler yapıldı.

Geçirgenlik yüzdesindeki dalgaboyuna bağlı niceliksel değişimlerin hesaplanabilmesi için örnekler pozitif kontrol (PK) – yani vitamin B kompleksi verilmemiş- grup ve 0,125 mg/mL konsantrasyonlu vitamin B kompleksi uygulanmış olarak iki farklı grubun lazer ışını maruziyeti öncesi alınan geçirgenlik oranlarının lazer sonrası maruz bırakılan örneklerin geçirgenlik oranlarından çıkarılarak dalgaboyuna

bağlı olarak ışık geçirgenlik yüzdesi (% T)'deki değişimlerin niceliksel farkı olarak bulundu. Şekil 1 ve Şekil 2'de *E. coli* ve *P. aeruginosa* örneklerinin 400 nm - 1000 nm arası ışık tayfı geçirgenlik değerlerindeki değişimlerin yüzdesel farkı olan geçirgenlik değişimleri (δ %) gösterilmektedir. Alınan ışık geçirgenlik verileri 400 nm ila 1000 nm dalgaboyu ışık tayfı arasında hem pozitif kontrol (PK) hem de vitamin B kompleksi verildikten sonra olan % T verilerinin alınması ile elde edildi.



Şekil 1: *E.coli* bakterisi için pozitif kontrol grubu ve Vitamin B kompleksi için lazer uygulama sonrası ve öncesi arası geçirgenlik değişimleri (δ %) – dalgaboyu (nm) analizi

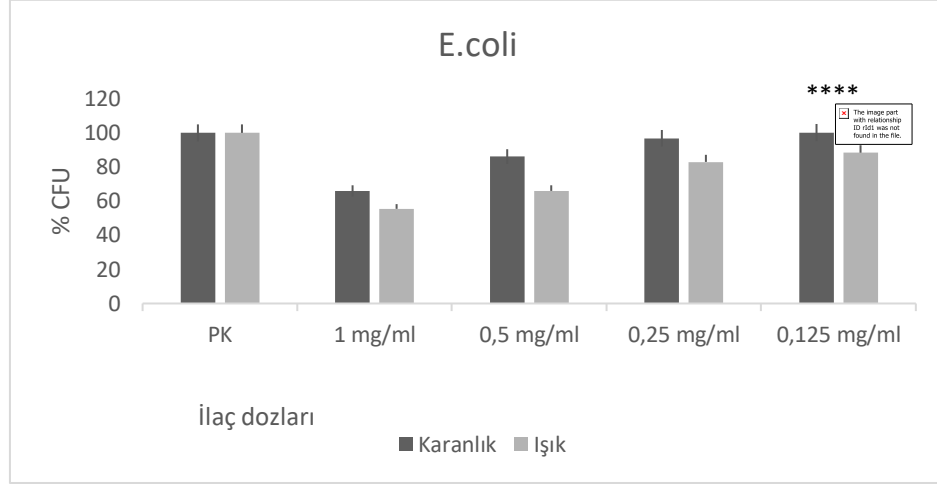


Şekil 2: *P.aeruginosa* patojeni için pozitif kontrol grubu ve Vitamin B kompleksi için lazer uygulama sonrası ve öncesi arası geçirgenlik değişimleri (δ %) – dalgaboyu (nm) analizi

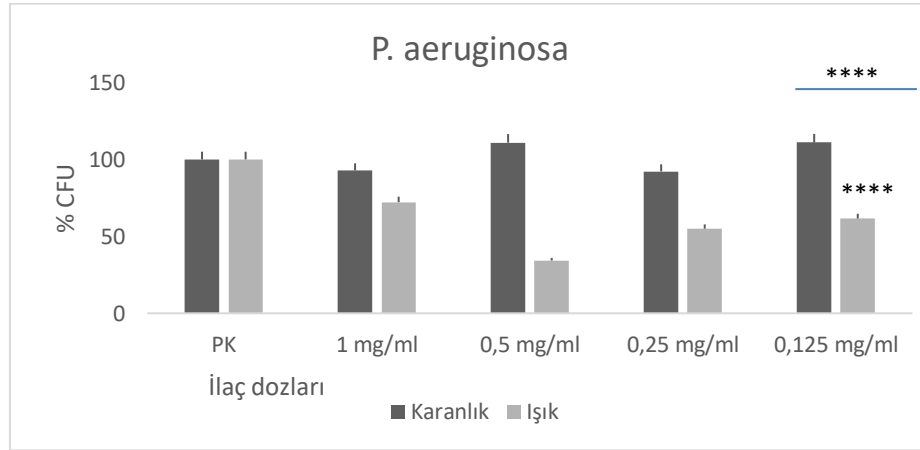
PDI'nin Bakteri Üremesi Üzerindeki Etkisi

E. coli ve *P. aeruginosa* bakteri suşlarına uygulanan PDI'dan sonra petride oluşan koloniler (tekli koloniler) sayılarak % CFU yüzdeleri hesaplanmıştır (7). *E. coli* bakteri suşunda karanlıkta 1mg/mL konsantrasyonunda kullanılan vitamin B kompleksinde % 35 lik bir ölüm görülmektedir. Üstüne lazer etkisiyle bu etki % 40 lara çıkmaktadır. Vitamin B kompleksinin diğer konsantrasyonlarında karanlık ve ışık deneylerinde anlamlı değerler görülmektedir (****p <0,001 vs Işık PK; ****P <0,001 vs Karanlık 0,125 mg/mL) (Şekil 3). *P. aeruginosa* bakteri suşlarının karanlık deneyinde ise anlamlı değerler

vitamin B kompleksinin 0,5 mg/mL ve 0,125 mg/mL konsantrasyonlarında görülmüştür. Bu konsantrasyonların üstüne ışık (lazer) ile maruziyet sonrası ölüm oranları % 60 ve % 50 çıktığı görülmektedir (****p <0,001 vs Işık PK, ****P <0,001 vs Karanlık 0.125 mg/mL) (Şekil 4).



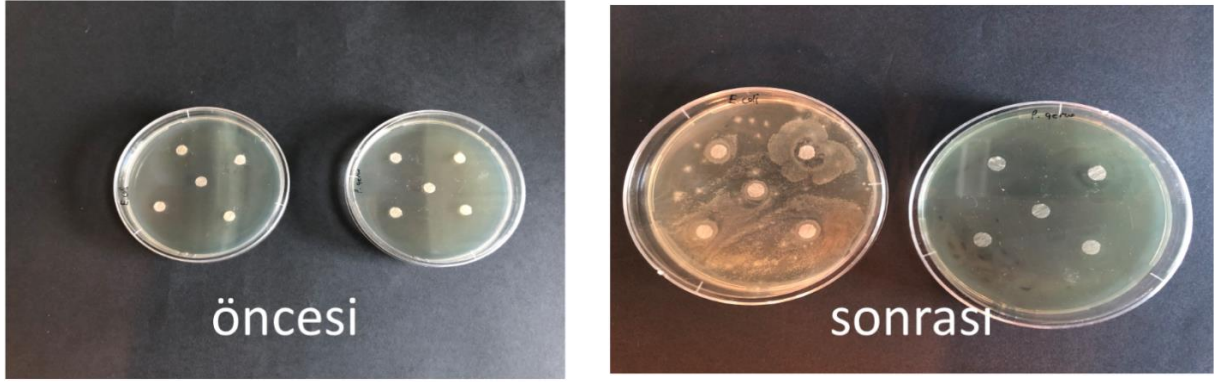
Şekil 3. Vitamin B kompleksinin *E.coli* suşu üzerindeki % CFU ****p <0,001 vs Işık PK; ****P <0,001 vs Karanlık 0,125 mg/mL



Şekil 4. Vitamin B kompleksinin *P. aeruginosa* suşu üzerindeki % CFU ****p <0,001 vs Işık PK, ****P <0,001 vs Karanlık 0,125 mg/ml

Antimikrobiyal Madde Etkinliğinin Test Edilmesi (Agar Disk Difüzyon Yöntemi)

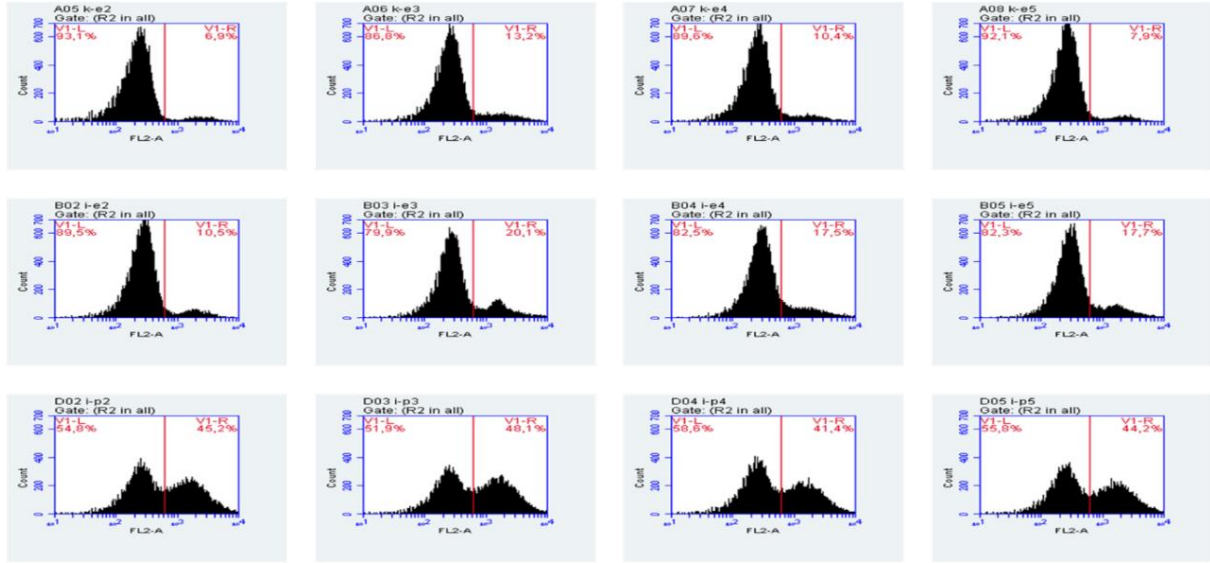
Antimikrobiyal madde etkinliğinin (AMM)'nin (özellikle antibiyotik vs.) etkinliği bu yöntemle kısa sürede ortaya konulabilmektedir. Yöntem; *E. coli* ve *P. aeruginosa* bakteri suşları ile inoküle edilmiş petri kutusundaki besiyerine eklenen AMM'nin (vitamin B kompleksi), besiyerinde difüze olduğu alanda *E. coli* ve *P. aeruginosa* bakteri suşlarının gelişimini engelleyip engellemediğinin belirlenmesine dayanmaktadır. Vitamin B kompleksi mikroorganizmalar üzerinde etkiliyse; vitamin B kompleksinin'in eklendiği yerin çevresinde, inkübasyon sonrasında mikroorganizma gelişiminin gözlenmediği bir "inhibisyon zonu" oluşur. Etkili değilse inhibisyon zonu oluşmaz ve AMM etkinliğinin olmadığına karar verilir. Bu çalışmada "kağıt disk agar difüzyon" yöntemi uygulandı ve vitamin B kompleksi inhibisyon zonu oluşturmadı. Vitamin B kompleksinin (0,125 mg/mL) konsantrasyonda lazersiz antibakteriyel aktivite göstermediği sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 5).



Şekil 5: Vitamin B kompleksinin *E.coli* ve *P. Aeruginosa* suşu üzerindeki antimikrobiyal madde etkinliği testi

Akış Sitometrisinde Canlılık Tayini

Propidium iyodür (PI), genellikle canlı hücrelerden dışlanan bir membran geçirimsiz boyadır. Hücre çekirdeğini boyayan PI, apoptozun geç evresindeki ve nekrotik hücreleri boyayarak FL2 panelinde görüntülenir. Sonuç olarak boyanmayan hücreler canlı PI ile boyanan hücreler ise ölü olarak değerlendirilir. Şekil 6 da görüldüğü gibi *E. coli* bakterisi suşunda çok fazla fotodinamik intaktivasyon etkinliği görülmemektedir. Zaten bu çalışmada arzu edilen patojen bakteri olan *P. aeruginosa* suşunun inaktive edilmesidir. *P. aeruginosa* suşunun ışık deneyine bakacak olursak *E. coli* bakterisi suşuna karşın yüksek oranda ölüm oranları görülmektedir. Vitamin B kompleksinin 0,125 mg/ml konsantrasyonunu değerlendirecek olursak *E. coli* karanlık deneyinde % 7,9 ölüm görülürken aynı bakteri suşunda ışık deneyinde % 17,7 ölüm görülmüştür. *P. aeruginosa* bakterisi suşunun ışık deneyinde % 44,2 oranlarında ölüm görülmüştür (Şekil 6).



Şekil 6: *E.coli* ve *P. aeruginosa* akış sitometrisindeki canlılık testi karşılaştırması

Birinci sıradaki grafikler *E.coli* karanlık deney sırasıyla (1mg/mL; 0,5mg/mL; 0,25mg/mL; 0,125mg/mL)
İkinci sıradaki grafikler *E.coli* ışık deneyi sırasıyla (1mg/mL; 0,5mg/mL; 0,25mg/mL; 0,125mg/mL)
Üçüncü sıradaki grafik *P. Aeruginosa* ışık deneyi sırasıyla (1mg/mL; 0,5mg/mL; 0,25mg/mL; 0,125mg/mL)

İstatistiksel analiz

İkiden fazla parametrik değişkenin karşılaştırılması Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ile, Tukey-Kramer Çoklu Karşılaştırma Testi ise post hoc testi ile yapılmıştır. Tüm istatistiksel analizler % 5 anlamlılık düzeyinde yapıldı ve P <0,05, P <0,01 ve P <0,001 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Analiz, Graphpad InStat (GraphPad Software, San Diego, CA, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. E-coli

suşunda ****p <0,001 vs Işık PK, ****P <0,001 vs Karanlık 0,125 mg/mL; *P. aeruginosa* bakteri suşunda ****p <0,001 vs. Işık PK, ****P<0,001vsKaranlık0,125mg/mL

4. Tartışma ve Sonuç

Lazer maruziyetinde *E. coli* ve *P. aeruginosa* geçirgenlik az miktarda da olsa numunelerin ışık geçirgenlik spektrumunda (tayfında) artış göstermektedir. Bu ışık geçirgenliğindeki artış lazer ışığının her iki mikroorganizma üzerinde negatif etki oluşturmasının sonucu olduğu unutulmamalıdır. Fakat vitamin B kompleksi uygulaması artı lazer uygulaması sonrası *E. coli* geçirgenlik değerleride değişimde (δ %) çok fazla bir etki gözlenmezken (bkz. Şekil 1); *P. aeruginosa* patojeni üzerindeki geçirgenlik değişimlerinde dikkate değer geçirgenlik oranları pozitif kontrole göre artmaktadır (bkz. Şekil 2). Bu da dolaylı olarak *P. aeruginosa* patojenlerinin lazer maruziyetinden, *E. coli*'ye göre daha fazla etkilendiğini göstermektedir. Bunun sonucunda *E. coli* ve *P. aeruginosa* patojen karma ortamında seçici olarak patojenlerin terminasyonu vitamin B kompleksi ve lazer ışını uygulaması ile kontrollü sağlanabilir. PK ile 0,125 mg/mL Vitamin B kompleksi uygulama sonrası *E. coli* bakterisi, PK grubundan çok ayırt edilebilir bir δ % göstermemekle birlikte 400 nm ila 1000 nm dalgaboyları aralığında hemen hemen aynı δ % düzeylerine sahiptir. Oysaki *P. aeruginosa* patojeni üzerindeki vitamin B kompleksi uygulaması δ % farkedilebilir bir değişim göstermekte ve özellikle kızılötesi dalgaboyu aralığında δ % değerleri artış göstermektedir. δ % değerlerindeki artış vitamin B kompleksi uygulama sonrası *P. aeruginosa* için % 15 değerini geçmektedir. Bu sonuçlar ışığında *E. coli* ve *P. aeruginosa* iki popülasyonun bulunduğu bir ortamda vitamin B kompleksi uygulaması sonrası yapılacak bir PDI süreci 660 nm lazer uygulamalar ile seçici terminasyon ve ayırıştırma süreçlerinde kullanılabileceğini öngörmekteyiz.

Klinik uygulamada PDI'nin yüksek maliyeti sadece ekipmanın fiyatından değil, aynı zamanda PDI için kullanılan ilaçların yüksek maliyetinden de kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, özellikleri yüksek etkinlik, düşük yan etkiler ve düşük maliyet içermesi gereken yeni ilaçların geliştirilmesi arzu edilmektedir. Bu gereklilikleri takiben, halihazırda varolan bazı organik kimyasallar PDI adayları olarak önerilmiştir. Bunlardan biri de 660 nm'de yüksek ışık absorpsiyonuna sahip iyi bilinen bir boya olan metilen mavisi (MB), PDI'de etkilidir ve çeşitli hastalıklara karşı klinik uygulamalar için 1O_2 ve fotodinamik aktivite üretme kabiliyeti göstermektedir [19]. PDI' de MB fotosensitizer olarak kullanılmıştır, bakteri hücre duvarlarını geçmekte zorluk çekmez. Katyonik yükü nedeniyle, Gram negatif bakterilerin lipopolisakaritlerinin negatif yüküne kolayca bağlanır [25, 26]. Gram pozitif bakteriler sitoplazmik membranın dışında sadece kapsüler materyale ve peptidoglikana sahiptir, bu da metilen mavisinin membranı kolayca geçmesini sağlar [27]. Bizim bu çalışmada kullandığımız bakteriler *E. coli* ve *P. Aeruginosa* gram negatiftir, fotosensitizer olarak kullandığımız vitamin B kompleksi katyonik etki ile her iki bakteri membranından kolayca geçmesini sağlayacaktır. Antibiyotik direnç, enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde ciddi sorunlar oluşturmaktadır [28]. *P. aeruginosa* bakterilerin % 77'si çoklu dirençli (≥ 3 grup antibiyotiğe dirençli) olup, çalışılan antibiyotikler içinde en düşük duyarlılığı tobramisine (% 35), en yüksek duyarlılığı ise piperasilin+tazobaktama (% 55) karşı gösterdiği izlenmiştir [29]. Hastane enfeksiyonu etkeni Gram negatif bakteriler içinde Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz (GSBL) üreten *E. coli* ve *P. aeruginosa*, birçok antimikrobiyal ajana karşı artmakta olan direnç ile önem taşımakta ve enfeksiyonların tedavi ve kontrolünde problemler yaşanmaktadır [30]. Bu çalışma, antibiyotiklere karşı direnç geliştiren *P. aeruginosa* bakterisini daha etkili ve ucuz bir yöntemle inaktive ederek yeni alternatif tedavilere imkân sağlayacaktır.

Bu çalışmada ışık deneylerinde sürekli lazer ışık kaynağı kullanılmıştır. Lazeri diğer ışık kaynaklarıyla karşılaştırdığımızda birden fazla avantajı barındırmaktadır. Lazer ışınması, dar dalgaboyu band aralığında kontrollü ışınma miktarlarını ayarlayabilmesi sayesinde hedeflenen organizmalara eşyönlü ışınım kabiliyeti ve hedef odaklı çalışması nedeniyle PDI uygulamaları için çok iyi bir seçenektir. Bu makalede, lazer ışığının eş zamanlı olarak vitamin B kompleksinin mikroorganizmalara PDI etkisine bakılmıştır. PDI'nin bakteri üremesi üzerindeki etkisi; *E. coli* 1 mg/mL vitamin B kompleks konsantrasyonu kullanan numuneler için, karanlık ve ışık ölüm oranları % 40 olarak görülmüştür. Bu sonuç, tek başına vitamin B kompleksi'nin yüksek dozlarda zaten yüksek bir ölüm yüzdesini indüklediği gerçeğiyle açıklanabilir. Bir başka olası açıklama, daha yüksek konsantrasyonlarda fotosensitizerleri'nin su ortamında kendi kendine agregre olabileceği ve böylece singlet oksijen verimini azaltabileceğidir [31]. *P. aeruginosa* 1mg/mL vitamin B kompleks konsantrasyonu kullanan numuneler için, karanlık ve ışık ölüm oranları % 20 olarak görülmüştür. 0,5 mg/mL vitamin B kompleks konsantrasyonu *E. coli*'de karanlık ve ışık ölümleri arasında anlamlı bir fark görülmezken *P. aeruginosa*'de karanlık ve ışık ölümleri arasında anlamlı bir fark (% 60 lık ölüm) görülmüştür. 0,125

mg/mL vitamin B kompleks konsantrasyonu *E. coli*'de karanlık ve ışık ölümleri arasında anlamlı bir fark görülmezken *P. aeruginosa*'de karanlık ve ışık ölümleri arasında anlamlı bir fark (%40 lık ölüm) görülmüştür. *E. coli* suşunda ****p <0,001 vs Işık PK, ****P <0,001 vs Karanlık 0,125 mg/mL; *P. aeruginosa* bakteri suşunda ****p <0,001 vs. Işık PK, ****P <0,001 vs Karanlık 0,125 mg/mL (Şekil 3-4). Vitamin B kompleksinin yüksek konsantrasyonlarda *E. coli* için biraz toksik olduğu, patojen mikroorganizma (*P. aeruginosa*) artan toksisitenin yalnızca lazer tarafından ışınlandığında meydana geldiğini, dolayısıyla bu terapi esas olarak lokal ve topikal uygulamalar için kullanılacaktır. İntravenöz yoldan kullanım için, ilacın vücutta birikeceği yeri tam olarak bilmek ve ardından o bölgeyi lazer ışımaya maruz bırakmak önemlidir. Işığa maruz kalma süresi, vitamin B kompleksi konsantrasyonu ve lazer ışık dozu arasındaki dengenin araştırılması PDI verimliliğinin kontrol edebileceğini göstermektedir. Vitamin B kompleks birikiminin zayıf olduğu perfüze olmayan dokular için, benzer bir terapötik etkiye izin vermek için ışınlama süresi uzatılmalıdır. Maruz kalma süresi, farklı maruz kalma uzunluklarında hücre ölüm hızı üzerindeki etkilerle gözlemlenebileceği gibi, PDI aktivitesi için esastır.

Antimikrobiyal madde etkinliğini karşılaştıracak olursak kağıt disk difüzyon yöntemiyle vitamin B kompleksinin 0,125 mg/mL konsantrasyonunda lazere maruz bırakılmamış hali ile antibakteriyel aktivite göstermediği sonucuna ulaşılmıştır.

Akış sitometrisinde canlılık testinde *E. coli* bakteri suşunda çok fazla fotodinamik inaktivasyon etkinliği görülmemektedir. Başka bir çalışmada da bizim çalışmamıza benzer olarak *E. coli* bakteri suşunda fotosensitizer kullanılarak yapılan karanlık deneyi ile ışık deneyini arasında fotodinamik etkinlik olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir [19]. Zaten bu çalışmada arzu edilen patojen bakteri olan *P. aeruginosa* suşunun inaktive edilmesidir. *P. aeruginosa* suşunun ışık deneyine bakacak olursak *E. coli* bakteri suşuna karşı yüksek oranda ölüm oranları görülmektedir. Vitamin B kompleksi *E. coli* bakteri suşunda ışıkta minimum toksik etki gösterirken *P. aeruginosa* suşunda % 45'lik oranda ölüm gözlenmiştir. Burada belirtmekte fayda var: Vitamin B kompleksinin uygulanan konsantrasyonu için lazerin 660 nm dalgaboyunu çok az bir miktarda absorblamaktadır. Aksine vitamin B kompleksi bu çalışmada kullanılan konsantrasyonlarda 660 nm dalgaboyu için yüksek geçirgenliğe sahip olmasına rağmen üzerinde durulan ışık etkileşimi özellikle, patojen mikroorganizma (*P. aeruginosa*) bünyesinde vitamin B kompleksinin 660 nm ışınımına direkt tepki verdiğini ve PDI etkileşiminin patojenin terminasyonu ile sonuçlandığını akış sitometrisi de doğrulamaktadır. Burada Tip I PDT'den daha az etkili olan Tip II PDT yoluyla fotodinamik aktivite gösterebilir [32-34]. Ancak ilgili patojen içinde Vitamin B kompleksi+lazer ışığı, ne gibi bir mekanizma ile bu terminasyon sürecini tetiklediği ileriki çalışmalarımızın konusunu oluşturmaktadır.

Teşekkür

Bu araştırma için akış sitometrisinde canlılık belirleme sürecindeki değerli katkılarından dolayı Metin Çetin'e teşekkür ederiz.

Etik Beyanı

Bu çalışmada, "Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi" kapsamında uyulması gerekli tüm kurallara uyulduğunu, bahsi geçen yönergenin "Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiğine Aykırı Eylemler" başlığı altında belirtilen eylemlerden hiçbirinin gerçekleştirilmediğini taahhüt ederiz.

Kaynakça

- [1] Ohta, K.1900. Chemical studies of hematoporphyrin rabbits. Munch Med Wochenschr, 47, 5.
- [2] Kapuscinski, R. B., Mitchell, R. 1981. Solar radiation induces sublethal injury in Escherichia coli in seawater. Applied and Environmental Microbiology, 41(3):670-674
- [3] Cooney, J. J., Krinsky, N. I. 1972. Photodynamic killing of *Acholeplasma laidlawii*. Photochemistry and Photobiology, Dec;16(6):523-6.
- [4] Acher, A.J, Juven, B.J. 1977. Destruction of coliforms in water and sewage water by dye sensitized photooxidation. Applied and Environmental Microbiology, 33(5):1019-1022

- [5] Chidinma, C. 2016. Identifying misconnection hotspots using coliforms and biofilm communities. University of Hertfordshire Research Archive 2016.
- [6] Hamblin, A. M. R, Jori, G. 2011. Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens Medical and Environmental Applications: Light Strikes Back Microorganisms in the New Millennium. *Photochemistry and Photobiology*, 87(6), 1479–1479.
- [7] Oktavia, L, Mulyani, I, Suendo, V. 2021. Investigation of Chlorophyl-a Derived Compounds as Photosensitizer for Photodynamic Inactivation. *Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis*, 16 (1), 161-169.
- [8] Amos-Tautua, B. M., Songca, S. P., Oluwafemi, O. S. 2019. Application of Porphyrins in Antibacterial Photodynamic Therapy. *Molecules*, 24(13), 2456.
- [9] Wise, R. The urgent need for new antibacterial agents. 2011. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(9), 1939–1940.
- [10] Liu, Y., Qin, R., Zaat, S. A. J., Breukink, E., Heger, M. 2015. Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections, *JDR Clinical and Translational Research*, 1(3), 140 – 167.
- [11] Yurttas, G. A., Gökdoğan, K., Hekim, S. N. 2022. Liposomes Loaded with Activatable Disulfide Bridged Photosensitizer: Towards Targeted and Effective Photodynamic Therapy on Breast Cancer Cells. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, Volume 12, Issue 1, 304 -325
- [12] Tim, M. 2015. Biology Strategies to optimize photosensitizers for photodynamic inactivation of bacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 150, 2–10.
- [13] Maisch, T., Eichner, A., Späth, A., Gollmer, A., König, B., Regensburger, J., Bäuml, W. 2014. Fast and effective photodynamic inactivation of multiresistant bacteria by cationic riboflavin derivatives, *PLoS ONE*, 9(12), 1-8.
- [14] Ghorbani, J., Rahban, D., Aghamiri, S., Teymouri, A., Bahador, A. 2018. Photosensitizers in antibacterial photodynamic therapy : an overview. *Laser therapy*, 27(4), 293–302,
- [15] Nitzan, Y., Gutterman, M., Malik, Z., Ehrenberg, B. 1992. Inactivation of Gram-Negative Bacteria By Photosensitized Porphyrins. *Photochemistry and Photobiology*, 55(1), 89–96.
- [16] Jones, M. E., Draghi, D. C., Thornsberry, C., Karlowsky, J. A., Sahm, D. F., Wenzel, R.P. 2004. Emerging resistance among bacterial pathogens in the intensive care unit—a European and North American Surveillance study (2000-2002). *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 3: 14.
- [17] Ahmed, F. Y., Aly, U. F., El-Baky, R. M. A., Waly, N. G. F. M. 2020. Comparative Study of Antibacterial Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles Alone and in Combination with Antibiotics on MDR *Pseudomonas aeruginosa* Strains, *International Journal of Nanomedicine*, 15 3393 – 3404
- [18] Whooley, M. A., O'callaghan, J. A., Mcloughlin, A. C. 1983. Effect of Substrate on the Regulation of Exoprotease Production by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. *Journal Of General Microbiology*, 129, 981-988.
- [19] Peloi, L. S., Soares, R. R. S., Biondo, C. E. G. , Souza, V. R., Hioka, N., Kimura, E. 2008. Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue, *Journal of Biosciences*, 33(2), 231–237.
- [20] Lu, C. L., Liu, C. Y., Huang, Y. T., Liao, C. H., Teng, L. J., Turnidge, J. D., Hsueh, P. R. 2011. Antimicrobial susceptibilities of commonly encountered bacterial isolates to fosfomicin determined by agar dilution and disk diffusion methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(9):4295-301.
- [21] Sana, F., Satti, L., Zaman, G., Ikram, A., Gardezi, A. H., Khadim, M. T. 2019. In Vitro Comparison of Disk Diffusion Method and Agar Dilution Method for Sensitivity of Polymyxin B against Multi Drug Resistant *Acinetobacter Baumannii*. *Pakistan Armed Forces Medical Journal*, 69(5), 998–1003.
- [22] Robertson, J., Swift, S., McGoverin, C., Vanholsbeeck, F. 2019. Optimisation of the protocol for the liVE/DEAD@BacLight™ bacterial viability kit for rapid determination of bacterial load. *Frontiers in Microbiology*, 10(APR). doi:10.3389/fmicb.2019.00801

- [23] Karaboz, İ., Kayar, E., Akar, S. 2008. Flow Sitometri ve Kullanım Alanları. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR, Cilt: 06 Sayı: 2 Sayfa: 01-18.
- [24] Kanev, M. O., Muranlı, F. D. G.2022. Flow sitometri ve kullanım alanları. Sakarya University Journal of Science, 20(1):33-38. Accessed May 19.
- [25] Westfall, D. A., Krishnamoorthy, G., Wolloscheck, D., Sarkar, R., Zgurskaya, H. I., Rybenkov, V. V. 2017. Bifurcation kinetics of drug uptake by Gram-negative bacteria. PLoS ONE, 12(9), 1–18.
- [26] Önal, Ş, Seçkin, H. 2021. Identification and phylogenetic differences of newly isolated Streptomyces sp. Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi, 8(3), 680–685.
- [27] Zeina, B., Greenman, J., Purcell, W. M., Das, B. 2001. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy, British Journal of Dermatology, 144 274–278
- [28] Mengelöglu, F. Z., Koçođlu, A. E., Çiçek, O. B., Özgümüő, C., Sandalli, E. E. 2021. Carriage of Class 1 and 2 Integrons in Acinetobacter Baumannii and Pseudomonas Aeruginosa Isolated from Clinical Specimens and a Novel Gene Cassette Array: BlaOXA-11-CmlA7." Mikrobiyoloji Bülteni, 48 (1): 48–58.
- [29] Zarakolu, P., Haşcelik, G., Ünal, S. 2006. Hastane enfeksiyonu etkeni gram negatif bakterilerin çeşitli antimikrobiyal ajanlara karşı duyarlılık durumu: hacettepe üniversitesi erişkin hastanesi mystic çalışması verisi (2000-2004). Mikrobiyoloji Bülteni, 40: 147-154
- [30] Gaynes, R., Edwards, J. R. 2005. National Nosocomial Infections Surveillance System. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. Clinical Infectious Diseases, 41: 848-54.
- [31] Cossu, M., Ledda, L., Cossu, A. 2021. Emerging trends in the photodynamic inactivation (PDI) applied to the food decontamination. Food Research International (Ottawa, Ont.), 144, 110358.
- [32] Usacheva, M. N., Teichert, M. C., Biel, M. A. 2003. The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 71 87–98
- [33] Kesici, D., Yıldırım, M. 2009. Fotodinamik Tedavi. SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi, 7(4)
- [34] Boran, R., Pamuk, A. M., Uğur, A.2018. In Vitro Evaluation Of The Effectiveness Of Different Bodipy Dyes As Photosensitizer In Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Treatment. Mugla Journal of Science and Technology. 4(2): 191-197.

Tıp Fakültesi Öğrencilerinde Koku ve Uyku Kalitesi İlişkinin Araştırılması

Investigation of the Relationship between Smell and Sleep Quality in Medical Faculty Students

Arzu YALÇIN^{1*}, Üiker TUNCA¹, Mustafa SAYGIN¹, Önder ÖZTÜRK², Sadettin ÇALIŞKAN³,
Yücel KURT⁴

¹ Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye

² Süleyman Demirel Üniversitesi, Göğüs Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Isparta, Türkiye

³ Üsküdar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

⁴ Finike Devlet Hastanesi, Kulak-Burun-Boğaz Kliniği, Antalya, Türkiye

ÖZET

Amaç: Tıp Fakültesi öğrencilerinde uyku kalitesi ve koku arasındaki ilişkinin araştırılması planlandı.

Materyal-Metot: Çalışmamız klinik araştırmalar etik kurulu tarafından onaylandı. Kesitsel tipte olan araştırmamızda üniversitemizin tıp fakültesi öğrencilerine sosyodemografik özellikler anketi, uyku kalitesini değerlendirmeye yönelik Pittsburg uyku kalite indeksi (PUKI) ve koku-uyku anketi uygulandı.

Bulgular: Çalışmamıza; 91 (%46,9) kadın öğrenci ve 103 (%53,1) erkek öğrenci dâhil edildi. Çalışmaya dâhil olan öğrencilerin yaş ortalaması 21,91±1,94, öğrencilerin %42,2'sini (n=79) 1000 TL ve üzerinde kazandığı, 87 (%44,8) kişinin apartta kalmakta dığı, 149 (%76,8) kişinin sigara ve 143 (%73,7) kişinin alkol kullanmadığı tespit edildi. Katılımcılardan 165 (%86,4) kişi karanlık ortamda uyumayı tercih ettiğini belirtti. Çalışmaya katılan öğrencilerin 160 (%82,9)'ü gürültü, 149 (%77,2)'u ışık, 145 (%75,1)'i ortamın ısı düzeyi, 122 (%63,2)'si fiziksel olarak yatak yapısı, 107 (%55,4)'si ortamın kirli olması ve 106 (%54,9)'sı ortamın kötü kokması gibi faktörlerin uyku kalitelerini etkilediğini düşünmekteydi. Koku uyku arasındaki ilişkiye 89 (%45,9) kişi, koku ile hafıza arasında ilişkisine 70 (%36,1) kişi katılıyor keskinlikle evet cevabını verdi. Çalışmamızdaki toplam PUKI ölçeği ortalaması 12,88±5,60 olarak bulundu. Dönem I ve II öğrencilerinde uykuya yatış zamanı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardı (p=0,040). Dönem II öğrencilerinde yatış zamanının uzadığı bulundu. Çalışmamıza katılan öğrencilerin dönem II ve dönem III öğrencileri arasında uykuya dalma süresinde anlamlı farklılık bulundu var (p=0,017). Çalışmamıza dâhil olan öğrencilerin uykuya dalma sırasındaki uyku kalitesi istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0,05).

Sonuç: Kaliteli bir uyku için, koku ile uyku süreci arasında bir bağlantı olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Tıp öğrencileri, Uyku, Uyku kalitesi, Koku.

Alınış / Received: 15.03.2022 Kabul / Accepted: 08.09.2022 Online Yayınlanma / Published Online: 20.12.2022



ABSTRACT

Objective: The relationship between sleep quality and odor in medical faculty students was investigated.

Material-Method: Our study was approved by the clinical research ethics committee. In our cross-sectional study, socio-demographic characteristics questionnaire, Pittsburg sleep quality index (PUKI) and odor-sleep questionnaire were used to evaluate the sleep quality of the medical faculty students of our university.

Results: Our work; 91 (46.9%) female students and 103 (53.1%) male students were included. The mean age of the students included in the study is 21.91 ± 1.94 , the income level of the students is 79 (42.2%) 1000 TL and above, 87 (44.8%) people live in apartments, 149 (76.8%) people smoke and 143 (73.7%) people do not use alcohol. 165 (86.4%) of the participants preferred to sleep in a dark environment. Of the students participating in the study, 160 (82.9%) were noise, 149 (77.2%) light, 145 (75.1%) the temperature level of the environment, 122 (63.2%) were physically in bed. structure, 107 (55.4%) polluted environment and 106 (54.9%) bad smell of the environment affected their sleep quality. 89 (45.9%) people agreed with the relationship between smell and sleep, and 70 (36.1%) people agreed with the relationship between smell and memory. The mean of the total PUKI scale in our study was found to be 12.88 ± 5.60 . There was a statistically significant difference between the time to sleep in term I and II students ($p=0.040$), and it was found that the time to sleep was prolonged in term II students. There was a significant difference in the duration of falling asleep between the students who participated in our study, between the semester II and the third semester students ($p=0.017$). The sleep quality of the students included in our study during falling asleep was found to be statistically significant ($p<0,05$).

Conclusion: For a quality sleep, it is thought that there may be a connection between the smell and the sleep process.

Keywords: Medical Students, Sleep, Sleep quality, Smell.



1. Giriş

İnsanın beş duyusundan biri olan koku, diğer duyu kadar belirgin olmasa da beyin yapılarında birçok aktivasyona neden olmaktadır. İnsan beyninde, olfaktör epitel içerisine yerleşmiş olarak yaklaşık altı milyon olfaktör reseptör hücre bulunmaktadır. Dışarıdan gelen havanın yaklaşık %10 kadarı olfaktör epitele ulaşır ve burada da olfaktör reseptörler koku moleküllerini alırlar. Olfaktör reseptör hücreleri iki kutuplu nöronlardır ve birçok nöronun aksine sürekli olarak yenilenirler. Olfaktör reseptör hücreleri koku moleküllerini beyin olfaktör bulbul denilen bölgesine gönderir. Buradaki iletili hücreler sayesinde ise koku bilgisi amigdalaya ve limbik sisteme iletilir. Amigdalaya gelen koku bilgisi çeşitli yollardan sonra hipotalamus ve orbitofrontal kortekse iletilir [1]. Koku duyumuzu tek boyutlu düşünmek mümkün değildir. Kokular farklı olduğu için insanlarda farklı etkilere sebep olabilmektedir. Bu durum bazen ruh hali, bazen de bilişsel performanslar üzerinde geçerli olabilir. Bu nedenle koku değişkeni için net bir çerçeve çizmek mümkün değildir. Görsel ve işitsel uyaran değişkenleri niteliğine göre davranışların değiştiği söylenebilir, koku değişkeni için de aynı değerlendirmeyi yapılabilir. Bazı kokular daha uyarıcı olurken bazı kokular daha yatıştırıcı etkiye sahip olabilmektedir [2-5]. Koku; bilme yetisi ve duyu ile ilişkili olduğu için karmaşık bir kavramdır [6]. Kokunun kişinin duyu, davranış ve ruh hali üzerindeki etkisi yadsınamaz. Bu noktadan hareketle farklı kokuların beyindeki uyarılma durumunu nasıl etkilediği araştırma konusu haline gelmiştir. Birçok çalışmada işitsel ve görsel öğelere yeterince yer verilir. Koku ise henüz yeterince anlaşılabilen ve genellenebilir kavram değildir [7]. Uyku, dış uyaranların duyarlılığın azalmasıyla karakterize bir durumdur [8,9]. Birçok çalışmada; işitsel,

somatosensoriyel ve görsel uyaranların uyarılmaları tetikleyerek, uyku uzunluğunu ve mimariyi bozarak uykuyu bozduğunu doğrulamaktadır [10-12]. Buna karşılık, artan sayıda kanıt, diğer modalitelerdeki duyuşsal uyarlardan farklı olarak, tamamen koku alma veya hafif trigeminal kokuların uyanmaya veya uykudan uyanmaya yol açmadığını göstermektedir [13]. Birkaç kokunun uykuyu teşvik ettiğine dair bazı kanıtlar vardır. İnsanlarda, uyku sırasında sunulan lavanta yağı uykuyu verimliliğini artırdığı, toplam uyku süresini artırdığı, ertesini sabah artan canlılık ve [14,15] uykusuzluk çeken hastalarda uykuya teşvik ettiği görülmektedir eder [16].

Uyku, bilincin dış uyaranların bir kısmını veya tamamını algılamadığı, tepki gücünün zayıfladığı ve vücudumuzdaki pek çok organın etkilendiğinin büyük ölçüde azaldığı bir dinlenme durumudur. Pek çok organ sistemi uyku sırasında yavaşlar. Beynin tam bir durgunluk veya dinlenme durumuna geçmediği, uyku sırasında da çalıştığı, sadece etkinlik türünü değıştirdiğı düşünölmektedir. Uyku sırasında elektriksel olaylar devam ettiği için beyinden çeşitli elektroensefalografi (EEG) dalgaları kaydedilmektedir [17]. Uyku sağlıklı bir yaşam için gereklidir. Gelişme, büyüme, öğrenme, istirahat ve sağlık için doğumdan esastır. Yetişkin nüfusun yarısından fazlası gecede 7-8 saat uyur [18]. Yaşamın vazgeçilmez bir parçası olan uyku kalitesi, dinlenme ve sağlıklı bir yaşam için da önemlidir. Klinik pratikte uyku kalitesine ve uykuyla ilgili araştırmalara büyük bir odaklanma olmuştur, ancak kavramın nesnel olarak tanımlanması ve ölçülmesi zordur [19].

Üniversite öğrencileri, yorgunlukları ve uyku yetersizlikleri nedeniyle eğitim yaşamları boyunca ciddi sorunlar yaşayan bir grup insandan oluşmaktadır. Üniversite öğrencilerindeki yorgunluk seviyelerinin ağır el emeğı olan işçilere eşdeğer olduğu bildirilmektedir [20]. Tüm üniversitelerin büyük bir bölümünü oluşturan tıp öğrencileri, en ciddi yorgunluk ve uyku problemlerinden bazılarını yaşamaktadır [21]. Medikal eğitimin yoğun teorik ve pratik yapısından dolayı uykuda geçen zamanın azaldığı, stres ve gerginliğin uyku kalitesini düşürdüğü bilinmektedir [22-24].

Bu çalışmada, Tıp Fakültesi öğrencilerinde koku ve uyku ilişkisi sosyodemografik bilgileri içeren bir giriş anketi, uyku kalitesini değıerlendirmek için Pittsburgh Uyku Kalitesi İndeksi ve koku-uyku anketi kullanılarak araştırıldı.

2. Materyal ve Metot

Çalışmamız Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alındı (28.05.2019/191). Araştırma 3-7 Haziran 2019 tarihlerinde Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesinde öğrenim çalışmaya katılmaya gönüllü gören öğrenciler üzerinde yapıldı. Çalışmaya; 91'i (%46,9) kadın öğrenci, 103'ü (%53,1) erkek öğrenci dâhil edildi. Öğrencilerin 29'u (%14,9) Dönem I, 45'i (%23,2) Dönem II, 35'i (%18,0) Dönem III, 29'u (%14,9) Dönem IV, 28'i (%14,4) Dönem V, 28'i (%14,4) Dönem VI öğrencisiydi. Verileri elde etmek için literatür doğrultusunda geliştirilen koku-uyku anket formu, Pittsburgh uyku kalite indeksi ve sosyodemografik bilgi formu kullanıldı.

Pittsburg Uyku Kalitesi İndeksi 19 maddelik bir öz bildirim ölçeğidir. Testin her maddesi 0-3 arasında eşit olarak puanlanır. Sorular 0-3 arasında puanlanır ve yüksek puanlar kötü uyku kalitesini yansıtır. Ölçek subjektif uyku latansı, uyku kalitesi, uyku süresi, uyku bozuklukları, alışılmış uyku etkinliğı, uyku ilacı kullanımı ve gündüz işlevsellik kaybını değıerlendiren 7 alt ölçekten oluşmaktadır. Alt ölçekler toplanarak 0 ile 21 arasında değışen toplam PUKİ puanı elde edilmektedir. %89,6 duyarlılık ve %86,5 özgüllük ile beşten büyük bir toplam PUKİ puanı, yetersiz uyku kalitesini gösterir ve yukarıda belirtilen alanlardan en az ikisinde ciddi bozulmayı veya üç alanda orta düzeyde bozulmayı gösterir [25].

Diğer uygulanan ankette 8 adet sosyodemografik verileri içeren soru, 6 adet uyku fizyolojisi ve uyku bozukluklarını ve 11 adet koku-uykuyu sorgulayan çoktan seçmeli ve açık uçlu sorular veriler kullanıldı.

İstatistiksel değıerlendirmeler SPSS 15.0 for Windows paket programı kullanılarak yapıldı. Grupların tanımlayıcı istatistikleri ortalama ve standart sapma (sd) şeklinde verildi. Değıerlendirme öncesinde, verilerin normal dağılım gösterip göstermedikleri Kolmogorov-Smirnov testi ile bakıldı. İncelenen özelliklerin normal dağılım gösterdiği, sonrasında gruplar arası karşılaştırmalar parametrik testler (Anova, Ki-Kare Korelasyon analizi) yapıldı. İstatistiksel anlamlılık değıeri % 95 güven aralığında $p < 0.05$ olarak alındı.

3. Bulgular

Araştırmaya katılan tüm öğrencilerin yaş ortalaması $21,91 \pm 1,94$ olarak bulundu. Tüm öğrenciler üzerinde yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda; öğrencilerin gelir düzeyleri 79'u (%42,2) nun gelir düzeyleri 1000 TL ve üzerinde, 87'i (%44,8) kişi apartta kalmakta, 149 (%76,8) kişi sigara ve 143 (%73,7) kişi alkol kullanmamaktaydı. Katılımcılara günlük ders çalışma süreleri sorulduğunda; 1-2 saat ders çalışan 102 (%52,6), 4-5 saat ders çalışan 74 (%38,1), 5-8 saat ders çalışan 16 (%8,2), 9 saat ve üzeri ders çalışan 1 (%0,5) kişidir. Katılımcılardan 45'i (%23,2) uykuya dalmak için besin takviyesi kullandığına evet, 147 (%75,8) kişi ise hayır cevabını verdi. Çalışmaya dâhil olan öğrencilere uyku ortamı tercihi sorulduğunda 165 (%86,4) kişi karanlık, 23 (%11,9) kişi yarı aydınlık ve 3 (%1,5) kişi aydınlık ortamı tercih ettiğini belirtti. Uyku kalitesini etkileyen faktörler sorusu; 160 (%82,9) gürültü, 149 (%77,2) ışık, 145 (%75,1) ortamın ısı düzeyi, 122 (%63,2) fiziksel olarak yatak yapısı, 107 (%55,4) ortamın kirli olması ve 106 (%54,9) kişi ortamın kötü kokmasının uyku kalitelerini etkilediğini belirtti (Tablo 1). Çalışmaya dâhil olan öğrencilere "Kokulardan hangisi huzur verir?" sorusuna; 60 (%36,1) kişi lavanta, 40 (%24,1) kişi nane, 27 (%16,3) kişi gül ve 20 (%10,3) kişi okalptüs kokusunun huzur verdiğini belirtti. "Evlerinde herhangi bir koku verici cihazı kullanıyor musunuz?" sorusuna, 122 (%62,9) kişi hayır cevabını verdi. Koku duyumuz kaç saat çalışır sorusuna 24 saat cevabını 71 (%36,6) kişi verdi. "Yatak odasında sigara içiyor musunuz?" sorusuna 172 (88,7) kişi hayır cevabını verdi. Odanızda koku kullanıyorsanız, bu kokunun sizin üzerindeki etki sorusuna 39 (%20,1) kişi uykumu kaçırır yanıtını verdi. Yatak odamda uyku kalitemi artıracak koku kullanırım sorusuna 22 (%11,3) kişi evet şeklinde cevapladı. Koku ile uyku arasında ilişkiye 89 (%45,9) kişi, koku ile hafıza arasında ilişkiye 70 (%36,1) kişi katılıyorum cevabını verdi. Güzel kokular uyku kalitesini artırır sorusuna 73 (%37,6) kişi, kötü kokular uyku kalitesini azaltır sorusuna 86 (%44,3) kişi katılıyorum cevabını verdi (Tablo 2). Çalışmamızda PUKİ toplam ölçeğinin ortalaması $12,88 \pm 5,60$ olarak bulundu. Dönem I ve dönem II öğrencilerinde uykuya yatış zamanı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0,040$). Dönem II öğrencilerinde yatış zamanının uzadığı bulundu. Çalışmamıza katılan öğrencilerin dönem II ve dönem III öğrencileri arasında uykuya dalma süresinde anlamlı farklılık var ($p=0,017$). Çalışmamıza katılan öğrencilerin uykuya dalma sırasındaki uyku kalitesi istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). PUKİ ve koku arasındaki ilişki karşılaştırıldığında ortalamaları okalptüs $14,80 \pm 4,86$, nane $13,95 \pm 6,04$, lavanta $12,10 \pm 5,82$ ve gül $11,66 \pm 5,43$ olarak bulundu (Tablo 3).

Tablo 1: Sosyo-demografik ve uykuya dair değişkenler

Cinsiyet	n	(%)	Ortalama \pm ss
Kadın	91	46,9	
Erkek	103	53,1	
Yaş			$21,91 \pm 1,94$
Aylık gelir düzeyi			
1000 TL üstü	79	42,2	
1000 TL altı	46	24,6	
Nerede yaşıyor?			
Apart	87	44,8	
Ev	73	37,6	
Yurt	34	17,5	
Sigara kullanımı			
Evet	45	23,2	

Hayır	149	76,8	
Alkol Kullanımı			
Evet	50	25,8	
Hayır	143	73,7	
Uyanık kalmak için ilaç, besin takviyesi vb. kullananlar			
Evet	45	23,2	
Hayır	147	75,8	
Yatmadan 2-3 saat önce tüketilen çay, kahve, gazlı içecek vb. maddelerin uyku kalitesini etkilediğini düşünenler			
Evet	66	34,0	
Hayır	50	25,8	
Günlük ders çalışma süreleri			
1-2 saat	102	52,6	
4-5 saat	74	38,1	
5-8 saat	16	8,2	
9 saat ve üzeri	1	0,5	
Uyku ortamı tercihi			
Aydınlık	3	1,5	
Yarı aydınlık	23	11,9	
Karanlık	165	86,4	
Uyku kalitesini etkileyen faktörler			
Gürültü	160	82,9	
Işık	149	77,2	
Ortamın ısı düzeyi	145	75,1	
Fiziksel olarak yatak yapısı	122	63,2	
Ortamın kirli olması	107	55,4	
Ortamın kötü kokması	106	54,9	

Tablo 2: Koku ve Uyku Bilgilerine Dair Değişkenler

Anket sorusu	n	%
Kokulardan hangisi huzur verir?		
Lavanta	60	36,1
Nane	40	24,1
Gül	27	16,3
Okaliptus	20	10,3
Evinizde herhangi bir koku verici kullanıyor musunuz?		
Evet	18	9,3
Hayır	122	62,9
Koku duyumuz kaç saat çalışıyor?		
Bir şey kokladığımız zaman	30	15,5
Anlık	49	25,3
12 saat	15	7,7
24 saat	71	36,6
Bilmiyorum	29	14,9
Yatak odanızda sigara içiyor musunuz?		
Evet	15	7,7
Hayır	172	88,7
Odanızda koku kullanıyorsanız, bu kokunun sizin üzerinde ne gibi etkilerinin olduğunu biliyor musunuz?		
Rahat uyurum	37	19,1
Uykumu kaçırır	39	20,1
Baş ağrısı yapar	30	15,5
Sabah dinlenmiş uyanırım	6	3,1
Uykuya hızlı dalarım	7	3,6
Diğer	12	6,2
Yatak odamda uyku kalitemi arttıracak koku kullanırım.		
Kesinlikle hayır	67	34,5
Hayır	58	29,9
Bazen	41	21,1
Evet	22	11,3
Kesinlikle evet	6	3,1
Koku ile uyku arasında ilişki bulunmaktadır.		
Kesinlikle hayır	9	4,6

Hayır	21	10,8
Bazen	58	29,9
Evet	89	45,9
Kesinlikle evet	17	8,8
Koku ile hafıza arasında ilişki bulunmaktadır.		
Kesinlikle hayır	9	4,6
Hayır	5	2,6
Bazen	23	11,9
Evet	70	36,1
Kesinlikle evet	87	44,8
Güzel kokular uyku kalitesini artırır.		
Kesinlikle hayır	7	3,6
Hayır	16	8,2
Bazen	77	39,7
Evet	73	37,6
Kesinlikle evet	19	9,8
Kötü kokular uyku kalitesini azaltır.		
Kesinlikle hayır	11	5,7
Hayır	6	3,1
Bazen	24	12,4
Evet	86	44,3
Kesinlikle evet	67	34,5

Tablo 3: PUKİ ve koku arasındaki karşılaştırma

	Ortalama±ss
Okaliptüs	14,80±4,86
Nane	13,95±6,04
Lavanta	12,10±5,82
Gül	11,66±5,43

4. Tartışma ve Sonuç

Uyku, insanların yaşam kalitesine etki eden ve sağlık durumlarını etkileyen bir durumdur. Uyku vücudun dinlenmesini ve yenilenmesini sağlar. Uyku sürecindeki herhangi bir problem bireylerin biyolojik ve psikolojik problemler yaşamasına neden olur. Kokunun, uyku oluşumu ve uyku sürecinde önemli etkileri bulunmaktadır.

Hastaneye yatan hastaların uyku problemlerine yönelik yapılan bir çalışmada, hastaların %67,7 ortamın gürültüsünden etkilendiğini ortaya koymuş. Bu gürültülerden en çok, hastaların sesi (%55,3), ayak sesi (%39,8), musluk, kapı, pencere sesi (%28,6), telefon sesi (%25,5), tamirat sonucu oluşan sesler (%17,4) ve hastane dışından gelen seslerden (%17,4) etkilendikleri saptanmıştır [26]. Çalışmamızda, 160 (%82,9) kişi gürültü, 149 (%77,2) kişi-ışık, 145 (%75,1) kişi ortamın ısı düzeyi, 122 (%63,2) kişi fiziksel olarak yatak yapısı, 107 (%55,4) kişi ortamın kirli olması ve 106 (%54,9) kişi ortamın kötü kokmasının uyku kalitelerini etkilediğini belirtti. Bir araştırmada katılımcılara yatmadan önce lavanta esansı, ertesi gün ise saf su koklatılmış. Bu kişilerin lavanta esansı kokladıkları gece boyunca beyin dalgaları incelenmiş ve derin uyku evrelerinin uzadığı, buna ek olarak katılımcılar lavanta esansı kokladıkları gecenin sabahında daha enerjik uyandıklarını ifade etmişlerdir [27]. Ritter ve arkadaşlarının yaptığı bir araştırmada, katılımcılara öğretilmesi gereken bilgiler kokuyla bir arada verildi. Aynı günün gecesinde uyku sırasında aynı kokunun yeniden verilmesi sonucu ertesi günün yaratıcı olma durumunun arttığı gözlemlendi. Bu durum kokunun birey üzerinde pasif bir şekilde de olsa anımsatıcı etkisinin olduğunu göstermekte ve kokunun bilişsel performans görevlerindeki etkisini ortaya koymaktadır [28]. Çalışmamızda, koku ile uyku arasında ilişkiye 89 (%45,9) kişi, koku ile hafıza arasında ilişkisine 70 (%36,1) kişi evet cevabını verdi. Güzel kokular uyku kalitesini artırır sorusuna 73 (%37,6) kişi, kötü kokular uyku kalitesini azaltır sorusuna 86 (%44,3) kişi evet cevabını verdi. Çin'de yapılan bir çalışmada; 1602 tıp fakültesi öğrencisinin PUKİ puan ortalaması $6,24 \pm 2,44$ olarak bulundu [29]. İran'da yapılan çalışmada; 224 Tıp Fakültesi öğrencisinin 91'inde (%40,6) uyku kalitesi kötü olduğunu bulmuşlar [30]. Brezilya'da Tıp Fakültesi öğrencileri ile yapılan bir araştırmada PUKİ kullanıldı ve öğrencilerin %38,9'unun uyku kalitesinin iyi olmadığını bulmuşlar [31]. PUKİ değeri 5'in üzerinde olanlar uyku kalitesinin kötü olduğu kabul edilmektedir (32). Uyku, gençlerin sağlığında önemli bir rol oynar. Yetersiz uyku, psikomotor, bilişsel ve duygusal işlevlerde azalmanın yanı sıra sağlığı tehdit eder [24,25]. Çalışmamızda, öğrencilerin PUKİ toplam ölçeği ortalaması $12,88 \pm 5,60$ olarak bulundu. Yapılan bir çalışmada; inhalasyon yolu ile lavanta kokusu verildiği zaman üniversite öğrencileri için uyku kalitesinin artırdığını bulundu [33]. Bizim çalışmamızda; PUKİ ve koku arasındaki ilişki karşılaştırıldığında ortalamaları okaliptüs $14,80 \pm 4,86$, nane $13,95 \pm 6,04$, lavanta $12,10 \pm 5,82$ ve gül $11,66 \pm 5,43$ olarak bulundu.

Sonuç olarak; uyku kalitesi fiziksel ortam koşullarından etkilendiği yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Kokunun uyku kalitesini etkilediği yönünde veriler bulunmaktadır. Bu nedenle koku ile uyku kalitesine yönelik bir ilişki olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda, tıp fakültesi öğrencilerinde kokunun uyku kalitesi üzerinde etkileyebileceğini düşünmekteyiz.

Araştırmanın Kısıtlılığı

Bu araştırmanın tek bir üniversitede yapılması ve soruların öğrencilerin cevaplarına dayalı olması bir kısıtlılıktır.

Etik Beyanı

Bu çalışmada, "Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi" kapsamında uyulması gerekli tüm kurallara uyulduğunu, bahsi geçen yönergenin "Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiğine Aykırı Eylemler" başlığı altında belirtilen eylemlerden hiçbirinin gerçekleştirilmediğini taahhüt ederiz.

Kaynakça

- [1] Carlson NR. Fiziyojik Psikoloji: Davranışın Nörolojik Temelleri. Çev. M. Şahin. İstanbul: Nobel Akademik Yayıncılık 2000.
- [2] Diego MA, Jones NA, Field T, Hernandez-reif M, Schanberg S, Kuhn C, Galamaga M, McAdam V, Galamaga R. Aromatherapy positively affects mood, eeg patterns of alertness and math computations. *International Journal of Neuroscience* 1998; 96(3-4), 217-224
- [3] Field T, Diego MA, Hernandez-Reif M, Cisneros W, Feijo L, Vera Y, Gil K, Grina D, Claire HQ. Lavender fragrance cleansing gel effects on relaxation. *International Journal of Neuroscience* 2005; 115(2), 207-222.
- [4] Ludvigson HW, Rottman TR. Effects of ambient odors of lavender and cloves on cognition, memory, affect and mood. *Chemical Senses* 1989; 14(4), 525-536.
- [5] Moss M, Cook J, Wesnes K, Duckett P. Aromas of rosemary and lavender essential oils differentially affect cognition and mood in healthy adults. *International Journal of Neuroscience* 2003; 113(1), 15-38.
- [6] Lawless H, Engen T. Associations to odors: Interference, mnemonic and verbal labelling, *Journal of Experimental Psychology: Human learning and memory* 1977; vol. 3, no 1, sf. 52.
- [7] Kroupi E, Yazdani A, Vesin JM, Ebrahimi T. EEG correlates of pleasant and unpleasant odor perception, *ACM Transactions on Multimedia Computing Communications and Applications* 2014; vol. 1, Makale No. 13.
- [8] Bastuji H, Perrin F, Garcia-Larrea L. Semantic analysis of auditory input during sleep: studies with event related potentials. *Int J Psychophysiol* 2002; 46: 243–255, 2.
- [9] Portas CM, Krakow K, Allen P, Josephs O, Armony JL, Frith CD. Auditory processing across the sleep-wake cycle: simultaneous EEG and fMRI monitoring in humans. *Neuron* 2000; 28: 991–999.
- [10] Terzano MG, Parrino L, Fioriti G, Orofiamma B, Depoortere H. Modifications of sleep structure induced by increasing levels of acoustic perturbation in normal subjects. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1990; 76: 29–38.
- [11] Vallet M, Mouret J. Sleep disturbance due to transportation noise: ear plugs vs. oral drugs. *Experientia* 1984; 40: 429–437, 1984.
- [12] Velluti RA. Interactions between sleep and sensory physiology. *J Sleep Res* 1997; 6: 61–77.
- [13] Arzi A, Sela L, Green A, Givaty G, Dagan Y, Sobel N. The influence of odorants on respiratory patterns in sleep. *Chem Senses* 2010; 35: 31–40.
- [14] Fisser KL, Pilkington K. Lavender and sleep: a systematic review of the evidence. *Eur J Integr Med* 2012; 4: e436–e447.
- [15] Goel N, Kim H, Lao RP. An olfactory stimulus modifies nighttime sleep in young men and women. *Chronobiol Int* 2005; 22: 889–904.
- [16] Hardy M, Kirk-Smith MD, Stretch DD. Replacement of drug treatment for insomnia by ambient odour. *Lancet* 1995; 346: 701.
- [17] McCormick DA, Westbrook GL. Sleep and Dreaming. In Kandel, ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ eds: *Principles of Neural Science*. 5. Baskı. New York: Mc Graw Hill; 2013; 1140-1158.
- [18] Sneerson JM. *Handbook of sleep medicine*. Oxford: Blackwell science Ltd, 2000; 1-15.
- [19] Buysse DJ, Reynolds CF, Monk TH, Berman SR, Kupfer DJ. The Pittsburgh Sleep Quality Index: A new instrument for psychiatric practice and research. *Psychiatr Res* 1989; 28:193– 213.
- [20] Oginska H, Pokorski J. Fatigue and mood correlates of sleep length in three age-social groups: School children, students, and employees. *Chronobiol Int* 2006; 23:1317-28.
- [21] Veldi M, Aluoja A, Vasar V. Sleep quality and more common sleep-related problems in medical students. *Sleep Med* 2005; 6:269-75.
- [22] Azad MC, Fraser K, Rumana N, et al. Sleep disturbances among medical students: a global perspective. *J Clin Sleep Med* 2015; 11:69–74.

- [23] Altaf M, Altaf F, Iftikhar A, Goha S Yusra. Workload and health problems in medical students. *Int J Endorsing Health Sci Res* 2013; 1:69-72.
- [24] Abdulghani HM, Alrowais NA, Bin-Saad NS, Al-Subaie NM, Haji AM, Alhaqwi AI. Sleep disorder among medical students: relationship to their academic performance. *Med Teach* 2012; 34 Suppl 1:S37-41.
- [25] ÜB Semiz, A Algül, C Başoğlu, ve ark. Antisozyal Kişilik Bozukluğu Olan Erkek Bireylerde Subjektif Uyku Kalitesinin Saldırganlık İle İlişkisi. *Türk Psikiyatri Dergisi* 2008; 19: 373-81.
- [26] Yılmaz E, Kutlu AK, Çeçen D. Cerrahi kliniklerinde yatan hastaların uyku durumlarını etkileyen faktörler. *Yeni Tıp Dergis* 2008; 25(3), 149-156.
- [27] Koulivand PH, Ghadiri KM, Gorji A. Lavender and the Nervous System, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : eCAM, 2013, 681304.
- [28] Ritter SM, Strick M, Bos MW, Van Baaren RB, Dijksterhuis A. Good morning creativity: Task reactivation during sleep enhances beneficial effect of sleep on creative performance. *Journal of Sleep Research* 2012; 21(6), 643-647.
- [29] Abdulkadiroğlu Z, Bayramoğlu F, İlhan N. Uyku ve uyku bozuklukları. *Genel Tıp Dergisi* 1997; 7 (3), 161-166.
- [30] Orzech KM, Salafsky DB, Hamilton LA. The State of Sleep Among College Students at a Large Public University. *Journal of American College Health* 2011; 59 (7), 612-619.
- [31] Zheng J, Yang L, Chen Q. Effect of physical exercise on sleep quality in medical students. *Chinese Journal of Public Health*. 2008-03.
- [32] Ghoreishi A, Aghajani AH. Sleep quality in Zanjan university medical students. *Tehran University Medical Journal*. 2008; 66(1): 61-7.
- [33] Lillehei AS, Halcón LL, Savik K, Reis R. Effect of Inhaled Lavender and Sleep Hygiene on Self-Reported Sleep Issues: A Randomized Controlled Trial. *J Altern Complement Med*. 2015 Jul 1; 21(7): 430–438.

Üçüncü Basamak Bir Hastanede Sağlık Çalışanlarının COVID-19 Enfeksiyonu ve Aşılması Hakkındaki Yaklaşım ve Davranışları

Approach and Behaviors of Healthcare Professionals in a Tertiary Hospital About COVID-19 Infection and Vaccination

Zeliha SALMAN¹, Hakan SALMAN^{2*}, Mustafa AKÇAM²

¹ Sanayi Aile Sağlığı Merkezi, Isparta, Türkiye

² Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkların Anabilim Dalı, Çocuk Gastroenteroloji, Hepatoloji ve Beslenme Bilim Dalı, Isparta, Türkiye



Ö Z E T

Amaç: Pandemide sağlık çalışanlarının COVID-19 hastalığı ve aşısıyla ilgili yaklaşım ve davranışlarını belirlemek.

Materyal-Metot: Çalışma, 1-31 Mart 2022 tarihlerinde hastanede görevli sağlık çalışanlarına COVID-19 enfeksiyonu ve aşılarıyla ilgili yaklaşım ve davranışlarını sorgulayan 44 soruluk ankete Whatsapp uygulaması üzerinden verdikleri cevaplar toplanarak yapıldı.

Bulgular: Çalışmaya katılan 311 sağlık personelinin 209'u kadındı. (%67,2). Ortanca yaşları 36 idi. Katılımcıların 203'ü (%65,3) üniversite mezunu, 159'u (%51,1) hekimdi. Kronik hastalığı olan 51 olgu (%16,4) vardı. Sağlık çalışanlarından COVID-19 enfeksiyonu geçiren 141 (%45,3), ailesinden biri enfeksiyonu geçiren 176 (%56,6), ailesinden biri enfeksiyona bağlı yoğun bakımda kalan 23 (%7,4) ve ailesinden biri enfeksiyona bağlı vefat eden 22 (%7,1) kişiydi. Aşı olan 304 (%97,7) sağlık çalışanından 211'inde (%67,8) en az bir yan etki gelişti. En sık görülen yan etki 156'sında (%73,9) halsizlikti ve en sık yan etki Biontech (%59,8) ile görüldü. Seçenek olsaydı %70,1'i Biontech aşısının ilk tercihleri olacağını belirtti. Turcovac aşısına güvenen 131 (%42,1) kişi vardı. Toplum sağlığı açısından aşının zorunlu olması gerektiğini düşünenlerin oranı %83,3, COVID-19 aşısı ile pandeminin biteceğine inananlar %58,8 ve hasta sayısının azalacağına inananlar %80,4 idi. Sağlık çalışanlarında aşıya karşı kararsızlığı arttıran nedenler arasında en sık aşıların yan etkilerine yönelik duyulan endişe (%74) yer alıyordu. Hekim grubunda çocuğuna aşı yaptıрма, aşı ile pandeminin biteceği inancı, aşı ile hasta sayısının azalacağı inancı ve yakınlarınıza aşı önerir misiniz soruna pozitif cevap verenlerin oranı istatistiksel olarak daha yüksekti.

Sonuç: Sağlık çalışanları arasında COVID-19 aşısı olma oranı ve Biontech aşısına olan güven yüksekti. Bunun sebebi COVID-19 aşısı ile pandeminin biteceği veya hasta sayısının azalacağı inancının yüksek olması olabilir.

Anahtar Kelimeler: Biontech, sağlık çalışanı, pandemi, Turcovac

Alınış / Received: 02.05.2022 Kabul / Accepted: 12.09.2022 Online Yayınlanma / Published Online: 20.12.2022



ABSTRACT

Objective: To determine the approaches and behaviors of healthcare professionals regarding COVID-19 disease and vaccination during the pandemic.

Material-method: The study was carried out by collecting the answers of the healthcare professionals working at the hospital through WhatsApp application. This was done via 44-question survey questioning their approaches and behaviors regarding COVID-19 infection and vaccines between 1-31 March 2022.

Results: 209 of 311 health workers participating in the study were female (67.2%). The median age was 36 years. Of the participants, 203 (65.3%) were university graduates and 159 (51.1%) were physicians. There were 51 persons (16.4%) with chronic disease. Of the healthcare workers, 141 (45.3%) had COVID-19 infection, and 176 (56.6%) had a family member with COVID-19 infection. There were 23 (7.4%) family members who stayed in the intensive care unit due to infection, and 22 (7.1%) whose family members died. At least one side effect developed in 211 (67.8%) of 304 (97.7%) healthcare workers who were vaccinated. The most common side effect was fatigue in 156 (73.9%) and the most common side effect was seen with Biontech (59.8%). If there was an option, 70.1% stated that Biontech vaccine would be their first choice. There were 131 (42.1%) people who relied on the Turkovac vaccine. The rate of those who thought that the vaccine should be mandatory in terms of public health was 83.3%, those who believed that the pandemic would end with the vaccine, 58.8%, and 80.4% believed that the number of patients would decrease. Among the reasons that increased indecision towards COVID-19 vaccines in healthcare workers, side effects of the vaccines was the most common concern with 74%. In the physician group, the rate of those who answered positively to the question of having their children vaccinated, the belief that the pandemic will end with the vaccine, the belief that the number of patients will decrease with the vaccine, and the question "Would you recommend vaccines to your relatives" was statistically higher

Conclusion: Among healthcare workers, the rate of being vaccinated against COVID-19 and confidence in Biontech vaccine was high. The belief that the pandemic will end or the number of patients will decrease with the COVID-19 vaccine may be a factor in this high rate.

Keywords: Biontech, healthcare worker, pandemic, Turkovac



1. Giriş

Çin'in Hubei eyaletinin Wuhan şehrinde 2019 sonunda pnömoni vakalarıyla ortaya çıkan Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus 2 (SARS-COV-2) virüsünün neden olduğu tablo şubat 2020'de Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından COVID-19 hastalığı olarak tanımlandı [1]. Bu tarihten günümüze (DSÖ 10 Nisan 2022 verilerine göre) hastalık 496 milyondan fazla konfirme vaka ve 6 milyondan fazla insanın hayatını kaybettiği bir pandemiye dönüştü [2]. Pandemide en büyük sorumluluğu üzerine alan sağlık çalışanları hayatları pahasına salgınla mücadele ettiler. COVID-19'a bağlı sağlık çalışanlarının bir kısmı hastanede, bir kısmı yoğun bakımda tedavi gördü, bir kısmı da vefat etti [3].

Pandemide sağlık hizmeti sunumunda yer alan ve canı pahasına salgının kontrol altına alınmasında en büyük pay sahibi olan sağlık çalışanlarıdır. Bu çalışmada sağlık emekçilerinin COVID-19 hastalığı ve aşılamayla ilgili yaklaşım ve davranışlarının belirlenmesi amaçlandı.

2. Materyal ve Metot

Çalışmamız 1-31 Mart 2022 tarihleri arasında Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanesinde görevli sağlık çalışanlarına gönüllülük esasına dayalı olarak Google formlar üzerinden oluşturulan 44 soruluk anketin Whatsapp uygulaması ile telefon üzerinden gönderilmesi ve anketi tamamlayanlardan veriler toplanarak yapıldı. Çalışmamızın evreni hekimler ve yardımcı sağlık personelinde oluşmaktaydı. Anket formu; sağlık çalışanlarının sosyodemografik bilgilerini, çalıştıkları birimi, COVID-19 ile ilgili görüşleri, kendi veya ailesinde COVID-19 enfeksiyonu geçirme, yoğun bakımda kalma ve vefat durumlarını, COVID-19 aşısı olma, yan etkileri ve aşılardan ilgili yaklaşım ve davranışlarını sorgulayan 44 adet sorudan oluşmaktaydı. Çalışma için T.C. Sağlık Bakanlığı'ndan ve hastanemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 11.02.2022 tarih ve 51 karar numarasıyla onay alındı. Helsinki Deklarasyonu Prensipleri'ne uyuldu.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS 26.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, ABD) kullanılarak yapıldı. Ortalamalar ve standart sapmalar hesaplandı. Değişkenlerin karşılaştırılmasında ki-kare testi kullanıldı, $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. Bulgular

Çalışmamıza sağlık personeli olan toplam 311 kişi katıldı. Katılımcıların 209'u kadındı (%67,2). Ortanca yaşları 36 (min-max:22-60) idi. Katılımcılar arasında eğitim düzeyi olarak en çok üniversite mezunu 203 (%65,3) ve meslek olarak hekim 159 (%51,1) vardı. Katılımcıların çalıştıkları yerler en sık %61,4 poliklinik, %48,6 servis ve %27 yoğun bakımda şeklindeydi.

Sağlık çalışanların 187'sinin (%60,1) çocuğu vardı ve hanesinde ortalama $3,1 \pm 1,44$ kişi (min-max:1-10) yaşamaktaydı. Sağlık çalışanların 51'inin (%16,4) kendisinde, 84'ünün (%27) hanesinde yaşayanlarda kronik hastalık vardı. Kronik hastalık olarak görülen en sık hastalık 14'ünde (%27,5) hipertansiyondu. Sağlık çalışanlarının özellikleri Tablo 1'de verildi.

Tablo 1: Katılımcıların sosyo demografik özellikleri

Eğitim Düzeyi	n	%
Üniversite	203	65,3
Lisansüstü	77	24,8
Lise,	28	9
Ortaokul	3	1
Meslek	n	%
Hekim	159	51,1
Hemşire	67	21,5
Sekreter	37	11,9
Büro personeli	32	10,3
Temizlik personeli	10	3,2
Eczacı	6	1,9
Kronik Hastalıklar	n	%
Hipertansiyon	14	27,5
Diyabet	11	21,6
Kalp hastalığı	9	17,6
Endokrin problemler	9	17,6
Astım	8	2,6
Romatolojik	8	2,6

Nörolojik	3	0,96
Bağışıklık problemi	1	0,32
Psikiyatrik problem	1	0,32
Malignite	1	0,32

Katılımcıların 176'sı (%56,6) COVID-19 enfeksiyonun laboratuvarında üretilen bir virüs veya biyolojik bir silah olduğuna inanıyordu, 140'ı (%45) 2-3 yıl, 98'i (%31,5) 4-5 yıl, 35'i (%11,3) 6-10 yıl, 29'u da (%9,3) 11 yıl ve üzerinde enfeksiyondan kurtulacağımız düşüncesindeydi.

Sağlık çalışanların 141'i (%45,3) COVID-19 enfeksiyonu geçirmişti. 53'ü (%37,6) aşı bulunmadan önce geçirmişti. COVID-19 enfeksiyonu geçirmeden önce aşı olmayan 80 kişi vardı. Bunların 53'ünün sebebi (%66,2) aşı bulunmadığı, 27'si de (%33,8) kendisi aşı olmayı istemediği içindi. Kendisi aşı olmak istemeyen 27 kişiden 9'unun (%33,3) enfeksiyon sonrası aşı yaptırmaya düşüncesinde pozitif yönde değişiklik olduğu görüldü. Sağlık çalışanlarından 1'i COVID-19 bağlı gelişen durumlar nedeniyle yoğun bakımda kalmıştı. Sağlık çalışanlarının 176'sının (%56,6) ailesinden biri COVID-19 enfeksiyonu geçirmiş, 23'ünün (%7,4) ailesinden biri enfeksiyona bağlı yoğun bakımda kalmış ve 22'sinin (%7,1) de ailesinden biri enfeksiyona bağlı vefat etmişti. Ailesinden biri COVID-19 enfeksiyonuna bağlı yoğun bakımda kalan veya vefat eden toplam 32 sağlık çalışanından 14'ünün (%43,8) aşı olma kararı bu durum sonrası aşı olma yönünde değiştiği saptandı.

Sağlık çalışanlarının 304'ü (%97,7) aşı olmuştu. 141'i (%45,3) 4 tane, 64'ü (%20,6) 5 tane, 64'ü (%20,6) 3 tane, 29'u (%9,3) 2 tane ve 6'sı (%1,9) toplamda 1 aşı olmuştu. Sağlık çalışanlarının 267'sinin (%85,9) hanesindeki veya yaşadığı yerdeki tüm bireyler COVID-19 aşısı olmuştu ve 292'si (%93,9) COVID-19 aşısını yakınlarına öneriyordu. Aşı olan 304 sağlık çalışanından 211'inde (%67,8) en az bir yan etki gelişti. En sık görülen yan etki 156 (%73,9) halsizlikti. Aşı yan etkileri Tablo 2'de verildi. Yan etkiler 186'sında (%59,8) Biontech, 24'ünde (%7,7) CoronaVac, 1'inde (%0,3) Turkovac ve 6'sında (%1,9) hem Biontech hem de CoronaVac aşısı sonrası görüldü.

Tablo 2: Aşıya bağlı görülen yan etkiler

Aşı yan etkileri	n	%
Halsizlik	156	73,9
Kas ağrısı	148	70,1
Lokal kızarıklık ve ağrı	95	45
Ateş	69	32,7
Burun akıntısı	19	9
Öksürük	10	4,7
Baş ağrısı	7	3,3
Otonom sinir sistem bulguları	7	3,3
Kusma-ışhal	6	2,8
Lenfadenopati	5	2,3
Yürüyememe	4	1,9
Kalp kasi tutulumu	3	1,4
Serebrovasküler olay	1	0,47

Sağlık çalışanlarına seçenek verilseydi ilk hangi aşığı olurdu sorusuna 218'i (%70,1) Biontech, 60'ı (%19,3) CoronaVac, 23'ü (%7,4) Turkovac, 6'sı (%1,9) uzun araştırmalardan geçmiş bir aşığı ve 4'ü (%1,3) Moderna'yı olmak istediğini belirtti. Katılımcılardan Turkovac aşısına güvenen 131 (%42,1) kişi vardı. COVID-19 ile ilgili bilgileri nerden edindikleri sorulduğunda %74,3 Sağlık Bakanlığı, %62,7 hekimler, %49,8 ilgili akademik yayınlar, %41,8 televizyon ve gazete, %33,8 sosyal medyadan olduğunu belirtti.

Toplum sağlığı açısından aşının zorunlu olması gerektiğini düşünenlerin oranı %83,3 ve çocuğunuza aşı yaptırır mısınız sorusuna olumlu cevap verenlerin oranı %72,7 idi. Kronik hastalık varlığı veya kronik hastalığı olduğunu düşünceleri durumunda aşı olma kararınızı etkiler mi sorusuna %50,2, hanenizdeki veya yaşadığınız ortamdaki kişilerin kronik hastalığı olsa bu durum aşı olma kararınızı etkiler mi sorusuna %54, sağlık sektöründe (riskli ortamda) çalışmanız aşı olma kararınızı etkiledi mi sorusuna %74 ve çalıştığınız ortamda gördüğünüz sıkıntılı COVID-19 hastaları aşı olma kararınızı etkiledi mi sorusuna ise %68,8 kişi evet cevabını verdi. Sağlık çalışanlarının 183'ü (%58,8) COVID-19 aşısı ile pandeminin biteceğine, 250'si (%80,4) COVID-19 aşısı ile hasta sayısının azalacağına inanıyordu. COVID-19'dan önce yıllık grip aşısı olanların oranı %20,9 iken sonrasında %16,1'e düştüğü görüldü. Sağlık çalışanları arasında COVID-19 aşısına karşı kararsızlığı arttıran nedenler arasında en sık aşılardan yan etkilerine yönelik duyulan endişe (%74) yer alıyordu. Sağlık çalışanları arasında COVID-19 aşısına karşı kararsızlığı arttıran nedenler Tablo 3'te verildi.

Tablo 3: Katılımcılarda COVID-19 aşısına karşı kararsızlığı arttıran nedenler

Sağlık çalışanlarında COVID-19 aşısına karşı kararsızlığı arttıran nedenler	n	%
Aşıların yan etkilerine yönelik duyulan endişe	230	74
Aşıların içeriğine güvenmeme	192	61,7
Sosyal medya	187	60,1
Toplumda rol model kabul edilenlerin aşılar hakkındaki olumsuz ifadeleri	159	51,1
İlaç-aşı şirketleri hakkında olumsuz düşüncelere sahip olma	126	40,5
Geleneksel tıp sempatizanlarının aşılar hakkındaki düşünceleri	125	40,2
Cehalet	40	1,3
Bencillik ve toplum bilinci olmaması	20	0,6
Dini ve hurafe bilgiler	10	0,3
Saklama koşullarına duyulan güvensizlik	10	0,3

Çalışanlar eğitim düzeyine göre ilköğretim, ortaokul, lise eğitimi alanlar temel eğitim grubu ve üniversite ile lisansüstü eğitim alanlar lisans grubu olarak ikiye ayrılarak değerlendirildi. Çalıştığı birimin sağlık hizmeti olması ve çalıştığı ortamda gördüğü sıkıntılı COVID-19 hastaları bulunması lisans eğitimi alan gruptakilerde aşı olma kararının istatistiksel olarak pozitif yönde etkilendiği görüldü (p:0.000, p:0.003). Ayrıca lisans eğitimi alan gruptakilerin COVID-19 aşısı ile pandeminin biteceğine inanma ve COVID-19 aşısı ile hasta sayısının azalacağını düşünme oranı temel eğitim grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksekti (p:0.005, p:0.000). Sağlık çalışanları hekim ve hekim dışı sağlık personeli şeklinde incelendiğinde hekim grubunda çocuğuna aşı yaptırmama, aşı ile pandeminin biteceği inancı, aşı ile hasta sayısının azalacağı inancı ve yakınlarınıza aşı önerir misiniz sorusuna pozitif cevap verenlerin oranı istatistiksel olarak daha yüksekti (p:0.000, p:0.016, p:0.000, p:0.001).

4. Tartışma ve Sonuç

Gözle göremediğimiz mikroskobik canlılar sonucu oluşan pandemiler ülkelerin özellikle sağlık sistemi başta olmak üzere ekonomisinden, eğitim sistemine kadar her bakımdan derin izler bırakır. Sosyal yaşam tarzlarının değişimine neden olarak toplumların psikolojisini ve yaşamlarını derinden etkileyebilir. Bu dönemlerde enfeksiyon kontrolünde en önemli rolü hastalarla yakın temas halinde olan sağlık personeli üstlenmiştir. COVID-19 pandemisinde sağlık personelleri olağanüstü koşullarda ve uzun saatler çalışmak durumunda kalmıştır [4].

Yılmaz ve ark.'larının çalışmasında sağlık çalışanları arasında COVID-19'un laboratuvar ortamında üretildiğini düşünenlerin oranı %47,7 ve biyolojik silah olduğunu düşünenler ise %45,9 saptanmıştır [5]. Çalışmamızda ise bu inanış daha yüksek %56,6 saptandı.

Aloğlu ve ark.'larının çalışmasında kendisi ya da akrabaları COVID-19 geçirenler %63,4, COVID-19 tedavisi alanlar %62,32, akraba ya da yakın çevresinde COVID-19 nedeniyle vefat edenler %42,8 oranında bildirilmiştir [4]. Sağlık Bakanı Koca'nın açıklamasında sağlık çalışanlarında COVID-19

pozitiflik oranı %10,3, Figueira ve ark.'larının çalışmasında %11 bulunmuştur [6,7]. İtalya'da yapılan bir çalışmada COVID-19 kliniklerinde görevli sağlık çalışanlarının ilk iki ay içinde %20'sinin enfekte olduğu bildirilmiştir [8]. Çin'de yapılan bir çalışmada ise sağlık çalışanlarında hastalık oranı %3,8 saptanmış ve bunların yaklaşık %15'inin hastalığı ciddi düzeyinde geçirdiği tespit edilmiştir [9]. Çalışmamızda sağlık çalışanlarından kendisi COVID-19 enfeksiyonu geçirenlerin oranı %45,3 ve ailesinde biri geçirenlerin oranı %56,6 idi. Sağlık çalışanlarından %7,4'ünün ailesinden biri enfeksiyona bağlı yoğun bakımda kalmıştı ve %7,1'nin de ailesinden biri enfeksiyona bağlı vefat etmişti.

Kurtuluş ve ark.'larının [10] Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde sağlık çalışanları arasında yaptıkları anket çalışmasında aşı yaptırmak isteyen sağlık çalışanlarının oranı %53,6, Shaw ve ark.'larının [11] New York eyaletindeki bir üniversite hastanesinde yaptıkları anket çalışmasında %57,5, Gagneux-Brunon ve ark.'larının [12] Fransa'da yaptıkları bir anket çalışmasında da %76,9 olarak tespit edilmiştir. Kabul oranı en yüksek meslek grubu %92 ile doktorlar ve %96 ile fizyoterapistler yer almaktayken, en düşük %65 ile hemşireler ve %60 ile yardımcı hemşirelerdir. Ülkemizden Kader ve ark.'larının [13] çalışmasında COVID-19 aşısı olma isteği %83 ile en fazla doktorlarda iken %37,7 ile en az hemşirelerde saptanmıştır. Yaş arttıkça aşı olma isteğinin arttığı gözlenmiştir. Ayrıca sağlık çalışanlarının %58'i aşığı ailelerine önereceğini belirtmiştir. Dünya nüfusunun %65'i en az bir doz COVID-19 aşısı olmuştur. Dünya çapında 11.48 milyar doz aşı uygulanmış ve her gün 10.76 milyon doz aşı uygulanmaktadır. Dar gelirli ülke insanların ise sadece %15,2'si en az bir doz aşı olmuştur [14]. Çalışmamızda sağlık çalışanlarının %97,7'si aşı olmuştur. Çalışmaların çoğunluğu (%45,3) toplamda 4 tane aşı olmuş ve %93,9'u COVID-19 aşısını yakınlarına öneriyordu. Buradan sağlık çalışanlarının COVID-19 aşılarını yüksek oranda yaptırdığı ve topluma rol model olmak anlamında örnek bir davranış sergiledikleri söylenebilir.

Aloğlu ve ark.'larının çalışmasında katılımcıların %47'si ilk sırada yerli aşı Turcovac, ikinci sırada %24,7 ile Alman Biontech aşısı, üçüncü sırada %20,5 ile Çin CoronaVac aşısını tercih etmişti [4]. Lin ve ark.'larının Çin'de yaptıkları bir anket çalışmasında yerli aşı isteyenlerin oranı %48,7 olarak bulunmuştur [15]. Yılmaz ve ark.'larının çalışmasında katılımcılar %64,3 ile Türkiye, %51,3 ile Almanya ve %23 ile İngiltere kaynaklı aşığı yaptırmak istediklerini belirtmişlerdir [5]. Erdem ve ark.'larının yaptığı ankette %46,8 ile Türkiye, %12,2 ile Almanya, %5,1 ile Küba ve %2,9 ile İsviçre (%2,9) kaynaklı aşı tercih edilmiştir [16]. Çalışmamızda diğer çalışmalardan farklı olarak ilk hangi aşığı olurdunuz sorusuna sağlık çalışanları %70,1 ile Biontech ve %19,3 ile CoronaVac en sık alınan cevaplardı. Buradan sağlık çalışanlarımız arasında aşı geliştirilmesinde Türk bilim adamlarının da yer aldığı Biontech aşısına güvenin yüksek olduğu söylenebilir.

Giao ve ark.'larının çalışmasında hekimlerin COVID-19 ile ilgili bilgilerini %91,1 sosyal medya, %82,6 Sağlık Bakanlığı ve %79,2 televizyondan edindiği görülmüştür [17]. Bhagavathula ve ark.'larının yaptığı başka bir çalışmada da %61'i sosyal medyadan ve resmi kamu sitelerinden edindiğini belirtmiştir [18]. Başka bir çalışmada bilgiye ulaşma yolu olarak önceki çalışmalarda farklı akademik yayın takibi bulunmuştur [19]. Çalışmamızda COVID-19 ile ilgili bilgileri nerden edindikleri sorulduğunda en sık %74,3 ile Sağlık Bakanlığı cevabı alındı.

İngiltere'de 2020 yılında yapılan bir çalışmada sağlık personelinde pozitiflik oranı %14 saptanmıştır. Bu oran salgın başlangıcında %5 iken sonrasında %29 a kadar yükselmiştir [20]. Tayland'da yapılan çalışmada kronik hastalığı olan katılımcıların bilgi düzeyleri ve tutumlarının olmayanlara göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir [21]. Başkol ve ark.'larının çalışmasında da COVID-19 enfeksiyonu nedeniyle hayatını kaybeden yakını/tanıdığı olmasının da aşığı olmaya teşvik edebilecek bir etken olabileceği düşünülmüştür [19]. Çalışmamızda sağlık çalışanları kronik hastalık varlığı veya kronik hastalığı olduğunu düşünmeleri durumunda aşı olma kararlarını %50,2, hanenizdeki veya yaşadığınız ortamdaki kişilerin kronik hastalığı olması aşı olma kararlarını %54 ve sağlık sektöründe (riskli ortamda) çalışma aşı olma kararlarını %74 pozitif yönde etkileyeceği cevabını verdi.

Başkol ve ark.'larının çalışmasında 2019-2020 sezonunda İnfluenza aşısı olanların oranı %21,2, 2020-2021 sezonunda %45,3 saptanmıştır. Koronavirüs aşısı için endişeler devam ederken diğer pnömokok ve İnfluenza gibi aşılarla yönelik de gönüllülük oranlarının arttığı görülmüştür [19]. Literatürden farklı olarak çalışmamızda COVID-19'dan önce yıllık grip aşısı olanların oranı %20,9 iken sonrasında %16,1'e düştüğü görüldü. Tunçer ve ark.'larının çalışmasında katılımcıların %46,6'sı aşının zorunlu olması gerektiğini belirtmiştir [22]. Çalışmamızda ise toplum sağlığı açısından aşının zorunlu olması gerektiğini düşünenler %83,3 gibi yüksek bir orandaydı. Cihan ve ark.ları pandemide aktif rol üstlenecek sağlık çalışanı adaylarında COVID-19'un yayılımının önlenmesi ve kontrol altına

alınabilmesi için hiyerarşik bilgi tabanlı öğretimin modeli önerilmiştir [23]. Buradan sağlık öğrencilerinin doğru yetiştirilmesiyle hem hizmet sunumunda hem de topluma örnek olma açısından büyük bir adımın atılabileceği söylenebilir.

Sonuç olarak sağlık çalışanları arasında COVID-19 aşısı olma oranı ve Alman menşeli aşıya olan güven yüksekti. COVID-19 aşısı ile pandeminin biteceği veya hasta sayısının azalacağı inancı bu oranın yüksek olmasında etken olabilir. Sağlık çalışanlarının yüksek aşılanma oranları ile topluma rol model olmak anlamında örnek bir davranış sergiledikleri söylenebilir.

Etik Beyanı

Bu çalışmada, "Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi" kapsamında uyulması gerekli tüm kurallara uyulduğunu, bahsi geçen yönergenin "Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiğine Aykırı Eylemler" başlığı altında belirtilen eylemlerden hiçbirinin gerçekleştirilmediğini taahhüt ederiz.

Kaynakça

- 1- World Health Organization. Director-General's remarks at the media briefing on 2019-nCoV on 11 February 2020. <http://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-remarks-at-the-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020> (Accessed on February 12, 2020).
- 2- World Health Organization. Weekly epidemiological update on COVID-19- 12 April 2022. <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-COVID-19-12-april-2022> (Accessed on April 15, 2022)
- 3- Pruc M, Golik D, Szarpak L, Adam I, Smereka J. COVID-19 in healthcare workers. Am J Emerg Med. 2021;39:236. doi: 10.1016/j.ajem.2020.05.017. Epub 2020 May 8. PMID: 32414525
- 4- Aloğlu N, Dönmez M. Investigation of Attitudes and Behaviours Towards COVID-19 Pandemic and Vaccine in Turkey with Some Variables. Usaysad Derg, 2021;7(3):520-535
- 5- Yılmaz Hİ, Turgut B, Çıtak G, Mert O, Paralı B, Engin M. People's View of COVID-19 Vaccine in Turkey. Dicle Med J. 2021;48(3):583-594
- 6- Medimagazin.com. Sağlık Bakanlığı, Basın Açıklaması. Fahrettin Koca ilk kez sayı verdi: 29 bin 865 sağlık çalışanı enfekte. (Accessed on April 15, 2022). Available from: <https://www.medimagazin.com.tr/guncel/genel/tr-fahrettinkoca-ilk-kez-sayi-verdi-29-bin-865-saglik-calisani-enfekte-11-681-91089.html>
- 7- Folgueira MD, Munoz-Ruiperez C, Alonso-Lopez MA, Delgado R. SARS-CoV-2 infection in Health Care Workers in a large public hospital in Madrid, Spain, during March 2020. medRxiv. 2020. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.07.20055723>
- 8- Lahner E, Dilaghi E, Prestigiacomo C, et al. Prevalence of SarsCov-2 infection in health workers (HWs) and diagnostic test performance: The experience of a teaching hospital in central Italy. Int J Environ Res Public Health. 2020;17(12):4417.
- 9- Nguyen LH, Drew DA, Graham MS, et al. Risk of COVID-19 among front-line health-careworkers and the general community: A prospective cohort study. Lancet Public Health. 2020; 5(9):e475-483
- 10- Kurtuluş Ş, Can R. What do health care professionals think about COVID-19 vaccine applications: A university example. Harran Univ Tıp Fak Derg. 2021;18(1):29-34
- 11- Shaw J, Stewart T, Anderson KB, et al. Assessment of U.S. health care personnel attitudes towards COVID-19 vaccination in a large university health care system. Clin Infect Dis. 2021;73(10):1776-1783
- 12- Gagneux-Brunon A, Detoc M, Bruel S, et al. Intention to get vaccinations against COVID-19 in French healthcare workers during the first pandemicwave: a cross-sectional survey. J Hosp Infect. 2021;108:168-173
- 13- Kader Ç, Erbay A, Demirel MS, Kocabıyık O, Çiftçi E, Yalçın Çolak N. Evaluation of Attitudes and Behaviors of Healthcare Professionals towards COVID-19 Vaccination. Klimik Dergisi 2022;35(1):30-35

- 14- Coronavirus (COVID-19) Vaccinations. <https://ourworldindata.org/COVID-19-vaccinations>. (Accessed on April 20, 2022)
- 15- Lin Y, Hu Z, Zhao Q, Alias H, Danaee M, Wong LP. Understanding COVID-19 vaccine demand and hesitancy: A nationwide online survey in China. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14(12): e0008961.
- 16- Giriřim Araştırma. Kovid-19 aşı anketi sonuğlandı. 11 Aralık'ta yapılacak in aşısına güven %1,9, retim aşamasındaki Türk aşısına %46,8. Independent Türkçe; Aralık 2, 2020. <https://www.indyturk.com/node/280201/haber/kovid-19-aşı-anketi-sonuğlandı...-11-aralıktayapılacak-in-aşısına-güven-retim>. (Accessed on April 20, 2022)
- 17- Giao H, Le An P, Thi Ngoc Han N, Van Khanh T, Kim Ngan V, Van Tam V. Knowledge and attitude toward COVID-19 among healthcare workers at District 2 Hospital, Ho Chi Minh City. *Asian Pac J Trop Med*. 2020;13:6-11.
- 18- Bhagavathula AS, Aldhalei WA, Rahmani J, Mahabadi MA, Bandari DK. Novel Coronavirus (COVID-19) Knowledge and Perceptions: A Survey of Healthcare Workers. medRxiv <https://doi.org/10.1101/2020.03.09.20033381>
- 19- Başkol D, Akyol D, Tařbakan SE, Pulluku H, Iřıkgz Tařbakan M. Evaluation of knowledge levels and other adult vaccines situations who vaccinated for coronavirus vaccine in Ege University Faculty of Medicine Hospital. *Ege Journal of Medicine*. 2021;60(4):412-417.
- 20- Black JRM, Bailey C, Swanton C. COVID-19: the case for health-care worker screening to prevent hospital transmission. *The Lancet*. 2020;395(10234):1418-20. (doi: 10.1016/S0140-6736(20)30917-X).
- 21- Srichan P, Apidechkul T, Tamornpark R et al. Knowledge, attitudes and preparedness to respond to COVID-19 among the border population of northern Thailand in the early period of the pandemic: a crosssectional study. *WHO South-East Asia Journal of Public Health*, 2020;9(2):118-125.
- 22- Tuner J, Karka A. Evaluation of Dentists' Attitudes Towards the COVID-19 Pandemic and Vaccine. *Van Dentistry Journal* 2021;2(2):11-23
- 23- Cihan E, řahbaz Piriņi C, Gerek H, nvar BS, Demirdel E. The Knowledge Levels, Preventive Behavior And Risk Perception On COVID-19 of The Healthcare Students In Turkey. *Sd Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. 2020;11(3):342-347

Determining Nurses' Professional Image Perceptions:

A Descriptive Cross-Sectional Study

Hemşirelerin Mesleki İmaj Algılarının Belirlenmesi:

Tanımlayıcı-Kesitsel Bir Araştırma

Merve TARHAN^{1*}, Pinar DOĞAN¹, Esengül ELİBOL²

¹ Istanbul Medipol University, Health Sciences Faculty, Nursing Department, Istanbul, Türkiye

² Istanbul Bilgi University, Health Sciences Faculty, Nursing Department, Istanbul, Türkiye

ABSTRACT

Objective: The nursing image is built on a tripod of the public, nursing students, and nurses. Determining how each leg of this tripod perceives the nursing is crucial to improving the professional image. This study aimed to determine the nursing image perceptions among nurses at a private hospital group in Istanbul.

Material-Method: This descriptive-cross-sectional study was carried out with 428 nurses at four private hospitals affiliated with a foundation university in Istanbul. Data were collected through a random sampling method using a self-administered questionnaire, including a personal information form, and The Image Scale for Nursing Profession. Data analysis was performed using descriptive statistics, Mann-Whitney U test, and Kruskal Wallis-H variance analysis.

Results: Nurses generally perceived the nursing image as positive with a median score of 169 (160-177) out of 210. Nursing image for gender and professional status subscales was perceived more negatively than others, with median scores of 23 (19-28) and 19 (17-22), respectively. Nurses who were female ($p=0.007$), younger than 22 years ($p=0.001$), unwilling to re-choose nursing as a career ($p=0.001$), had professional experience less than a year ($p=0.002$), and worked more than 55 hours a week ($p=0.000$) perceived nursing image more negatively.

Conclusion: The results of this study showed that nurses working at a private hospital group had positive perceptions of the nursing image at a high level, except in terms of gender and professional status. Reflecting a gender equality perspective on nursing management, employing only undergraduate nurses for nursing, and planning an effective work schedule are recommended.

Keywords: History of nursing, nurses, nurses' role, nursing

Alınış / Received: 15.04.2022 Kabul / Accepted: 04.11.2022 Online Yayınlanma / Published Online: 20.12.2022



Ö Z E T

Amaç: Hemşirelik imajı, genel olarak toplum, hemşirelik öğrencileri ve hemşireler olmak üzere üçlü bir saç ayağı üzerine kurulmuştur. Her saç ayağının hemşireliği nasıl algıladığını belirlemek, mesleki imajı geliştirmek için oldukça önemlidir. Bu araştırmada, İstanbul'da özel bir hastane grubunda çalışan hemşirelerin hemşirelik imajı algılarını belirlemek amaçlanmıştır.

Materyal-Metot: Tanımlayıcı- ilişki arayıcı araştırma, İstanbul'da özel bir vakıf üniversitesine bağlı dört hastanede çalışan 428 hemşire ile gerçekleştirilmiştir. Kişisel Bilgi Formu ve Hemşirelik Mesleğine Yönelik İmaj Ölçeğini içeren öz bildirim dayalı bir anket aracılığıyla rasgele örnekleme yöntemi kullanılarak veriler toplanmıştır. Verilerin analizinde tanımlayıcı istatistikler, Mann-Whitney U testi ve Kruskal Wallis-H varyans analizi kullanılmıştır.

Bulgular: Hemşireler, 210 puan üzerinden 169 (160-177) medyan puanı ile genel olarak hemşirelik imajını olumlu olarak algılamıştır. Cinsiyet ve mesleki statü alt boyutlarına yönelik hemşirelik imajı, sırasıyla 23 (19-28) ve 19 (17-22) medyan puanları ile diğer alt boyutlara göre daha olumsuz algılanmıştır. Kadın ($p=0,007$), 22 yaşından genç ($p=0,001$), mesleki deneyim süresi bir yılın altında olan ($p=0,002$), haftada 55 saatten fazla çalışan ($p=0,000$) ve hemşireliği kariyer olarak tekrar seçmek için isteksiz olan ($p=0,001$) hemşirelerin, hemşirelik imajını daha olumsuz algıladıkları belirlenmiştir.

Sonuç: Bu çalışmanın sonuçları, özel bir hastane grubunda çalışan hemşirelerin, cinsiyet ve mesleki durum dışında, hemşirelik imajına ilişkin olumlu algılarının yüksek düzeyde olduğunu göstermiştir. Hemşirelik yönetimine toplumsal cinsiyet eşitliği bakış açısının yansıtılması, hemşirelik için sadece lisans hemşirelerin istihdam edilmesi ve etkin bir çalışma takviminin planlanması önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Hemşirelik tarihi, hemşireler, hemşirenin rolü, hemşirelik



1. Introduction

The nursing profession has the highest level of interaction with the public and plays a key role in providing quality and safe healthcare, with nearly 28 million members comprising 59% of the global healthcare workforce [1]. Despite this strategic importance, the professional image is still among the global problems of nursing.

Nursing image is defined as the sum of beliefs, views, and observations about nurses and nursing [2]. Studies with nursing students and nurses in different geographical regions reported that nursing image is a significant ongoing problem. As a result of these studies, nursing has been defined as a job rather than a profession that helps physicians, has negative working conditions, cares, and cleans, is low paid, limited career opportunities, and low social status, value, and prestige. In addition, nurses and nursing students are perceived as women, altruistic, helpful, obedient, and dependent [3-7]. However, the media often portray nurses and nursing with stereotypes of angels of mercy, the sexual object, the physician's handmaiden, and battle-axe, highlighting femininity and powerlessness [4-6]. A negative public nursing image threatens the quality and safety of healthcare by affecting nurses' competence development, mental health, work behaviours, and job satisfaction [6-8]. Besides, such a negative image perception may result in a more powerless workforce providing healthcare services to the public in the future by causing less qualified and reluctant candidates to choose nursing as a career [9]. As a result, a negative image affects nursing candidates and members negatively and is negatively reflected in the public's perceptions of the nursing image.

Türkiye had less than three nurses per 1.000 population, which was the lowest number of nurses among the Organization for Economic Cooperation and Development countries in 2018 [10]. Therefore, attempts to increase the number of nurses for the ideal nursing workforce in recent years have led to

qualitative differences among nurses. Although nursing education was started at the undergraduate level in Türkiye in 1955, health vocational high schools continued to educate nurses simultaneously until 2014. In the same year, graduates of health vocational high schools were given the title of assistant nurse and their duties, authorities and responsibilities were defined legally [11]. Therefore, today's nursing workforce consists of members who graduated from undergraduate programs and secondary education in Türkiye. Midwives who graduated from undergraduate programs perform nursing roles and responsibilities in different working units despite having job descriptions in the neonatal unit, maternity unit, and gynaecology wards. Emergency medicine, dialysis, operating room, and elderly care technicians who graduate from associate programs perform nursing duties and authority in working units other than job descriptions [12]. As a result, nursing services in Türkiye are provided to the public by nurses and health employees graduating from secondary education, associate programs, and undergraduate programs.

Studies in different geographical regions and different periods in Türkiye reported that nursing students and the Turkish public had moderate positive perception levels of nursing image [13-20]. In a study of eleven Turkish films, nursing was defined as a profession that lacks professional autonomy, ignores independent roles, and helps physicians [21]. As a result, the nursing image is built on a tripod of the public, nursing students, and nurses. Determining how each leg of this tripod perceives the nursing and nurses is crucial to improving the nursing image. Previous studies have examined nurses' perceptions of the nursing image working at public hospitals in Istanbul [22], in the paediatric units of public and university hospitals in Ankara [23], and in the surgical units of a private hospital in Istanbul [24]. However, studies on nurses' perceptions of the professional image at private hospitals are limited in Türkiye. From this point of view, the study was carried out to determine the nursing image perceptions among nurses at a private hospital group in Istanbul. This study aimed to answer the following questions:

- What is the level of the nursing image perceptions among nurses?
- Does the level of the nursing image perceptions change through the personal characteristics of nurses?

2. Material and Method

Design and Setting

A descriptive, cross-sectional study was conducted from January to March 2019, in Türkiye. The study setting included four private hospitals located in Istanbul. Private hospitals are equipped with over 300 beds in emergency services, paediatric, gynaecology, internal medicine, and surgery, as well as coronary, adult, and paediatric intensive care units. Further, these hospitals are affiliated with a foundation university in Istanbul.

Sample and Participants

The population consisted of all nurses working at the time of the study and meeting the inclusion criteria: (a) to be a full-time nurse, (b) to be employed for at least three months, and (c) willing to participate in this study. The exclusion criterion was an incomplete filling of the study instrument. The sample size was calculated using an online sample size calculator at <https://clincalc.com/stats/samplesize.aspx>. The sample size was determined as 417 nurses according to a previous study (24), based on 95% confidence level and a 5% margin of error. Questionnaires were distributed to 493 nurses using a random sampling method to allow for a non-response level of approximately 20%.

Instruments

Data were collected using a self-administered questionnaire including a personal information form, and Image Scale for Nursing Profession.

A personal information form is designed by researchers to question personal characteristics. These characteristics included age, gender, marital status, education level, length of professional and institutional experience, working shift, working unit, work position, working hours a week, and willingness to re-choose nursing as a career.

The Image Scale for Nursing Profession, developed by Dost and Bahcecik (2015), was used to determine nurses' perceptions of the nursing image. It consists of 42 items and six subscales:

professional qualifications (11 items), working conditions (10 items), gender (8 items), education (5 items), professional status (5 items) and appearance (3 items). Each item is rated on a 5-point Likert scale with ranges from "1=strongly disagree" to "5=strongly agree". Fifteen items are reverse-scored. The total score is created by summing and ranges from 42 to 210. Higher scores indicate positive perceptions of the nursing image. Cronbach's alpha coefficient for the original version was 0.88 [25].

Data Collection

Researchers reached out to nurses at shift change. Researchers gave the questionnaires to the nurses at the beginning of the shift. At the end of the shift, the researchers received from nurses the completed questionnaires. The mean response time for the questionnaires was determined as 10-15 minutes. Overall, 493 nurses completed the questionnaire (response rate: 86.8%), although 63 filled questionnaires incompletely were excluded. Consequently, 428 questionnaires were analyzed.

Ethical Considerations

The study protocol was approved by the Non-Invasive Research Ethics Committee, Istanbul Medipol University (Date: 14.11.2018; Decision Number: 662) and written approval was obtained from the hospitals to collect data. The personal characteristics of nurses' identities remained confidential, and each nurse's anonymity was assured by assigning each nurse a code number. Participation in this study was voluntary; participants were informed about this study verbally and gathered consent forms.

Data Analysis

Data analysis was performed using Statistical Package for Social Sciences (SPSS, Version 25.0) at a significance level of $p < 0.05$. The personal characteristics of nurses were summarized into numbers with percentages. As a result of the Kolmogorov-Smirnov test, the Image Scale for Nursing Profession showed non-normal distribution ($p < 0.05$). The score of the scale was reported as the median score (Q1-Q3). The mean rank of two independent groups was compared with the Mann-Whitney U test, as Kruskal Wallis-H analysis of variance was used to compare more than two independent groups. The internal consistency of the scales was calculated by Cronbach's alpha coefficient.

3. Results

Personal Characteristics

The mean age of nurses was 26.3 years (range: 19-52; SD:5.4) with a small percentage of nurses younger than 22 years (16.8%). Most nurses were female (75.7%) and single (59.1%). More than half of nurses had a health vocational high school level (52.8%). Approximately half of the nurses had 1 to 5 years of professional (40.6%) and hospital (48.4%) experience. Almost two-thirds were willing to re-choose nursing as a career (61.4%). Approximately half of the nurses worked in inpatient services (44.2%), day shifts (42.8%), and 46 to 55 hours a week (52.8%).

Descriptive Results

Table 1: Descriptive results of Image Scale of Nursing Profession (n=428)

Scale and Subscales	Median (Q1-Q3)	Cronbach's Alpha
Image Scale of Nursing Profession (42-210) *	169 (160-177)	0.80
Professional Qualification (11-55) *	50 (46-53)	0.82
Working Conditions (10-50) *	44 (41-46)	0.70
Gender (8-40) *	23 (19-28)	0.75
Education (5-25) *	21 (18-23)	0.70
Professional Status (5-25) *	19 (17-22)	0.73
Appearance (3-15) *	14 (12-15)	0.84

*: Score ranges of the scale and subscales

Table 1 summarized the data on nurses' perceptions towards nursing image as median scores (Q1-Q3). The median score for the nursing image among nurses was 169 (160-177), which was a high level. Similarly, nurses had the highest level of nursing image perceptions on the subscales of appearance

with a median score of 14 (12-15), professional qualifications with a median score of 50 (46-53), working conditions with a median score of 44 (41-46), education with a median score of 21 (18-23). The highest scores on these subscales are 15, 55, 50, and 25 respectively. The nursing image perceptions towards professional status subscale was accepted at a moderate level with a median score 19 (17-22) since the highest score on this subscale is 50. Also, the nursing image perceptions towards gender subscale was at a low level with a median score 23 (19-28) since the highest score on this subscale is 40. In this study, the scale (Cronbach's $\alpha=0.80$) and all subscales (Cronbach's α 0.70-0.84) demonstrated acceptable reliability.

Comparative Results

As presented in Table 2, nurses who were younger than 22 years ($p=0.001$), female ($p=0.007$), unwilling to re-choose nursing as a career ($p=0.001$), had professional experience less than a year ($p=0.002$), and worked 45 hours a week ($p=0.000$) perceived nursing image more negatively. There was no significant difference between nurses' other personal characteristics and perceptions of nursing image ($p>0.05$).

Table 2: Comparative results between personal characteristics and the nursing image perceptions of nurses (n=428)

Personal Characteristics	Image Scale for Nursing Profession	
	Mean Rank	Test and p
Age Groups		
Younger than 22 years ^a	164.24	KW=15.450 p= 0.001 a<b,d
22-25 years ^b	216.30	
26-29 years ^c	230.50	
Older than 30 years ^d	230.62	
Gender		
Female	205.43	Z=-2.678 p=0.007
Male	242.75	
Marital Status		
Married	219.65	Z=-0.716 p=0.474
Single	210.94	
Educational Level		
High school/associate level	207.69	Z=-1,425 p=0.154
Undergraduate/Postgraduate level	225.15	
Professional Experience		
Less than a year ^a	169.35	KW=12.719 p=0.002 a<b,c
1-5 years ^b	224.98	
6 years or more ^c	224.15	
Hospital Experience		
Less than a year ^a	208.78	KW=0.391 p=0.823
1-5 years ^b	216.96	
6 years or more ^c	216.89	
Working Units		
Outpatient units	230.91	KW=4.148 p=0.386
Inpatient units	219.94	
Emergency service	218.47	
Operating room	201.43	
Intensive care unit	192.62	
Working Shift		
Days	218.91	KW=2.630 p=0.269
Nights	192.01	
Rotating	218.43	
Work hours a week		
45 hours ^a	261.27	KW=21.657 p=0.000 c<b<a
46-55 hours ^b	209.72	
More than 55 hours ^c	181.58	
Willingness to re-choose nursing as a career		
Willing ^a	225.26	KW=14.111 p=0.001 b<a,c
Unwilling ^b	161.64	
Unstable ^c	220.55	

KW: Kruskal-Wallis variance analyses Z: Mann-Whitney U test

Table 3: Comparative results between some personal characteristics and nurses' nursing image perceptions towards subscales (n=428)

Personal Characteristics	Professional Qualifications		Working Conditions		Gender		Education		Professional Status		Appearance	
	Mean Rank	Test and p	Mean Rank	Test and p	Mean Rank	Test and p	Mean Rank	Test and p	Mean Rank	Test and p	Mean Rank	Test and p
Age Groups												
Younger than 22 years ^a	212.07	KW=2.886 p=0.410	188.06	KW=15.264 p=0.002 a,b,c<d	185.10	KW=8.263 p=0.041 a<b,c	165.97	KW=16.315 p=0.001 a<b,c,d	180.90	KW=8.241 p=0.041 a<c,d	193.65	KW=3.694 p=0.296
22-25 years ^b	213.97		202.75		224.23		223.16		211.43		211.09	
26-29 years ^c	203.10		212.82		231.06		237.68		224.86		222.36	
Older than 30 years ^d	232.07		256.57		200.58		208.86		232.62		226.32	
Gender												
Female	217.49	Z=-0.880	213.60	Z=-0.265	220.93	Z=-1.889	215.31	Z=-0.238	203.06	Z=-3.368	198.90	Z=-4.724
Male	205.30	p=0.379	217.27	p=0.791	194.71	p=0.059	212.01	p=0.812	249.70	p=0.001	262.49	p=0.000
Professional Experience												
Less than a year ^a	229.82	KW=2.346 p=0.309	151.78	KW=27.936 p=0.000 a<b,c	205.90	KW=3.741 p=0.154	229.36	KW=1.424 p=0.491	186.15	KW=5.483 p=0.064	193.90	KW=2.985 p=0.225
1-5 years ^b	204.89		216.46		204.42		210.00		216.45		221.71	
6 years or more ^c	217.21		240.64		228.28		212.36		225.14		216.51	
Work hours a week												
45 hours ^a	232.31	KW=18.881 p=0.000 b<a,c	204.28	KW=1.518 p=0.468	203.05	KW=14.256 p=0.001 c>a,b	248.48	KW=9.572 p=0.008 a>b,c	265.05	KW=35.701 p=0.000 a>b>c	256.65	KW=15.553 p=0.000 a>b,c
46-55 hours ^b	190.65		213.75		201.05		204.49		217.33		202.96	
More than 55 hours ^c	249.38		225.55		254.02		204.65		161.71		200.41	
Willingness to re-choose nursing as a career												
Willing ^a	226.64	KW=6.619 p=0.037 a>b,c	216.46	KW=0.629 p=0.730	215.14	KW=3.987 p=0.136	216.98	KW=6.293 p=0.043 b<a<c	224.13	KW=8.415 p=0.015 b<a<c	218.94	KW=8.562 p=0.014 b<a<c
Unwilling ^b	194.17		203.33		189.72		181.42		174.62		175.48	
Unsure ^c	195.79		216.62		228.93		229.50		215.10		228.20	

KW: Kruskal-Wallis variance analyses Z: Mann-Whitney U test

Table 3 summarized the comparative results between nurses' personal characteristics and subscales of nursing image. Nurses who were younger than 22 years had lower nursing image perceptions in the subscales of working conditions ($p=0.002$), gender ($p=0.041$), education ($p=0.001$), and professional status ($p=0.041$). Male nurses had higher nursing image perceptions towards professional status ($p=0.001$) and appearance ($p=0.000$). Nurses with less than a year of professional experience had significantly lower perceptions of the nursing image towards working conditions ($p=0.000$). Nurses who worked 46 to 55 hours a week had significantly lower nursing image perceptions towards professional qualifications ($p=0.000$). Also, nurses working more than 56 hours a week had significantly higher perceptions of the nursing image towards gender ($p=0.001$). Nurses working 45 hours a week had significantly higher nursing image perceptions towards education ($p=0.008$), professional status ($p=0.000$), and appearance ($p=0.000$). Whereas nurses who were unwilling to re-choose nursing as a career had significantly lower perceptions in the subscales of education ($p=0.043$), professional status ($p=0.015$), and appearance ($p=0.014$), nurses who were willing had significantly higher perceptions towards professional qualifications ($p=0.037$).

4. Discussion and Conclusion

Determining the professional image perceptions of the nurses is essential to contribute to the consolidating of professional identity and consequently increase the place of nurses in public. Therefore, this study was conducted to determine the nursing image perceptions among nurses at a private hospital group in Istanbul. In this study, nurses perceived the nursing image as highly positive with a median score of 169 (160-177). Studies in other countries have reported different results related to the nursing image perceptions of nurses. Nurses had a highly positive professional image in Egypt, Israel, Iran, and East Africa [7, 26-28], whereas Vietnamese, Nigerian, and Indonesian nurses perceived that the nursing profession has a negative image [29-31]. The nursing image varies globally from country to country. Therefore, nurses may perceive the nursing image more negatively, especially in low-income countries with less advanced health and nursing systems and a shortage of nursing workforce markedly.

Previous studies using the same scale in Türkiye reported lower image perceptions of nurses than this study, at a moderate level [22,23]. However, a study conducted with surgical nurses in a private hospital found that the professional image perceptions of nurses were at a low level. The authors explained the reason for low professional image perception as nurses' short-term professional experiences and patients' needs outside of healthcare [24]. Among nursing students in Türkiye, the professional image was perceived as moderately positive [16-20]. Similarly, studies using another scale reported that the public's perception of the nursing image was at a moderate level in Erzurum, Duzce and Istanbul [13-15]. In the literature, the nursing image perceptions of nurses, nursing students, and the public were lower than in this study. The main aim of private hospitals is to provide quality and safe healthcare services to gain a competitive advantage. The reasons for high professional image perceptions among nurses working in private hospitals may be having a more impressive appearance, performing professional roles and responsibilities more competently, working in more positive conditions, and following current scientific research through continuous education. Supporting this view, nurses in this study had a highly positive perception of the subscales of appearance, professional qualification, working conditions and education in the Image Scale for Nursing Profession, respectively.

Analysis of the subscales of The Image Scale for Nursing Profession revealed that nurses had highly positive perceptions of the other subscales, except for the gender and professional status subscale. Whereas nurses perceived the professional status subscale moderately, the professional image perceptions towards the gender subscale are at a low level.

Previous studies in Türkiye reported different results regarding the gender subscale: the most positive perceptions among nurses working in private hospitals [24], and the most negative perceptions among nursing students [18,19]. Additionally, Tarhan et al. (2020) reported that the Y generation in public perceived male nurses more positively than the other generations and there was no difference between the generations in terms of nurses being female [15]. Considering that three-quarters of the participants in this study were female, nursing is still considered a female-dominated profession in Türkiye. A systematic review reported that male nurses worked more in high-level important units such as emergency departments, intensive care units, and operating rooms rather than in obstetrics and paediatrics [32]. However, a qualitative study in Türkiye showed that males exclude females from advanced career positions in nursing by reflecting gender stereotypes on the profession and using symbolic violence. This strengthens the glass ceiling that limits the career advancement of females in nursing [33]. Additionally, males' perceptions of the nursing image were higher than females' significantly

in this study. Whereas males and females working in public and university hospitals in Türkiye and Israel perceived the nursing image at a similar level [22,23,26] males working in a private hospital had a higher perception of the nursing image than females [24]. Private hospitals had more advanced career opportunities than public and university hospitals. Male nurses may have the advantage of these career opportunities, particularly in managerial positions. Thus, male nurses may gain professional status, more pay, and a positive image. Supporting this view, the professional image perceptions of male and female nurses in this study showed significant differences only in the subscales of professional status and appearance.

Comparing this study, in the professional status subscale, whereas nursing students had similar perceptions [17,19,20] the perceptions of nurses working in private hospitals were lower [24]. Statements in the professional status subscale indicate that professional status is related to public image. Tarhan et al. (2020) highlighted that there was no difference between generations in terms of nursing as a profession with independent practices and high prestige [15]. The residents of Duzce regarded nurses as people carrying out secondary tasks, like assistants to physicians [14]. Sis Çelik et al. (2013) reported that nearly half of the residents in Erzurum partially agreed with the high prestige of nurses in society [13]. Therefore, in this study, nurses may have perceived the professional status subscale more negatively, considering the public image in Türkiye. Abdelrahman (2018) reported that there was a positive relationship between nurses' self-image and public image, and a negative relationship between nurses' self-image and self-esteem [7]. Another study determined that the perceived public image was to affect nurses' work performance and intentions to leave the profession [34]. Additionally, Grinberg and Sela (2022) showed the correlation between the nursing profession's self-image and self-reported good quality of care [26]. As a result, a negative public image may force private hospitals to seek strategies to improve nurses' self-image because of providing quality and safe healthcare services and maintaining the continuity of the nursing workforce.

Previous studies have shown different results regarding the comparative results between age groups and perception of the nursing image. Professional image perceptions of nurses working in public hospitals decrease according to age groups [22]. The professional image perceptions of paediatric nurses between the ages of 41 and 50 working in public and university hospitals were more positive [23]. In a study from Iran, the professional image perceptions of nurses aged 41 and above working in university hospitals were more positive [28]. In all these studies, comparative results between age groups and the professional image perceptions of nurses were reported without any significant difference. However, Aşçı (2019) found that surgical nurses between the ages of 20 and 25 working in a private hospital had significantly lower perceptions of professional image, consistent with the result of this study [24]. In general, nurses' perception of the professional image more positively can be explained by accepting as a member of the profession themselves. According to Higher Education Institution Statistics, undergraduate students in Türkiye are mainly between the years of 18 and 22 [35]. Therefore, most of the nurses younger than 22 years in this study may have graduated from an associate-level or vocational medical high school. Supporting this view, the professional image perceptions of undergraduate and postgraduate nurses were higher than vocational medical high school and associate-level graduates in this study, without any significant difference. In analyses of subscales, there was no significant difference in the subscales of professional qualifications and appearance. The main reason may be that private hospitals focused on patient satisfaction expect nurses at all educational levels to perform similar roles and responsibilities and have a positive appearance. However, the perceptions of nurses younger than 22 years regarding the subscales of gender, education and professional status were significantly lower. It is thought that most nurses in this group graduated from vocational medical high school or associate level. Nurses in this group may have perceived gender, education, and professional status as an unimportant part of the nursing image because they were educated focusing on technical skills rather than professional values and evidence-based practices.

In this study, nurses with longer professional experience had more positive perceptions of professional image. Whereas the professional image perceptions of nurses working in public and university hospitals were similar based on professional experience [22,23], nurses, who had long professional experience, had higher perceptions of the nursing image in a private hospital [24]. In Türkiye, nurses are employed in public and university hospitals for some periods of the year with an exam result called the Public Personnel Selection Exam. Therefore, new graduates usually enter the workforce in private hospitals. The main reason for lower nursing image perceptions among new graduate nurses may be a challenging period called transition shock that requires adapting to the healthcare system [36]. Supporting this view, in this study, nurses with less than a year of professional experience had lower nursing image perception in the subscale of working conditions. During this period, the main problems of new graduate nurses are

inexperience regarding professional practices, communicating and collaborating ineffectively, and exposing negative workplace behaviours [36]. A study found that nurses entered the profession with positive nurse image perceptions, but they developed negative perceptions about the profession, influenced by the work environment and interactions with experienced nurses [3]. As a result, private hospitals may need to consider the negative nursing image among new graduate nurses, especially in terms of the working environment, to facilitate the transition into practice.

In this study, only a quarter of the nurses stated that the working hours were 45 per week. This result is a small cross-section showing the nursing workforce shortage in Türkiye. However, nurses who worked 45 hours a week had more positive nursing image perceptions. Previous studies reported that the professional image perceptions of nurses who stated the number of nurses sufficient or insufficient was at a similar level [22,24]. Heavy workload is associated with fatigue, job stress, job dissatisfaction, and burnout [37]. However, job dissatisfaction and turnover intention were associated with a poor nursing image [34,38]. These negative results by affecting self-concept and self-esteem levels may have caused nurses to perceive nursing as a negative career option. In support of this view, nurses who were unwilling to re-choose nursing as a career had significantly lower perceptions of the professional image in this study. Also, nurses working more than 55 hours a week in the gender subscale had higher image perceptions. Male nurses, who spend less time on home and family responsibilities than females, have more time for themselves than females [33]. Considering that most of the nurses in this study were female, nurses working more than 55 hours a week may think that males could cope with heavy workloads more easily due to these characteristics.

Conclusion

The results of this study showed that the nursing image was strongly positively perceived by nurses working in private hospitals. However, nursing image perceptions towards gender and professional status were more negative. Nurses who were younger than 22 years, female, unwilling to re-choose nursing as a career, had professional experience less than a year and worked 45 hours a week perceived nursing image more negatively.

Firstly, raising awareness about the effects of males in professionalism and planning a nursing workforce including males in all working units are recommended. Nursing management should reflect a gender equality perspective on promotion and wages, which give nurses a positive appearance and professional status. Secondly, nursing management should employ only undergraduate nurses to perform nursing duties, authority, and responsibilities. This may contribute to the perception of nursing as a professional profession integrating professional values and evidence-based practices, rather than a workforce profile performing only technical works, and increase the status of the profession. Also, a more professional nursing workforce may facilitate the transition into practice by contributing to a positive work environment and maintaining a positive perception of new graduate nurses' professional image. Thirdly, because the heavy workload is an essential factor for the poor image, nursing management should effectively plan weekly working hours and shifts to maintain the continuity of the workforce. Future studies should focus on gender discrimination in nursing, the factors affecting the image perceptions of undergraduate nurses, and innovative management approaches that will strengthen the professional image perceptions of nurses, especially new graduates.

Acknowledgement

The authors thank the nurses who accepted to participate in this study.

Declaration of Ethical Code

In this study, we undertake that all the rules required to be followed within the scope of the "Higher Education Institutions Scientific Research and Publication Ethics Directive" are complied with and that none of the actions stated under the heading "Actions Against Scientific Research and Publication Ethics" is not carried out.

References

- [1] World Health Organization. 2020. State of the world's nursing report. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240003279> (Accessed Date: 15 March 2022).
- [2] Kalisch, P., Kalisch B. 1987. The Changing Image of the Nurse. Menlo Park, California: Addison-Wesley Publishing
- [3] Emeghebo, L. 2012. The Image of Nursing as Perceived by Nurses. *Nurse Education Today*, 32(6), 49-53.
- [4] Varaei, S., Vaismoradi, M., Jasper, M., Faghihzadeh, S. 2012. Iranian Nurses' Self-Perception Factors Influencing Nursing Image. *Journal of Nursing Management*, 20(4), 551-560.
- [5] Bakalis N. A., Mastrogianni, E., Melista, E., Kiekkas, P. 2015. The Image and Profile of the Nursing Profession in Greece High School Students, Nursing Students and Nurses. *International Journal of Nursing & Clinical Practices*, 2, 125-129.
- [6] Masih, S., Gulzar, L. 2018. Association of Nurses' Self-Perception about their Public Image and Their Job Satisfaction in Tertiary Care Hospitals, Karachi, Pakistan. *International Journal of Advanced Nursing Studies*, 7(1), 55-61.
- [7] Abdelrahman, S.M. 2018. Relationship Among Public Nursing Image, Self-Image, and Self-Esteem of Nurses. *IOSR Journal of Nursing and Health Science*, 7(1), 10-16.
- [8] Pushpinder, K., Maheshwari, S. K., Rawat, H. C. 2017. Impact of Self-Perceived Public Image of Nursing on Nurses' Work Behavior. *International Journal of Psychiatric Nursing*, 3(2), 6-11.
- [9] Veliöglu, P. 1985. Hemşirelikte Bilimselleşmeye Doğru. İstanbul: Bozok Yayıncılık.
- [10] Türkiye Health Ministry. 2019. Türkiye Health Statistics Yearbook. <https://sbsgm.saglik.gov.tr/Eklenti/40564/0/saglik-istatistikleri-yilligi-2019pdf.pdf> (Accessed Date: 15 March 2022).
- [11] Kocaman, G., Arslan Yurumezoglu, H. 2015. Situation Analysis of Nursing Education in Türkiye: Nursing Education with Numbers (1996-2015). *Journal of Higher Education and Science*, 5(3), 255-262.
- [12] Yıldırım, A. 2014. Sağlık Sistemi ve Yönetim İlkeleri Işığında Hemşirelik. Ankara: Hedef Yayıncılık.
- [13] Sis Çelik, A., Pasinlioğlu, T., Kocabeyoğlu, T., Çetin, S. 2013. Determination of the Image of the Nursing Profession in Community. *Florence Nightingale Journal of Nursing*, 21 (3), 147-153.
- [14] Keçeci, A., Çelik Durmuş, S., Oruç, D., Öner Kapısız, Ö. 2014. The Society's View of Nursing in Türkiye Hospital Topics, 92(2), 36-43.
- [15] Tarhan, M. T., Doğan, P., Kürklü, A. 2021. Nursing's Public Image in İstanbul: Comparison Between Generations. Ss 301-316. Eti Aslan, F., Kurtulan, G., Yalın, H. ed. 2021. *Scientific Researches in Health Sciences II*, Berlin: Peter Lang.
- [16] Kızılcık Özkan, Z., Ünver, S., Avcıbaşı, I. M., Semerci, R., Yıldız Fındık, U. 2017. Professional Image Perception of A Group of Nursing Students. *Hemşirelikte Araştırma Geliştirme Dergisi*, 19(1), 38-47.
- [17] Sümen, A., Teskereci, G., Aksoy, S., Ergen, Z., Ala, M., Üzüm, F. 2022. Examining Perceptions and Attitudes of Nursing Students Regarding Their Image of Nursing Profession. *Ordu University Journal of Nursing Studies*, 5(1), 75-83.
- [18] Seval, M., Sönmez, M. 2020. Relationship Between the Attitudes and Image Perceptions of Nursing Students' Profession. *Sağlık Akademisi Kastamonu*, 5(1), 19-35.
- [19] Karaman, F., Çakmak, S., Yerebakan, A. N. 2020. Professional Image Perceptions of Nursing Students and Determining Affecting Factors. *İstanbul Gelişim University Journal of Health Sciences*, 11, 217-219.
- [20] Dönmez, S., Akdolun Balkaya, N. 2021. Young Nurses' Choice and Perception of the Image of the Nursing Profession. *International Anatolia Academic Online Journal Health Sciences*, 7(2), 1-14.
- [21] Yılmaz Gören, S., Şahinoğlu, S. 2018. The Nurse Phenomenon in Turkish Cinema. *Dokuz Eylül University Nursing Faculty Electronic Journal*, 11(3), 250-6.

- [22] Sarı, M. 2019. Hemşirelerin mesleğine yönelik imaj ve mesleki bağlılık algısı. Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 101s, İstanbul.
- [23] Sezer, T. A., Esenay, F. I., Korkmaz, G. 2017. Occupational Image of Pediatric Nurses: Professional or Traditional? Hemşirelikte Araştırma Geliştirme Dergisi, 19(3), 45-54.
- [24] Aşçı, B. 2017. Cerrahi servislerinde çalışan hemşirelerin hemşirelik imajı ve etkileyen faktörler. Okan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 50s, İstanbul.
- [25] Dost, A., Bahcecik, N. 2015. Developing A Scale for the Image of Nursing Profession. Journal of Academic Research in Nursing, 1(2), 51-59.
- [26] Grinberg, K., Sela, Y. 2022. Perception of the Image of the Nursing Profession and Its Relationship with Quality of Care. BMC Nursing, 21(1), 57-65.
- [27] Ndirangu, E. W., Sarki, A. M., Mbekenga, C., Edwards, G. 2021. Professional Image of Nursing and Midwifery in East Africa: An Exploratory Analysis. BMC Nursing, 20(1), 37-47.
- [28] Roshangar, F., Soheil, A., Moghbeli, G., Wiseman, T., Feizollahzadeh, H., Gilani, N. 2021. Iranian Nurses' Perception of the Public Image of Nursing and Its Association with Their Quality of Working Life. Nursing Open, 8(6), 3441-3451.
- [29] Ha, D., Nuntaboot, K. 2016. Perceptions of How Negative Nursing Image Impacts on Nursing Care and Nursing Competency Development, 4th Asian Academic Society International Conference (AASIC), 254-262.
- [30] Ingwu, J. A., Ohaeri, B. M., Iroka, O. L. 2016. The Professional Image of Nursing as Perceived Nurses Working in Tertiary Hospitals, Enugu, Southeast Nigeria. *African Journal of Nursing and Midwifery*, 4(1), 595-602.
- [31] Gunawan, J., Aunguroch, Y., Sukarna, A., Nazliansyah, Efendi, F. 2018. The Image of Nursing as Perceived by Nurses: A phenomenological Study. *Nursing and Midwifery Studies*, 7, 180-185.
- [32] Başaran, F., Köşgeroğlu, N. 2020. Reflections of Gender Inequality on Nursing Profession. *Gümüşhane University Journal of Health Sciences*, 9(3), 293-299.
- [33] Gönç T. 2017. Türkiye'de Erkek Hemşire Olmak: Avantajlar ve Dezavantajlar. *Ankara Üniversitesi SBF Dergisi*, 72(1), 35-76.
- [34] Takase, M., Maude, P., Manias, E. 2006. Impact of the Perceived Public Image of Nursing on Nurses' Work Behavior. *Journal of Advanced Nursing*, 53(3), 333-343.
- [35] Council of Higher Education. 2019. Student Statistics. <https://istatistik.yok.gov.tr/> (Accessed Date: 15 March 2022).
- [36] Duchscher, J. E. 2009. Transition Shock: The Initial Stage of Role Adaptation for Newly Graduated Registered Nurses. *Journal of Advanced Nursing*, 65(5), 1103-1113
- [37] Wei, H., Sewell, K. A., Woody, G., Rose, M. A. 2018. The State of the Science of Nurse Work Environments in the United States: A Systematic Review. *International Journal of Nursing Science*, 5(3), 287-300.
- [38] Alotaibi, J., Paliadelis, P. S., Valenzuela, F. R. 2015. Factors that Affect the Job Satisfaction of Saudi Arabian Nurses. *Journal of Nursing Management*, 24(3), 275-282.

The Evaluation of Incidentally Detected Head and Neck Region Soft Tissue Calcifications and Ossifications on Computed Tomography Images

Bilgisayarlı Tomografi Görüntülerinde Rastlantısal Olarak Belirlenen Baş ve Boyun Bölgesi Yumuşak Doku Kalsifikasyonlarının ve Ossifikasyonlarının Değerlendirilmesi

Ezgi TÜRK¹ , Veysel Atilla AYYILDIZ² , Özlem GÖRMEZ^{1*} 

¹ Suleyman Demirel University, Faculty of Dentistry, Department of Dentomaxillofacial Radiology Isparta, Turkey

² Suleyman Demirel University Faculty of Medicine, Department of Radiology, Isparta, Turkey

ABSTRACT

Aims: Unorganized accumulation of calcium stored in soft tissues is termed as heterotopic calcification, organized accumulation of it is termed as heterotopic ossification. The aim of this study was to evaluate retrospectively all head and neck region soft tissue calcifications/ossifications that are detected incidentally on computed tomography (CT) images of Turkish patients and to analyze them according to age and gender.

Methods: CT images of 917 patients were retrospectively analyzed in terms of the presence of head and neck soft tissue calcification/ossification, and demographic characteristics (age and gender) of the patients were recorded. The data were analyzed with descriptive statistical methods and the relationship between soft tissue calcification/ossification and gender was evaluated with the chi-square test.

Results: Soft tissue calcification/ossification was detected on CT images of 214 (mean age= 61.35±14.7 years, 50.5% female, 49.5% male) of 917 patients examined (23.3%). Among the calcifications/ossifications detected, tonsillolith (n=120, 56.1%), arterial calcifications (n=61, 28.5%) and sialolith (n=15, 7%) were determined in the first three rows. Tonsillolith was significantly more common in female and ossified stylohyoid ligament (OSL) was significantly more common in male (p<0.05).

Conclusions: Soft tissue calcifications/ossifications can be detected incidentally in radiographic images taken from head and neck region for various purposes. In the study, tonsillolith was the most common soft tissue calcification on CT images. It was found that the tonsillolith was statistically higher in female, and the OSL in male. These calcifications/ossifications were most frequently found in patients over age 40.

Keywords: Multidetector computed tomography, physiologic calcification, pathologic calcification, heterotopic ossification

Alınış / Received: 23.05.2022 Kabul / Accepted: 14.09.2022 Online Yayınlanma / Published Online: 20.12.2022



ÖZET

Amaç: Kalsiyumun yumuşak dokularda birikmesine heterotopik kalsifikasyon, organize birikimine heterotopik ossifikasyon denir. Bu çalışmanın amacı, Türk hastaların bilgisayarlı tomografi (BT) görüntülerinde rastlantısal olarak saptanan tüm baş ve boyun bölgesi yumuşak doku kalsifikasyonlarını/ossifikasyonlarını retrospektif olarak değerlendirmek yaş ve cinsiyete göre analiz etmektir.

Yöntemler: 917 hastanın BT görüntüleri baş boyun yumuşak doku kalsifikasyonu/ossifikasyonu açısından retrospektif olarak incelendi ve hastaların demografik özellikleri (yaş ve cinsiyet) kaydedildi. Veriler tanımlayıcı istatistiksel yöntemlerle analiz edildi ve yumuşak doku kalsifikasyonu/ossifikasyonu ile cinsiyet arasındaki ilişki ki-kare testi ile değerlendirildi.

Bulgular: İncelenen 917 hastanın (%23,3) 214'ünün (ortalama yaş= 61,35±14,7 yıl, %50,5 kadın, %49,5 erkek) BT görüntülerinde yumuşak doku kalsifikasyonu/ossifikasyonu tespit edildi. Tespit edilen kalsifikasyonlardan/ossifikasyonlardan ilk üç sırada tonsillolit (n=120, %56.1), arteriyel kalsifikasyonlar (n=61, %28.5) ve sialolit (n=15, %7) saptandı. Tonsillolit kadınlarda, ossifiye stilohyoid ligament (OSL) erkeklerde anlamlı olarak daha sıkı (p<0.05).

Sonuç: Baş ve boyun bölgesinden çeşitli amaçlarla alınan radyografik görüntülerde rastlantısal olarak yumuşak doku kalsifikasyonları/ossifikasyonları saptanabilmektedir. Çalışmada, BT görüntülerinde en sık görülen yumuşak doku kalsifikasyonu tonsillolit idi. Kadınlarda tonsillolit, erkeklerde OSL istatistiksel olarak daha yüksek bulundu. Bu kalsifikasyonlar/ossifikasyonlar en sık 40 yaş üstü hastalarda bulundu.

Anahtar Kelimeler: Çok kesitli bilgisayarlı tomografi, fizyolojik kalsifikasyon, patolojik kalsifikasyon, heterotopik ossifikasyon



1. Introduction

Physiological mineralization is limited to the certain regions in skeletal tissues like growth cartilage, bones and teeth. However, calcium salts can accumulate uncontrollably in any soft tissue [1]. Soft tissue calcifications/ossifications are divided into groups according to their formation mechanism, etiology and localization [2,3]. As unorganized accumulation of calcium salts stored in soft tissues is termed as heterotopic calcification, organized accumulation of it is termed as heterotopic ossification [2,4]. Heterotopic calcifications are divided into three different categories as dystrophic, idiopathic and metastatic calcifications. Dystrophic calcifications are a form of calcification that occur in degenerated, diseased or dead tissues in individuals with normal serum calcium and phosphate levels. Calcifications in this group are calcified lymph node, tonsillolith, cysticercosis and arterial calcifications. Idiopathic calcifications take place as a result of the accumulation of calcium in normal tissues despite the normal levels of serum calcium and phosphate. The examples of such calcifications are sialolith, phlebolith, laryngeal calcification and anthrolith-rhinolith-dacryolith [2,3]. Metastatic calcifications of the soft tissues are detected in conditions with high serum calcium and phosphate levels, such as hyperparathyroidism, hypercalcemia of malignancy, hypervitaminosis D and chronic kidney failure [4]. As for heterotopic ossification types, ossified stylohyoid ligament (OSL), osteoma cutis and myositis ossificans can be given as examples [2,5]. Soft tissue calcifications/ossifications in maxillofacial region are common and they are usually detected incidentally after routine radiographic images taken for diagnosis and treatment in dentistry [3,6]. When soft tissue calcifications/ossifications are detected, the primary object

should be to determine whether treatment is required. Knowing the frequency, gender and age distribution of soft tissue calcifications/ossification helps to determine the treatment status [2]. Conditions such as sialoliths that may cause pain, swelling and salivary gland dysfunction, OSL that may be associated with Eagle's syndrome, and atherosclerotic plaque that may be associated with cardiovascular disease risk are clinically important, may require intervention and follow-up [2,7].

Most of these calcifications are asymptomatic and diagnosed incidentally on panoramic radiography which is one of the two-dimensional imaging techniques frequently used in dentistry [8]. For detecting the soft tissue calcifications/ossifications, it may be beneficial to take a radiograph from different angles, examine with ultrasonography or use three-dimensional imaging techniques in addition to the patient's history and clinical examination [2,4]. Computed tomography [CT], which is one of the three-dimensional imaging technique, allows examining normal and pathological conditions in soft tissues in different planes as well as showing the changes in the bone.

It was aimed in this study to determine the incidence, age and gender distribution of soft tissue calcifications/ossifications in the head and neck region on CT images, to review the information on this subject in the light of current literature and to increase the awareness of clinicians.

2. Material and Method

In this study, head and neck CT images of 1323 patients who consulted Suleyman Demirel University with adenoid hyperplasia, acute pharyngitis, sialadenitis, thyroiditis, localized swelling in the neck, lymphadenitis, dysphagia reasons were analyzed retrospectively by two observer (a dentomaxillofacial radiology research student and specialist radiolog). CT images were obtained with a 128-slice multi-detector SOMATOM Definition AS Siemens CT device (Siemens Healthcare, Erlangen, Germany) and taken as the section thickness of the acquired images = 1 mm; matrix = 512x512; collimation = 128x0.6; section increment = 0.7; pitch = 0.8 and FOV = (25-30 cm). All pathologies and images with artifacts were excluded from the study, except for soft tissue calcifications/ossifications in the head and neck region. Besides, CT images of the patients who were requested due to the detected soft tissue calcifications/ossifications were excluded from the study. CT images of 917 patients (524 men, 393 women) with diagnostically optimum quality were included in the study and analyzed by examining axial, coronal and sagittal sections on the PACS system [Picture Archiving and Communication Systems]. The presence of soft tissue calcifications/ossifications, which could be detected in the head and neck region, and the demographic characteristics [age and gender] of the patients were evaluated. SPSS 22 software program [IBM SPSS Statistics 22] was used to evaluate the findings obtained from the study. Soft tissue calcifications/ossifications were classified and the data were analyzed by descriptive statistical methods. The frequency of soft tissue calcification/ossification and the relationship between genders were evaluated with the chi-square test. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

Soft tissue calcification/ossification was detected in 214 of 917 patients examined in our study (23.3%). Of the patients with soft tissue calcification/ossification, 50.5% were female (n=108) and 49.5% were male (n=106). These calcifications/ossifications were most frequently found in patients over age 40 years (n=193, 90.2%). Multiple calcifications/ossifications were detected in only seven patients. The gender distribution, mean age values and age ranges of the patients with soft tissue calcification/ossification are shown in Table 1.

Table 1: Gender distribution, mean age values and age range in soft tissue calcifications/ossifications

	Female	Male	Mean Age \pm Standard deviation [SD]	Age range
Tonsillolith	69	51	58.9 \pm 14	19-90
Arterial Calcifications	31	30	71.1 \pm 11	40-93
Sialolith	6	9	47.7 \pm 16	27-82
Ossified Stylohyoid Ligament	2	12	58.7 \pm 16	26-90
Calcified Lymph Node	1	6	59.3 \pm 13	45-82
Osteoma cutis	2	2	63.3 \pm 8	53-72
Arytenoid Cartilage Calcification	1	0	71	71

More than one calcification/ossification were detected in only seven patients.

It has been observed that the most common type of calcification/ossification was tonsillolith, while the least common was arytenoid cartilage calcification. The distribution of identified soft tissue calcifications/ossifications is depicted respectively tonsillolith (n=120, 56.1%), arterial calcifications (n=61, 28.5%), sialolith (n=15, 7%), OSL (n=14, 6.5%), calcified lymph node (n=7, 3.3%), osteoma cutis (n=4, 1.9%), arytenoid cartilage calcification (n=1, 0.5%) (Figure 1).

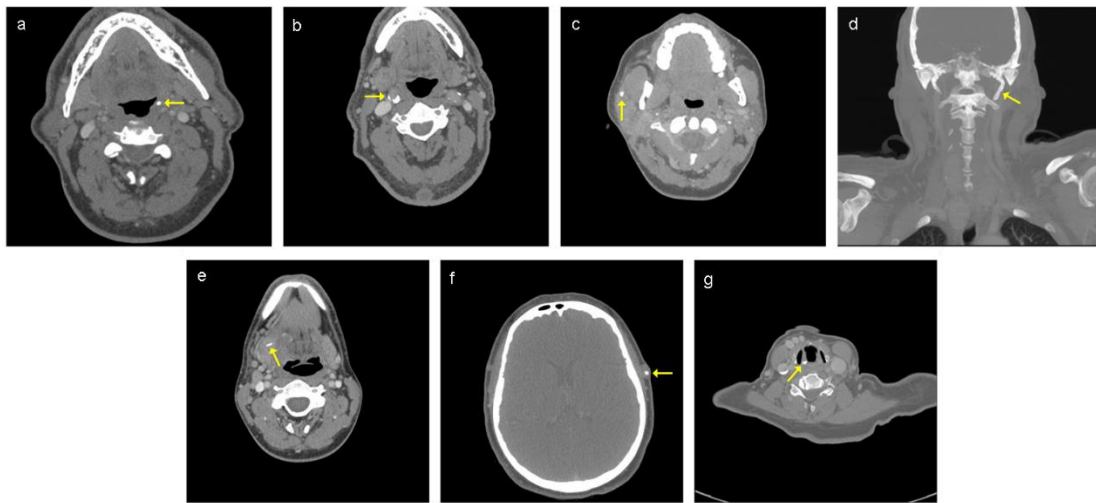


Figure 1: Yellow arrows pointing to soft tissue calcifications/ossifications in axial and coronal sections of CT. **a** Tonsillolith located in left tonsilla closer to airspace in axial section, **b** Calcified atheroma plaque located in right carotid artery in axial section [arterial calcification], **c** Sialolith in the right parotid gland in axial section, **d** Ossified stylohyoid ligament extending from the temporal bone in coronal section, **e** Calcified lymph node in the submandibular lymph node in axial section, **f** Osteoma cutis in subcutaneous adipose tissue at left side of the head in axial section, **g** Arytenoid cartilage calcification in axial section.

It has been seen that tonsillolith and arterial calcifications were more common in female, while sialolith, OSL and calcified lymph node were more common in male (Table 2). There was a significant difference between genders considering tonsillolith and OSL ($p < 0.05$). No statistically significant difference was found between genders considering sialolith, arterial calcifications and calcified lymph node ($p > 0.05$).

Table 2: Distribution of soft tissue calcifications/ossifications by gender

Soft Tissue Calcifications/Ossifications	Female		Male		Total [n]		p
	n	%	n	%	n	%	
Tonsillolith	69	63.9	51	48.1	120	56.1	0.021
Other calcifications/ossifications	39	36.1	55	51.9	94	43.9	
Arterial Calcifications	31	28.7	30	28.3	61	28.5	0.948
Other calcifications/ossifications	77	71.3	76	71.7	153	71.5	
Sialolith	6	5.6	9	8.5	15	7.0	0.567
Other calcifications/ossifications	102	94.4	97	91.5	199	93.0	
Ossified Stylohyoid Ligament	2	1.9	12	11.3	14	6.5	0.012
Other calcifications/ossifications	106	98.1	94	88.7	200	93.5	
Calcified Lymph Node	1	0.9	6	5.7	7	3.3	0.064
Other calcifications/ossifications	107	99.1	100	94.3	207	96.7	
Osteoma Cutis	2	1.9	2	1.9	4	1.9	-
Other calcifications/ossifications	106	98.1	104	98.1	210	98.1	
Arytenoid Cartilage Calcification	1	0.9	0	0.0	1	0.5	-
Other calcifications/ossifications	107	99.1	106	100.0	213	99.5	

* $p < 0.05$

4. Discussion and Conclusion

Soft tissue calcifications/ossifications occur as a result of the organized or unorganized accumulation of calcium salts in different places rather than the skeleton. The calcification/ossification types frequently seen in the head and neck region are calcified lymph node, tonsillolith, arterial calcifications, sialolith and OSL. These may not cause any obvious signs or symptoms and are mostly detected incidentally during radiological examination. Panoramic radiography is one of the two-dimensional imaging methods that are routinely used in dentistry and provide information about soft tissue calcifications/ossifications in the head and neck region within the image layer [2]. Two-dimensional imaging methods have limitations such as superposition and distortion that negatively affect the examination. Therefore, three-dimensional imaging techniques such as CT or cone-beam computed tomography (CBCT) are utilized to eliminate these limitations [9,10]. In literature, certain soft tissue calcifications/ossifications were examined on panoramic radiography, CT or CBCT images [6,7,8,11,12,13]. To the best of our knowledge, any study retrospectively examining all types of soft tissue calcifications/ossifications on head and neck region on CT images of Turkish patients does not exist. So CT imaging method was preferred in our study, which helps to distinguish the soft tissues better due to its better contrast resolution and less image-noise properties, and helps the examination of normal and pathological conditions in different planes.

The prevalence of soft tissue calcification/ossification at different populations varies between 2.61-27.64% in studies performed on panoramic radiography images [6,12,14,15], and 15-62.6% in studies performed on CBCT images [7,13,16]. In a study examining soft tissue calcification/ossification in the head and neck region of Turkish patients, their incidence was reported to be 33.4% on CBCT images [8]. In our study, the incidence of soft tissue calcification/ossification in the head and neck region on CT images of Turkish patients was indicated to be 23.3%. The variation in the results given in literature was thought to be due to the difference in the population studied, number of patients, and the imaging procedures used.

Demographic characteristics differ in patients with soft tissue calcifications/ossifications according to the population. In literature, some studies indicate that soft tissue calcification/ossification is more common in female [12, 17], in some other studies is more common in male [18,19], while some other studies it is reported to no difference between the genders [8,16]. Soft tissue calcifications/ossifications are generally seen in patients over the age of 40, but they can also be seen in children [6,20]. In three recent studies examining patients in Turkey, the mean age of patients with soft tissue calcification/ossification was 52.12 ± 17.62 , 44.17 ± 16.04 , 51.2 ± 15.6 , respectively [8,12,19]. In these studies, it was reported that the patients with soft tissue calcification/ossification were mostly 40 years and older. Considering the demographic characteristics of the patients in our study, there was no difference between the gender, but when their age was evaluated, the majority were over 40 years old, which is consistent with the literature.

In studies evaluating the frequency of soft tissue calcifications/ossifications, it was stated that tonsillolith [6,14], OSL [12] or arterial calcification [15] were most common on panoramic radiographs; tonsillolith [8,16] or arterial calcifications [17] are frequently seen on CBCT; on the other hand, it was stated that tonsillolith [11] was seen frequently on CT. In our study, which will examine on CT images, the most common soft tissue calcification/ossification type was tonsilloliths and it was found to be compatible with most studies in literature. In addition, it was thought that the most common type and ranking of soft tissue calcification in literature differed according to the characteristics of the population [race, mean age], except for the imaging procedures.

Palatine tonsils are lymphatic tissue collections located in the palatine fossa on both sides of the oropharynx, which is limited to the palatoglossal and palatopharyngeal arches [21]. With the recurrence of inflammation in the tonsils, the crypts of the tonsils enlarge and tonsillolith occurs [2]. Tonsilloliths can be recognized on the lateral radiograph of the pharynx and on the panoramic radiograph. However, it is not possible to distinguish tonsils from arteries, lymph nodes or salivary glands on two-dimensional radiographs. Tonsilloliths can be easily distinguished from the surrounding bone structures by three-dimensional imaging methods such as CT and/or CBCT [21]. Tonsilloliths are identified as multiple small radiopaque masses superposed to the anterior border of the oropharyngeal airway space on panoramic radiography, as dense and homogeneous oval shaped opacities resembling multiple clusters of "rice grains" adjacent to the lateral oropharyngeal airway space on CBCT or CT imaging [22]. They are usually asymptomatic and do not require treatment, but treatment may be considered in elderly patients with

immunosuppression due to the risk of aspiration pneumonia [23]. In studies evaluating the prevalence of tonsilloliths on CT images have reported that the prevalence ranged from 16% to 46.1% [11,21,24,25,26,27], while the prevalence of tonsilloliths on CBCT images ranged from 4.9% to 34.1% [15,23,28]. In some studies, it has been reported that tonsilloliths are seen more frequently in men [24,26,27] and in some studies it is more common in female [21,25,28], there is also a study that found no difference between the genders [19]. While in our study, the prevalence of tonsilloliths was found to be 13.3% [in 120 of 917 patients]. It was determined that there was a statistically significant relationship between tonsilloliths and gender, and it was seen at a higher rate in female. The difference in results between studies; may depend on soft tissue resolution characteristics of imaging procedures [CT or CBCT], slice thickness, number of study populations, hormonal changes.

In cases such as old age, genetic disorders, and some systemic diseases, calcification may occur in the vessels [3]. Arterial calcifications are an important risk factor in cardiovascular diseases [19]. Calcified atherosclerotic plaque is often observed in the spaces between the cervical third vertebrae or adjacent to the greater cornu of the hyoid bone on panoramic radiographs. On CBCT image, it is noticed in the form of rice grains or as linear calcifications in the region of the carotid artery. Atherosclerosis appears as opacities called “tubule body” or “train track” on panoramic radiographs along the outer wall of the vessel, more often in the facial artery and less frequently in the carotid artery, and this appearance is pathognomonic [2,3,15]. Atherosclerosis causes high mortality, so early diagnosis is critical. It has been associated with various diseases, such as diabetes, osteoporosis, coronary artery disease and chronic kidney failure, and often occurs in after 50 years of age. The appearance and localization of arterial calcifications are helpful in the differential diagnosis [28]. It has been reported that the prevalence of carotid artery calcification in patients admitted for dental treatment varies between 3-5% [17]. In a study performed on panoramic radiographs, it was reported that carotid artery calcification was the most common in 1615 patients and it was more common in women than men [15]. Taguchi et al. [29] reported that carotid artery calcification is more common in postmenopausal women due to the loss of the protective effect of hormones. In our study, arterial calcifications were seen in the second frequency. It was thought that this situation was affected by systemic diseases due to the high mean age of the patients.

Sialoliths are soft tissue calcification that are formed by precipitation of calcium and phosphate salts in the salivary gland or duct, and most of them occur in submandibular salivary glands. Imaging methods such as plain radiographs, CT, CBCT, ultrasonography, and sialography are used for imaging sialoliths [12,30]. In studies evaluating the prevalence of sialoliths on panoramic images have reported that the prevalence ranged from 0.01% to 1% [6,31], while the prevalence of sialoliths on CBCT images ranged from 0.2% to 1.7% [8,23,28]. In our study, the incidence of sialolith was found to be 1.63%. This situation was thought to be caused by the use of different imaging methods and the population difference.

The stylohyoid complex includes the styloid process, the stylohyoid ligament, and the cornu minus of the hyoid bone. The styloid process, which is located anteromedially of the stylomastoid foramen, is a thin, long and cylindrical bony prominence of the temporal bone. The structure, which is approximately 20-25 mm in length and resembles a dry tree branch that thins from top to bottom, is located between the internal and external carotid arteries and the internal jugular vein. The stylohyoid ligament is a connective tissue band that attaches to the cornu minus of the hyoid bone originating from the apex of the styloid process and plays a role in chewing and swallowing processes. The ossification of the stylohyoid ligament usually extends down from the skull base and occurs bilaterally. The ossifying ligament can usually be noticed as a hard, pointed structure on palpation on the tonsils [2,3,32,33]. Although it is mostly asymptomatic, it is called “Eagle Syndrome” when symptoms accompanying ossification of the ligament are observed [2]. Classic eagle syndrome causing compression in cranial nerves and carotid artery syndrome causing compression of carotid arteries are seen as symptoms associated with OSL [12]. In classical type Eagle syndrome, there are complaints such as foreign body sensation in the throat during speech and swallowing, turning head, and tinnitus as a result of compression of the cranial nerves accompanying the ligament. Recent history of trauma in the neck region supports the diagnosis. In carotid artery syndrome, syncope and hemiparalysis accompany the findings in the midface and orbital region as a result of the pressure of the ossifying ligament on the internal and external carotid arteries and the accompanying sympathetic nerve network [34]. OSL is detected incidentally on panoramic radiographs [33]. In literature, their incidence in panoramic radiography has been reported as 1.4-19.7% [12]. Accurate diagnosis of OSL on panoramic images is sometimes difficult due to the superposition of different bone structures such as the mandible, teeth, or base of the skull. CT and CBCT images provides reliable visualization of the features of the OSL and its

relationship to the surrounding anatomy [35]. In a study comparing the incidence of OSL in panoramic and CBCT images, it was reported that the incidence was 42% on panoramic images and 63% on CBCT images. In addition, it was stated in the study that there was no relationship between the presence of OSL and gender in both imaging methods [35]. Gozil et al. [36] evaluated the relationship of OSL with gender using CT images and reported that OSL generally occurs in male. In our study, as reported by Gozil et al. [36], OSL was statistically higher in males.

Presence of calcified lymph nodes may be a sign of a previously treated pathology or an active disease [2]. Calcified lymph nodes can be identified on routine panoramic radiographs taken in dentistry. On panoramic radiographs, they are observed slightly below the inferior border of the mandible, around the angulus mandible, between the posterior border of the ramus and the cervical vertebrae [13]. In a study evaluating the prevalence of soft tissue calcification/ossification on panoramic radiographs, calcified lymph nodes were reported at a rate of 2.1% [15]. Yalçın et al. [8] reported the frequency of calcified lymph node as 0.2% in the Turkish population on CBCT images. Eisenkraft and Som [37] found 1% cervical lymph node calcification as a result of neck CT examination of 2300 patients, and in our study that conducted on CT images, calcified lymph node was found 0.7%, which is consistent with this study.

There are few studies in literature that retrospectively scanned all head and neck soft tissue calcifications [6,8,11,12,14,15,16,17]. Most studies have examined one or more calcifications [21,24,25,26,28,33,35,37]. The results of our study in this direction could not be fully compared in literature, since it is the first study to look at all types of calcifications in Turkish patients on CT images. In our study, calcification/ossification types which may found in this region such as cysticercosis, phlebolith, laryngeal cartilage calcification, rhinolith, antrolith, myositis ossificans were not detected. When soft tissue calcification/ossification is identified, the primary object is to identify it well and determine if follow-up and treatment is required. Incidentally found soft tissue calcifications/ossifications in the head and neck region are usually followed, but rarely, they can be life-threatening. In parallel with the clinical importance of the lesions, the rate of reporting and follow-up of incidentally detected soft tissue calcifications/ossifications should increase.

Declaration of Ethical Code

In this study, we undertake that all the rules required to be followed within the scope of the "Higher Education Institutions Scientific Research and Publication Ethics Directive" are complied with, and that none of the actions stated under the heading "Actions Against Scientific Research and Publication Ethics" are not carried out.

Ethics committee approval was obtained for this study with the decision dated and numbered 13.05.2020/114 from Süleyman Demirel University Ethics Committee of Clinical Research.

References

- [1] Kirsch, T. 2006. Determinants of pathological mineralization. *Curr Opin Rheumatol*,174-180.
- [2] White, S.C., Pharoah, M.J. 2014. *Oral Radiology Principles and Interpretation*. 7th Ed. Canada: Elsevier, 524-525.
- [3] Yıldırım, D., Bilgir, E. 2015. Baş Boyun Bölgesindeki Yumuşak Doku Kalsifikasyon Ve Ossifikasyonları. *J Dent Fac Atatürk Uni*, 25[13], 82-90.
- [4] Harorlu, A. 2014. *Ağız, Diş ve Çene Radyolojisi*. 1. baskı. İstanbul:Nobel Tıp Kitapevi Yayını, 416-419.
- [5] Avsever, H., Orhan, K. 2018. Çene Kemiği ve Çevre Dokuları Etkileyen Kalsifikasyonlar. *Türkiye Klinikleri J Oral Maxillofac Radiol-Special Topics*, 4[1], 43-52.
- [6] Garay, I., Netto, H.D., Olate, S. 2014. Soft tissue calcified in mandibular angle area observed by means of panoramic radiography. *Int J Clin Exp Med*, 7[1], 51-56.
- [7] Missias, E.M., Nascimento, E., Pontual, M. et al. 2018. Prevalence of soft tissue calcifications in the maxillofacial region detected by cone beam CT. *Oral Dis*, 24[4], 628-637.
- [8] Yalcin, E.D., Ararat, E. 2020. Prevalence of soft tissue calcifications in the head and neck region: A cone-beam computed tomography study. *Niger J Clin Pract*, 23[6], 759-763.

- [9] Ertaş, E.T., Kalabalık, F. 2014. Bir Türk Örneklem Grubunda Dental Volümetrik Tomografi Endikasyonları. *J Dent Fac Atatürk Uni*, 24[2], 232-240.
- [10] Akarşan, Z., Peker, İ. 2015. Bir diş hekimliği fakültesindeki konik ışınli bilgisayarlı tomografi incelemesi istenme nedenleri. *Acta Odontol Turc*. 32[1], 1-6.
- [11] Ergun, T., Lakadamyali, H. 2013. The prevalence and clinical importance of incidental soft-tissue findings in cervical CT scans of trauma population. *Dentomaxillofac Radiol*, 42[10], 20130216.
- [12] Çitir, M., Gündüz, K. 2020. Panoramik radyografide yumuşak doku kalsifikasyon/ossifikasyonlarının görölme sıklığı. *Selcuk Dent J*, 7[2], 226-232.
- [13] Nunes, L.F.D.S., Santos, K.C.P., Junqueira, J.L.C., Oliveira, J.X. 2011. Prevalence of soft tissue calcifications in cone beam computed tomography images of the mandible. *Revista Odonto Ciência*, 26[4], 297-303.
- [14] Icoz, D., Akgunlu, F. 2019. Prevalence of detected soft tissue calcifications on digital panoramic radiographs. *SRM Journal of Research in Dental Sciences*, 10[1], 21-25.
- [15] Vengalath, J., Puttabuddi, J.H., Rajkumar, B., Shivakumar, G.C. 2014. Prevalence of soft tissue calcifications on digital panoramic radiographs: A retrospective study. *Journal of Indian Academy of Oral Medicine and Radiology*. 26[4], 385.
- [16] Bayramov, N., Üsdat, A., Yalcinkaya, Ş.E. 2019. KIBT Görüntülerinde Rastlantı Bulgusu Olarak Görülen Yumuşak Doku Kalsifikasyonları. *Selcuk Dental Journal*, 6[4], 228-233.
- [17] Patil, S.R., Alam, M.K., Moriyama, K., Matsuda, S., Shoumura, M., Osuga, N. 2017. 3D CBCT assessment of soft tissue calcification. *Journal of Hard Tissue Biology*, 26[3], 297-300.
- [18] Khojastepour, L., Haghnegahdar, A., Sayar, H. 2017. Prevalence of Soft Tissue Calcifications in CBCT Images of Mandibular Region. *J Dent (Shiraz)*, 18[2], 88-94.
- [19] Yeşilova, E., Bayrakdar, İ.Ş. 2021. Radiological evaluation of maxillofacial soft tissue calcifications with cone beam computed tomography and panoramic radiography. *Int J Clin Pract* 75[5], 14086.
- [20] Thakur, J.S., Minhas, R.S., Thakur, A., Sharma, D.R., Mohindroo, N.K. 2008. Giant tonsillolith causing odynophagia in a child: a rare case report. *Cases J*, 1[1], 50.
- [21] Aspestrand, F., Kolbenstvedt, A. 1987. Calcifications of the palatine tonsillary region: CT demonstration. *Radiology*, 165[2], 479-480.
- [22] Scarfe, W.C., Farman, A.G. 2010. Soft tissue calcifications in the neck: Maxillofacial CBCT presentation and significance. *Australas Dental Pract*, 2[2], 3-15.
- [23] Price, J.B., Thaw, K.L., Tyndall, D.A., Ludlow, J.B., Padilla, R.J. 2012. Incidental findings from cone beam computed tomography of the maxillofacial region: a descriptive retrospective study. *Clin Oral Implants Res*, 23[11], 1261-1268.
- [24] Fauroux, M.A., Mas, C., Tramini, P., Torres, J.H. 2013. Prevalence of palatine tonsilloliths: A retrospective study on 150 consecutive CT examinations. *Dentomaxillofac Radiol*. 42, 20120429.
- [25] Oda, M., Kito, S., Tanaka, T. et al. 2013. Prevalence and imaging characteristics of detectable tonsilloliths on 482 pairs of consecutive CT and panoramic radiographs. *BMC Oral Health*, 13, 54.
- [26] Takahashi, A., Sugawara, C., Kudoh, T. et al. 2014. Prevalence and imaging characteristics of palatine tonsilloliths detected by CT in 2,873 consecutive patients. *ScientificWorldJournal*, 2014, 940960.
- [27] Kim, M.J., Kim, J.E., Huh, K.H. et al. 2018. Multidetector computed tomography imaging characteristics of asymptomatic palatine tonsilloliths: a retrospective study on 3886 examinations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 125[6], 693-698.
- [28] Ozdede, M., Kayadugun, A., Ucok, O., Altunkaynak, B., Peker, I. 2018. The assessment of maxillofacial soft tissue and intracranial calcifications via cone-beam computed tomography. *Current Medical Imaging*, 14[5], 798-806.
- [29] Taguchi, A., Sueti, Y., Sanada, M. et al. 2003. Detection of vascular disease risk in women by panoramic radiography. *J Dent Res*, 82[10], 838-843.

- [30] Çağlayan, F., Sümbüllü, M.A., Miloğlu, Ö., Akgül, H.M. 2014. Are all soft tissue calcifications detected by cone-beam computed tomography in the submandibular region sialoliths? *J Oral Maxillofac Surg*, 72[8]:1531.e1-6.
- [31] El Deel, M., Holte, N., Gorlin, R.J. 1981. Submandibular salivary gland sialoliths perforated through the oral floor. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 51[2], 134-139.
- [32] Colby, C.C., Del Gaudio, J.M. Stylohyoid complex syndrome: a new diagnostic classification. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2011;137(3):248-252.
- [33] Alpoz, E., Akar, G.C., Celik, S., Govsa, F., Lomcali, G. 2014. Prevalence and pattern of stylohyoid chain complex patterns detected by panoramic radiographs among Turkish population. *Surg Radiol Anat*, 36[1], 39-46.
- [34] Özcan, İ. 2017. *Konvansiyonelden Dijitale Diş Hekimliğinde Radyolojinin Esasları*, 1. Baskı, İstanbul Medikal Sağlık ve Yayıncılık Tic. Ltd. Şti., İstanbul, 759-778.
- [35] Centurion, B.S., Imada, T.S., Pagin, O., Capelozza, A.L., Lauris, J.R., Rubira-Bullen, I.R. 2013. How to assess tonsilloliths and styloid chain ossifications on cone beam computed tomography images. *Oral Dis*, 19[5], 473-478.
- [36] Gözil, R., Yener, N., Calgüner, E., Araç, M., Tunç, E., Bahcelioğlu, M. 2001. Morphological characteristics of styloid process evaluated by computerized axial tomography. *Ann Anat*, 183[6], 527-535.
- [37] Eisenkraft, B.L., Som, P.M. 1999. The spectrum of benign and malignant etiologies of cervical node calcification. *AJR Am J Roentgenol*, 172[5], 1433-1437.

COVID-19 Hastalarında Dalak Boyutu ve Hematolojik Parametrelerinin Klinik Önemi

Clinical Significance of Spleen Size and Hematological Parameters in COVID-19 Patients

Pınar YÜRÜK ATASOY^{1*}, Engin BEYDOĞAN²

¹ Ankara Şehir Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji, Ankara, Türkiye
² Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Van Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Radyoloji Kliniği, Van, Türkiye

Ö Z E T

Amaç: Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2'nin (SARS-CoV-2) neden olduğu COVID-19, sistemik tutulumu neden olur ve dalak hedef organlardan biri olabilir. Bu çalışmamızda COVID-19 hastalarının hastane başvurusu sırasında çekilen bilgisayarlı tomografi (BT) kesitlerindeki dalak boyutu ve laboratuvar parametrelerinin COVID-19'un sonlanımı üzerine etkisini değerlendirmeyi amaçladık.

Materyal-Metot: Bu retrospektif kohort çalışmasına Nisan ve Aralık 2020 tarihleri arasında hastanemize başvuran 644 COVID-19 hastası alındı. Hastaların medikal kayıtları toplandı ve başvuru anında çekilen Toraks BT kesitlerinde dalağın tümünün değerlendirilebildiği Toraks BT'ler gözden geçirildi.

Bulgular: Çalışma popülasyonu, medyan yaşı 59 (45 – 69 yıl) olan 644 hastayı (387 erkek, 57 kadın) içermektedir. COVID-19 ile ilişkili en yaygın üç sistemik hastalık hipertansiyon (%28), diabetes mellitus (%22.2) ve kalp hastalığıydı (%18.6). Başvuru sırasında en sık görülen aktif şikayet nefes darlığı (%57,5) ve öksürükdü (%46). 644 hastanın 109'u mortal seyretti. Başvuru sırasında, mortalitesi olan hastalarda medyan lökosit sayısı daha yüksek olmasına rağmen (8.9'a karşı 6.5, $p<0.001$), lenfosit sayısı (1.3'e karşı 1.0, $p<0.001$) ve trombosit sayısı (200'e karşı 187, $p= 0.035$) mortalitesi olmayan hastalarda daha yüksekti. Çalışma popülasyonunun 173'ünde (%26,9) splenomegali vardı ve mortalitesi olmayan hastalarda splenomegali oranı oldukça yüksekti (%31'e karşı %6,4, $p<0,001$).

Sonuç: COVID-19 özellikle erken dönemde akciğer tutulumu ile kendini gösterse de sistemik tutulumu da neden olur ve hedefteki organlarından biri dalak olabilir. Ayrıca hastaların başvuru anındaki lenfosit, monosit ve trombosit sayıları COVID-19'un ilerlemesini öngörebilir. Çalışmamızın sonuçları dalak boyutu artışının COVID-19 sonlanımı açısından dikkate alınması gereken bir belirteç olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: SARS-CoV-2, spleen size, laboratory, CT-SS, pandemic

Alınış / Received: 30.06.2022 Kabul / Accepted: 14.09.2022 Online Yayınlanma / Published Online: 20.12.2022



ABSTRACT

Objective: COVID-19, caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), causes systemic involvement and the spleen may be one of the target organs. In this study, we aimed to evaluate the effect of spleen size and laboratory parameters in computed tomography (CT) sections taken during hospital admission of COVID-19 patients on the outcome of COVID-19.

Material-Method: This retrospective cohort study included 644 COVID-19 patients admitted to our hospital between April and December 2020. The medical records of the patients were collected, and the thorax CT scans in which the entire spleen could be evaluated in the thorax CT sections taken at the time of admission were reviewed.

Results: The study population included 644 patients (387 men, 257 women) with a median age of 59 (45 – 69 years). The three most common systemic diseases associated with COVID-19 were hypertension (28%), diabetes mellitus (22.2%), and heart disease (18.6%). The most common active complaints at admission were shortness of breath (57.5%) and cough (46%). 109 of 644 patients were mortal. At admission, patients with mortality had higher median leukocyte count (8.9 vs 6.5, $p<0.001$), lymphocyte count (1.3 vs 1.0, $p<0.001$) and platelet count (187 vs 200, $p=0.001$). 0.035) was higher in patients without mortality. Of the study population, 173 (26.9%) had splenomegaly, and the rate of splenomegaly was significantly higher in patients without mortality (31% vs. 6.4%, $p<0.001$).

Conclusion: Although COVID-19 manifests itself with lung involvement especially in the early period, it also causes systemic involvement and one of the target organs may be the spleen. In addition, the lymphocyte, monocytes and platelet counts of the patients at the time of admission can predict the progression of COVID-19. The results of our study suggest that increased spleen size may be a marker that should be considered in terms of COVID-19 outcome.

Keywords: SARS-CoV-2, spleen size, laboratory , CT-SS, pandemic



1. Giriş

Aralık 2019'da Çin'de yeni bir koronavirüs tespit edildi ve şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2 (SARS-CoV-2) olarak adlandırıldı [1]. SARS-CoV-2 çok sayıda kişiyi enfekte ederek küresel halk sağlığı için bir tehdit oluşturdu ve COVID-19 pandemisine neden oldu.

COVID-19'un en yaygın klinik belirtileri ateş, kuru öksürük, dispne, yorgunluk ve kas ağrısıdır. Bununla beraber belirti ve semptomlar, bireyler arasında asemptomatikten şiddetli enfeksiyona kadar değişebilir [2]. COVID-19 sadece solunum sistemini değil aynı zamanda vücuttaki diğer hayati organları da etkiler. Bununla beraber hastaların dalak tutulumları hakkında çok az şey bilinmektedir. SARS-CoV-2 Konak hücre reseptörü olarak anjiyotensin dönüştürücü enzim 2'yi (ACE2) kullanır [3]. Yapılan çalışmalar tüm dokular arasında akciğerlerin orta düzeyde ACE2 ekspresyonuna sahip olduğunu, dalağın ise en düşük ACE2 ekspresyon seviyelerine sahip olduğunu bildirmiştir [4].

Dalak, insan vücudundaki en büyük periferik lenfoid organdır. Kan filtreleme, kan depolama, hematopoietik ve immünomodülasyon fonksiyonları ile bağışıklık tepkileri ve bağışıklık hücresi yerleşimi için ana bölgedir [5]. Sınırlı sayıdaki otopsi çalışmaları COVID-19 nedeniyle virüs tarafından doğrudan dalağın saldırıya uğrayabileceğini; hücrelerde T ve B lenfosit sayısında azalma, lenfoid foliküllerde atrofi gibi değişikliklere neden olabileceğini göstermiştir [6]. Ayrıca yapılan çalışmalarda hematolojik parametreler ve inflamatuvar belirteçlerin, enfeksiyonların ve diğer birçok hastalığın prognozu için önemli bir prediktif değeri olduğu bildirilmiştir [7]. Özellikle trombositopeni, lenfopeni ve

göreceli olarak daha yüksek monosit-nötrofil seviyeleri SARS-CoV-2 enfeksiyonlarında yaygın bulgulardır [8]. Ayrıca COVID-19 tanılı hastalarda klinik şiddete eşlik edecek düzeyde dalak boyutunda değişiklikler olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte trombositopeni, splenomegali ve mortalite ile ilişkisi tam olarak aydınlatılmamıştır [9]. Bu çalışmada COVID-19 tanılı hastaların başvuru anındaki dalak boyutu ve lenfosit, lökosit, trombosit sayısı ile hastalığın seyri arasındaki ilişki incelenmiştir.

2. Materyal ve Metot

Hastalar

Bu çalışma Van Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Etik Kurulu tarafından gözden geçirilmiş ve onaylanmıştır (onay numarası: 2020/09, 22.05.2020 tarih). Çalışmaya katılan tüm katılımcılardan yazılı ve sözlü onay formları alınmıştır. Acil servise 01.04.2020 ile 31.12.2020 tarihleri arasında başvuran ve olası COVID-19 vaka tanımına uygun hastalar arasında moleküler yöntemlerle saptanan SARS-CoV-2 olguları çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya, etik kurul izninin alındığı tarihten sonraki 6 aylık dönemde dahil edilen hastaların tomografi çekimleri, dalağın da özellikle görüntüleme alanına gireceği şekilde yapılmamıştır. Toraks BT incelemesinde dalak büyüklüğü görüş alanında olmayan hastalar çalışma dışı bırakıldı. Demografik veriler ve laboratuvar değerleri elektronik tıbbi kayıtlardan ve hasta dosyalarından çıkarıldı.

Görüntüleme Tekniği ve Görüntü Analizi

Kollar kaldırılmış olarak sırtüstü pozisyonda ve inspirasyonun sonunda bilgisayarlı tomografi görüntülemesi (BT çalışmaları Toshiba, Alexion/Advance, Toshiba Medical Systems Corporation Nashua, Japonya) yapıldı. Toraks BT radyolojisinde deneyimli iki radyolog sırasıyla ince kesitli BT görüntülerini gözden geçirdi ve fikir birliği ile varılan bir karar eşliğinde son değerlendirmeler yapıldı. Aksiyal BT incelemesinde dalağın en uzun eksenini mediastinal pencerede ölçüldü. Dalağın maksimum uzunluk ve dikey yükseklik gerçek dalak büyüklüğü ile yakın sonuç vermektedir. Kucybala ve ark. tanımladığı ölçüm yöntemine göre 115 mm'nin üstü uzunluk splenomegali için yüksek hassasiyet değerlerine sahiptir [10]. Biz de çalışmamızda bu metotta tanımlanan ölçümleri kullandık.

İstatistiksel Analiz

Sürekli değişkenler normal dağılım için Shapiro-Wilk normallik testi kullanılarak değerlendirildi. Normal dağılım gösteren sürekli değişkenlerin hiçbirisi ortanca olarak sunulmadığından (1.-3. çeyreklik) ve gruplar arasındaki karşılaştırma Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı. Kategorik değişkenler için karşılaştırmalar Pearson'un ki-kare testi ile Yate'in süreklilik düzeltmesi veya Fischer'in kesin testi kullanılarak yapıldı. P değeri 0.05 anlamlı kabul edildi.

3. Bulgular

Çalışma popülasyonunun yaş ortalaması 59 (45-69) idi. Üç yüz seksen yedi (%60.1) hasta erkekti. Çalışma popülasyonunda tablo 1'de özetlenen bir (0-2) ilişkili sistemik hastalık vardı. En sık görülen üç ilişkili sistemik hastalık sırasıyla sistemik hipertansiyon (%28), diabetes mellitus (%22.2) ve kalp hastalığı (%18.6) idi. Laboratuvar değerlendirme sonuçları tablo 1'de sunulurken, çalışma popülasyonunun 173'ünde (%26.9) splenomegali vardı. Ek olarak, çalışma popülasyonunda tablo 2'de sunulan iki (1-3) aktif şikayet vardı. Bunların arasında nefes darlığı (%57.5) başvuru sırasında en sık görülen aktif şikayetti, bunu sırasıyla öksürük (%46) ve ateş (%27) izledi. 178 (%27.6) hasta yoğun bakım ünitesine (YBÜ) başvurmayı zorunlu kılarken, YBÜ ve hastanede kalış süresi sırasıyla 7 gün (3-13 gün) ve 8 gün (5-13 gün) idi (Tablo 1).

Çalışma popülasyonu mortalite sonuç noktasından değerlendirildiğinde (Tablo 1), mortalitesi olan hastalar mortalitesi olmayan hastalarinkinden anlamlı derecede daha yaşlıydı ($p < 0.001$). Cinsiyet grupları arasında anlamlı bir fark ortaya koymazken ($p = 0.053$), ilişkili sistemik hastalık sayısının ortancası mortalitesi olan hastalarda daha yüksekti ($p < 0.001$), farkın yüksek oranda sistemik hipertansiyon oranına ($p < 0.001$), kalp hastalığına ($p < 0.001$), kronik akciğer hastalığı ($p = 0.015$) ve nörolojik hastalık ($p < 0.001$). Mortalitesi olan hastalarda ortanca aktif şikayet sayısı daha yüksekti ($p = 0.021$). Kabulde, ölümlü hastalarda ortanca lökosit sayısı daha yüksek olmasına rağmen (8.9'a karşı 6.5, $p < 0.001$), lenfosit sayısı (1.3'e karşı 1.0, $p < 0.001$) ve trombosit sayısı (200'e karşı 187, $p = 0.035$) mortalitesi olmayan hastalarda daha yüksekti. Mortalitesi olmayan hastalarda splenomegali oranı

oldukça yüksekti (%31'e karşılık %6.4, $p<0.001$). Mortalitesi olan hastalarda YBÜ başvuru oranı ve YBÜ ve hastanede kalış sürelerinin ortanca süreleri anlamlı olarak daha yüksekti.

Tablo 1: Çalışma popülasyonunun demografik ve klinik özellikleri

Değişkenler	Tümü (n= 644)	Mortal (+) (n= 109)	Mortal (-) (n= 535)	p value
Yaş, yıl	59 (45 – 69)	69 (59.5 – 79)	57 (41 – 67)	<0.001 ^a
Erkek, n (%)	387 (60.1)	75 (68.8)	312 (58.3)	0.053 ^b
İlişkili sistemik hastalık sayısı, n	1 (0 – 2)	2 (0.5 – 3)	0 (0 – 1)	<0.001 ^a
Hipertansiyon, n (%)	180 (28)	48 (44)	132 (24.7)	<0.001 ^b
Diyabet, n (%)	143 (22.2)	31 (28.4)	112 (20.9)	0.111 ^b
Kalp hastalığı, n (%)	120 (18.6)	39 (35.8)	81 (15.1)	<0.001 ^b
Kronik akciğer hastalığı, n (%)	72 (11.2)	20 (18.3)	52 (9.7)	0.015 ^b
Kronik böbrek yetmezliği, n (%)	24 (3.7)	7 (6.4)	17 (3.2)	0.176 ^b
Nörolojik hastalık, n (%)	23 (3.6)	13 (11.9)	10 (1.9)	<0.001 ^b
Psikiyatrik hastalık, n (%)	19 (3)	6 (5.5)	13 (2.4)	0.084 ^b
Kronik karaciğer hastalığı, n (%)	4 (0.6)	2 (1.8)	2 (0.4)	0.135 ^c
Malinite, n (%)	11 (1.7)	4 (3.7)	7 (1.3)	0.098 ^c
Obesite, n (%)	5 (0.8)	1 (0.9)	4 (0.7)	1.0 ^c
Aktif şikayet sayısı, n	2 (1 – 3)	2 (1 – 3)	2 (1 – 3)	0.021 ^a
Lenfosit sayısı, birim	1.23 (0.9 – 1.7)	1.0 (0.6 – 1.4)	1.3 (0.9 – 1.7)	<0.001 ^a
Lökosit sayısı, birim	6.63 (5.2 – 9.1)	8.9 (5.7 – 12)	6.5 (5.1 – 8.8)	<0.001 ^a
Trombosit sayısı, birim	199 (162 – 252)	187 (144 – 239)	200 (166 – 254)	0.035 ^a
Splenomegali, n (%)	173 (26.9)	7 (6.4)	166 (31)	<0.001 ^b
YBÜ kabulü, n	178 (27.6)	99 (90.8)	79 (14.8)	<0.001 ^b
YBÜ kalış, gün*	7 (3 – 13)	8 (5 – 13)	5 (3 – 13)	0.004 ^a
Hastanede kalış, gün	8 (5 – 13)	11 (5 – 19)	7 (5 – 12)	<0.001 ^a

YBÜ: yoğun bakım ünitesi. ^aMann-Whitney U test, ^bPearson's chi-square test ile Yate's continuity doğrulaması, ^cFischer's exact test. * 178 hasta arasında.

Tablo 2: Hastaneye yatış şikayetleri

Şikayet değişkenleri	n (%)
Nefes darlığı	370 (57.5)
Öksürük	296 (46)
Ateş	174 (27)
Asemptomatik	173 (26.9)
Miyalji	112 (17.4)
Baş ağrısı	25 (3.9)
Balgam	24 (3.7)
Bulantı-Kusma	23 (3.6)
Diyare	8 (1.2)
Koku ve tat durusu kaybı	6 (0.9)
Bilinç kaybı	1 (0.2)

Hastalığın seyri şiddetine göre kategorize edildiğinden (Tablo 3),% 32.9'u komplike olmayan,% 39.1'i hafif-orta şiddette,% 16.9'u mortalitesi olan hastalar dahil% 27.9'u şiddetli seyir gösterdi.

Tablo 3: Hastalığın seyri

Şiddet Kategorileri	n (%)
Komplike olmayan	212 (32.9)
Hafif-orta şiddete seyir	252 (39.1)
Şiddetli seyir	71 (11)
Mortal seyir	109 (16.9)

Hastalık seyrinin şiddeti kötüleştiçe hastaların yaş ortalaması artmış bulundu ($p<0.001$). Benzer şekilde, ilişkili sistemik hastalık sayısının ortanca değeri ve aktif şikayet sayısı da yükseliyordu. İlişkili sistemik hastalıkların alt grup analizinde, sistemik hipertansiyon, kalp hastalığı, kronik akciğer hastalığı,kronik böbrek yetmezliği ve nörolojik hastalık oranları, hastalık seyrinin kötüleşmesinde olduğu gibi doğrusal bir artış göstermiştir. Hastalığın şiddetinin artmasında olduğu gibi, ortanca lenfosit ($p<0.001$) ve trombosit sayısı ($p= 0.037$) belirgin bir düşüş eğilimi gösterirken, lökosit sayısı ($p<0.001$) artış eğilimi gösterdi (Tablo 4).

Tablo 4'te sunulduğu gibi, kabulde splenomegali olan hastalar daha yaşlı ($p= 0.0217$), ortanca aktif şikayet sayısı ($p<0.001$), yoğun bakım ünitesi ($p<0.001$) ve hastanede kalış süreleri ($p<0.001$) daha uzundu ve yoğun bakım ünitesine kabul oranı daha yüksekti ($p<0.001$).

Tablo 4: Hastalığın seyri ile ilişkili faktörlerin dağılımı.

Değişkenler	Komplike olmayan seyir (n= 212)	Hafif-orta şiddete seyir (n= 252)	Şiddetli seyir (n= 71)	Mortal seyir (n= 109)	p value
Yaş, yıl	48.5 (32.2 – 63)	58 (46.2 – 67)	66 (56 – 72)	69 (59.5 – 79)	<0.001^b
Erkek, n (%)	121 (57.1)	148 (58.7)	43 (60.6)	75 (68.8)	0.216 ^b
İlişkili sistemik hastalık sayısı, n	0 (0 – 1)	1 (0 – 2)	1 (0 – 2)	2 (0.5 – 3)	<0.001^b
Hipertansiyon, n (%)	34 (16)	64 (25.4)	34 (47.9)	48 (44)	<0.001^b
Diyabet, n (%)	27 (12.7)	64 (25.4)	21 (29.6)	31 (28.4)	0.001^b
Kalp hastalığı, n (%)	15 (7.1)	45 (17.9)	21 (29.6)	39 (35.8)	<0.001^b
Kronik akciğer hastalığı, n (%)	7 (3.3)	32 (12.7)	13 (18.3)	20 (18.3)	<0.001^b
Kronik böbrek yetmezliği, n (%)	1 (0.5)	8 (3.2)	8 (11.3)	7 (6.4)	<0.001^b
Nörolojik hastalık, n(%)	6 (2.8)	2 (0.8)	2 (2.8)	13 (11.9)	<0.001^b
Psikiyatik hastalık, n (%)	4 (1.9)	5 (2)	4 (5.6)	6 (5.5)	0.031^b
Kronik karaciğer hastalığı, n (%)	1 (0.5)	1 (0.4)	0 (0)	2 (1.8)	0.229 ^b
Malinite, n (%)	2 (0.9)	5 (2)	0 (0)	4 (3.7)	0.175 ^b
Obesite, n (%)	1 (0.5)	3 (1.2)	0 (0)	1 (0.9)	0.864 ^b
Aktif şikayet sayısı, n	1 (0 – 2)	2 (2 – 3)	2 (1 – 3)	2 (1 – 3)	<0.001^b
Lenfosit sayısı, birim	1.5 (1.1 – 1.9)	1.2 (0.9 – 1.6)	1.0 (0.6 – 1.5)	0.9 (0.6 – 1.4)	<0.001^b

Lökosit sayısı, <i>birim</i>	6.1 (4.7 – 8.0)	6.6 (5.5 – 9.0)	7.0 (5.4 – 10.4)	8.9 (5.7 – 12)	<0.001 ^b
Trombosit sayısı, <i>birim</i>	201 (171 – 250)	200 (163 – 263)	185 (153 – 238)	187 (144 – 239)	0.082 ^b
Splenomegali, <i>n (%)</i>	46 (21.7)	111 (44)	9 (12.7)	7 (6.4)	<0.001 ^b
YBÜ kabulü, <i>n</i>	0 (0)	22 (8.7)	57 (81.4)	99 (90.8)	<0.001 ^b
YBÜ kalış, <i>gün*</i>	3 (3 – 3)	3 (2 – 7)	6 (3 – 13)	8 (5 – 13)	0.003 ^b
Hastanede kalış, <i>gün</i>	5 (4 – 8)	8 (5 – 11)	18 (12 – 27)	11 (5 – 19)	<0.001 ^b

^bDoğrusal-doğrusal ilişkilendirme ile ki-kare testi.

Ek olarak, splenomegali oranı gruplar arasında anlamlı bir fark ortaya koydu. YBÜ'ne kabul oranı ve ortanca YBÜ ve hastanede kalış süresi, hastalık seyri kötüleştikçe önemli bir artış eğilimi göstermiştir (Tablo 5).

Tablo 5. Splenomegali ile ilişkili faktörlerin dağılımı

Değişkenler	Splenomegali (+) (n= 173)	Splenomegali (-) (n= 471)	p value
Yaş, <i>yıl</i>	61 (53 – 68.5)	58 (41 – 70)	0.017 ^a
Erkek, <i>n (%)</i>	97 (56.1)	290 (61.6)	0.241 ^b
İlişkili sistemik hastalık sayısı, <i>n</i>	1 (0 – 1.5)	1 (0 – 2)	0.788 ^a
Aktif şikayet sayısı, <i>n</i>	2 (2 – 3)	2 (1 – 3)	<0.001 ^a
Lenfosit sayısı, <i>birim</i>	1.3 (0.9 – 1.7)	1.2 (0.8 – 1.7)	0.181 ^a
Lökosit sayısı, <i>birim</i>	6.5 (5.4 – 8.8)	6.8 (5.0 – 9.3)	0.606 ^a
Trombosit sayısı, <i>birim</i>	192 (162 – 257)	200 (163 – 250)	0.903 ^a
YBÜ kabulü, <i>n</i>	2 (1.2)	176 (37.4)	<0.001 ^b
YBÜ kalış, <i>gün*</i>	6 (4 – 10)	8 (5 – 14)	<0.001 ^a
Hastanede kalış, <i>gün</i>	7 (4)	102 (21.7)	<0.001 ^b

YBÜ: yoğun bakım ünitesi. ^aMann-Whitney U test, ^bPearson's chi-square test ile Yate's continuity doğrulaması, ^cFischer's exact test. * 178 hasta arasında.

4. Tartışma ve Sonuç

COVID-19 hastalarında virüsün akciğerden periferik kana girip viremiye neden olduğu sonrasında özellikle ACE2 eksprese eden hedef organlara saldırdığı (dalak, testis, kalp, kolon, karaciğer) yapılan çalışmalarda gösterildi. Hem SARS-Cov-2 hem de otoimmünite, dalak, periferik lenf düğümleri ve diğer lenfoid dokuların bağışıklık hücrelerine zarar verir [4]. COVID-19 dalağa girdiğinde, bir dizi bağışıklık tepkisi başlatılır ve çoklu sitokinler salınır [11]. Bazı çalışmalar, artan inflamasyonla ilişkili splenomegali vakaları bildirmiştir (8). Çoğu durumda dalak rutin muayenede olmadığından, literatürde SARS-CoV-2 enfeksiyonunun dalak üzerindeki etkisi çok fazla araştırılmamıştır.

Laboratuvarca doğrulanmış 120 COVID-19 hastasının BT sonuçlarını değerlendiren bir çalışmada 22 hastada hafif splenomegali vardı. Bu çalışmaya dahil edilen hastaların 96'sı serviste, 11'i yoğun bakımda yatarak takip edilmiş ve 13'ü takip sırasında ex olmuştur; bu üç grubun splenomegali oranları %19,8 (19/96), %27.3 (3/11) ve 0 idi [12]. Yine bir başka çalışmada; basvuru anı ve 1 hafta sonra çekilen BT lerde dalak hacminin anlamlı olarak arttığı gösterildi. Bizim çalışmamızda literatür ile uyumlu olarak, enfeksiyonun ilk evrelerinde dalak boyutunun hafif-orta derecede arttığını ve bu artışın özellikle hafif şiddetli enfeksiyon tablosu olan hastalarda daha sık saptandığını göstermiştir.

Birçok çalışma, SARSCoV-2 enfeksiyonunun bağışıklık hasarına neden olabileceğini ve şiddetli veya yaşlı COVID-19 hastalarında lenfositlerin azalmasının çok yaygın olduğunu bildirmiştir [13]. Çalışmamızda da literatür ile benzer olarak hastalarda hastalık şiddetinin artmasıyla birlikte medyan lenfosit ve trombosit sayıları belirgin bir düşüş eğilimi gösterirken, lökosit sayısı artış eğilimi gösterdi. Çalışmamızda ileri yaş, hipertansiyon, DM ve kalp hastalığı COVID-19 şiddeti için, literatür ile uyumlu olarak öngörücü olmuştur [14].

Çalışmamız ile, hastaneye ilk başvuruda splenomegali saptanan hastalarda; COVID-19'un komplike olmadan daha hafif seyrettiği, hastanede kalış süresinin daha kısa olduğu ve mortalitenin bu grupta daha az görüldüğü sonucuna varılmıştır.

COVID-19 özellikle erken dönemde akciğer tutulumu ile kendini gösterse de sistemik tutulumu da neden olur ve hedefteki organlarından biri dalak olabilir. Ayrıca hastaların başvuru anındaki lenfosit, monosit ve trombosit sayıları COVID-19'un ilerlemesini öngörebilir. Çalışmamız sonucunda dalak boyutu artışının COVID-19 sonlanımı açısından dikkate alınması gereken bir belirteç olabileceğini düşündürmektedir.

Kısıtlılıklar

Çalışmamızın kaçınılmaz kısıtlılıkları mevcuttur. Çalışmanın retrospektif tasarımı, hastalara taburculuktan belli bir süre sonra kontrol BT çekilerek dalak boyutu yeniden değerlendirilerek karşılaştırma yapılmaması ve eş zamanlı COVID-19'un torasik görüntüleme özelliklerini değerlendirmemiş olması bu kısıtlılıklardan sayılabilir. Bununla birlikte çalışmamızda azımsanamayacak sayıda hasta popülasyonunun değerlendirilmesi, dalak boyutlarının ek bir tetkike ve maliyete ihtiyaç duyulmadan acile ilk başvuruda çekilen görüntülemelerden ölçülebilmesi, hastaların klinik sonlanım verilerinin ortaya konulması bakımından değerli veriler elde edilmiştir.

Etik Beyanı

Bu çalışmada, "Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi" kapsamında uyulması gerekli tüm kurallara uyulduğunu, bahsi geçen yönergenin "Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiğine Aykırı Eylemler" başlığı altında belirtilen eylemlerden hiçbirinin gerçekleştirilmediğini taahhüt ederiz.

Kaynakça

1. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. Nat Microbiol. 2020;5(4):536–44.
2. Lotfi M, Hamblin MR, Rezaei N. COVID-19: Transmission, prevention, and potential therapeutic opportunities. Clin Chim Acta. 2020 Sep;508:254–66.
3. Xu X, Chen P, Wang J, Feng J, Zhou H, Li X, et al. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. Sci China Life Sci. 2020;63(3):457–60.
4. Li M-Y, Li L, Zhang Y, Wang X-S. Expression of the SARS-CoV-2 cell receptor gene ACE2 in a wide variety of human tissues. Infect Dis poverty. 2020 Apr 28;9(1):45.
5. Basso C, Leone O, Rizzo S, De Gaspari M, van der Wal AC, Aubry M-C, et al. Pathological features of COVID-19-associated myocardial injury: a multicentre cardiovascular pathology study. Eur Heart J. 2020 Oct;41(39):3827–35.
6. Xu X, Chang XN, Pan HX, Su H, Huang B, Yang M, et al. [Pathological changes of the spleen in ten patients with coronavirus disease 2019(COVID-19) by postmortem needle autopsy]. Zhonghua bing li xue za zhi = Chinese J Pathol. 2020 Jun 8;49(6):576–82.
7. Han Q, Wen X, Wang L, Han X, Shen Y, Cao J, et al. Role of hematological parameters in the diagnosis of influenza virus infection in patients with respiratory tract infection symptoms. J Clin Lab Anal. 2020 May 4;34(5).
8. Haigh K, Syrimi ZJ, Irvine S, Blanchard TJ, Pervaiz MS, Toth AG, et al. Hyperinflammation with COVID-19: The key to patient deterioration? Clin Infect Pract. 2020 Oct;7:100033.
9. Tahtabasi M, Hosbul T, Karaman E, Akin Y, Konukoglu O, Sahiner F. Does COVID-19 cause an increase in spleen dimensions? Possible effects of immune activation, hematopoietic suppression and microthrombosis. Clin Imaging. 2021 Nov;79:104–9.

10. Kucybała I, Ciuk S, Tęczar J. Spleen enlargement assessment using computed tomography: which coefficient correlates the strongest with the real volume of the spleen? *Abdom Radiol*. 2018 Sep 19;43(9):2455–61.
11. Gu J, Gong E, Zhang B, Zheng J, Gao Z, Zhong Y, et al. Multiple organ infection and the pathogenesis of SARS. *J Exp Med*. 2005 Aug 1;202(3):415–24.
12. Tabatabaei SMH, Talari H, Moghaddas F, Rajebi H. CT Features and Short-term Prognosis of COVID-19 Pneumonia: A Single-Center Study from Kashan, Iran. *Radiol Cardiothorac imaging*. 2020 Apr;2(2):e200130.
13. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*. 2020 Feb;395(10223):507–13.
14. Mo P, Xing Y, Xiao Y, Deng L, Zhao Q, Wang H, et al. Clinical Characteristics of Refractory Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. *Clin Infect Dis*. 2021 Dec 6;73(11):e4208–13.

Serum Metalloproteinase-2 and Tissue İnhibitor Metalloproteinase-1 Levels As a Biomarker in Patients With Osteoarthritis Due To Brucella İnfection

Brucella Enfeksiyonuna Bağlı Osteoartritli Hastalarda Biyobelirteç Olarak Serum Metalloproteinaz-2 ve Doku İnhibitörü Metalloproteinaz-1 Seviyeleri

Mustafa GÜZEL ^{*İB}, Orhan AKPINAR ^{2İB}, Veysel Atilla AYYILDIZ ^{2İB}, Mümtaz Cem ŞİRİN ^{2İB}

¹ Maltepe Medical Center Department of Medical Microbiology, Istanbul, Turkey

² Süleyman Demirel University, Health Sciences Institute, Department of microbiology, Isparta, Turkey

³ Süleyman Demirel University, Medical Faculty, Department of Radiology, Isparta, Turkey

⁴ Süleyman Demirel University Faculty of Medicine Department of Medical Microbiology, Isparta, Turkey

ABSTRACT

Objectives: It was aimed to investigate the usability of MMP-2 and TIMP-1 levels as biomarkers in the osteoarticular complications of brucellosis.

Methods: The subjects were categorized into three groups as the healthy control group, brucella group, and brucella patients with osteoarticular involvement groups. Before medical treatment, serum samples from patients and control groups were stored at -80°C until the day of study. MMP-2 and TIMP-1 serum levels were quantified by the ELISA method.

Results: Serum level of MMP-2 (mean ± SD) in healthy control group was 1.71 +/- 0.10 ng / mL. Brucella patient group and Osteoarticular complication group were 14.3 +/- 2.52 ng / ml 20.65 +/- 2.33 ng / ml respectively (p=0.001). The mean TIMP-1 level in the control group was 3578.96 +/- 67.2 ng / mL, while in the Brucella group, this rate was 998.27 +/- 66.7 ng / mL and in the bone involvement group, 1656. 17 +/- 17.3 ng / ml. The difference between the control group and the brucella patients and the complicated group was statistically significant (p= 0.001).

Conclusions: We think that the significant change in serum levels of MMP-2 and TIMP-1 when evaluated together with the radiological method, can be used as a biochemical indicator of the development of osteoarticular complications.

Keywords: : Brucellosis, MMP-2, TIMP-1 ,osteoarticular complication, biomarker

Alınış / Received: 01.07.2022 Kabul / Accepted: 14.09.2022 Online Yayınlanma / Published Online: 20.12.2022



Ö Z E T

Amaç: Brusellozun osteoartiküler komplikasyonlarında MMP-2 ve TIMP-1 düzeylerinin biyobelirteç olarak kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlandı.

Metot: Olgular sağlıklı kontrol grubu, brusella grubu ve osteoartiküler tutulumu olan brusella hastaları olarak üç gruba ayrıldı. Medikal tedavi öncesi hasta ve kontrol gruplarından alınan serum örnekleri çalışma gününe kadar -80°C'de saklandı. MMP-2 ve TIMP-1 serum seviyeleri, ELISA yöntemiyle ölçüldü.

Bulgular: Sağlıklı kontrol grubunda MMP-2 (ortalama \pm SD) serum düzeyi 1,71 +/- 0,10 ng / mL idi. Brusella hasta grubu ve Osteoartiküler komplikasyon grubunda sırasıyla 14,3 +/- 2,52 ng / ml 20,65 +/- 2,33 ng / ml idi (p=0,001). Kontrol grubunda ortalama TIMP-1 düzeyi 3578,96 +/- 67,2 ng/ml iken, Brucella grubunda bu oran 998,27 +/- 66,7 ng/ml, kemik tutulumu grubunda 1656, 17 +/- 17,3 ng / ml idi . Kontrol grubu ile brusella hastaları ve komplike grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı (p= 0,001).

Sonuç: Radyolojik yöntemle birlikte değerlendirildiğinde, MMP-2 ve TIMP-1 serum seviyelerindeki önemli değişiklik, brusellozun osteoartiküler komplikasyonlarının gelişiminin biyokimyasal bir göstergesi olarak kullanılabilirliğini düşünüyoruz.

Anahtar kelimeler: Brusellozis, MMP-2, TIMP-1 ,osteoartiküler komplikasyon, biyobelirteç



1. Introduction

Brucellosis is a zoonotic bacterial infection that affects many organs and systems. It is transmitted by direct or indirect contact with infected animals or their products. Although brucella infection can be transmitted to humans in various forms, the most common way of spreading is by consuming unpasteurized milk and dairy products from an infected animal [1,2]. Besides, it can also be transmitted directly through the damaged skin, conjunctival inoculation, and inhalation of infectious aerosols. There is no specific clinical finding as it can involve all organs and tissues. Although the liver, bone marrow, spleen, and lymph nodes are the most frequently involved organs, they can also include organs and tissues such as the heart, genitourinary system organs, central nervous system, and joints [1,2,3]. Bone and joint involvement, with a rate of about 40%, are the most common complications of brucellosis [2,4,5]. The most commonly affected areas are sacroiliac joints, peripheral joints and spinal regions. Various clinical conditions have been reported, including peripheral arthritis, osteomyelitis, sacroiliitis, bursitis, spondylitis, and tenosynovitis [5,6,7].

Although the clinical and radiological features of osteoarthritic brucellosis are well known, the mechanisms of bone involvement are still poorly understood. Under different conditions, matrix metalloproteinases (MMPs) are released in the inflammatory environment. MMPs are produced not only by macrophages and neutrophils but also by several osteoblasts, including MMP-2. Type I collagen in Bone and MMP-2 degrades type II collagen in cartilage [8].TIMPs, which are specific tissue inhibitors, play a crucial role in the control of MMP activity. Tetracyclines, α 2-macroglobulin, heparin, and synthetic inhibitors are among the active MMP inhibitors [9]. TIMPs are proteins necessary for regulating connective tissue metabolism. They are found in many tissues and body fluids. It activates the latent enzyme form by binding irreversibly and non-covalently to MMPs and preventing catalytic activity maintenance [10,11].

We aimed to investigate the levels of MMP-2 and TIMP-1, which play a role in the regulation of connective tissue metabolism in patients with brucellosis who have osteoarticular involvement.

2. Material and Method

Ethical Approval

The study was conducted by Research Ethics Committee of the Suleyman Demirel University (no:116137).

Study Population

Laboratory and radiological data of outpatient and inpatient brucellosis patients admitted to xxx Infection diseases clinic were evaluated between January 2018 and January 2020. People aged 25 to 65 years without another inflammatory, autoimmune and malignant diseases were included in the study. The subjects were categorized into three groups, the healthy control group (n=30), the brucella group (n=30), and the brucella patients with osteoarticular complication group (n=30).

Group-A (Healthy control group)

A control group was created with individuals without acute or chronic disease, symptoms, or pathological physical examination. It was similar in age and gender in both groups.

Group-B (Brucella group)

Patient serums for the Rose Bengal test positive were examined by immunocapture-agglutination technique to eliminate the factors that caused false negativity/positivity. A brucella patient group (n = 30) was created by patients without complications.

Group-C (Osteoarticular complication group)

Brucella patients with osteoarticular involvement were evaluated as a separate group. Traditional radiological methods were used to assess morphological changes in the osteoarticular system. Patients with osteoarthritic participation were identified with cases of sacroiliitis, peripheral arthritis, spondylitis, and osteomyelitis.

Diagnosis of Brucellosis

Brucellosis was diagnosed based on clinical, bacteriological, and serological findings. Patient serums were first screened by the Rose Bengal slide agglutination test (Seromed, Istanbul, Turkey). Then the Brucellacapt test (Vircell SL, Granada, Spain) was performed according to the manufacturer's instructions. Antibody titers of 1/160 and above were considered positive for brucellosis, whereas those lower than 1/160 were considered negative. Blood cultures were performed by using BacT/ALERT 3D (bioMérieux, France) automated blood culture system. The isolated bacterial strains were identified using conventional methods and Phoenix 100 (Becton Dickinson, USA) automated system. Osteoarticular brucellosis is diagnosed with clinical inflammatory signs of the affected joints, with positive serological tests and positive cultures. Radiological evaluations such as joint sonography, direct radiography, computed tomography, and magnetic resonance imaging were performed to diagnose osteoarticular brucellosis.

ELISA detection of MMP-2 and TIMP-1

Blood samples were centrifuged, and serum was stored at -80°C until testing. Stored serum was analyzed for MMP-2 (Human MMP-2 ELISA Kit, Elabscience, USA) and their specific inhibitors TIMP-1 (Human TIMP-1 ELISA Kit, Elabscience, USA) with commercially available sandwich ELISA according to the manufacturer guidelines. ELISA testing was performed at the Suleyman Demirel University research laboratory using the ELISA plate washer (Medispec ESW 300, Palmcity 72, USA) and ELISA plate reader (Biotek FLX50, Absorbance Microplate Reader, ABD).

Statistical analysis

SPSS 16.0 (for Windows) version was used for statistical evaluation. For the assessment of the results, standard statistical methods were used. Average, standard deviation, minimum and maximum values of the data were determined. The student's t-test was used to compare independent quantitative data with normal distribution. Mann Whitney U-test was used to compare independent quantitative data without normal distribution. Comparing the categorical and continuous variables between the groups was performed using the chi-square test and ANOVA. Correlation between the investigated variable was found using Pearson's coefficient linear correlation. The data were evaluated in the 95% confidence interval, and $p < 0.05$ were considered significant. The ROC curves were generated to assess the sensitivity and specificity for the prediction of osteoarticular complication.

3. Results

The mean ratios (mean \pm SD) of MMP-2 in the control group, Brucella patient group and osteoarticular complication group were 1.71 ± 0.10 ng / mL, 14.3 ± 2.52 ng / ml 20.65 ± 2.33 ng / ml respectively. The difference between the control group, the brucella patients, and the complicated group was statistically significant ($p = 0.001$). Compared with the control group, the MMP-2 ratios increased about sevenfold in the brucella group and about tenfold in the bone involvement group (Figure-1).

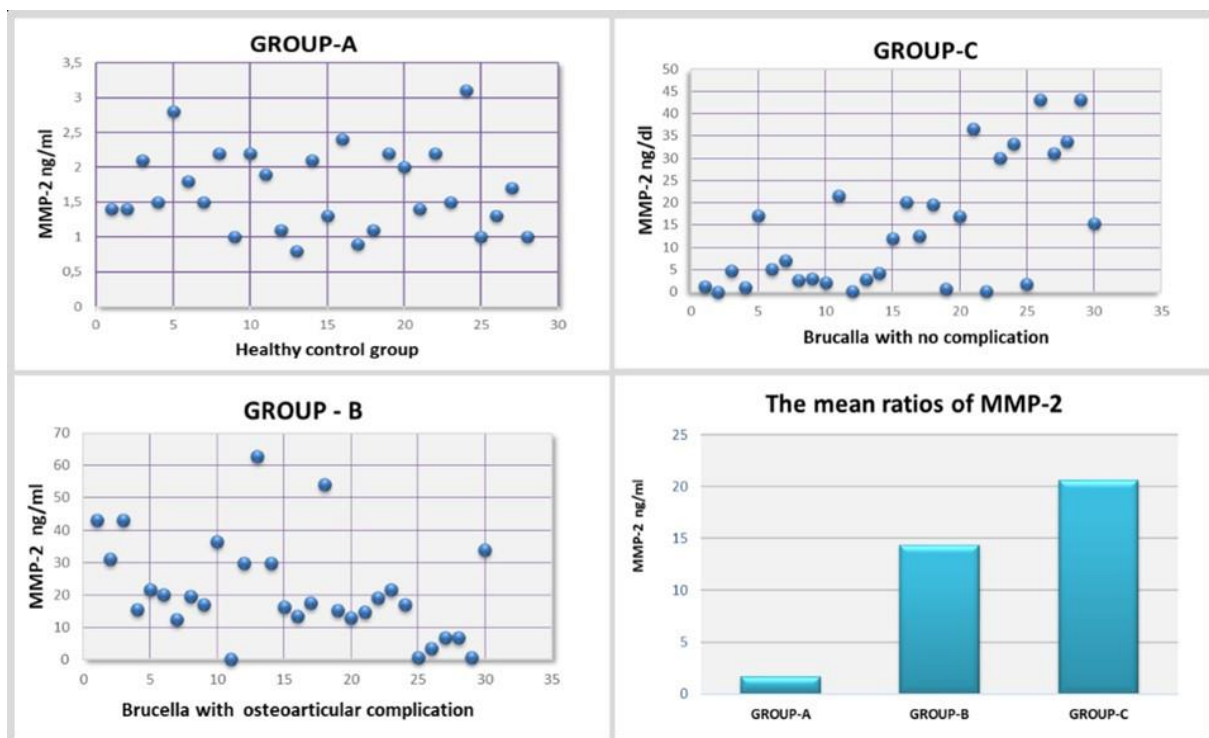


Figure 1: Distribution of MMP-2 serum levels and mean rates by study groups

The mean TIMP-1 level in the control group ($n = 30$) was 3578.96 ± 67.2 ng / mL, while in the Brucella group this rate was 998.27 ± 66.7 ng / mL and in the bone involvement group, $1656, 17 \pm 17.3$ ng / ml. The difference between the control group, the brucella patients, and the complicated group was statistically significant ($p: 0.001$). Compared with the control group, TIMP-1 ratios decreased about four times in the brucella group and about twice in the bone involvement group (Figure-2).

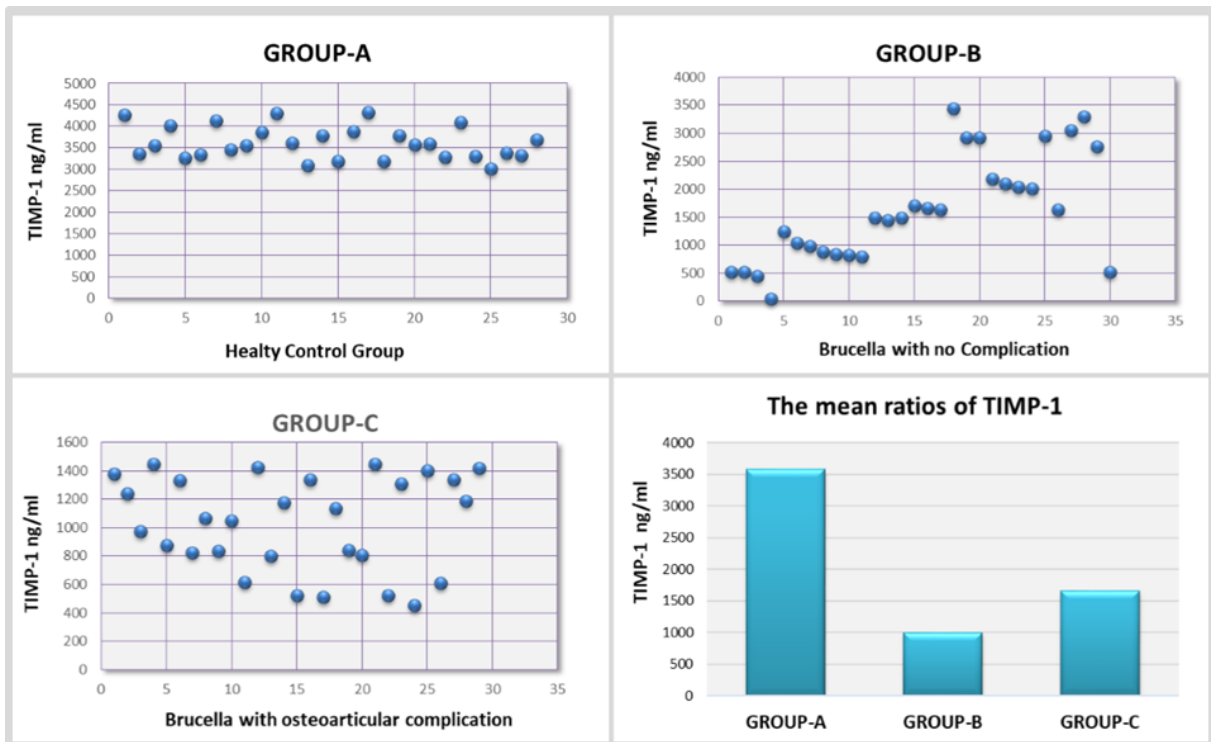


Figure-2: Distribution of TIMP-1 serum levels and mean rates by study groups

This difference was statistically significant ($p: 0.001$). When all groups were evaluated, a negative correlation was found between serum levels of MMP-2 and TIMP-1 ($p < 0.05$; $p = 0.001$). When we compared the MMP-2 / TMP-1 ratios, this ratio was $0.045 \pm 0.029 \mu\text{g} / \text{ml}$ in the control group and $1.438 \pm 0.588 \mu\text{g} / \text{ml}$ in the Brucella patient group and $1.246 \pm 0.456 \mu\text{g} / \text{ml}$ in the bone involvement group (Figure-3)

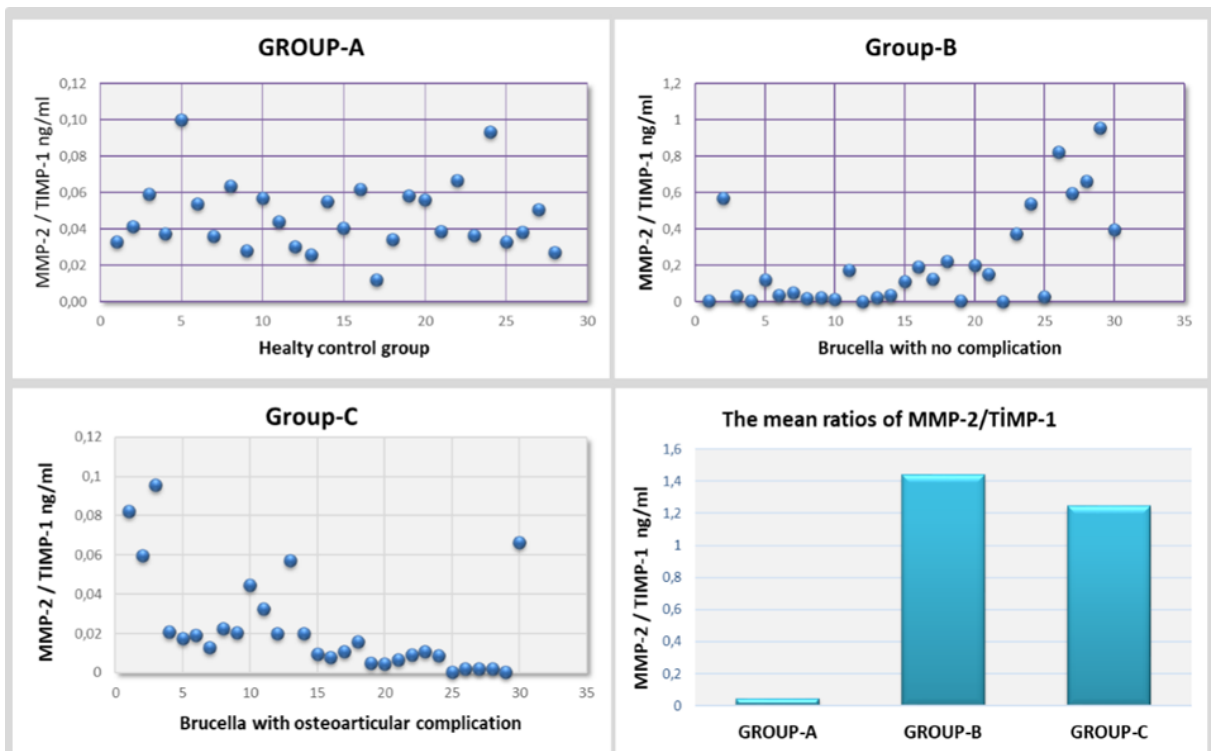


Figure-3: Distribution of MMP-2/TIMP-1 serum levels and mean rates by study groups

The difference between the control group, the brucella patients, and the complicated group was statistically significant ($p: 0.001$). ROC analysis was performed to evaluate the osteoarticular complication of brucella, which demonstrated that areas under the curve (AUC) of MMP-2, TIMP-1 ROC analysis also showed a cut-off value of the sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value. (Table 1, Figure 4). MMP2 and TMP1 measurement results had a significant ROC curve, whereas MMP2 / TMP1 ratios did not have a significant curve between brucella patients and bone involvement groups.

Table 1:The area under the curve (AUC) values for MMP-2 and TIMP-1 serum levels

Variables	AUC (95% CI)	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	P-Value	Accuracy
MMP-2	0.84 (0.79-0.89)	53%	83%	0.76	0,64	0,054	68%
TIMP-1	0.78 (0.65-0.87)	100%	56%	0.69	1	0,005	78,3%

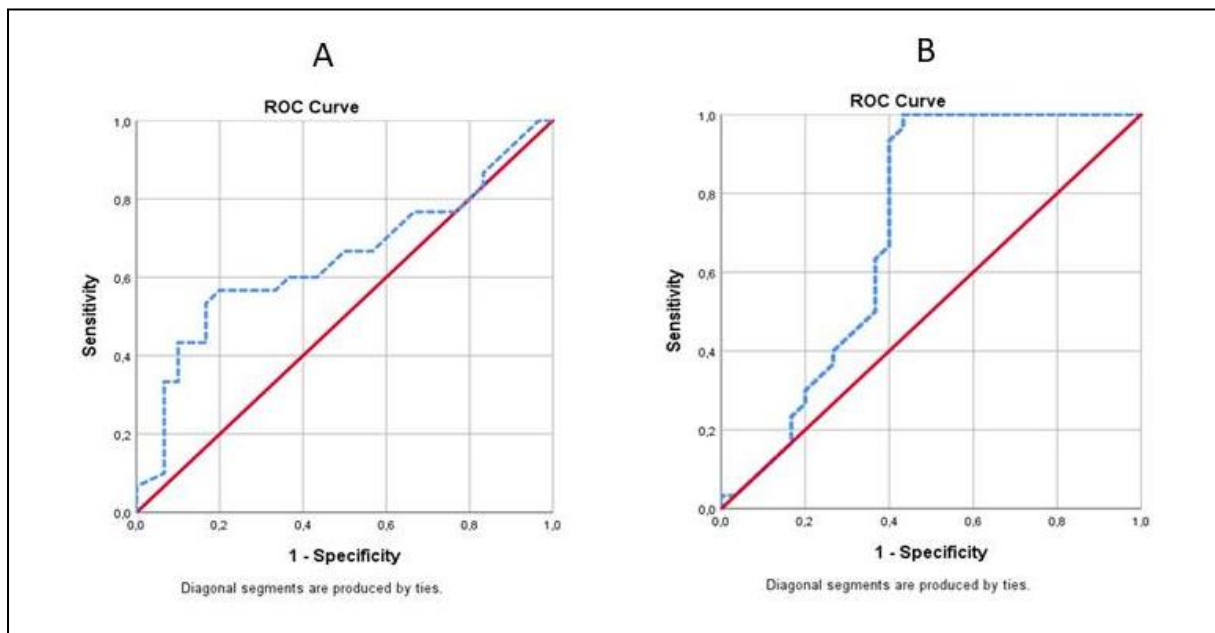


Figure-4: A; ROC curves of MMP-2 serum level for discriminating osteoarticular involvement B; ROC curves of TIMP-1 serum level for determining osteoarticular involvement

4. Discussion and Conclusion

Brucellosis is a common disease worldwide and causes a considerable disease burden in endemic countries such as Turkey. Brucellosis may involve many organs and systems. The clinical manifestations of brucellosis are related to inflammatory processes in acute and chronic periods [3,4]. Brucellosis may become chronic, resulting in osteoarticular complications leading to bone and joint damage. In most cases of osteoarticular involvement, bone and joint damage are caused by the inflammatory reaction, including increased MMP activity, provoked by the infection [11]. While clinical and radiological evaluations are revealed in brucellosis, immunopathological mechanisms have not been fully elucidated yet. In recent studies, the role of matrix metalloproteinases in the immunopathogenesis of human brucellosis has been tried to be explained. It is assumed that MMPs have essential in developing brucella complications [12,13].

Osteoblasts have been shown to produce several MMPs, including MMP-2. MMP-2 is extremely important because it degrades the type-II collagen in the bone and the cartilage. The potential contribution of MMPs to tissue damage in osteoarticular brucellosis has not been evaluated [8]. We aimed to investigate the levels of MMP-2 and TIMP-1 in patients with brucellosis who have osteoarticular involvement. The current study showed an increased serum MMP-2 level in the brucella group and the bone involvement group compared with the control group (Figure-1). This study showed increased serum matrix metalloproteinase levels in all brucellosis patients ($p = 0001$). Serum MMP-2 levels were higher in all patients with osteoarticular involvement. This increase was statistically significant between the group with osteoarticular involvement and other groups. ($p < 0.05$; $p = 0.001$). The results of the presented study suggested that MMP-2 has a vital role in the development of osteoarticular complications.

Studies on several cell lines have shown that MMP production can be induced by GM-CSF (Granulocyte macrophage-colony Stimulating Factor) [14,15]. This factor, produced by Brucella-infected osteoblasts, may stimulate MMP-2 in the same cells [12,13]. Different studies have shown that GM-CSF is an essential mediator of MMP-2 production by brucella-infected osteoblasts. Cytokines such as TNF- and IL-1 induce MMP-2 secretion by osteoblasts [15,16]. But Brucella-infected osteoblasts do not produce detectable levels of TNF- or IL-1. Therefore, the role of GM-CSF secreted by Brucella-infected osteoblasts is essential in increasing MMP-2 production [8,17]. Šiširak et al. demonstrated that the detection of matrix metalloproteinases in the serum is necessary for assessing the disease activity and predicting the development of complications of brucellosis [18]. MMPs are capable of breaking down the components of the extracellular matrix. However, they also break down some proteinases, chemotactic molecules, adhesion molecules, and cell surface receptors. The activated forms are all inhibited by TIMPs that bind tightly to each activated enzyme and block its action. However, the localization and clearance of MMPs are also tightly controlled [11,8,19]. In vivo, the activity of MMPs is counterbalanced by the activity of TIMPs. This balance between MMPs and their inhibitors TIMPs is of great importance in maintaining physiological events in organisms, such as remodeling of the ciliate, wound healing, angiogenesis, inflammation, apoptosis, and development of the immune response [20,21,22]. Our study showed that TIMP-1 was expressed in serum samples of all brucellosis patients. Compared with the control group, the serum level of TIMP-1 decreased about two times in the bone involvement group (figure-2). This difference was statistically significant ($p: 0.001$). The area under the curve of TMP1 was found to be more important. In osteoarticular infections or inflammatory conditions, TIMPs generally do not increase to the same extent as MMPs. Therefore, increasing the MMP / TIMP ratio is a biomarker that supports cartilage and joint damage [23,24,25].

When all groups were evaluated, a negative correlation was found between MMP-2 and TIMP-1. Our study showed that serum levels of MMP-2 / TIMP-1 ratios were higher in the brucella and bone involvement group compared to the control group. Compared with the Brucella patient group, the serum level of the MMP-2 / TIMP-1 ratios was lower in the bone involvement group. The presented study showed no statistically significant correlation between serum levels of MMP-2 / TIMP-1 ratios and the development of osteoarticular complications ($p 0.05$). In other words, our results show that MMP-2 / TIMP-1 ratios cannot be used as a biomarker to show osteoarticular complications. Serum levels of MMP-2 dominated in all patients with osteoarticular complications. The equilibrium MMP activity bias shift leads to uncontrolled destruction of the matrix and, ultimately, pathophysiological events. Osteoarthritic joints contain increased MMP and, less frequently, increased TIMP [8,24]. It was demonstrated that osteoarticular complications in human brucellosis were manifested as cartilage degradation and bone loss [12,13,25].

Measurement of metalloproteinase concentration in serum is non-invasive, easy to administer, and relatively fast. It could be a promising procedure for determining osteoarticular involvement of brucella. Although the significant change in serum levels of MMP-2 and TIMP-1 does not provide a definitive

clinical diagnosis, they can be used as a biochemical indicator of the development of osteoarticular complications of brucellosis when evaluated together with the radiological method.

Declaration of Ethical Code

In this study, we undertake that all the rules required to be followed within the scope of the "Higher Education Institutions Scientific Research and Publication Ethics Directive" are complied with, and that none of the actions stated under the heading "Actions Against Scientific Research and Publication Ethics" are not carried out.

References

- [1] Young, E.J. 2010. Brucella Species. Ss 2921-25. Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE.,7th ed.2010. Principles and Practice of Infectious Diseases. Churchill Livingstone,Philadelphia,USA, 4028s
- [2] Akpınar, O. 2016. Historical perspective of brucellosis: a microbiological and epidemiological overview. Le Infezioni in Medicina, 24(1),77-86.
- [3] Corbel, M. J. 2006. Brucellosis in humans and animals. World Health Organization. CDS/EPR/2006.7, 89s.
- [4] Franco, M. P., Mulder, M., Gilman, R. H.,Smits, H. L. 2007. Human brucellosis. The Lancet infectious diseases, 7(12), 775-786.
- [5] Akpınar, O., Kılıç, H. (2012). Bruselloz: 382 olgunun geriye dönük irdelenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 3(3), 108-113.
- [6] Ibero, I., Vela, P., & Pascual, E. (1997). Arthritis of shoulder and spinal cord compression due to Brucella disc infection. British journal of rheumatology, 36(3), 377-381.
- [7] Duman, A., & Akpınar, O. (2016). Brucellar spondylodiscitis in chronic low back pain patients. Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 7(3), 63-65.
- [8] Burrage, P. S., Mix, K. S., Brinckerhoff, C. E. 2006) Matrix metalloproteinases: role in arthritis. Frontiers in Bioscience-Landmark, 11(1), 529-543.
- [9]Nagase H, Woessner JFJr. 1999.Matrix metalloproteinases. J Biol Chem ,274,21491-4.
- [10] Lambert, E., Dassé, E., Haye, B., Petitfrère, E. 2004. TIMPs as multifacial proteins. Critical reviews in oncology/hematology, 49(3), 187-198.
- [11] Behera, A. K., Hildebrand, E., Scagliotti, J., Steere, A. C., Hu, L. T. 2005. Induction of host matrix metalloproteinases by Borrelia burgdorferi differs in human and murine Lyme arthritis. Infection and immunity, 73(1), 126-134.
- [12] Delpino, M. V., Fossati, C. A., Baldi, P. C. 2009. Proinflammatory response of human osteoblastic cell lines and osteoblast-monocyte interaction upon infection with Brucella spp. Infection and immunity, 77(3), 984-995.
- [13] Scian, R., Barrionuevo, P., Fossati, C. A., Giambartolomei, G. H.,Delpino, M. V. 2012. Brucella abortus invasion of osteoblasts inhibits bone formation. Infection and immunity, 80(7), 2333-2345.
- [14] Kohno, Y., Tanimoto, A., Cirathaworn, C., Shimajiri, S., Tawara, A., Sasaguri, Y. 2004. GM-CSF activates RhoA, integrin and MMP expression in human monocytic cells. Pathology international, 54(9), 693-702.
- [15] Krubasik, D., Eisenach, P. A., Kunz-Schughart, L. A., Murphy, G., English, W. R. 2008. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor induces endothelial capillary formation through induction of membrane-type 1 matrix metalloproteinase expression in vitro. International journal of cancer, 122(6), 1261-1272.
- [16] Scian, R., Barrionuevo, P., Giambartolomei, G. H., Fossati, C. A., Baldi, P. C., & Delpino, M. V. (2011). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-and tumor necrosis factor alpha-mediated matrix metalloproteinase production by human osteoblasts and monocytes after infection with Brucella abortus. Infection and immunity, 79(1), 192-202.
- [17] Saklatvala J, Nagase H, Salvesen G, Brew K. 2003. Designing TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) variants that are selective metalloproteinase inhibitors. Biochem Soc Symp, 70:201-12.

- [18] Šiširak, M., & Hukić, M. (2015). Osteoarticular complications of brucellosis: The diagnostic value and importance of detection matrix metalloproteinases. *Acta medica academica*, 44(1), 1.
- [19] Cawston, T. 1993. Blocking cartilage destruction with metalloproteinase inhibitors: a valid therapeutic target?. *Annals of the rheumatic diseases*, 52(11), 769.
- [20] Galis, Z. S., & Khatri, J. J. (2002). Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circulation research*, 90(3), 251-262.
- [21] Jacob, M. P., Badier-Commander, C., Fontaine, V., Benazzoug, Y., Feldman, L., Michel, J. B. 2001. Extracellular matrix remodeling in the vascular wall. *Pathologie Biologie*, 49(4), 326-332.
- [22] Brinckerhoff, C. E., & Matrisian, L. M. 2002. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nature reviews Molecular cell biology*, 3(3), 207-214.
- [23] Kevorkian, L., Young, D. A., Darrah, C., Donell, S. T., Shepstone, L., Porter, S., Clark, I. M. 2004. Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 50(1), 131-141.
- [24] Malesud, C. J., Islam, N., Haqqi, T. M. 2003. Pathophysiological mechanisms in osteoarthritis lead to novel therapeutic strategies. *Cells Tissues Organs*, 174(1-2), 34-48.
- [25] Murphy, G., Lee, M. H. 2005. What are the roles of metalloproteinases in cartilage and bone damage?. *Annals of the rheumatic diseases*, 64(suppl 4), iv44-iv47.

A Comparison of the Short-Term Efficacy of Physiotherapy Approaches in Patients with Lateral Epicondylitis

Lateral Epikondilitli Hastalarda Fizyoterapi Yaklaşımlarının Kısa Dönem Etkinliğinin Karşılaştırılması

Şahin ÇAKIR¹, Ayşenur TUNCER², Muhammed Furkan ARPACI³, Mine ARĞALI DENİZ⁴

¹ Turgut Ozal University, Malatya Training and Research Hospital, Department of Physiotherapy and Rehabilitation, Malatya, Turkey

² Hasan Kalyoncu University, Faculty of Health Sciences, Department of Physiotherapy and Rehabilitation, Gaziantep, Turkey

³ Malatya Turgut Ozal University, Faculty of Medicine, Department of Anatomy, Malatya, Turkey

⁴ Suleyman Demirel University, Research and Application Hospital, Department of Physical Therapy and Rehabilitation, Isparta, Turkey,

ABSTRACT

The study aimed to investigate the short-term effects of radial nerve self-mobilization [RNSM], manual therapy [MT], and extracorporeal shock wave therapy [ESWT] on pain, pain-free grip strength, functional status, and patient satisfaction in patients with Lateral Epicondylitis [LE] and to determine the superiority of these methods to each other. 48 patients diagnosed with LE were included in the study and were randomly divided into three groups. RNSM was applied to all patients as a home program. The first group [n=16] received only the RNSM as a home program, the MT group [n=16] received MT combined with RNSM, and the ESWT group [n=16] received ESWT combined with RNSM. The RNSM was applied five days per week, and the MT and ESWT for two sessions per week for three weeks. Pain severity, pain-free handgrip strength, functionality levels, and patient satisfaction were evaluated before and after three weeks of treatment. The pain level significantly decreased, and handgrip strength and functionality increased in all groups after three weeks [p<0.001]. In comparison between the groups, the decrease in pain level, the increase in maximum grip strength, and patients' overall satisfaction scores were found to be higher in the MT group than in the ESWT, and only the RNSM groups [p<0.05]. MT application combined with radial nerve self-mobilization exercises in the treatment of LE appears to be more effective.

Keywords: Lateral epicondylitis, radial nerve mobilization, manual therapy, extracorporeal shock wave therapy, pain

Alınış / Received: 20.06.2022 Kabul / Accepted: 10.11.2022 Online Yayınlanma / Published Online: 20.12.2022



Ö Z E T

Çalışmamızdaki amaç Lateral Epikondilit'te [LE] self radial sinir mobilizasyonu [RSM], manuel terapi [MT], ekstrakorporeal şok dalga tedavisi [ESWT]'nin ağrı, kavrama kuvveti, fonksiyonel durum ve hasta memnuniyeti üzerindeki erken dönem etkilerinin araştırılması ve bu yöntemlerin birbirlerine göre üstünlüğünü belirlemektir. Çalışmaya 48 LE tanılı hasta dahil edildi ve rastgele üç gruba ayrıldı. Tüm hastalara ev programı olarak RSM uygulandı. Birinci grup [n=16] sadece RSM'yi ev programı olarak, MT grubu [n=16] RSM ile birlikte MT ve ESWT grubu [n=16] RSM ile birlikte ESWT aldı. RSM haftada beş gün, MT ve ESWT ise üç hafta boyunca haftada iki seans uygulandı. Üç haftalık tedaviden önce ve sonra ağrı şiddeti, ağrısız kavrama gücü, işlevsellik düzeyleri ve hasta memnuniyeti değerlendirildi. Üç haftalık tedavi sonrasında tüm gruplarda ağrı düzeyi anlamlı olarak azalırken kavrama gücü ve fonksiyonellikte artış oldu [p<0.001]. Gruplar arası karşılaştırmada ise ağrı düzeyindeki azalma, maksimum kavrama gücündeki artış ve hastaların genel memnuniyet skorları MT grubunda ESWT ve sadece RSM gruplarına göre daha yüksek bulundu [p<0.05]. LE tedavisinde RSM egzersizleri ile kombine MT uygulamasının daha etkili olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Lateral epikondilit, radial sinir mobilizasyonu, manuel terapi, ekstrakorporeal şok dalga tedavisi, ağrı



1. Introduction

Lateral epicondylitis [LE] is one of the most common upper extremity lesions, characterized by pain in the epicondyles lateralis and forearm extensor muscles [1]. It is generally seen in those exposed to repetitive wrist extension, forearm pronation-supination, and vibrations. There is a reported prevalence of 1-3% in the general population, and it is seen more often between the ages of 30-60 years, primarily in females and on the dominant side [2,3]. Symptoms of LE are seen as tenderness on the lateral epicondyle, pain with resistant middle finger extension and wrist extension, a decrease in pain-free grip strength, and difficulty in daily living activities [4].

Many conservative therapies have been used in the treatment of LE, and no standard protocol is documented in the literature [4-6]. The general principle in LE is to relieve pain, accelerate recovery, increase function, and ensure a rapid return to daily life activities. Most patients can recover with conservative treatment. Surgical treatment is indicated in 5-10% of patients whose symptoms do not improve with conservative treatment [4]. Treatment procedures include modifications of daily life activities, exercise, manual therapy, orthosis, taping, laser treatment, extracorporeal shock wave therapy, and pharmacotherapy [2, 4-7].

Exercise therapy, including radial nerve mobilization exercises, has been used to treat musculoskeletal problems, including LE [8,9]. Nerve mobilization or neurodynamics mobilization, defined by David Butler, is aimed at restoring homeostasis in and around the nervous system through facilitating movement between neural structures and their surroundings. It is stated that neural shifting reduces adhesions between the nerve and surrounding tissue, improves neural vascularity, and improves the axoplasmic flow [9-11]. Manual therapy [MT] increases joint and soft tissue mobility by stimulating mechanoreceptors. By stimulating the mechanoreceptors, the mechanical effect enables

the collagen fibrils to regain the ability to glide over scar tissue and increase joint mobility. It has been reported that in this way, articular structures increase flexibility and tissue strength, and these effects are utilized in LE. The biomechanical effects seen help to reveal indirect neurophysiological responses. Receptor nerve endings in periarticular structures affect pain, proprioception and muscle relaxation. Matrix production is stimulated, circulation increases, histamine release decreases and reflex sympathetic effect is inhibited. This reduces pain and protective muscle spasm. With increased intra-articular movement, synovial fluid movement is stimulated, edema is reduced with increased circulation and intra-articular structures are nourished [12-14]. In the 1990s, extracorporeal shock wave therapy [ESWT], developed for soft-tissue problems, was widely used in the treatment of musculoskeletal problems. Although the analgesic effect of ESWT has not been fully elucidated, it is widely accepted that shock waves cause hyperstimulation analgesia of nerve endings at the painful point. It is thought to contribute to the analgesic effect by increasing cell membrane permeability, blocking nociceptors, reducing neuropeptides such as Substance P and calcitonin gene-related peptide (CGRP) [15]. Although the current level of evidence for ESWT is largely unknown yet, the success rate of treatment varies between 65% and 91% [16].

Since lateral epicondylitis as a common disease results in economic losses, efficient, safe, and easily applicable treatment approaches should be preferred. Most patients diagnosed with lateral epicondylitis can be effectively managed with non-surgical treatment. There are numerous studies for the non-surgical treatment of LE, but the current literature does not provide conclusive evidence for the treatment of LE. Therefore, the aim of this study was to determine the short-term effects of RNSM, MT, and ESWT approaches on pain, pain-free grip strength, functional status and patient satisfaction in patients with LE; to evaluate the superiority of these approaches to each other. The hypothesis of the study was that there would be a difference in respect to pain, pain-free grip strength and functionality between the results.

2. Material and Method

This randomized, controlled study was conducted in the Malatya Training and Research Hospital Department of Physiotherapy and Rehabilitation. Participants randomized the list in order of arrival method was divided into groups. The study was approved by the Hasan Kalyoncu University School of Health Sciences Non-Interventional Research Ethics Committee [2018-5]. All the subjects were given an explanation of the study and signed a consent form before the examination.

Participants

Volunteer patients older than 18 years of age with a diagnosis of LE were included in the study. The study inclusion criteria were defined as follows; the patients had complaints of pain and tenderness on and around the lateral epicondyle and increased pain with resistant elbow extension, wrist extension, gripping, and supination. The study exclusion criteria were defined as follows: patients with tendon rupture, limited joint movement as a result of known ulna, radius or humerus fracture, undergoing surgery in the elbow region, using painkillers, with bilateral symptoms, cardiac arrhythmia or pacemaker, nerve or nerve root compression, local dermatological problems, with diabetes mellitus or neurological problems, and those who had received physical therapy and injections in the last six months. The first group received only the RNSM exercise as a home program. The MT group received the same RNSM combined with MT. The third group received ESWT combined with the same RNSM.

Interventions

Radial Nerve Self Mobilization [RNSM] group: All the patients in the study received general training about the mechanism of LE, progression, and preventative measures. The patients were also taught how to apply home exercises comprising radial nerve mobilization. While applying radial nerve self-mobilization, the patient was in a standing position, depressed the shoulder and rotated the shoulder internally, extended elbow, turned wrist flexion and towards the ulnar deviation, looked towards the

hand, and held at it for 5 seconds before returning to the initial position [Fig. 1a] [9]. These exercises were to be performed at home five days a week, with ten repetitions in each session for a total of three weeks. Once a week, a reminder message was sent to all the patients.

Manual Therapy [MT] group: For the MT group, in conjunction with RNSM, MT techniques were applied two days a week for three weeks by the physiotherapist [SC], who was seven years of clinically experienced and was trained in manual therapy. Deep friction massage was applied to the extensor carpi radialis brevis muscle in transverse direction for 5 minutes, with the patient in a comfortable position on the bed, elbow flexed, and forearm in pronation. For joint mobilization, starting with cervical tractions, mobilizations were applied to the distal and proximal radio-ulnar and humero-ulnar joints at grade 1-2 intensity. Mobilization oscillations 1-2/sec., 5 sets and 20 sec each set. was in the form. [Figure 1b-f] [2, 7,13].



Figure 1. Mobilization techniques applied to patients; **a:** mobilization of radial nerve **b:** deep friction massage **c:** mobilization of the humeroulnar joint **d:** mobilization of the humeroradial joint **e:** mobilization of the proximal radioulnar joint **f:** mobilization of the distal radioulnar joint.

Extracorporeal Shock Wave Therapy [ESWT] group: Similarly, in conjunction with RNSM, a total of six ESWT sessions were applied two days a week for three weeks by the physiotherapist [SC]. The ESWT therapy was applied at 8 Hz frequency, 1.8 bar intensity, and 2000 beats using a Swiss DolorClast® Master ESWT device [EMS SA, CH, Nyon, Switzerland] [16]. ESWT was applied to the lateral epicondyles and the sensitive points around them. As the area of application is narrow, to minimize complications, low pressure was preferred. The patients were followed up until the end of the study, and no local tissue effect was reported.

Outcome measures

The demographic information, affected side and duration of complaints was recorded for all the patients at baseline before the treatment. Evaluations were made of pre-and post-treatment pain intensity, wrist ROM, hand and finger grip strength, functional status of the upper extremity, and patient satisfaction.

Pain severity: This was evaluated using a Visual Analog Scale [VAS]. On a 10 cm horizontal line, the patients indicated the pain level at rest, during activity, and at night before the treatment at baseline, and at the end of 3 weeks following the last treatment [17].

Pain-free handgrip strength: Pain-free maximum grip strength was taken with a hand dynamometer [Baseline Hydraulic Hand Dynamometer, Irvington, NY, USA]. The test was measured until the

patients felt discomfort. The pain-free maximum grip strength test was performed in two positions of the elbow. First, the patient is seated with the shoulder in adduction, the elbow in 90° flexion, the forearm neutral, and the wrist in 0-30° extension and 0-15° ulnar deviation, and the second measurement was taken on the elbow in the extension [18]. The measurements were repeated three times at the affected side at 30-second intervals, and the average of the measurements was taken for analysis. Values were recorded in the kg-force.

Level of functionality: The Turkish version of the Disabilities of the Arm, Shoulder, and Hand [DASH] was used to assess upper extremity functions [19]. The questionnaire consists of three sections, 38 questions in total related to symptoms and activities of daily living scored on a 5-point system. The maximum score is 100, and higher scores indicate greater disability.

Patient satisfaction: The Turkish version of the Patient Satisfaction Questionnaire Short Form [PSQ-18] was used to assess the patient's overall satisfaction with the treatment. PSQ-18 consists of seven scales general satisfaction, technical quality, interpersonal attitude, communication, financial aspects, time spent with the health care provider, accessibility, and convenience. Each item is scored between 1-5 [20]. The PSQ-18 was administered at the end of 3 weeks following the last treatment.

Statistical Analysis

Data obtained in the study were analyzed statistically using IBM® SPSS® 21.0 software [SPSS Inc., Chicago, IL, USA] [21]. Descriptive statistics were presented as mean±standard deviation values and number [n] and percentage [%]. Categorical variables were compared using the Pearson Chi-Square Test and Fisher's Exact Test. Conformity of the variables to normal distribution was assessed with the Shapiro-Wilk Test. In comparisons between three independent groups, the one-way ANOVA test and posthoc Tukey test were applied when data were homogenous. The Welch test and posthoc Tamhane test or Kruskal-Wallis test were used in case of nonhomogeneity. Homogeneity was examined using Levene's test. The Paired T-test was used for normally distributed variables to compare pre and post-treatment values in two dependent groups. Relationships between categorical variables were examined with Spearman correlation analysis. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant in all analyses. Power analysis to calculate the sample size was applied using G-power 3.19 software. A moderate effect size [effect size = 0.5] was set based on Cohen's d, and the significance level was set to $\alpha = 0.05$ and power = 0.8, resulting in a minimum of 15 subjects per group required [22].

3. Results

52 of the patients eligible to participate in the study, four patients were excluded because they could not continue with the treatments, so the analysis was made of 48 patients [31 females, 17 males] [Figure 2].

Demographic Findings

There was no significant difference between the groups in terms of age, gender, weight, height, dominant side, affected side, occupation, and duration of complaints [$p > 0.05$] [Table 1]. There was a significant, positive, and moderate relationship between the dominant and affected sides [$r = 0.334$; $p = 0.020$].

Clinical Findings

Pain severity: A statistically significant decrease was observed in pain symptoms during rest, activity, and at night after treatment in all three groups [$p < 0.001$] [Table 2]. Comparing the groups there was no significant differences between the groups at the beginning of the therapy [$p > 0.05$] [Table 3]. After 3 weeks of treatment a statistically significant decrease was found in pain symptoms during rest [$p = 0.006$], activity [$p = 0.000$], and at night [$p = 0.003$] between the groups [Table 3]. In the comparison of

the post-treatment pain values, a significant difference was determined between the groups RNSM - MT [$p=0.010$] and MT-ESWT [$p=0.023$]. There were no significant differences between the RNSM-ESWT group in all pain symptoms during rest [$p=0.948$], activity [$p=0.344$], and at night [$p=0.992$] [Table 4].

Pain-free handgrip strength: A significant increase was observed in all handgrip strength measurements after treatment on the affected side in all three groups [$p=0.000$] [Table 2]. Comparing the groups there was no significant differences between the groups at the beginning of the therapy [$p>0.05$] [Table 3]. Comparing the groups there was no differences at the beginning of the study. After treatment period a statistically significant decrease was found in maximum grip [$p=0.025$], and painless grip [$p=0.034$], at elbow extension, and painless grip at elbow flexion [$p=0.026$] between the groups [Table3]. In the evaluation of the post-treatment, a statistically significant difference was found in the MT group in terms of maximum grip in elbow extension [$p=0.034$], painless grip in elbow extension [$p=0.026$], and painless grip in elbow flexion [$p=0.020$] on the affected side compared to the ESWT group. No difference was seen between the RNSM and MTgroups [$p>0.05$] and between RNSM and ESWT [$p>0.05$] groups [Table 4].

Level of functionality: DASH measurements were found to be statistically significantly decreased in all three groups after treatment [$p=0.000$] [Table 2]. No statistically significant difference was found between the groups at the baseline [$p=0.711$] and after treatment [$p=0.489$] evaluation of DASH scores [Table 3].

Patient satisfaction: There was a difference in the PSQ-18 parameters of mean "overall satisfaction" and "mean time spent with a healthcare provider" levels after the treatment [$p<0.05$] [Table 2]. A statistically significant difference was determined in the MT group compared to RNSM and ESWT groups [$p<0.05$] [Table 4].

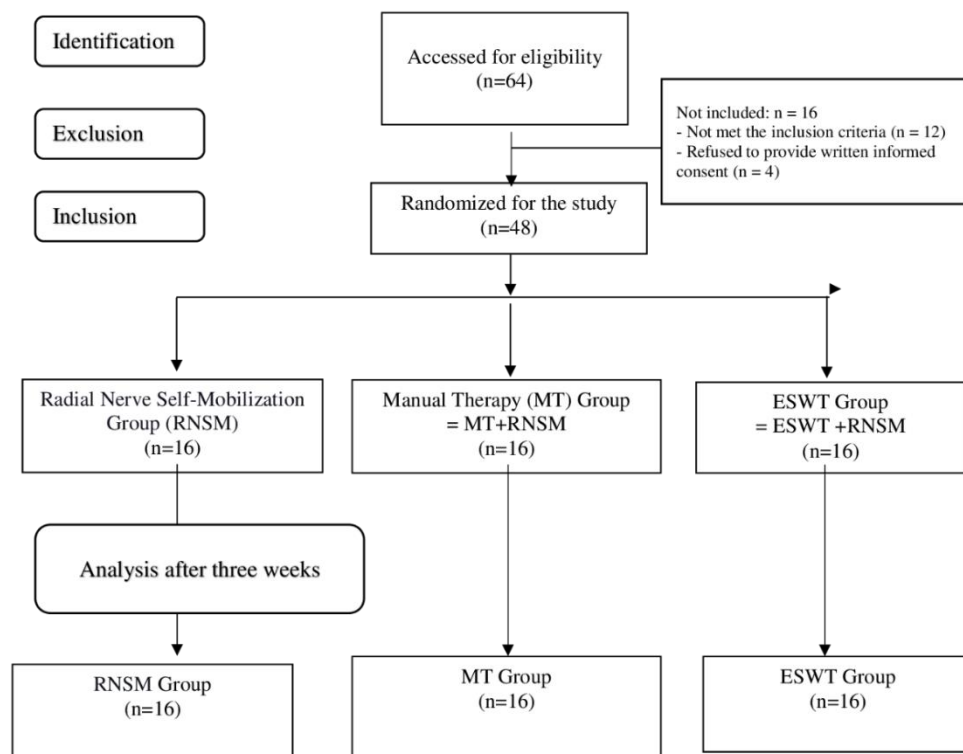


Figure 2: Flow diagram of the study

Table 1: Comparison of demographic characteristics of the groups

		Home program group [n=16]	Manual therapy group [n=16]	ESWT group [n=16]	Toplam [n=48]	F	P
Age [year] [X±SS]		45,43±10,43	45,93±9,11	46,81±11,15	46,06±10,06	0,074	0,929 ^a
Gender N[%]	Female	11 [%68,8]	9 [%56,3]	11 [%68,8]	31 [%64,6]		0,695 ^b
	Male	5 [%31,3]	7 [%43,8]	5 [%31,3]	17 [%35,4]		
Weight [kg] [X±SS]		72,31±11,85	75,43±9,55	70,37±13,79	72,70±11,79	0,742	0,482 ^a
Height [cm] [X±SS]		167,25±8,52	169,12±8,56	164,12±10,09	166,83±9,13	1,235	0,300 ^a
Dominant Side N[%]	Right	14 [%87,5]	14 [%87,5]	13 [%81,3]	41 [%85,4]		1,000 ^c
	Left	2 [%12,5]	2 [%12,5]	3 [%18,8]	7 [%14,6]		
Affected Side N[%]	Right	12 [%75,0]	11 [%68,8]	9 [%56,3]	32 [%66,7]		0,519 ^b
	Left	4 [%25,0]	5 [%31,3]	7 [%43,8]	16 [%33,3]		
Working conditions N[%]	Housewife	7 [%43,8]	6 [%37,5]	7 [%43,8]	20 [%41,7]		1,000 ^c
	Working	3 [%18,8]	4 [%25,0]	3 [%18,8]	10 [%20,8]		
	Retired	3 [%18,8]	3 [%18,8]	2 [%12,5]	8 [%16,7]		
	Others	3 [%18,8]	3 [%18,8]	4 [%25,0]	10 [%20,8]		
Complaint period [months] [X±SS]		6,94±3,13	6,56±2,80	7,75±3,89	7,08±3,27	0,539	0,587 ^a

a: One-way ANOVA test, b: Chi-square test, c: Fisher's exact test

Table 2: Intragroup changes of measurements before and after treatment

		Home program group				Manual therapy group				ESWT group			
		Pre-T	Post-T	t	p	Pre-T	Post-T	t	p	Pre-T	Post-T	t	p
Pain [VAS]	Rest	3,25 ±1,3 4	1,97 ±0,9 6	4,873	0,000 ^a	4,06±1, 38	1,09 ±0,8 8	12,7 10	0,000 ^a	3,51± 1,21	2,07±0,87	6,04 3	0,000 ^a
	Activity	6,90 ±1,0 6	4,80 ±1,3 0	5,195	0,000 ^a	7,31±1, 08	3,64 ±0,7 9	16,7 93	0,000 ^a	7,39± 1,02	5,38±1,35	6,63 1	0,000 ^a
	Night	3,58 ±1,1 5	2,65 ±1,1 0	4,358	0,001 ^a	4,57±1, 89	1,65 ±0,7 2	14,4 11	0,000 ^a	3,96± 1,04	2,69±0,82	5,59 2	0,000 ^a

Hand grip strength	Affected side	Maximum grip at elbow extension	23,7 0±7,06	26,5 5±7,54	-5,781	0,000^a	24,47±7,39	28,3 7±8,17	- 8,305	0,000^a	21,33±6,33	23,76±7,00	- 5,977	0,000^a
	Affected side	Maximum grip at elbow flexion	21,8 0±6,88	24,0 8±7,46	- 4,138	0,001^a	21,99±7,16	24,8 9±7,70	- 6,485	0,000^a	18,64±6,28	22,58±9,51	- 2,094	0,054^a
		Painless grip at elbow extension	19,7 4±6,43	22,2 2±7,39	- 5,227	0,000^a	19,35±6,72	25,2 6±7,60	- 9,085	0,000^a	16,60±5,57	18,49±6,27	- 4,315	0,001^a
		Painless grip at elbow flexion	18,5 3±7,65	19,6 8±6,64	- 1,421	0,024^a	17,47±6,65	23,0 6±7,12	- 7,945	0,000^a	14,76±5,35	16,60±5,67	- 6,003	0,000^a
Finger grip	Effect side	Lateral finger grip	3,12 ±0,76	3,99 ±0,87	-5,450	0,000^a	3,30±0,81	4,49 ±0,97	- 8,715	0,000^a	3,16±0,74	4,03±0,90	- 5,659	0,000^a
	Effect side	Fingertip grip	1,93 ±0,64	2,62 ±0,59	-5,126	0,000^a	1,87±0,59	2,74 ±0,79	- 8,322	0,000^a	1,91±0,50	2,70±0,76	- 7,559	0,000^a
DASH			43,9 4±6,03	35,4 6±5,41	5,549	0,000^a	45,42±5,65	33,5 3±4,71	6,771	0,000^a	45,33±5,27	35,17±4,47	10,662	0,000^a
PSQ-18		Overall satisfaction		4,31±0,47			4,54±0,34				4,15±0,30		0,021^b	
		Technical quality		4,53±0,40			4,67±0,29				4,48±0,44		0,371 ^b	
		Interpersonal attitude		4,96±0,12			5,00±0,00				4,96±0,12		0,610 ^b	
		Communication		4,62±0,34			4,65±0,35				4,53±0,34		0,569 ^b	
		Financial dimensions		5,00±0,00			4,93±0,17				4,93±0,17		0,344 ^c	
		Health Service		4,56±0,30			4,93±0,17				4,71±0,25		0,000^d	
		Accessibility and comfort		4,65±0,30			4,62±0,32				4,71±0,30		0,688 ^b	
	Total		83,62±3,87			85,56±2,58				84,37±2,65		0,221 ^d		

*p<0.05; a: Paired T test, b: One-way ANOVA test, c: Kruskal-Wallis test, d: Welch test.

ESWT: Extracorporeal Shock Wave Therapy, **VAS:** Visual Analog Scale, **Pre-T:** Before treatment, **Post-T:** After treatment, **DASH:** Disabilities of the Arm, Shoulder, and Hand, **PSQ-18:** Patient Satisfaction Questionnaire Short Form.

Table 3: Comparison of the evaluation parameters between groups before and after treatment

	Evaluation criteria	Measurement periods	Home program group	Manual therapy group	ESWT group	F	p ^a	
			(X±SS)	(X±SS)	(X±SS)			
PAIN (VAS)	Rest	Pre-T	3,25±1,34	4,06±1,38	3,51±1,21	1,588	0,216 ^a	
		Post-T	1,97±0,96	1,09±0,88	2,07±0,87	5,666	0,006 ^a	
	Activity	Pre-T	6,90±1,06	7,31±1,08	7,39±1,02	0,976	0,385 ^a	
		Post-T	4,80±1,30	3,64±0,79	5,38±1,35	9,083	0,000 ^a	
	Night	Pre-T	3,58±1,15	4,57±1,89	3,96±1,04	3,135	0,053 ^a	
		Post-T	2,65±1,10	1,65±0,72	2,69±0,82	6,841	0,003 ^a	
Hand grip strength	Maximum grip at elbow extension	Pre-T	23,70±7,06	24,47±7,39	21,33±6,33	0,892	0,417	
		Post-T	26,55±7,54	28,37±8,17	23,76±7,00	1,493	0,025	
	Maximum grip at elbow flexion	Pre-T	21,80±6,88	21,99±7,16	18,64±6,28	1,234	0,301	
		Post-T	24,08±7,46	24,89±7,70	22,58±9,51	0,322	0,727	
	Painless grip at elbow extension	Pre-T	19,74±6,43	19,35±6,72	16,60±5,57	1,197	0,311	
		Post-T	22,22±7,39	25,26±7,60	18,49±6,27	3,635	0,034	
	Painless grip at elbow flexion	Pre-T	18,53±7,65	17,47±6,65	14,76±5,35	1,38	0,262	
		Post-T	19,68±6,64	23,06±7,12	16,60±5,67	3,942	0,026	
	Finger grip	Lateral finger grip	Pre-T	3,12±0,76	3,30±0,81	3,16±0,74	0,259	0,773
			Post-T	3,99±0,87	4,49±0,97	4,03±0,90	1,453	0,245
Fingertip grip		Pre-T	1,93±0,64	1,87±0,59	1,91±0,50	0,05	0,951	
		Post-T	2,62±0,59	2,74±0,79	2,70±0,76	0,122	0,885	
DASH	Pre-T	43,94±6,03	45,42±5,65	45,33±5,27	0,343	0,711		
	Post-T	35,46±5,41	33,53±4,71	35,17±4,47	0,726	0,489		

p<0.05; a: F: One-way ANOVA test

Table 4: Differences in variation of measurements between groups

		Home program group - Manual therapy group	Manual therapy group - ESWT group	Home program group - ESWT group
		p ^a	p ^a	p ^a
Pain [VAS]	Rest	0,010	0,023	0,948
	Activity	0,021	0,000	0,344
	Night	0,008	0,006	0,992
Hand grip strength	Affect side	Maximum grip at elbow extension	0,034	0,343
		Painless grip at elbow extension	0,026	0,309
	Painless grip at elbow flexion	0,316	0,020	0,381
PSQ-18	Overall satisfaction	0,204	0,016	0,485
	Health Service	0,001	0,026	0,343

*p<0.05; a: Tukey Post-hoc test

ESWT: Extracorporeal Shock Wave Therapy, **VAS:** Visual Analog Scale, **PSQ-18:** Patient Satisfaction Questionnaire Short Form.

4. Discussion and Conclusion

The results of this study demonstrate that all groups, the RNSM group as a home program, RNSM combined with soft and joint mobilization (MT group), and RNSM combined with ESWT (ESWT group), experienced significant improvements in pain, pain-free grip strength, functional status and patient satisfaction following three weeks treatment. The MT group experienced significant outcomes for all variables compared to those receiving only RNSM and ESWT group treatment. The MT group had the combination of deep friction massage, humeroradial, humeroulnar, proximal and distal radioulnar joint, and cervical traction, in conjunction with a home program of radial nerve mobilization was determined to be the most effective treatment method for pain reduction, pain-free grip power, increased functionality, and patients' overall satisfaction scores. We hypothesized that there would be a difference in pain, pain-free grip strength, and functionality between the groups' results. Considering these results, we confirmed the hypothesis of our study.

It has been suggested that inflammation of the extensor digitorum muscle tendons of the wrist causes reactive synovitis and fibrosis in the annular ligament in LE. The local edema increases the pressure on the radial nerve [2, 9]. Studies pointed out that the pain level and loss of grip strength will affect the upper extremity functionality in patients [8-10]. Therefore, the pain level and grip strength are used as valid tests to evaluate the effect of treatment. Neural mobilization exercises performed on patients with LE reduce pain by reducing pressure on the neural tissues and providing an appropriate physiological function range. According to Butler, nerve mobilization increases the nerve's sliding ability and blood supply, providing healing [10]. On the other hand, different results appear in the literature. Yilmaz et al. [9] reported that the neuro mobilization technique did not increase grip strength but decreased pain level. Vilfane et al. [23] suggested that nerve mobilization increases grip strength but found no significant difference between the groups.

In our study, effective results were obtained in all groups. All three groups in this study were given nerve mobilization exercises as a home program. Even in the first group that underwent only RNSM, it was observed that the active nerve mobilization of the patients effectively reduced the pain and increased maximum grip strength. We believe the mobilization of the radial nerve has increased the sliding ability of the nerve and decreased the pressure on the nerve and around the tissue. Therefore, decreased pain level may have increased grip strength.

The effect of MT approaches has been demonstrated in the literature. Studies have recommended manual therapy alone or as part of multimodal physical therapy interventions in patients with LE [6,7,14]. Richer et al. [14] suggested that wrist mobilizations were influential in the long and short-term improvement of pain and functional status. Hoogvliet et al. [7] reported that exercise and joint mobilization could be applied together with other medial and lateral epicondylitis therapies. Evidence suggests that mobilization positively affected pain and functional capacity and pain-free maximum grip strength scores compared to the control group [12,24]. Yi et al. [25] reported a significant difference in pain reduction with deep friction massage for two weeks compared to the other groups.

Our findings agree with the results of the literature, indicating the effectiveness of MT treatment in LE patients. As there was a significant reduction in pain and increased maximum grip strength in the MT group in our study, soft tissue, and joint mobilizations can be considered one of the effective treatment methods for reducing pain, similar to the literature mentioned above. MT is a complex intervention involving multiple interactions of complementary mechanisms. It works through biomechanical and neurophysiological mechanisms [26]. Bialosky et al. postulate that an MT intervention results in neurophysiological responses within the peripheral and central nervous systems responsible for pain inhibition [27]. In our study, we proposed that the mobilization of the soft tissue and joints with combined RNSM may reduce pain and increase functionality through biomechanical and neurophysiological mechanisms.

There has been increasing in the number of ESWT studies over the years. However, conflicting study results are seen in the literature. Different application methods and parameters were used in the studies [22, 28-32]. For this reason, the results of the studies differ, and no definite results can be given about the effectiveness of shock waves. While some studies report that ESWT is not superior to the control group [15,28], other studies show that this application is especially effective in healing inflamed tendon problems [16, 29-31]. Yao et al. [16] compared 501 patients who applied with ESWT and 534 patients with other methods and reported that the ESWT application effectively reduced pain and improved finger grip strength. In the comparison of various techniques, one study reported the

superiority of ESWT application over the laser [29], corticosteroid injection [30], and wrist splint [31]. Haake et al. [15] conducted an active ESWT and placebo study on 30 LE patients. They gave three treatments weekly and found no differences between treatment groups. Significantly more side effects like skin reddening, pain, and small hematoma were documented in the active ESWT group than in the placebo group. In the current study, we performed two ESWT applications a week, for three weeks and did not see any side effects, and our patients did not report any complaints during or after the treatment. ESWT group was found to be effective after three weeks in all measurements. However, when we compared the groups, the MT group was influential in pain, pain-free grip strength, and patient satisfaction. The MT group experienced significant outcomes compared to those receiving ESWT, and home program groups. Moreover, there was no statistical significance between the RNSM and the ESWT groups.

The pain and decreased grip strength in patients with LE can affect functionality. In the current study, we used the DASH to measure the functionality of the upper extremity. Studies have demonstrated improvement in the upper extremity function following eccentric exercises [32], and nerve mobilization exercises [33]. Similarly, in the current study, DASH measurements were significantly decreased in all three groups after the treatment period. Although there was no statistically significant difference between groups, the DASH functionality value was found lowest in the MT group following three weeks treatment. In addition, it was observed that the patient's overall satisfaction levels from the treatment were higher in the MT group. Patient satisfaction is most often mentioned in healthcare institution management literature and has become a leading subject examined in the research. In the current study, patient satisfaction was evaluated with the PSQ-18. The results showed that in the parameter of "time spent with the healthcare provider," the values of the MT group were higher than those of the other two groups. This difference was thought to be due to the longer time spent with the patient and that touching the patient during the application was influential on the pain and other values.

Although many medical and conservative methods are used for lateral epicondylitis, there is no definite consensus about the effectiveness of these treatments. In this study, we aimed to determine the short-term effects on pain, pain-free grip strength, and functionality of three different approaches discussed in the literature and to evaluate the superiority of these to each other. This study can be considered that treatment interventions treating patients with LE were influential in the short term in all study groups. Comparing the results, MT including soft tissue and joint mobilizations supported with RNSM, was the most effective treatment protocol in LE treatment. It was thought that there might be some differences between the groups which did not emerge in the short term but would be seen after the long-term follow-up. Therefore, there is a need for longer-term follow-up to better understand the efficacy of these treatment methods.

Limitations of the Study

The patients included in the study had ongoing complaints for 2 -17 months. This range includes subacute and chronic periods, which could affect the efficacy of the treatment. Also, radial nerve mobilization exercises given as a home program made follow-up of the patients more difficult. Although the follow-ups are made with weekly controls, we can say that the exercises may have 5-10% margin of error as a limitation. Moreover finally, although early results of the treatment were seen, the follow-up period of 3 weeks can be considered short.

Declaration of Ethical Code

In this study, we undertake that all the rules required to be followed within the scope of the "Higher Education Institutions Scientific Research and Publication Ethics Directive" are complied with, and that none of the actions stated under the heading "Actions Against Scientific Research and Publication Ethics" are not carried out.

References

- [1] Vaquero-Picado, A., Barco, R., Antuña, SA. 2017. Lateral epicondylitis of the elbow. EFORT Open Rev. 1[11], 391-7.
- [2] Coombes, BK., Bisset, L., Vicenzino, B. 2015. Management of Lateral Elbow Tendinopathy: One Size Does Not Fit All. J Orthop Sports Phys Ther. 45[11], 938-49.

- [3] Bisset, L., Paungmali, A., Vicenzino, B., Beller, E. 2005. A systematic review and meta-analysis of clinical trials on physical interventions for lateral epicondylalgia. *Br J Sports Med.* 39[7], 411-22.
- [4] Lenoir, H., Mares, O., Carlier, Y. 2019. Management of lateral epicondylitis. *Orthop Traumatol Surg Res.* 105[8]: 241-6.
- [5] Weber, C., Thai, V., Neuhauser, K., Groover, K., Christ, O. 2015. Efficacy of physical therapy for the treatment of lateral epicondylitis: a meta-analysis. *BMC Musculoskelet Disord.* 16, 223.
- [6] Marcolino, AM., das Neves, LM., Oliveira, BG., Alexandre, AA., Corsatto, G., Barbosa, RI., de Cássia Registro Fonseca, M. 2016. Multimodal approach to rehabilitation of the patients with lateral epicondylitis: a case series. *Springerplus.* 5[1], 1718.
- [7] Hoogvliet, P., Randsdorp, MS., Dingemanse, R., Koes, BW., Huisstede, BM. 2013. Does effectiveness of exercise therapy and mobilisation techniques offer guidance for the treatment of lateral and medial epicondylitis? A systematic review. *Br J Sports Med.* 47[17], 1112-9.
- [8] Basson, A., Olivier, B., Ellis, R., Coppieters, M., Stewart, A., Mudzi, W. 2017. The Effectiveness of Neural Mobilization for Neuromusculoskeletal Conditions: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Orthop Sports Phys Ther.* 47[9], 593-615.
- [9] Yılmaz, K., Yigiter Bayramlar, K., Ayhan, C., Tufekci, O. 2022. Investigating the effects of neuromobilization in lateral epicondylitis. *J Hand Ther.* 35[1], 97-106.
- [10] Butler, D. 1989. Adverse Mechanical Tension in the Nervous System: A Model for Assessment and Treatment. *Australian Journal of Physiotherapy.* 35(4), 227-38.
- [11] Paungmali, A., O'Leary, S., Souvlis, T., Vicenzino, B. 2003. Hypoalgesic and sympathoexcitatory effects of mobilization with movement for lateral epicondylalgia. *Phys Ther.* 83[4], 374-83.
- [12] Lucado, AM., Dale, RB., Vincent, J., Day, JM. 2019. Do joint mobilizations assist in the recovery of lateral elbow tendinopathy? A systematic review and meta-analysis. *J Hand Ther.* 32[2], 262-76.
- [13] Ahmed, A., Ibrar, M., Arsh, A., Wali, S., Hayat, S., Abass, S. 2021. Comparing the effectiveness of Mulligan mobilization versus Cyriax approach in the management of patients with subacute lateral epicondylitis. *J Pak Med Assoc.* 71[1], 12-5.
- [14] Richer, N., Marchand, AA., Descarreaux, M. 2017. Management of Chronic Lateral Epicondylitis with Manual Therapy and Local Cryostimulation: A Pilot Study. *J Chiropr Med.* 16[4], 279-88.
- [15] Dıraçoğlu, D. 2004. Kas-İskelet sistemi hastalıklarında ekstrakorporal şok dalga tedavisi. *Türkiye Klinikleri J PM&R,* 4, 104-6.
- [16] Yao, G., Chen, J., Duan, Y., Chen, X. 2020. Efficacy of Extracorporeal Shock Wave Therapy for Lateral Epicondylitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomed Res Int.* 2020:2064781.
- [17] Bijur, PE., Silver, W., Gallagher, EJ. 2001. Reliability of the visual analog scale for measurement of acute pain. *Acad Emerg Med.* 8[12], 1153-7.
- [18] Dorf, ER., Chhabra, AB., Golish, SR., McGinty, JL., Pannunzio, ME. 2007. Effect of elbow position on grip strength in the evaluation of lateral epicondylitis. *J Hand Surg Am.* 32[6], 882-6.
- [19] Duger, T., Yakut, E., Oksuz, C., Yorukan, S., Bilgutay, B. S., Ayhan, C. 2006. Reliability and validity of the Turkish version of the disability of the arm, shoulder and hand-DASH questionnaire. *Fizyoterapi Rehabilitasyon.* 17[3], 99-107.
- [20] Erden, A., Topbas, M. 2019. Turkish validity and reliability of the Patient Satisfaction Scale in Physiotherapy for Patients with Musculoskeletal Pain. *J Back Musculoskelet Rehabil.* 32[2], 197-203.
- [21] IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21. 0. Armonk, NY.
- [22] Yuruk, ZO., Kirdi, N., Simsek, N. 2016. Effects of Extracorporeal Shock Wave Therapy on Pain, Grip Strength and Functionality in Patient with Lateral Epicondylitis: A Randomized Controlled Study. *Clinical and Experimental Health Sciences.* 6[3], 107-15.
- [23] Villafañe, J. H., Silva, G. B., Bishop, M.D., Fernandez-Carnero, J. 2012. Radial nerve mobilization decreases pain sensitivity and improves motor performance in patients with thumb carpometacarpal osteoarthritis: a randomized controlled trial. *Arch Phys Med Rehabil.* 93[3], 396-403.

- [24] Reyhan, A. C., Sindel, D., Dereli, E. E. 2020. The effects of Mulligan's mobilization with movement technique in patients with lateral epicondylitis. *J Back Musculoskelet Rehabil.* 33[1], 99–107.
- [25] Yi, R., Bratchenko, W. W., Tan, V. 2018. Deep friction massage versus steroid injection in the treatment of lateral epicondylitis. *Hand.*13[1], 56–9.
- [26] Bialosky, J.E., Bishop, M.D., Price, D.D., Robinson, M.E., George, S.Z. 2009. The mechanisms of manual therapy in treating musculoskeletal pain: a comprehensive model. *Man Ther.* 14, 531-8.
- [27] Bialosky, J.E., Beneciuk, J.M., Bishop, M.D., Coronado, R.A., Penza, C.W., Simon, C.B., George, S.Z. 2018. Unraveling the Mechanisms of Manual Therapy: Modeling an Approach. *J Orthop Sports Phys Ther.* 48(1), 8-18.
- [28] Capan, N., Esmaeilzadeh, S., Oral, A., Basoglu, C., Karan, A., Sindel, D. 2016. Radial extracorporeal shock wave therapy is not more effective than placebo in the management of lateral epicondylitis: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *American journal of physical medicine & rehabilitation.* 95[7], 495–506.
- [29] Devrimsel, G., Kucukali, T., Turkyilmaz, A., Yildirim, M., Ulasli, A. M. 2014. A Comparison of Laser and Extracorporeal Shock Wave Therapies in Treatment of Lateral Epicondylitis. *Turk J of Phys Med.* 60, 194-8.
- [30] Ibrahim, N.H., El Tanawy, R.M., Mostafa, A. F. S. 2021. Extracorporeal shock wave therapy [ESWT] versus local corticosteroid injection in treatment of lateral epicondylitis [tennis elbow] in athletes: clinical and ultrasonographic evaluation. *Egypt Rheumatol Rehabil.* 48, 32.
- [31] Aydin, A., Atic, R. 2018. Comparison of extracorporeal shock-wave therapy and wrist-extensor splint application in the treatment of lateral epicondylitis: a prospective randomized controlled study. *Journal of pain research.* 11, 1459.
- [32] Ortega-Castillo, M., Medina-Porqueres, I. 2015. Effectiveness of the eccentric exercise therapy in physically active adults with symptomatic shoulder impingement or lateral epicondylar tendinopathy: A systematic review. *J Sci Med Sport.* 19(6), 438-53.
- [33] Oskay, D., Meriç, A., Kirdi, N., Firat, T., Ayhan, C., Leblebicioğlu, G. 2010. Neurodynamic mobilization in the conservative treatment of cubital tunnel syndrome: long-term follow-up of 7 cases. *J Manipulative Physiol Ther.* 33(2),156-63.

Göz Yüzeyinden Elde Edilen Bakterilerin Oluşturduğu Biyofilme Karşı Probiyotik Bakterilerin Hücresiz Filtratlarının Antibiyofilm Etkilerinin Araştırılması

Investigation Of The Antibiofilm Effects Of Cell-free Supernatants Of Probiotic Bacteria Against The Biofilm Formed By Bacteria Obtained From The Ocular Surface

Sertaç Argun KIVANÇ¹ , Berna AKOVA¹ , Merih KIVANÇ^{2*} 

¹ Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Bursa, Türkiye
² Eskişehir Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Eskişehir, Türkiye



ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı probiyotik laktik asit bakterilerine ait hücresiz filtratların göz yüzeyinden izole edilmiş olan *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Stenotrophomonas maltophilia* ve *Staphylococcus epidermidis*'in ürettikleri biyofilm üzerine antibiyofilm aktivitesinin araştırılmasıdır.

Materyal-Metot: Laktik asit bakterileri olarak *Lactobacillus rhamnosus* 1743, *Lactobacillus plantarum*1771, *Lactobacillus rhamnosus* 3111, *L. rhamnosus* KA1 ve *L. rhamnosus* 1724 kullanıldı. Kullanılmadan önce hem laktik asit bakterilerinin hem test bakterilerinin saflıkları kontrol edildi. Laktik asit bakterileri hücresiz filtratları 22µm'lik filtreden geçirildi. Hücresiz filtratın antibiyofilm etkisi için TSB ortamında kültüre edilen test bakterileri kuyucuklara dağıtıldı. Kuyucuklar yıkandıktan sonra 570 nm'de spektrofotometrik olarak optik yoğunluğa göre biyofilm oluşumu değerlendirildi.

Bulgular: Laktik asit bakterilerinden elde edilen hücresiz filtratların farklı test bakterilerinde farklı oranlarda biyofilm oluşumunu inhibe ettiği gözlemlendi. *L. rhamnosus* KA1'in hücresiz filtratı test edilen tüm bakterilerin biyofilmlerini ortalama en fazla azaltan filtrattı. Laktik asit bakterilerinin filtratlarının biyofilmi en çok azalttıkları test bakterisi *P. stutzeri* 23 CZPX olarak tespit edildi.

Sonuç: Probiyotik laktik asit bakterilerinden elde edilen hücresiz filtratlar bakterilerin oluşturduğu biyofilmlerin önlenmesinde yardımcı olabilir. Farklı LAB hücresiz filtratlarının farklı test bakterilerinin oluşturduğu biyofilme etkileri değişebilmektedir. Geniş spektrumlu bir LAB hücresiz filtratın tespiti ve etkinliği için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Hücresiz filtrat, laktik asit bakterisi, probiyotik, biyofilm, parabiyoetik

Alınış / Received: 30.07.2022 Kabul / Accepted: 21.11.2022 Online Yayınlanma / Published Online: 20.12.2022



ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to investigate the antibiofilm activity of the acellular filtrates of probiotic lactic acid bacteria on the biofilm produced by *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Staphylococcus epidermidis*, isolated from the ocular surface.

Material-Method: *Lactobacillus rhamnosus* 1743, *Lactobacillus plantarum*1771, *Lactobacillus rhamnosus* 3111, *L. rhamnosus* KA1 and *L. rhamnosus* 1724 were used as lactic acid bacteria. The purity of both lactic acid bacteria and pathogenic test bacteria was checked before use. Cell-free supernatant of lactic acid bacteria were passed through a 22µm filter. For the antibiofilm effect of the acellular filtrate, test pathogenic bacteria cultured in TSB medium were dispersed into the wells. After washing the wells, biofilm formation was evaluated spectrophotometrically at 570 nm according to optical density.

Results: It was observed that acellular filtrates obtained from lactic acid bacteria inhibited biofilm formation at different rates in different test bacteria. The *L. rhamnosus* KA1 acellular filtrate was the filtrate that reduced the biofilms of all tested bacteria at most. It was also determined that the filtrates of lactic acid bacteria reduced the biofilm of *P. stutzeri* CZPX 23 at most.

Conclusion: Cell-free supernatants obtained from probiotic lactic acid bacteria can help prevent biofilms formed by bacteria. The effects of acellular filtrates of different lactic acid bacteria on the biofilm formed by different test bacteria may vary. Further studies are needed for the detection and efficacy of a broad-spectrum lactic acid bacteria acellular filtrates.

Keywords: Cell-free supernatant, lactic acid bacteria, probiotic, biofilm, parabiotic



1. Giriş

Biyofilm "bir alt tabakaya veya ara yüze ya da birbirlerine geri dönüşümsüz olarak bağlanan, sahip oldukları hücre dışı polimerik maddelerden oluşan bir matris içine gömülmüş hücrelerle karakterize edilen sabit bir mikrobiyal topluluk" olarak tanımlanmaktadır [1,2]. Biyofilmler mikroorganizmaların oluşturduğu bir savunma şeklidir. Bulaşıcı hastalıkların yaklaşık %65'inin biyofilmle ilgili enfeksiyonlar olduğu belirlenmiştir [3]. Biyofilm ve biyofilmle ilişkili enfeksiyonların varlığı göz hastalıklarında da gözlenmektedir. Göz içi lensler, kontakt lensler, sütür materyali, kapak implantları, soket implantları, orbita implantları ve skleral serklaj materyalleri, punktum tıkaçları ve sert ve yumuşak kontakt lensler üzerinde oküler bakterilerin biyofilm oluşturduğu bildirilmiştir. Bu durum iyileşme konusunda sorunlara neden olmaktadır [2,4,5].

Biyofilm oluşturarak enfeksiyona neden olan bakteriler arasında *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus epidermidis* yer almaktadır [2,6,7]. Biyofilm oluşturan bir başka ajan olan *Listeria monocytogenes* de konjonktivit, keratit, sklerokeratit, endoftalmi ve akut koryoretinite neden olmaktadır [8,9].

Bakterilerin, hızla antibiyotiklere direnç kazanması ve biyofilm oluşturması nedeniyle mikroorganizmaları kontrol altına almak için farklı stratejiler geliştirilmiştir; bu stratejilerin arasında laktik asit bakterilerinin kullanımı da yer alır. Laktik asit bakterilerinin (LAB) antibiyofilm etkileri gösterilmiştir [10,11]. Laktik asit bakterileri oluşturdukları antimikrobiyal bileşikler, bakteriyosinler, bakteriyosin benzeri maddeler, hidrojen peroksit, laktik asit gibi maddeler nedeniyle mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivite gösterdiği düşünülmektedir [12-18].

Bu çalışmada probiyotik laktik asit bakterilerinin hücresiz filtratlarının *L. monocytogenes*, *P. putida*, *P. sututzeri*, *S. maltophilia*, *S. epidermidis* biyofilmi üzerine antibiyofilm aktivitesi araştırılmıştır.

2. Materyal ve Metot

Bakteriler

Probiyotik laktik asit bakterileri (LAB) *Lactobacillus rhamnosus* 1743, *Lactobacillus plantarum* 1771, *Lactobacillus rhamnosus* 3111, *Lactobacillus rhamnosus* KA1, *Lactobacillus rhamnosus* 1724, ve test bakterileri daha önce yapılan çalışmalarda göz yüzeyinden izole edilen ve stoklanan *Pseudomonas stutzeri* CZPX 23, *Pseudomonas putida* CZPX 25-1, *Listeria monocytogenes* PCA 47, *Stenotrophomonas maltophilia* 25-1A, *S.epidermidis* PCA 4-1 Eskişehir Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Mikrobiyoloji biriminden sağlanarak kullanılmıştır. Stoktan çıkarılan LAB Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) brotha ekilerek 35°C de %5 CO₂ içeren ortamda 24 saat inkübe edildikten sonra MRS agara ekilerek aynı koşullarda inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra koloni özellikleri incelenerek ve Gram boyama yapılarak morfolojik özellikleri incelenerek saflıkları kontrol edilmiştir. Test bakterileri ise beyin kalp infüzyon (BHI) brothta ekilerek 37°C de 24 saat inkübe edilerek aktive edilmiş daha sonra BHI agara ekilerek 35°C de 24 saat inkübe edilmiş ve kültürler Gram boyama yapılarak mikroskopik olarak saflıkları kontrol edildikten sonra kullanılmıştır.

Test bakterilerinin biyofilm aktivitesi mikrotitrasyon plaklarında Stepanovic ve arkadaşlarının belirttikleri yöntemle göre belirlenmiştir [19].

Hücresiz Filtratın Hazırlanması

Laktik asit bakterileri MRS brotha ekilerek 35°C de %5 CO₂ içeren ortamda 48 saat süre ile inkübe edilmiştir. Daha sonra kültürler 15dk +4 derecede 10000 rpm de santrifüj edilerek üst kısımdaki filtratların pH'sı 5.5 'a ayarlanmıştır. Her bir hücresiz filtrat 22µm'lik filtreden geçirilerek kullanılmıştır.

Hücresiz Filtratların Antibakteriyel ve Antibiyofilm Aktivitesi

Hücresiz filtratların antibakteriyel aktivitesi agar difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Test mikroorganizmaları BHI broth içerisinde 35°C'de 24 saat inkübe edilerek aktive edilmiştir. Steril Petri plaklarına aktif test mikroorganizmalarından 10⁶ kob/mL olacak şekilde aktararak üzerlerine 20 ml 45 °C'ye kadar soğutulmuş nutrient agar besiyeri konularak karıştırılmış ve agar donduktan sonra agarda 0,8 cm çapında steril mantar delici ile çukurlar açılmıştır. Daha sonra çukurların dipleri ince bir agar tabakası ile kaplanmıştır. Her kuyucuğa 80 µl hücresiz filtratı aktararak 37°C'de 24 saat inkübe edilerek değerlendirilmiştir [20].

Laktik asit bakterilerinin hücresiz filtratının antibiyofilm aktivitesi için test bakterileri TSB içerisine ekilerek 18 saat 35°C'de inkübe edilmiştir. Bu kültürlerden 10 µL (10⁸ kob/ml) çok kuyucuklu ELISA plağının kuyucuklarına dağıtıldı. Üzerine %2 glikoz içeren 140 µL TSB aktarıldı. Daha sonra 50 µL laktik asit bakterilerinin filtratlarından ilave edildi ve 35°C'de 48 saat inkübe edildi. Bir grup kuyucuğu da kontrol olarak test bakterileri ve TSB eklendi. İnkübasyondan sonra, plakalar boşaltıldı ve her bir kuyucuk, steril fizyolojik tuzlu su ile 3 kez yıkandı. Kuyucuklar, 15 dakika 200µL %99 metanol ile muamele edildi. Bu süre sonunda kuyucuklar boşaltılarak kurumaya bırakıldı. Daha sonra her bir kuyucuk, 5 dakika boyunca 200 µL %2 kristal viyole ile boyandı. Bu süre sona erdiğinde kuyucuklar distile su ile yıkandı ve kurutuldu. Kurutmadan sonra, kuyucuklara 160µL %33 glasiyal asetik asit ilave edildi ve 570 nm'de spektrofotometrik olarak değerlendirildi. Optik yoğunluğa (OD) göre biyofilm oluşumu değerlendirildi. Test iki paralel halinde gerçekleştirilmiştir. Yüzde biyofilm giderimi hesaplandı.

$$\% \text{Biyofilm giderim} = \frac{\text{ODBlank} - \text{ODDeney}}{\text{ODBlank}} \times 100$$

3. Bulgular

Test bakterilerimiz *L. monocytogenes* PCA 47 ve *P. stutzeri* CZPX 23 yüksek, *S. maltophilia* 25-1A ve *S. epidermidis* 4-1 orta, *P. putida* CZPX 25-1 zayıf biyofilm oluşturan izolatlardı.

Hücreli filtratlar antibakteriyel etkinlik göstermemiştir ancak bakterilerin biyofilm oluşumunu değişen oranlarda engellemiştir (Tablo 1). Probiyotik laktik asit bakterilerinin hücreli filtratları göz yüzeyinden izole edilen bakterilerin in vivo olarak biyofilm oluşumunu %98,69-%4,88 oranlarında inhibe etmiştir. En dirençli bakteri *S. epidermidis* 4-1 olmuştur. *L. rhamnosus* 1743 ve *L. rhamnosus* 1724'e ait hücreli filtratları *S. epidermidis* 4-1'in biyofilm oluşumunun artmasına neden olmuştur. Laktik asit bakterilerin hepsinin filtratları *P. stutzeri* CZPX 23 biyofilmini %50'nin üzerinde inhibe etmiştir. *P. putida* CZPX 25-1 biyofilmi *L. rhamnosus* 3111 ve *L. rhamnosus* 312 haricinde %50 üzerinde inhibisyon sağlanmıştır. *L. monocytogenes* PCA 47 biyofilmini *L. plantarum* 1771 ve *L. rhamnosus* KA1 filtratları sırası ile %82,88 ve 91,78 oranında inhibe etmiştir. *L. rhamnosus* KA1 filtratı *S. maltophilia* 25-1A %95,95 oranında inhibe etmiştir.

Tablo 1: Probiyotik laktik asit bakterilerinin hücreli filtratlarının antibiyofilm aktivitesi

	Test bakterilerinin biyofilmlerinin yüzde giderimi (%)					Ortalama	
	<i>P. stutzeri</i> CZPX 23	<i>P. putida</i> CZPX 25-1	<i>S. maltophilia</i> 25-1A	<i>L. monocytogenes</i> PCA 47	<i>S. epidermidis</i> 4-1		
Probiyotik bakterilerin hücreli filtratları	<i>L. rhamnosus</i> 1743	76,35	77,93	68,32	21,73	-8,58	47,15
	<i>L. plantarum</i> 1771	82,06	81,17	82,30	82,88	49,32	75,55
	<i>L. rhamnosus</i> 3111	98,69	7,69	41,73	44,71	79,05	54,37
	<i>L. rhamnosus</i> KA1	80,68	82,83	95,95	91,78	80,52	86,35
	<i>L. rhamnosus</i> 1724	83,08	67,15	9,93	37,29	-6,58	38,17
	<i>L. rhamnosus</i> 312	58,89	16,33	19,12	63,68	4,88	32,52
	Ortalama	79,96	55,51	52,89	57,01	33,10	

Not: Negatif değer biyofilm üretiminin tetiklendiğini göstermektedir.

L. rhamnosus KA1 filtratı test edilen tüm bakterilerin biyofilmlerini en fazla azaltan filtrat olmuştur. Laktik asit bakterilerinin filtratlarının biyofilmi en çok azalttıkları test bakterisi *P. stutzeri* CZPX 23 olarak tespit edilmiştir.

4. Tartışma ve Sonuç

Bakterilerin biyofilm oluşturmaları antibiyotik direncine neden olarak bazı terapötik seçenekleri etkisiz hale getirebilir. Bu durum ise uygun bir tedavi seçiminde zorluklara neden olabilir. Biyofilmin yaşı ve matriksi bileşimi antibiyotik direnç seviyesini etkilediğinden, biyofilm duyarlılık testleri önem taşımaktadır. Bir monokültürde veya diğer türlerle birlikte biyofilmlerin oluşumu, enfeksiyonların etyopatogenezi için önem taşımaktadır. Biyofilm içindeki mikroorganizmalar hem fagositoza hem de antibiyotiklere karşı artan direnç göstermektedir [2,21].

Laktik asit bakterilerine ait hücreli filtratlar çalışmada kullandığımız test bakterilerine karşı antibakteriyel aktivite göstermemiştir. Bulgularımızın aksine yapılan çalışmalarda laktik asit bakterilerinin hücreli filtratlarının bakterilere karşı antimikrobiyel aktivite gösterdiği bildirilmiştir [22-24]. Forestier ve arkadaşları (ark.) [23] *Lactobacillus casei rhamnosus* hücreli filtratının *K. pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*'in büyümesini

engellediğini rapor etmişlerdir. Muhammad ve ark. [24], *L. plantarum*'un hücresiz filtratının *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ve *Salmonella typhimurium*'a karşı antimikrobiyel aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. El-Mokhtar ve ark. [22], *L. plantarum* izolatlarına ait hücresiz filtratların çoğunun *L. monocytogenes* üzerine inhibe edici etkisi varken bir izolatın etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Yine test edilen *L. plantarum* izolatlarının yarısına ait hücresiz filtratların *S. aureus*'u inhibe etmediğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar antimikrobiyal aktivitenin asitlik ile ilişkili olduğunu ileri sürmüşlerdir. Çalışmamıza benzer olarak *L. acidophilus* hücresiz filtratının klinik *P. aeruginosa* izolatlarının büyümesini engelleyemediği bildirilmiştir. Araştırmacılar bunun hücresiz filtrat içinde bulunan antimikrobiyel maddelere *P. aeruginosa*'nın direncini göstermişlerdir [25] Laktik asit bakterilerinin antimikrobiyel aktivitesi organik asitler, yağ asitleri, hidrojen peroksit, antimikrobiyal peptitler ve bakteriyosinlerin üretimi gibi farklı mekanizmalar yoluyla olmaktadır [12-18,24,26] Bulguların farklılığı test patojenlerinin farklı kaynaklardan izole edilmiş olmasından kaynaklanabileceği gibi kullanılan filtratın yoğunluğundan da kaynaklanıyor olabilir.

Laktik asit bakterilerinin hücresiz filtratlarının antibiyofilm etkileri son dönemde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [27,28]. Fermente palmye özütünden elde edilen *Lactobacillus brevis*'in hücresiz filtratının hem *A. baumannii* hem *E. coli*'nin oluşturduğu biofilm üzerine yüksek inhibitör etkisi olduğu görülmüştür [27]. Avokado ve salatalıktan izole edilen *L. monocytogenes* suşlarına karşı fermente mısır gevreğinden izole edilen *Lactobacillus brevis* ve hazır *L. acidophilus* ve *Lactocaseibacillus rhamnosus* suşları kullanılmıştır. Hücresiz filtratın varlığının, bu suşların biyofilm oluşum yeteneklerini azalttığı ve önceden oluşturulmuş biyofilmlerinin bütünlüğünü bozduğu tespit edilmiştir [28]. Son dönemde yapılan bu çalışmalarda çoğunlukla bitkisel kaynaklı bakteriler kullanılmıştır.

Bizim çalışmamızda test bakterisi olarak *P. stutzeri* CZPX 23, *P. putida* CZPX 25-1, *S. maltophilia* 25-1A, *S. epidermidis* 4-1 ve *L. monocytogenes* PCA 47 bakterileri kullanılmıştır. *Pseudomonas* spp. ince, çubuk şeklinde, spor oluşturmeyen Gram negatif basillerdir. *P. stutzeri* bir, *P. putida* bir veya daha fazla polar flagella nedeniyle hareketli bakterilerdir. Test bakterilerinden *P. putida* 25-1 düşük biyofilm oluşturmaktadır. *P. putida* CZPX 25-1'in biyofilmine karşı en yüksek etki gösteren hücresiz filtrat %83 inhibisyon oranı ile *L. rhamnosus* KA1'e aitti. Yapılan bir çalışmada *P. putida* logaritmik büyüme fazına girdikten sonra, uygulanan tetrasiklinin *P. putida*'nın biyofilm oluşumunu doza bağımlı olarak güçlü bir şekilde uyardığı gösterilmiştir. Tetrasiklin stresine yanıt olarak, *P. putida*'nın biyofilm ile ilgili genlerinin (lapa) ekspresyon seviyesinin modüle olduğu belirlenmiştir. Buna bağlı olarak hücrenin yapışma kabiliyetinin arttığı ve sonuçta daha sağlam bir biyofilm oluştuğu gözlenmiştir. Biyofilm içindeki bakteri popülasyonu bu koşullarda antibiyotikten etkilenmeden hayatta kalmıştır. Antibiyotiklerin, biyofilm oluşumu üzerinde daha güçlü bir indükleyici etki yaptığı rapor edilmiştir [29,30]. Bu durum için biyofilmlerin inhibisyonu için alternatif bir yol olarak probiyotik laktik asit bakterileri yararlı olabilir. *L. plantarum* 1771 ve *L. rhamnosus* KA1'e ait hücresiz filtratlar bu konuda ümit vaat etmektedir. Ding ve arkadaşları *P. stutzeri*'de, biyofilm oluşumunun hücre dışı protein miktarı ile yüksek pozitif korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir [31]. Bir başka çalışmada ise yüksek tuz, asidite ve yüksek ısı gibi stres faktörlerinin *P. stutzeri*'nin biyofilm oluşturma etkisini indüklediğini tespit etmişlerdir [32]. Çalışmamızda LAB hücresiz filtratlarının en etkili olduğu test bakterisi *P. stutzeri* CZPX 23 idi. *L. rhamnosus* 3111'in hücresiz filtratı *P. stutzeri* CZPX 23'ün oluşturduğu biyofilmi %99 oranında inhibe etmiştir. Benzer olarak yapılan bir çalışmada El-Mokhtar ve ark., laktobasillus izolatlarına ait hücresiz filtratların *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşumunda hücresiz filtrat dozuna bağlı olarak bir azalma gözlemlediklerini bildirmişlerdir. Ayrıca, 24 saatlik biyofilmlere hücresiz filtrat ilavesinde oluşan biyofilmin %41 oranında bozulduğunu saptamışlardır [22]. Razaee ve ark., lahana turşusundan elde ettikleri *Lactocaseibacillus rhamnosus* ve *Lactiplantibacillus plantarum* suşlarının hücresiz filtratlarını yiyecek patojeni olan *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşturma üzerine etkilerine bakmışlardır. Genel olarak hücresiz filtrat etkisi altında kontrol grubuna göre çok daha zayıf bir biyofilm geliştiği tespit edilmiştir. *L. rhamnosus*'un *P. aeruginosa* biyofilminin oluşumu üzerinde önemli bir inhibitör etkisi olduğunu saptamışlardır [33]. Jeyenatan ve ark., ortopedik implantlar üzerinde gelişen *P. aeruginosa* biyofilmine *L. acidophilus*, *L. plantarum* ve *Lactobacillus fermentum* hücresiz filtratlarının etkisini araştırmışlardır. Hücresiz filtratların *P. aeruginosa*'ya karşı yapışma önleyici, anti-biyofilm ve toksik etkileri görülmüştür [34].

Çalışmamızdaki bir başka test bakterisi ise *S. maltophilia* 25-1A'dır. *S. maltophilia*, fermentatif olmayan, gram negatif bir basildir. Farklı yüzeylere tutunarak biyofilm oluşturabilmektedir [35-40]. *S. maltophilia*, önemli bir fırsatçı oküler patojen olarak ortaya çıkmaktadır. Bu organizmanın neden olduğu enfeksiyonların çoğu, oküler bozukluğu olan hastalarda meydana gelir ve karakteristik olarak *S. maltophilia*'nın dirençli antibiyogramı, tedavi seçeneklerini sınırlar. Keratit, konjonktivit gibi oküler enfeksiyonlar ve katarakt cerrahisi sonrası endoftalmiye neden olan mikroorganizmalardan biri olan *S. maltophilia* kullanılan birçok antibiyotiğe içsel direnç göstermekte ve bu nedenle tedavide bazı

sıkıntılar ortaya çıkarmaktadır [37-39]. *S. maltophilia* β-laktamazlar ve diğer proteolitik, inaktive edici proteolitik enzimler üretir. DNase, RNase, elastaz, lipaz, hyaluronidaz, müsinaz ve hemolizin gibi hücre dışı enzimler ile antibiyotikleri etkisiz hale getirir. Aynı zamanda dış membran geçirgenliğinde meydana gelen değişiklikler ve antibiyotikler tarafından hedeflenen yapıların modifikasyonu nedeniyle uygulanan antibiyotikler *S. maltophilia*'nın inhibisyonunda etkisiz kalmaktadır [35]. Biyofilm içindeki *S. maltophilia*'nın test edilen bir çok antibiyotiğe duyarlılığının büyük ölçüde azaldığı ortaya konmuştur. Ancak levofloksasinin *S. maltophilia* biyofilm oluşumunu inhibe ettiğini elektron mikroskobu ile gösterilmiştir [36]. Çalışmada test edilen probiyotik laktik asit bakterilerine ait hücresiz filtratların *S. maltophilia* biyofilmi üzerine farklı oranlarda inhibe edici etki gösterdikleri belirlendi. *L. plantarum* 1771 *S. maltophilia* biyofilmini % 82 oranında giderirken *L. rhamnosus* KA1 filtratı biyofilmi %96 oranında inhibe etmiştir. Antibiyotiklere direnç gösteren *S. maltophilia* biyofilminin probiyotik laktik asit bakterileri ile inhibe olması önem taşımaktadır. Bu bulgular laktik asit bakteri filtratlarının *S. maltophilia* biyofilminin inhibisyonu ile ilgili ilk bulgulardan biridir.

S. epidermidis 4-1 de çalışmadaki test bakterilerindedir. *S. epidermidis*, koagülaz negatif, gram pozitif kok şeklindeki bakterilerdir. *S. epidermidis*, endoftalmide izole edilen en yaygın patojenlerden biridir. İntraoküler lenslerden izole edilen *S. epidermidis*'in biyofilm oluşturma potansiyeline sahip olduğu ve antibiyotiklere de direnç gösterdiği vurgulanmıştır [2,41,42]. Bu çalışmada *L. rhamnosus* 1743 ve *L. rhamnosus* 1724e ait hücresiz filtratlar *S. epidermidis* 4-1 biyofilminin artmasına neden olmuştur. Buna karşın *L. rhamnosus* 3111 filtratı %79, *L. rhamnosus* KA1 %81 oranında biyofilmi inhibe etmiştir. Frickman ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada *L. rhamnosus* hücresiz filtratının *S. epidermidis* ve *S. aureus*'un biyofilmleri üzerine etkisi izlenmiştir. Bizim çalışmamıza benzer şekilde *L. rhamnosus* hücresiz filtratı *S. epidermidis* planktonik hücre kültürleri üzerinde kullanıldığında, etkili bulunmamıştır. *S. aureus*'a karşı ancak hücresiz filtrat miktarı 15 katına çıkartıldığında pozitif kontrol değerlerinin altına inmiş olarak bulunmuştur; *S. epidermidis* için tüm dozlarda pozitif kontrol ile ya benzer ya da üzerinde sonuç bulunmuştur. Buna karşılık biyofilm üzerine etkisine bakıldığında, *L. rhamnosus* hücresiz filtratının kullanılması, pozitif kontrole kıyasla biyofilmin hem *S. aureus* için hem de *S. epidermidis* için biyofilm büyümesinin azalmasına neden olduğu tespit edilmiş ancak farklı hücresiz filtrat konsantrasyonları için değişken ve hatta çelişkili etkiler gözlemlenmiştir [43].

Çalışmamızdaki son test bakterisi *L. monocytogenes*'dir. *L. monocytogenes* gram pozitif bir bakteridir. *L. monocytogenes* enfeksiyonunun en yaygın oküler şekli konjonktivitir. Listeria ile ilişkili konjonktivit, menenjitli hastalarda endojen veya eksojen olabilmektedir. İnsanlarda listeria ile ilişkili keratit ve endoftalmi vakaları da bildirilmiştir. İnsanda listeria ilişkili endoftalmi, karakteristik bir pigmentli hipopiyon ve yüksek göz içi basıncı ile ilişkilendirilmiştir [44, 45]. *L. monocytogenes* PCA 47 yüksek biyofilm oluşturan bir bakteridir. *L. plantarum* 1771, *L. rhamnosus* KA1 ve *L. rhamnosus* 312'ye ait filtratlar sırasıyla %83, %92 ve %64 oranlarında biyofilmi inhibe etmiştir. Çalışmamıza benzer olarak, Hossain ve ark. [46], LAB suşları ile birlikte kültürlendiğinde *L. monocytogenes* tarafından biyofilm oluşumunun baskılandığını göstermiştir. Camargo ve ark. [12], *L. monocytogenes*'in biyofilm oluşumunu önlemek için laktik asit bakterilerinin hücresiz filtratlarını kullanmışlardır. Beraber verildiğinde biyofilm oluşumunu engelleyen hücresiz filtratın oluşmuş biyofilme etkisiz olduğu görülmüştür. EDTA ile etkinliğin artabileceği ileri sürülmüştür. *L. acidophilus*, *Lactiplantibacillus plantarum* ve *Lacticaseibacillus rhamnosus* suşlarının hücresiz filtratlarının *L. monocytogenes* izolatlarının biyofilm oluşumunu azalttığını ve olgun biyofilmlerini dağıttığı belirlenmiştir. Araştırmacılar, hücresiz filtrat varlığında *L. monocytogenes*'te biyofilm düzenleyici faktör A (prfA) gen ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığını ortaya koymuşlardır [28].

Laktik asit bakterilerinin hücresiz filtratlarının nasıl etki ettikleri incelendiği çalışmalar laktik asit bakteri filtratları içinde bulunan bakteriyosin veya bakteriyosin benzeri maddelerin antibiyofilm aktivite göstermiş olabileceği üzerinde durmuşlardır [12-18]. Bakteriyosin üreten *L. curvatus* ET31'in hücresiz filtratı üç *L. monocytogenes* suşunun biyofilmlerini inhibisyonu açısından değerlendirilmiştir. *L. curvatus* ET31'in hücresiz filtratı biyofilm oluşumunu engellemiş ancak oluşmuş biyofilm üzerine etkisiz kalmıştır [12]. Laktik asit bakterilerinin antibiyofilm aktivitesi bu bakteriler tarafında oluşturulan biosümfektanlar ile de ilgili olabilir. Laktik asit bakterileri tarafından sentezlenen biosümfektanlar antibiyofilm aktivitesi gösterebilir [13]. *L. jensenii* ve *L. rhamnosus* hücre yüzeylerinden izole edilen biosümfektanlar, 25 ila 100 mg/ml arasındaki konsantrasyonlarda uygulandığında, yaralarda, tıbbi implantlarda ve endüstriyel yüzeylerde sıklıkla biyofilm oluşturan çoklu antibiyotik dirençliliğine sahip *E. coli*, *S. aureus* ve *A. baumannii*'nin suşlarına karşı antibakteriyel, anti-adeziv ve anti-biyofilm aktivite göstermiştir. *A. baumannii* hücre zarına ve *S. aureus* hücre duvarına zarar verdiğini ortaya çıkarmıştır. *S. aureus*'a karşı antiadeziv aktivite göstermiştir [14]. İki *Lactobacillus casei* suşunun hücre yüzeylerinden izole edilen ham biosümfektanlar, oral fırsatçı *S. aureus* suşlarına karşı güçlü yapışma

önleyici ve biyofilm önleyici maddeler olarak rapor edilmiştir [15]. *Lactiplantibacillus plantarum*'a ait biyosüpfaktan *P. aeruginosa* biyofilmini doza bağlı olarak inhibe etmiştir. Araştırmacılar biyosüpfektanın anti-Quorum sensing (Çekirdek algılama) aktivitesi gösterdiğini ayrıca piyosyanin, toplam proteaz, LasA ve LasB elastazda azalmaya neden olduğunu saptamışlardır. Çekirdek algılama (QS, quorum sensing), virülans faktörleri de dahil olmak üzere bakterilerdeki çeşitli biyolojik özelliklerin ifadesini kontrol etmektedir. QS sistemini etkileyen bileşikler, bakteriyel biyofilmi önlemek için potansiyel bir strateji olarak kabul edilmektedir [47]. Bakteriyosinler, farklı pH konsantrasyonlarında stabildir ve bazıları biyofilmleri yok etme yetenekleriyle ilgili olan farklı biyolojik ve fiziko-kimyasal özelliklere sahiptir [16]. Laktik asit bakterilerinin etkisinin nedenlerinden biri de metabolik atık olarak hidrojen peroksit veya organik asitler üretmeleri ve maddelerin biyofilimde büyüyen hücreleri çevreleyen ortamın pH'sında bir değişikliğe neden olarak etkili olmasıdır [17]. Ancak bazı koşullarda çalışmamızda *S. epidermidis* 4-1'de görüldüğü gibi laktik asit bakteri metabolit ürününden faydalanabilir veya ondan etkilenmeyebilir [18].

Sonuç olarak probiyotik laktik asit bakterilerinin hücresiz filtratları biyofilmin önlenmesinde alternatif maddeler olarak görev alabilirler. Ancak biyofilmi oluşturan bakterilerin özelliğine göre etkili olabilecek laktik asit bakterisi değişiklik gösterebilmektedir. Geniş spektrumlu antibiyofilm olarak kullanılacak hücresiz LAB filtratlarının tespiti ve test edilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Etik Beyanı

Bu çalışmada, "Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi" kapsamında uyulması gerekli tüm kurallara uyulduğunu, bahsi geçen yönergenin "Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiğine Aykırı Eylemler" başlığı altında belirtilen eylemlerden hiçbirinin gerçekleştirilmediğini taahhüt ederiz.

Kaynakça

- [1] Kam Hepdeniz, Ö., Seçkin, Ö. 2017. Dinamik mikrobiyal bir yaşam: Oral biyofilm. Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 8(3): 47-55.
- [2] Kıvanç, S. A., Kıvanç, M., Kılıç, V., Güllülü, G., Özmen, A. T. 2017. Comparison of biofilm formation capacities of two clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* with and without *icaA* and *icaD* genes on intraocular lenses. Turk J Ophthalmol, 47(2):68-73.
- [3] Gbejuade, H. O., Lovering, A. M., Webb, J. C. 2015. The role of microbial biofilms in prosthetic joint infections. Acta Orthop, 86(2):147-158.
- [4] Bispo, P. J., Haas, W., Gilmore, M. S. 2015. Biofilms in infections of the eye. Pathogens, 4(1):111-136.
- [5] Paranhos, R. M., Batalhão, C. H., Semprini, M., Regalo, S. C., Ito, I. Y., de Mattos Mda, G. 2007. Evaluation of ocular prosthesis biofilm and anophthalmic cavity contamination after use of three cleansing solutions. J Appl Oral Sci, 15(1):33-38.
- [6] Enoch, D. A., Birkett, C. I., Ludlam, H. A. 2007. Non-fermentative Gram-negative bacteria. Int J Antimicrob Agents, 29 Suppl 3:S33-41.
- [7] Safdar, A., Rolston, K. V. 2007. *Stenotrophomonas maltophilia*: changing spectrum of a serious bacterial pathogen in patients with cancer. Clin Infect Dis, 45(12):1602-1609.
- [8] Tay, E., Rajan, M., Tuft, S. 2008. *Listeria monocytogenes* sclerokeratitis: a case report and literature review. Cornea, 27(8):947-949.
- [9] Shoughy, S. S., Tabbara, K. F. 2014. *Listeria monocytogenes* endophthalmitis following keratoconjunctivitis. Clin Ophthalmol, 8:301-304.
- [10] Mahdhi, A., Leban, N., Chakroun, I., Bayar, S., Mahdouani, K., Majdoub, H., Kouidhi, B. 2018. Use of extracellular polysaccharides, secreted by *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus spp.*, as reducing indole production agents to control biofilm formation and efflux pumps inhibitor in *Escherichia coli*. Microb Pathog, 125:448-453.
- [11] Akova, B., Kıvanç, S. A., Kıvanç, M. 2021. Antibiofilm effect of probiotic lactic acid bacteria against *Bacillus* spp obtained from the ocular surface. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 25(24):7799-805.

- [12] Camargo, A. C., de Paula, O. A., Todorov, S. D., Nero, L. A. 2016. In vitro evaluation of bacteriocins activity against *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl Biochem Biotechnol*, 178(6):1239-1251.
- [13] Fariq, A., Saeed, A. 2016. Production and biomedical applications of probiotic biosurfactants. *Curr Microbiol*, 72(4):489-495.
- [14] Gudiña E. J., Teixeira J. A., Rodrigues L. R. 2010. Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei*. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 76(1):298-304.
- [15] Merghni, A., Dallel, I., Noumi, E., Kadmi, Y., Hentati, H., Tobji, S., Ben Amor, A., Mastouri, M. 2017. Antioxidant and antiproliferative potential of biosurfactants isolated from *Lactobacillus casei* and their anti-biofilm effect in oral *Staphylococcus aureus* strains. *Microb Pathog*, 104:84-89.
- [16] Mathur, H., Field, D., Rea, M. C., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R. P. 2018. Fighting biofilms with lantibiotics and other groups of bacteriocins. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 4:9.
- [17] Makovcova, J., Babak, V., Kulich, P., Masek, J., Slany, M., Cincaro, L. 2017. Dynamics of mono- and dual-species biofilm formation and interactions between *Staphylococcus aureus* and Gram-negative bacteria. *Microb Biotechnol*, 10(4):819-832.
- [18] Nadell, C. D., Drescher, K., Foster, K. R. 2016. Spatial structure, cooperation and competition in biofilms. *Nat Rev Microbiol*, 14(9):589-600.
- [19] Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., Svabic-Vlahovic, M. 2002. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*, 40(2):175-179.
- [20] Carminati, D., Giraffa, G., Bossi, M. G. 1989. Bacteriocin-Like Inhibitors of *Streptococcus lactis* against *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot*, 52(9):614-617.
- [21] Prince, A. S. 2002. Biofilms, antimicrobial resistance, and airway infection. *N Engl J Med*, 347(14):1110-1111.
- [22] El-Mokhtar, M., Hassanein, K. M., Ahmed, A. S., Gad, G. F. M., Amin, M. M., Hassanein, O. F. E. 2020. Antagonistic activities of cell-free supernatants of lactobacilli against extended-spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect and Drug Resist*, 13: 543–552.
- [23] Forestier, C., De Champs, C., Vatoux, C., Joly, B. 2001. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Res Microbiol*. 152(2):167–173.
- [24] Muhammad, Z., Ramzan, R., Abdelazez, A., Amjad, A., Afzaal, M., Zhang, S., Pan, S. 2019. Assessment of the antimicrobial potentiality and functionality of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from the conventional inner Mongolian Fermented Cheese Against Foodborne Pathogens. *Pathogens*, 8(2):71.
- [25] Jamalifar, H., Rahimi, H., Samadi, N., Shahverdi, A., Sharifian, Z., Hosseini, F., Eslahi, F., Fazeli, M. 2011. Antimicrobial activity of different *Lactobacillus* species against multi- drug resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Iran J Microbiol*, 3 (1):21–25.
- [26] Mani-Lopez, E., Arrijo-Bretón, D., López-Malo, A., 2022. The impacts of antimicrobial and antifungal activity of cell-free supernatants from lactic acid bacteria in vitro and foods. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 21:604–641.
- [27] Sornsenee, P., Chatatikun, M., Mitsuwan, W., Kongpol, K., Kooltheat, N., Sohbenalee, S., Pruksaphanrat, S., Mudpan, A., Romyasamit, C. 2021. Lyophilized cell-free supernatants of *Lactobacillus* isolates exhibited antibiofilm, antioxidant, and reduces nitric oxide activity in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *PeerJ*, 9:e12586.
- [28] Masebe, R. D., Thantsha, M. S. 2022. Anti-biofilm activity of cell free supernatants of selected lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* isolated from avocado and cucumber fruits, and from an avocado processing plant. *Foods*, 11(18):2872.
- [29] Bagge, N., Schuster, M., Hentzer, M., Ciofu, O., Givskov, M., Greenberg, E. P., Høiby, N. 2004. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and beta-lactamase and alginate production. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(4):1175-1187.
- [30] Liu, C., Sun, D., Zhu, J., Liu, J., Liu, W. 2020. The regulation of bacterial biofilm formation by cAMP-CRP: A Mini-Review. *Front Microbiol*, 11:802.

- [31] Ding, X. S., Zhao, B., An, Q., Tian, M., Guo, J. S. 2019. Role of extracellular polymeric substances in biofilm formation by *Pseudomonas stutzeri* strain XL-2. *Appl Microbiol Biotechnol*, 103(21-22):9169-9180.
- [32] Yan, N., Yang, Z., Shang, L., Dai, S., Zhan, Y., Lu, W., Lin, M., Yan, Y. 2017. Patterns of Biofilm formation in *Pseudomonas stutzeri* Under abiotic stresses. *Biotechnology Bulletin*, 33(2): 172-178.
- [33] Rezaei, Z., Khanzadi, S., Salari, A. 2021. Biofilm formation and antagonistic activity of *Lactocaseibacillus rhamnosus* (PTCC1712) and *Lactiplantibacillus plantarum* (PTCC1745). *AMB Express*, 11(1):156.
- [34] Jeyanathan, A., Ramalmete, R., Blunn, G., Gibbs, H., Pumilia, C. A., Meckmongkol, T., Lovejoy, J., Coathup, M. J. 2021. Lactobacillus cell-free supernatant as a novel bioagent and biosurfactant against *Pseudomonas aeruginosa* in the prevention and treatment of orthopedic implant infection. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 109(10):1634-1643.
- [35] Sharma, S., Chinyadza, T., Chapnick, E. K., Ghitan, M. 2008. *Stenotrophomonas maltophilia* infection during treatment for pancreatitis with imipenem/cilastatin. *Clin.Microbiol.Newsletters*, 30:12-3
- [36] Sun, E., Liang, G., Wang, L., Wei, W., Lei, M., Song, S., Han, R., Wang, Y., Qi, W. 2016. Antimicrobial susceptibility of hospital acquired *Stenotrophomonas maltophilia* isolate biofilms. *Braz J Infect Dis*, 20(4):365-373.
- [37] Horio, N., Horiguchi, M., Murakami, K., Yamamoto, E., Miyake, Y. 2000. *Stenotrophomonas maltophilia* endophthalmitis after intraocular lens implantation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 238(4):299-301.
- [38] Karakurt, A., Abdik, O., Sengün, A., Karadağ, R., Saricaoğlu, S., Sarikatipoğlu, H. Y., Hasiripi, H. 2006 *Stenotrophomonas maltophilia* Endophthalmitis after cataract extraction. *Ocul Immunol Inflamm*,14(1):41-46.
- [39] Park, B. C., Lim, H. R., Park, S. J., Koh, J. W. 2021. Clinical features and management of *Stenotrophomonas maltophilia* keratitis. *Ophthalmol Ther*, 10(3):525-533.
- [40] Jucker, B. A., Harms, H., Zehnder, A. J. 1996. Adhesion of the positively charged bacterium *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* 70401 to glass and Teflon. *J Bacteriol*, 178(18):5472-5479.
- [41] Katiyar, R., Vishwakarma, A., Kaistha, S. D. 2012. Analysis of biofilm formation and antibiotic resistance of microbial isolates from intraocular lens following conventional extracapsular cataract surgery. *Int J Res Pure Appl Microbiol*. 2(2):20–24.
- [42] Kivanc, S. A., Kilic, V., Akova, B., Kivanc, M. 2020. The biofilm formation properties of the *S. epidermidis* isolates obtained from conjunctiva and multi-drug resistance. *Kuwait Medical Journal*, 52:143-150.
- [43] Frickmann, H., Klenk, C., Warnke, P., Redanz, S., Podbielski, A. 2018. Influence of probiotic culture supernatants on in vitro biofilm formation of Staphylococci. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*, 8(4):119-127.
- [44] Altaie, R., Fahy, G. T., Cormican, M. 2006. Failure of *Listeria monocytogenes* keratitis to respond to topical ofloxacin. *Cornea*, 25(7):849-850.
- [45] Gaskell, K. M., Williams, G., Grant, K., Lightman, S., Godbole, G. 2017. *Listeria Monocytogenes*: a rare cause of endophthalmitis, a case report. *IDCases*, 8:45-46.
- [46] Hossain, M. I., Mizan, M. F. R., Ashrafudoulla, M., Nahar, S., Joo, H.-J., Jahid, I. K., Park, S. H., Kim, K.-S., Ha, S.-D. 2020. Inhibitory effects of probiotic potential lactic acid bacteria isolated from kimchi against *Listeria monocytogenes* biofilm on lettuce, stainless-steel surfaces, and MBEC™ biofilm device. *LWT-Food Science and Technology*, 118, Article 108864.
- [47] Patel, M., Siddiqui, A.J., Ashraf, S.A., Surti, M.; Awadelkareem, A.M.; Snoussi, M.; Hamadou, W.S.; Bardakci, F.; Jamal, A.; Jahan, S.; et al. *Lactiplantibacillus plantarum*-derived biosurfactant attenuates quorum sensing-mediated virulence and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* and *Chromobacterium violaceum*. *Microorganisms* 2022, 10, 1026.

Tüketime Sunulan Çiğ Sütlerde Escherichia coli O157:H7 Araştırılması

Investigation of Escherichia coli O157:H7 in Raw Milk Offered for Consumption

Cansu ÖNLEN GÜNERİ^{1*} , Suna KIZILYILDIRIM² 

¹ Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Sağlık Meslek Yüksek Okulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Programı, Ankara, Türkiye

² Süleyman Demirel Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye



ÖZET

Amaç: *Escherichia coli* (*E.coli*) O157:H7 insan sağlığı açısından önemli morbidite ve mortalite nedenlerinden biridir. *E. coli* O157:H7'ye bağlı enfeksiyonların çoğunluğu gıda kaynaklıdır. Bu çalışmada, Mersin ilinde tüketime sunulan çiğ sütlerde *E. coli* O157:H7 prevalansının tespiti amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Mersin ilinde çeşitli pazar ve bakkalarda satışa sunulan 60 adet çiğ süt örneği incelenmiştir. Her bir süt numunesi steril kaba alınmış olup, soğuk zincirde bakteriyoloji laboratuvarına getirilmiştir. Süt örneklerinden 25 ml olacak şekilde alınarak, zenginleştirme işlemi için 225 ml olarak hazırlanan Tryptic Soy Broth'a inoküle edilmiştir. Zenginleştirme işlemi sonrasında, MacConkey veya Eozin Metilen Blue (EMB) agara kültüre edilmiştir. İnkübasyon sonunda üreyen şüpheli koloniler IMVIC testi ile *E. coli* olarak doğrulandıktan sonra *E. coli* O157:H7 araştırılması için Sorbitol-Mac-Conkey (SMAC) agar üzerine inoküle edilmiştir. Soyutlanan izolatlar antimikrobiyal direnç profilleri açısından araştırılmak üzere Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) kılavuzlarına göre Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılık testi yapılmıştır.

Bulgular: Analize alınan 60 adet çiğ süt örneğinin iki tanesinde (%3,3) *E. coli* O157:H7 soyutlanmıştır. *E. coli* O157:H7 izolatlarının ampisilin ve kloramfenikole karşı dirençli olduğu, gentamisin ve siprofloksasine ise yalnızca birinin dirençli iken diğer izolatın duyarlı olduğu bulundu. Ayrıca her iki izolatın da tetrasiklin, nalidiksik asit ve sefuroksime karşı duyarlı olduğu görüldü.

Sonuç: Çiğ süt ve süt ürünlerinin *E. coli* O157:H7 için kaynak olabileceği ve halk sağlığı açısından risk teşkil edebileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *E. coli*, Çiğ süt, Antibiyotik direnci

Alınış / Received: 11.11.2022 Kabul / Accepted: 24.11.2022 Online Yayınlanma / Published Online: 20.12.2022



ABSTRACT

Objective: *Escherichia coli* (*E.coli*) O157:H7 is one of the important causes of morbidity and mortality in terms of human health. Most infections due to *E. coli* O157:H7 are foodborne. In this study, it was aimed to determine the prevalence of *E. coli* O157:H7 in raw milk offered for consumption in Mersin.

Materials and Methods: Sixty raw milk samples sold in various markets and grocery stores in Mersin province were examined. Each milk sample was taken into a sterile container and brought to the bacteriology laboratory in the cold chain. 25 ml of milk samples were taken and inoculated into 225 ml of Tryptic Soy Broth, which was prepared for enrichment. After enrichment, it was cultured on MacConkey or Eozin Metilen Blue (EMB) agar. After the suspicious colonies that grew at the end of the incubation were confirmed as *E. coli* by IMVIC test, they were inoculated on Sorbitol-Mac-Conkey (SMAC) agar to investigate *E. coli* O157:H7. Antibiotic susceptibility test was performed by Kirby Bauer disk diffusion method according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines to investigate the isolated isolates in terms of antimicrobial resistance profiles.

Results: *E. coli* O157:H7 was isolated in two (3.3%) of 60 raw milk samples analyzed. *E. coli* O157:H7 isolates were found to be resistant to ampicillin and chloramphenicol, whereas only one isolate was resistant to gentamicin and ciprofloxacin, while the other isolate was susceptible. In addition, both isolates were found to be sensitive to tetracycline, nalidixic acid and cefuroxime.

Conclusion: It was concluded that raw milk and dairy products may be a source for *E. coli* O157:H7 and pose a risk to public health.

Keywords: *E. coli*, Raw milk, Antibiotic resistance



1. Giriş

Süt, temel besin bileşenleri ile beslenmede büyük önem taşır [1]. Sağlıklı bir memeden elde edilen süt, işlenmesi nedeniyle çoğalabilen birçok bakteri içerir [2]. Ayrıca eşsiz bileşimi ile süt, bakteri üremesi için mükemmel bir ortam sağlar. Bu nedenle tüketim açısından önemli bir bakteriyel enfeksiyon kaynağıdır. Sütte bulunan patojen bakteriler insan sağlığını tehdit etmekte olup, antibiyotiğe dirençli patojen etkenlerinin yayılması için önemli bir vektör olabilir. Patojenik mikroorganizmalar doğrudan memeden süte yayılabilirken, sağım sırasında ve sonrasında ahırdan, havadan, süt sağım cihaz ve ekipmanları ile personeller gibi önemli kontaminasyon kaynakları aracılığıyla yayılabilir. Sütte bulunan başlıca patojenler: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* ve *Campylobacter*'dir [3]. Özellikle *E. coli* O157 ve O157:H7 gibi *E. coli* serogrupları dışkıdan süt ve süt ürünlerine yayılabilir ve ciddi enfeksiyonlara neden olabilir [4]. *E. coli*, Enterobacteriaceae ailesinde sınıflandırılan Gram negatif, fakültatif anaerob bir bakteridir. İnsan normal florasının bir üyesi olarak bağırsağın önemli kommensallerinden biri olan *E. coli*, çoğunlukla fekal kontaminasyon ve hijyen analizleri için indikatör olarak kullanılan mikroorganizmadır [5]. Bununla birlikte, birkaç *E. coli* serotipi, yeni ortamlara uyum sağlamak adına virülans faktörleri kazanımıyla ciddi hastalıklara neden olmaktadır. İnsanlarda koliform bakteri grubunda yer alan *E. coli* genel olarak bağırsak epitel hücrelerini etkileyen altı patojenik serotipe sahiptir. Bunlar; enterohemorajik *E. coli* (EHEC); enteropatojenik *E. coli* (EPEC); enterotoksijenik *E. coli* (ETEC); enteroagregatif *E. coli* (EAEC); enteroinvaziv *E. coli* (EIEC); dir. Bu patojenik *E. coli* serotipleri arasında yüksek virülansı nedeniyle *E.*

coli O157:H7 olarak da bilinen EHEC suşları düşük sayıda bakteri ile bile (5-50 arası bakteri) enfeksiyon geliştirebilmektedir ve bu oran süt içerisinde de bulunabilmektedir. *E. coli* O157:H7, Avrupa gıda güvenliği otoritesi raporuna göre (EFSA, 2009a), endişe duyulan başlıca *E. coli* serotip/serogrupları arasında yer almaktadır [6]. Dolayısıyla süt ve süt ürünlerinin elde edildiği hayvanlardan kaynaklı olarak fekal kontaminasyona maruz kalan su ve gıda maddeleri, gıda güvenliği için önemli bir tehdit unsuru olabilir [5]. Ayrıca, ülkemize ailesi ile tatile gelen iki yaşında İngiliz bir kız çocuğunun, *E. coli* O157 enfeksiyonuna bağlı olarak gelişen Hemolitik Üremik Sendrom (HÜS) ile böbrek yetmezliği nedeniyle hayatını kaybetmesi basında geniş yer tuttu [7].

Dünya nüfusunun artmasıyla beraber çiğ süt ve çiğ süt ile yapılan peynir, tereyağı, dondurma ve kefir gibi ürünlere karşı tüketici talebi de artmaktadır. Dolayısıyla, pastörizasyon yapılmadan hazırlanıp tüketime sunulan pek çok peynir çeşidi bulunmaktadır. Günümüzde bu ürünlerin tüketimi ile patojenik mikroorganizmaların neden olduğu kontaminasyondan kaynaklanan hastalık risklerinin arttığı görülmektedir.

Süt ve süt ürünleri açısından kontaminasyon göstergelerinden biri; koliform bakteri grubunda yer alan *E. coli*'dir. *E. coli*'nin yukarıda bahsedilen birçok farklı serotipi vardır. Bu serotiplerden *E. coli* O157:H7 insan sağlığı için önemli morbidite ve mortalite nedeni olmasının yanında önemli bir de gıda patojenidir. Bu etkenin enfeksiyon dozunun da oldukça düşük olması önemini daha da arttırmaktadır.

E. coli O157:H7 sulu ishal gibi hafif enfeksiyonlardan hemorajik kolit, hemolitik üremik sendrom (HÜS) ve trombositopeni gibi ağır seyirli olabilen enfeksiyonlara kadar değişiklik göstermektedir [8]. *E. coli* O157:H7'nin çiftlik hayvanlarının bağırsak sisteminde yaygın olarak kolonize olduğu bildirilmektedir. Son zamanlarda yapılan epidemiyolojik çalışmalarda *E. coli* O157:H7'nin başlıca taşıyıcılarının süt sığırları olduğu belirtilmiştir. Dünya sağlık örgütünün 2018 raporuna göre *E. coli* O157:H7 enfeksiyonlarının çoğunun az pişirilmiş et ve pastörize edilmemiş süt ürünleri ile çiftlik hayvanlarının dışkıları ile kontamine olmuş sebzelerle ilişkili olduğu bildirilmiştir [9].

Dolayısıyla bu çalışmada, pek çok patojen etkenin bulaşmasında önemli bir rezervuar olabilen çiğ sütlerde *E. coli* O157:H7 prevalansının tespiti amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

Mersin ilinde halk pazarında ve bakkalarda tüketime sunulan çiğ süt örneklerinden 01.04.2019-31.05.2019 tarihleri arasında aseptik koşullar altında yaklaşık 250 ml olacak şekilde steril taşıma kaplarına alınarak soğuk zincir altında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına getirildi. Steril pastör pipeti ile süt örneklerinden 25 ml alındı ve zenginleştirme işlemi için 225 ml olarak hazırlanan Tryptic Soy Broth'a inoküle edilerek 37°C'de 48 saat inkübe edildi. Zenginleştirme işlemi sonrasında, MacConkey agar veya EMB agara kültüre edildikten sonra 37°C'de 48 saat süresince inkübe edildi. İnkübasyon sonunda üreyen metalik refle veren şüpheli koloniler IMVIC testi ile *E. coli* olarak doğrulandı. Ancak akabinde *E. coli* izolatlarının tanımlanmasında IMVIC testine ek olarak bu bakteriye ait biyokimyasal bazı özelliklerinin tespitine olanak tanıyan testler dikkate alınmıştır. Bu kriterler arasında MacConkey veya EMB agar besiyerinde metalik refle veren kolonilerin üremesinin yanında Triple Sugar Iron agar, Sulfide Indole Motility agar ve sitrat agar besiyerlerindeki karakterlerinin belirlenmesiydi. *E. coli* olarak tanımlanan izolatlar sonraki işlem basamakları için %20 gliserol içeren saklama besiyerinde -70°C'de saklandı.

E. coli O157:H7 araştırılması için -70°C'de tutulan *E. coli* izolatları SMAC agar üzerine inoküle edildi. 37°C'de en az 24 saat inkübasyon sonunda sorbitol negatif koloniler *E. coli* O157:H7 olarak tanımlandı. Sorbitol-negatif koloniler ayrıca O157 antiserumu ile doğrulandı [10, 11].

Sorbitol negatif *E. coli* suşları antimikrobiyal direnç profilleri tespiti için Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) kılavuzlarına göre Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile araştırıldı. Bu amaçla; ampisilin (10 µg), gentamisin (10 µg), sefuroksim (30 µg), tetrasiklin (30 µg), siprofloksasin (5 µg), nalidiksik asit (30 µg), ve kloramfenikol (30 µg) (Oxoid, İngiltere) antibiyotikleri kullanıldı. Sonuçlar CLSI (2016) kriterlerine göre yorumlandı. Negatif standart suş olarak *E. coli* O157: H7 ATCC 43888, pozitif standart suş olarak *E. coli* O157: H7 ATCC 43895 ve ATCC 43889 kullanıldı.

3. Bulgular

'Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization of the United Nations, (FAO)) standartları göz önünde bulundurularak 60 adet çiğ süt örneğinin 20'sinde *E. coli* izole edildi. İzole edilen *E. coli* izolatları *E. coli*'ye ait önemli bir serotip olan *E. coli* O157:H7 açısından incelendiğinde ise iki (n=2) izolatın (%3,3) *E. coli* O157:H7 olarak tespit edildiği görüldü (Tablo 1).

Çiğ sütte tespit edilen *E. coli* O157:H7 izolatının ikisi de ampisilin ve kloramfenikole karşı dirençliydi. Gentamisin ve siprofloksasine ise yalnızca biri dirençli iken diğeri duyarlıydı. Ayrıca her iki izolatın da tetrasiklin, nalidiksik asit ve sefuroksime karşı duyarlı olduğu bulundu (Tablo 2).

Tablo 1: Çiğ sütlerde *E.coli* O157:H7 varlığı

Örnek tipi	Örnek Sayısı	<i>E.coli</i> O157:H7	%
Çiğ Süt	60	2	%3.3

Tablo 2: Çiğ sütte tespit edilen *E.coli* O157:H7 izolatının Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılık sonuçları

Antibiyotikler	Duyarlı izolat sayısı	Dirençli izolat sayısı
Ampisilin (10 mg)	-	2
Gentamisin (10 mg)	1	1
Sefuroksim (30 mg)	2	-
Tetrasiklin (30 mg)	2	-
Siprofloksasin (5 mg)	1	1
Nalidiksik Asit (30 mg)	2	-
Kloramfenikol (30 mg)	-	2

4. Tartışma ve Sonuç

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü 2015 yılında, dünya süt üretiminin 724 milyon tona ulaştığını yayınlamıştır (FAO, 2015) [12]. Dolayısıyla bu oran süt ürünleri tüketimi ve ticaretinde muazzam bir artış olduğu bilgisini de beraberinde getirmiştir. Ayrıca bu kadar yüksek süt tüketim oranları süt kaynaklı gıda patojenlerinin güvenliği ve kontrolü/önlenmesi halk sağlığı için birincil öneme sahip olduğunu da gözler önüne sermektedir. Çiftlik hayvanları, süte geçebilen önemli patojen rezervuarları barındırır. Süt ve süt ürünleri ile insan bulaşı yüksek olabilen bakteriyel patojenler arasında *Salmonella spp*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Campylobacter spp* ve patojenik *E. coli* önemli bir yere sahiptir. Çiğ süt bu bakteriler için potansiyel bir büyüme ortamı sağlar [3].

Çiğ süt açısından değerli bir diğer bilgi ise et ve et ürünlerinden sonra *E. coli* O157:H7 enfeksiyonuna neden olan ikinci önemli gıda grubunda olmasıdır. Çiğ süt ile ilk *E. coli* O157:H7 enfeksiyonu 1986 yılında Amerika Birleşik Devleti'nde görülmüş olup [13], yine benzer tarihlerde Kanada'da çiğ süt tüketen bir kreşteki çocuklarda da rastlanmıştır [14]. İlerleyen yıllarda ise İskoçya'da *E. coli* O157:H7 ile kontamine pastörize süt tüketen 100 kişinin enfeksiyonuna neden olduğu bilgisine Lancet dergisinde yer verilmiştir [15]. Çiğ sütlerin bu enfeksiyon etkenine karşı önemli bir rezervuar olabileceği bilgisinin gün yüzüne çıkmasından sonra bu konu hakkında ülkemizde ve dünyada pek çok araştırma yapılmıştır.

Türkiye’de süt örneklerinde *E. coli* O157:H7 prevalansı konusunda; Öksüz ve ark [16] tarafından 2004 yılında çiğ süt ve peynir örneklerinde %1 ila %4 oranında; Aslantaş ve Yıldız [17] tarafından 100 çiğ süt örneğinden 2 (%2)’sinde; Aksu ve ark [18] tarafından 100 çiğ süt örneğinin 2’sinde (%2); İnat ve ark [18] tarafından 2017 yılında çiğ inek sütünün 1’inde (%0,66), Akkaya ve ark [20], 100 adet çiğ süt örneğinden 3’ünde (%3) ve 1 (%1) taze beyaz peynir örneğinde; Şeker ve Yardımcı [21] tarafından 2008 yılında, 213 çiğ süt örneğinin 3’ünde (%1,4); *E. coli* O157:H7 tespit ettikleri görülmüştür. Sancak ve ark [22] ise 2015 yılında; çiğ inek sütü örnekleri ile gerçekleştirdikleri çalışmada *E. coli* O157:H7 izole etmediklerini bildirilmiştir. Farklı ülkelerde gerçekleştirilen çalışmalarda ise; örneğin Amerika Birleşik Devletlerinin farklı eyaletlerinde Padhye ve Doyle [23] 115 çiğ süt örneğinden 11 (%10)’inde; Abdul-Raouf ve ark [24] 50 adet çiğ süt örneğinden 3’ünde (%6); Wells ve ark, [25] 23 adet çiğ süt örneğinden 1’inde (%4,34) Arimi ve ark [26] 2005 yılında Kenya’da gerçekleştirdikleri çalışmada 264 adet süt örneğinin ikisinde (%0,76), Dontorou C ve ark [27] 2003 yılında Yunanistan’da 100 adet koyun, inek ve keçi sütü örneğinin birinde (%0,33) ve Reuben A ve ark [28] Kosta rika’da ise 100 çiğ süt örneğinin ikisinde (%2) *E. coli* O157:H7 tespit edildiği görülmüştür. Mevcut çalışmada çiğ sütlerde tespit edilen %3.3 *E. coli* O157:H7 oranının yukarıda yer verilen çalışmaların bazıları ile benzer birkaçından yüksek birkaçından da düşük olduğu görülmüştür. Etken mikroorganizmanın farklı prevalanslarda bulunması; bölgesel ve mevsimsel farklılıklar ile süt toplama ve sağım alanlarındaki hijyenik koşulların farklılığından kaynaklanıyor olabileceğini göstermektedir.

Enfeksiyon etkeni mikroorganizmalar süt içerisine memeden direkt bulaşabileceği gibi hayvanın deri ve mukoz membalarından, süt sağım aletlerinden, kontamine olabilen sağım kaplarından, sütlerin toplandığı tanklardan, biyolojik vektör olarak önemli bir yere sahip olan böcekler ve kemirgenlerden ve fiziksel olarak kir ve dışkıdan da bulaşabilmektedir [20].

Ülkemizin birçok bölgesinde çiğ süttten peynir yapma alışkanlığı yaygın olarak devam etmektedir. Bu patojenin çiğ süttten tüketime sunulan peynirlerde bulunması durumunun peynirin çeşidine, pH değerine, tuz konsantrasyonuna, laktik asit konsantrasyonuna ve laktik asit florasının metabolik aktivitesine bağlı olduğu düşünülmektedir [29]. Günümüzde ticari olarak da bireysel tüketim amaçlı olarak da hijyen kurallarını göz önünde bulundurmaksızın geleneksel yöntemlerle yaygın olarak peynir üretimi ve tüketiminin gerçekleşmekte olduğu düşünüldüğünde tüketime sunulan peynirlerin halk sağlığı açısından risk taşıdığı görülmektedir [30].

E. coli O157:H7 çiğ süt örneklerinde düşük yaygınlık oranına sahip olmasına rağmen, minimum enfeksiyon dozunun düşük olması, hastalık oluşturma yeteneğinin yüksek olması, çapraz kontaminasyon riskinin olması, yüksek asiditeye karşı toleransının yüksek olması *E. coli* O157:H7’nin hijyen ve halk sağlığı açısından tehdit edici boyutta olduğunu bir kez daha gözler önüne sermektedir [20]. Ayrıca bu patojenin asidik koşullara yüksek uyum sağlama yeteneğine sahip olması ve bu nedenle fermente süt ürünlerinde dahi uzun süre canlılığını koruyor olması hijyen kurallarına karşı özverinin daha da artırılması gerekliliğini göstermektedir [31].

E. coli O157:H7 kontamine gıda numunelerinde düşük miktarlarda bulunduğundan, konvansiyonel yöntemlerle teşhiste problemler ve sınırlamalar olabilir. Etkenin tespiti için kültür testleri ve antijen-antikor tepkimelerine dayalı serolojik testler gibi farklı yöntemler kullanılsa da günümüzde *E. coli* O157:H7’nin doğru ve hızlı teşhisi açısından altın standart kabul edilen PCR’a dayalı moleküler tekniklerin kullanılmaması çalışmamızın kısıtlılığını oluşturmaktadır.

Sonuç olarak; bu araştırma ile çiğ sütlerin *E. coli* O157:H7 ile bulaşında önemli bir kaynak olabileceği gösterilmiştir. Bu nedenle çiğ süt ve süt ürünleri tüketimi ciddi sağlık sorunlarına neden olabilmektedir. Hijyenik olmayan üretim koşullarının bu patojenin sofralara ulaşmasında önemli faktörlerden biri olduğu göz önüne alındığında; çiğ süt elde edim aşamaları açısından hayvanların barındığı yerlerin hijyeninden başlayarak, özellikle süt sağım alet ve kaplarına dışkı bulaşmasının önüne geçilmesi, peynir yapımında pastörizasyon işleminin öneminin bilinmesi, çapraz kontaminasyon riskinin göz önünde bulundurulması gibi çiğ süttten süt ve süt ürünlerinin üretiminden paketlenmesine kadar tüm süreçlerde özen gösterilmesi halk sağlığı açısından oldukça değerlidir. Tüm bu kritik süreçlerde;

Tehlike Analizi Kritik Kontrol Noktaları (HACCP) kurallarının uygulanması ile çiğ süt ve süt ürünlerinin kontaminasyon risklerinin önlenmesi sağlanabilir.

Teşekkür

Deneylerin gerçekleştirilmesi için laboratuvar imkanlarından faydalanmamıza yardımcı olan Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Fatih KÖKSAL'a teşekkür ederiz.

Etik Beyanı

Bu çalışmada, "Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi" kapsamında uyulması gerekli tüm kurallara uyulduğunu, bahsi geçen yönergenin "Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiğine Aykırı Eylemler" başlığı altında belirtilen eylemlerden hiçbirinin gerçekleştirilmediğini taahhüt ederiz.

Kaynakça

- [1] Tamang, M. D., Gurung, M., Nam, H. M., Kim, S. R., Jang, G. C., Jung, S. C., et al. 2014. Short communication: genetic characterization of antimicrobial resistance in *Acinetobacter* isolates recovered from bulk tank milk. *J. Dairy Sci.* 97, 704–709. doi: 10.3168/jds.2013-7403.
- [2] Nahla, A. Abou El-Roos; Ebtesam M. Mazid; Eman M. Zakary and Kayrı F. Abou El Yazid. 2013. Molecular Characterization of *Pseudomonas Aeruginosa* Isolated from Milk. *Assiut Vet. Med. J.* 59, 139.
- [3] Claeys, W., Cardoen, S., Daube, G., De Block, J., Dewettinck, K., Dierick, K. 2013 Raw or Heated Cow Milk Consumption: Review of Risks and Benefits. *Food Control*, 31:251e262.
- [4] Ekici K., Bozkurt, H., Isleyici, O. Isolation of some pathogens from raw milk of different milk animals. 2004. *Pak J Nutr*, (3), 161–162.
- [5] Tchaptchet, S., and Hansen, J. 2011. The Yin and Yang of host-commensal mutualism. *Gut Microbes*, 2,347–352.
- [6] European Centre for Disease Prevention and Control and European Food Safety Authority (ECDPC/EFSA) (2011): Shiga toxin/verotoxin- producing *Escherichia coli* in humans, food and animals in the EU/ EEA, with special reference to the German outbreak strain STEC O104. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC).
- [7] <https://uk.news.yahoo.com/british-girl-dies-e-coli-poisoning-turkey-holiday-133106151.html>
- [8] Ameer, M. A, Wasey, A, Salen, P. *Escherichia coli* (E coli 0157 H7). 2022. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–. PMID: 29939622.
- [9] World Health Organization. *E.coli*. 2018. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
- [10] Feng, P., Weagant, S.D. 2011. Diarrheagenic *Escherichia coli*. U.S.A. Food and Drug Administration.
- [11] March, S.B., Ratnam, S. 1989. Latex agglutination test for detection of *Escherichia coli* serotype O157:H7. *J Clin Microbiol*, 27, 1675–1677.
- [12] World milk production. (2015): FAO data shows. <http://dairy.ahdb.org.uk/market-information/supply-production/milk-production/world-milk-production/#.Vmff47iLSUk>. (9 December 2015).
- [13] Martin, M. L., Shipman, L. D., Wells, G. J. 1986. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from dairy cattle associated with to cases of hemolytic uremic syndrome, *Lancett* ii, 1043.

- [14] Duncan, L., Mai, V., Carter, A., Carlson, J. A. K, Borczyk, A., Karmali, M. A. (1987. Outbreak of gastrointestinal disease, Ontario. Can. Dis. Weekly Rep., 13(2), 5-8.
- [15] Upon, P., Coia, J. E. 1994. Outbreak of *Escherichia coli* O157 infections associated with pasteurized milk supply. Lancet, 334: 1015.
- [16] Öksüz, Ö., Arici, M., Kurultay, S., et al 2004. Incidence of *Escherichia coli* O157 in raw milk and white pickled cheese manufactured from raw milk in Turkey. Food Control, 15, 453-456.
- [17] Aslantaş, Ö., Yıldız, P. 2002. Kars yöresinde hayvansal kaynaklı gıdalarda *Escherichia coli* O157:H7 izolasyonu, *Vet Bil Derg*, 18, 1-2, 107-111.
- [18] Aksu, H., Arun, Ö. Ö., Aydın, A., Uğur, M. 1999.: *Escherichia coli* O157:H7'nin hayvansal kökenli çeşitli gıda maddelerinde varlığı, *Pendik Vet Mikrobiyol Derg*, 30(2), 77- 81.
- [19] İnat, G., Sırıken, B., Pamuk, Ş. 2017. *Escherichia coli* O157 and O157:H7 in Raw Cow Milk. *Animal Health Prod and Hyg*, 6(1), 481 – 486.
- [20] Akkaya, L., Alişarlı, M., Kara, R., Telli, R.. 2007. Afyonkarahisar'da Tüketime Sunulan Çiğ Süt ve Peynirlerde *E. coli* O157:H7 Varlığının Belirlenmesi. *Yyü Vet Fak Derg*, 18(1), 1-5.
- [21] Şeker E., Yardimci H. 2008.: First isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from faecal and milk specimens from Anatolian water buffaloes (*Bubalus bubalus*) in Turkey. *Journal of the South African Veterinary Association*, 79, 167-170.
- [22] Sancak, Y.C., Sancak, H., Isleyici, O., Durmaz, H. 2015. Presence of *Escherichia coli* O157 and O157:H7 in raw milk and Van herby cheese. *Bull Vet Inst Pulawy*, 59, 511-514. DOI:10.1515/bvip-2015-0076.
- [23] Padhye, N. V., Doyle, M. P. 1992. *Escherichia coli* O157:H7 epidemiology pathogenesis and methods for detection in food, *J Food Prot*, 55(7), 555-565.
- [24] Abdul-Raouf, U.M., Ammar, M.S., Beuchat, L.R. 1996.: Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from some Egyptian foods. *International Journal of Food Microbiology*, 29, 423-426.
- [25] Wells, J. G., Shipman, L. D., Greene, K. D., Sowers, E. G. 1991. Isolation *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga like toxin producing *E. coli* from dairy cattle, *J Clin Microbiol*, 29(5), 985-989.
- [26] Arimi, S.M., Koroti, E., Kang'ethe, E.K., Omoro, A.O., McDermott, J.J.2005. Risk of infection with *Brucella abortus* and *Escherichia coli* O157:H7 associated with marketing of unpasteurized milk in Kenya. *Acta Trop*, 96, 1–8.
- [27] Dontorou, C., Papadopoulou, C., Filioussis, G., Economou, V., Apostolou, I., Zakkas, G., Salamoura, A., Kansouzidou, A., Levidiotou, S. 2003. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods in Greece. *Int J Food Microbiol*, 82, 273–279.
- [28] Reuben, A., Treminio, H., Arias, M.L., Chavez C.2003. Presence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in food from animal origin in Costa Rica. *Arch Latinoam Nutr.*, 53, 389–392.
- [29] Lekkas, C., Kakouri, A., Paleologos, E., Voutsinas, L.P., Kontominas, M.G., Samelis, J.2006. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Galotyri cheese stored at 4 and 12°C. *Food Microbiol*, 23, 268–276.
- [30] McLauchlin, J., Aird, H., Elliott, A., Forester, E., Jørgensen, F., Willis, C. 2020. Microbiological quality of raw drinking milk and unpasteurised dairy products: results from England 2013–2019. *Epidemiology and Infection*, 148, e135, 1–12. [https://doi.org/ 10.1017/S0950268820001016](https://doi.org/10.1017/S0950268820001016).
- [31] Tosun, H., Seckin A.K., Gonul, S.A. 2007. Acid adaptation effect on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in fermented milk products. *Turk J Vet Anim Sci*, 31, 61–6.

Rotenon'un İnsan Lenfositlerinde İn Vitro Genotoksisitesi In Vitro Genotoxicity of Rotenone in Human Lymphocytes

Dilek AŞCI ÇELİK^{1*}, Vehbi Atahan TOĞAY²

¹ Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, Isparta, Türkiye

Ö Z E T

Giriş: Rotenon, bir taşıyıcıdan bağımsız olarak hücrel membranları kolayca geçen, lipofilik, geniş spektrumlu insektisit ve pisisit sınıfı bir pestisitir. Bu çalışmada Rotenon'un insan periferik kan lenfositlerinde DNA üzerine olan etkisi comet metodu ile değerlendirilmiştir.

Materyal-Metot: Çalışmada 4 erkek 4 kadın toplam 8 gönüllüden alınan periferik kan lenfositleri Rotenon ile 10, 50 veya 100 µM olmak üzere üç farklı dozda ve her bir doz için 1, 2 veya 4 saat olmak üzere üç farklı sürede muamele edilmiştir. Comet metodu uygulanmış ve kuyruk DNA yüzdesi parametresi DNA hasarının göstergesi olarak negatif ve pozitif kontrol grupları ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

Bulgular: Rotenon uygulamaları inkübasyon saatine ve doza bağlı olarak farklı sonuçlar ortaya koymuştur. 10 veya 50 µM Rotenon ile 1 s ve 2 s inkübasyon uygulanan gruplar negatif kontrol gruplarına kıyasla DNA hasarında artışa sebep olmuş ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). 100 µM doz ile 1 ve 2 s inkübasyon uygulanan gruplar, kontrol gruplarına kıyasla DNA hasarında anlamlı artışa sebep olmuştur ($p<0,05$). 10, 50 veya 100 µM Rotenon ile 4 s inkübasyon uygulanan gruplarda negatif kontrol grubuna kıyasla DNA hasarında anlamlı seviyede artış tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Sonuç: Rotenon maruziyeti kısa süreli ve düşük dozlarda olduğunda DNA hasarında artış olmakla birlikte bu artış anlamlı değildir. Doz yükseldikçe, kısa maruziyet sürelerinde de anlamlı seviyede DNA hasarı oluşmaktadır. Uzun süreli Rotenon maruziyetinde ise doz bağımsız şekilde anlamlı seviyede DNA hasarı görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Comet metodu, DNA hasarı, Pestisit, Rotenon

Alınış / Received: 04.11.2022 Kabul / Accepted: 25.11.2022 Online Yayınlanma / Published Online: 20.12.2022



ABSTRACT

Objective: Rotenone is a lipophilic, broad-spectrum, insecticide and piscicide class pesticide that readily crosses cellular membranes. In this study, the effect of Rotenone on DNA of human peripheral blood lymphocytes was evaluated by the comet assay.

Material-Method: In the study, peripheral blood lymphocytes taken from 8 volunteers, 4 male and 4 female, were treated with Rotenone at three different doses as 10, 50 or 100 µM, and for three different time periods of 1, 2 or 4 hours for each dose. Comet assay was applied and tail DNA percentage parameter was chosen as measure of DNA damage and statistically compared with negative and positive control groups.

Results: Rotenone applications showed different results depending on incubation time and dose. Groups incubated with 10 or 50 µM Rotenone for 1 and 2 h caused an increase in DNA damage compared to the negative controls, but this increase was not statistically significant ($p>0,05$). There was a significant increase in DNA damage in the groups that were incubated with 10, 50 or 100 µM Rotenone for 4 h compared to the negative control group.

Conclusion: When Rotenone exposure is short-term and at low doses, there is an increase in DNA damage, but this increase is not statistically significant. As the dose increases, statistically significant DNA damage also occurs in short-term exposures. Long-term exposure to Rotenone, on the other hand, shows significant DNA damage regardless of dose.

Keywords: Comet assay, DNA damage, Pesticide, Rotenone



1. Giriş

Pestisitler, tarımsal zararlıları engellemek, zararlarını azaltmak ya da kontrol altına almak için kullanılan zirai ilaçlardır [1]. Tarımsal verimi arttırmak için önemli olsalar da, insanlar ve diğer canlılar için potansiyel toksisiteyi sebebiyle kullanımları çeşitli sorunlara neden olmaktadır [2]. Sağlık üzerindeki olumsuz etkileri konusunda tartışmalar devam etmektedir. Kanseri, solunum yolu hastalıkları ile immün sistem ve sinir sistemi bozukluklarına neden olabilecekleri bildirilmiştir [3].

Rotenon, Leguminosae familyasına ait Lonchocarpus ve Derris cinsi bitkilerin köklerinden elde edilen ve doğal olarak oluşan, insektisit ve pistisit grubu bir pestisittir [4]. Lipofildir ve bu nedenle kan-beyin bariyeri dahil tüm biyolojik zarları kolaylıkla geçer, taşıyıcılara ihtiyaç duymaz [5]. Rotenon toksisitesinin mekanizması henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır [6]. Mitokondriyal kompleks I inhibisyonuna sebep olarak elektron transferini ve dolayısı ile ATP üretilmesini engellediği [7, 8], ROS aktivitesini tetikleyerek mitokondriyal apoptotik yollar aracılığıyla oksidatif hasara ve DNA, protein ve lipid yapısında değişikliğe neden olduğu belirtilmektedir [9-11]. Bazı araştırmalar ise Rotenon'un pro-apoptotik etkilerinin kompleks I inhibisyonundan bağımsız olduğunu, ROS kaynaklı oksidatif stresin kaspaz bağımlı apoptotik yolağı indüklediğini göstermiştir. Ancak Rotenon'un kaspaz bağımsız apoptoza da neden olduğu gösterilmiştir [12]. DNA hasarı; kanser, bağışıklık sistemi bozuklukları ve nörodejeneratif hastalıklar gibi önemli sağlık problemlerinin gelişiminde rol oynayabilir [13]. Dolayısı ile genotoksisite biyobelirteçleri, pestisitlere maruz kalan insan popülasyonlarında incelenmektedir [14-16]. Sağlık risklerinin tespiti için sitogenetik yöntemlerden elde edilen sonuçlar, pestisitlerin etkilerinin ortaya konulmasında önem taşımaktadır [17] ve pestisitlerin DNA hasarına neden olabileceği de gösterilmiştir [18, 19]. Rotenon'un nörodejeneratif hastalıklara neden olmasından dolayı merkezi sinir sistemi hücrelerinde etkileri hala araştırılmaktadır. Bununla birlikte merkezi sinir

sistemi üzerindeki etkilerinin biyolojik olarak izlenmesi, biyolojik materyalin örneklenmesindeki problemlerden dolayı zordur. Bu nedenle, maruz kalma dozu ve süresinin etkisini değerlendirmek için aracı hücrelere ve analizlere de ihtiyaç duyulmaktadır. Dolayısı ile bu çalışmada, Rotenon'un insan lenfosit DNA'sına etkisinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu amaçla, farklı konsantrasyon ve uygulama sürelerinde genotoksik etkisinin ortaya konulması için, hem in vivo hem de in vitro olarak farklı hücre tiplerinde DNA hasarını hızlı ve güvenilir bir şekilde ölçülebilen comet metodu [20, 21] kullanılarak DNA hasarının tespiti yapılmıştır.

2. Materyal ve Metot

Çalışma Dizayını

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan araştırma onayı alınmıştır (10.10.2022 tarih ve 284 sayılı karar). Gönüllülerden bilgilendirilmiş onay alınmış ve çalışma "Helsinki Deklarasyonuna" uygun olarak yürütülmüştür. Gönüllüler için katı dışlama kriterleri uygulanmıştır. Son 6 ayda radyolojik muayene geçirmemiş, bilinen hastalığı ya da sürekli ilaç kullanımı olmayan ve sigara içmeyen 18–45 yaş aralığında 4 erkek ve 4 kadın gönüllüden 15 mL kan alınmış ve her katılımcının kanı çalışma dizaynında yer alan tüm gruplar için kullanılmıştır. Gruplar Tablo 1'de görülmektedir. Buna göre her grup için 8 katılımcının tümü değerlendirilmiştir. Dozlar ve uygulama saatleri literatür taraması sonucunda seçilmiştir. Araştırmada kullanılan Rotenon (%95< saf, CAS No:83-79-4, MA: 394,42, Sigma-Aldrich, Missouri, ABD) yerel satıcılar aracılığı ile temin edilmiştir.

DNA Hasarının Tespiti

DNA hasar tespiti için comet metodu "OECD İn Vivo Memeli Alkalın Comet Metodu Kılavuzu" [22] uyarınca uygulanmıştır. Kullanılan tüm kimyasallar aksi belirtilmediği sürece Merck (Darmstadt, Almanya) veya Sigma (St. Louis, MO, US) firmalarından yerel satıcılar aracılığı ile temin edilmiştir.

Gönüllülerden heparinize tüplere 15 mL kan alınmış ve bekletmeden comet prosedürüne geçilmiştir. Lenfosit ayırıcı olarak histopak-1077 kullanılmış ve kanlar ile 1:1 oranında karıştırılarak 2000 RPM'de 20 dk santrifüj işlemi uygulanmıştır. Lenfositler ayrı bir tüpe alınarak 1:1 oranında PBS ile karıştırılmış ve tekrar 2500 RPM'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Yıkamanın ardından lenfositler tekrar ayrı bir tüpe alınmış %10 FBS içeren RPMI 1640 eklenerek son hacim 1 mL olacak şekilde Rotenon uygulamasına geçilmiştir. Rotenon lenfositlere 3 farklı dozda (10, 50 ve 100 µM) ve her bir doz için 3 farklı saatte (1, 2 veya 4 s) uygulanmıştır. İnkübasyon 37°C'de etüvde yapılmıştır. Her inkübasyon saati için ayrı ayrı internal kontrol grupları oluşturulmuş, hiçbir uygulama yapılmayan negatif kontrol ve 100 µM H₂O₂ uygulaması yapılan pozitif kontrol grupları karşılaştırma için kullanılmıştır. İnkübasyon sonrasında hücreler santrifüj ile dibe çöktürülerek ayrılmış ve PBS ile 2500 RPM'de 10 dk santrifüj edilerek tekrar yıkama yapılmıştır. Ardından tüm gruplar 37°C'de 1 s daha inkübe edilmiştir. Daha sonra 20 µL hücre süspansiyonu 100 µL % 0,7'lik düşük erime noktalı agaroz (LMA, Fisher Scientific, Massachusetts, ABD) ile karıştırılmış ve daha önceden %1'lik normal erime noktalı agaroz (NMA, Serva Electrophoresis, Almanya) ile kaplanmış lamlara yayılmıştır. Lamlar taze soğuk lizis solüsyonunda (pH:10, 2,5 M NaCl, 100 mM Na₂-EDTA, 10 mM Tris, %10 DMSO ve %1 Triton X-100) karanlıkta ve +4 °C'de 90 dk bekletilmiştir. Ardından elektroforez aşamasına geçilmiştir. Örnekler taze, buz soğukluğunda elektroforez solüsyonunda (pH:13, 300 M NaOH, 1 mM EDTA) karanlıkta ve +4°C'de 30 dk bekletilmiştir. Daha sonra 25 V (1,02 V/cm) ve + 4°C 25 dk elektroforez işlemi uygulanmıştır. 25 dk sonunda elektroforez tankından dikkatlice çıkarılan lamlar nötralizasyon solüsyonu ile 3 kez 5 dk yıkanmış ve kurumaya bırakılmıştır. Kuruma sürecinin ardından örnekler preparat başına 20 µL etidyum bromür ile boyanmış ve karanlık odada floresan mikroskop (Zeiss Imager A1) altında görüntülenmiştir. Preparat başına 50 hücrenin fotoğrafı rastgele çekilmiştir (Axiocam Icc 1). Fotoğraflar OpenComet [23] programı aracılığı ile DNA hasarının tespit edilebilmesi için analiz edilmiştir. Kuyruk DNA Yüzdesi (TDNAP) parametresi DNA hasarının göstergesi olarak seçilmiştir.

İstatistik Analiz

Elde edilen sonuçlar SPSS v20 [24] programında tek – yönlü ANOVA (posthoc Tukey) kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar ortalama±standart hata olarak sunulmuş ve p<0,05 anlamlı kabul edilmiştir.

3. Bulgular

Her preperattan ortalama 50 hücrenin sonucunun rastgele değerlendirilmesi yapıldığında Rotenon ve H₂O₂ uygulamaları (pozitif kontrol) DNA hasarında internal negatif kontrol gruplarına kıyasla artışa sebep olmuştur (Tablo 1). DNA hasarında meydana gelen bu artışların istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığının tespiti için saat ve doz uygulamaları tek - yönlü ANOVA ile karşılaştırılmış ve bazı anlamlı sonuçlar elde edilmiştir.

Pozitif kontrol grupları beklendiği gibi aynı inkübasyon süresine sahip gruplardan anlamlı şekilde yüksek DNA hasarına sebep olmuştur ($p<0,05$). Rotenon uygulamaları ise inkübasyon saatine ve doza bağlı olarak farklı sonuçlar ortaya koymuştur. Sırası ile 10 ve 50 μM doz ile 1 s inkübasyon uygulanan grup 7 ve 8 internal negatif kontrol grubuna (grup 1) kıyasla DNA hasarında artışa sebep olmuş ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Benzer şekilde sırası ile 10 ve 50 μM doz ile 2 s inkübasyon uygulanan grup 10 ve 11 internal negatif kontrol grubuna (grup 2) kıyasla DNA hasarında artışa sebep olmuş ancak bu artış da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Bunun aksine 100 μM doz ile 1 veya 2 s inkübasyon uygulanan grup 9 ve 12, internal negatif kontrol gruplarına kıyasla (sırası ile grup 1 ve 2) DNA hasarında anlamlı artışa sebep olmuştur ($p<0,05$). 10, 50 veya 100 μM dozlar ile 4 s Rotenon uygulanan grup 13, 14 ve 15'de ise internal negatif kontrol grubuna (grup 3) kıyasla anlamlı seviyede DNA hasarı tespit edilmiştir ($p<0,05$). Hasar grup 13 ve 14'de benzer seviyede iken grup 15'de bu gruplara kıyasla daha yüksektir. Ancak grup 15'de, grup 13 ve 14'e kıyasla meydana gelen bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$). Benzer şekilde 1 ve 2 s inkübasyon sürelerinde de Rotenon uygulama dozu arttıkça DNA hasarlarında artış meydana geldiği ancak bu artışların anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p>0,05$).

Buna göre Rotenon maruziyeti kısa süreli ve düşük dozlarda olduğunda DNA hasarında artış olmakla birlikte bu artış anlamlı değildir. Doz yükseldikçe kısa maruziyet sürelerinde de anlamlı seviyede DNA hasarı oluşmaktadır. Uzun süreli Rotenon maruziyetinde ise doz bağımsız şekilde anlamlı seviyede DNA hasarı görülmektedir.

Tablo 1. Ortalama kuyruk DNA yüzdesi (DNA hasarı) değerleri

Grup	Uygulama	Uygulama Süresi (Saat)	Doz	Kuyruk DNA Yüzdesi (Ortalama \pm Standart Hata)
1	Yok (Negatif Kontrol)	1	-	2,14 \pm 0,11
2		2	-	2,61 \pm 0,13
3		4	-	2,79 \pm 0,14
4	H ₂ O ₂ (Pozitif Kontrol)	1	100 μM	45,30 \pm 1,29 *
5		2	100 μM	44,36 \pm 1,30 **
6		4	100 μM	41,77 \pm 1,35 ***
7	Rotenon	1	10 μM	3,68 \pm 0,38
8		1	50 μM	4,62 \pm 0,32
9		1	100 μM	6,22 \pm 0,46 #
10		2	10 μM	4,32 \pm 0,35
11		2	50 μM	4,68 \pm 0,33
12		2	100 μM	6,36 \pm 0,52 ##
13		4	10 μM	6,43 \pm 0,55 ###
14		4	50 μM	6,43 \pm 0,39 ###
15		4	100 μM	7,94 \pm 0,68 ###

* Grup 1, 7, 8 ve 9 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$);

** Grup 2, 10, 11 ve 12 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$);

*** Grup 3, 13, 14 ve 15 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$);

Grup 1 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$);

Grup 2 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$);

Grup 3 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$)

4. Tartışma ve Sonuç

Pestisitlere maruz kalan insanlar üzerinde yapılan biyoizleme çalışmaları, maruziyetin genotoksisite ve sitotoksisiteye neden olduğunu göstermektedir [15-17, 25, 26]. Çeşitli pestisitlerin üretiminde çalışan işçilerin periferik kan lenfositlerinde DNA hasarı comet metodu ile kesitsel ve uzamsal olarak değerlendirilmiş ve DNA hasarında artış tespit edilmiştir. Pestisit maruziyeti olmadan geçen 6 ayın ardından, işçilerin DNA hasarının kontrole göre halen yüksek olduğu ancak ilk analize kıyasla önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir [16]. Benzer bir çalışmada tarımsal pestisit maruziyeti ve genotoksik hasar arasındaki ilişki periferik kan örneklerinde comet ve mikronükleus (MN) metotları ile araştırılmıştır. Tebuconazole, 2,4-D veya cyfluthrin'e yüksek oranda maruz kalan kişilerde genotoksik hasar seviyelerinde artış görülmüştür [15]. En az 1 yıl pestisitlere maruz kalan 33 işçinin lenfosit DNA hasarı yine comet metodu ile incelenmiş, işçilerin DNA hasarı, kontrol grubuna göre önemli ölçüde yüksek bulunmuştur. Bireysel güvenlik önlemlerini uygulayan işçilerde ise DNA hasarının önemli ölçüde daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Pestisitlere maruz kalma süresi ile DNA hasarının derecesi arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır [17]. Araştırmamızda ise Rotenona maruz kalma süresi arttıkça DNA hasarında artışın olduğu tespit edilmiştir. Ancak çalışmamız in vitro olarak yapıldığından araştırılan maruziyet süreleri, işçilerin pestisite maruz kaldığı süreler ile kıyaslanmayacak kadar kısadır. Buradaki çalışmalara benzer birçok araştırma bulunmakla birlikte, birçok pestisit in vivo veya in vitro genotoksik potansiyeli hakkındaki bilgiler oldukça sınırlıdır.

Lenfositler tüm dokularda dolaşan, kolay elde edilebilen, uzun ömürlü, in vitro DNA hasarını tespit etmede sıklıkla kullanılan hücrelerdir [27, 28]. Çalışmamızda olduğu gibi lenfositlere in vitro pestisit uygulayarak genotoksisiteyi araştıran birçok araştırma olduğu görülmektedir. İnsan lenfositlerinde farklı pestisitlerin DNA'ya olan etkilerinin comet metodu ile incelendiği bir çalışmada, 37°C'de 30 dk süreyle 10, 50, 100 ve 200 µg/mL dozlarında inkübasyon uygulanmış ve önemli genotoksik etkiler gözlenmiştir. 100 ve 200 µg/mL'de dimethoat ve metil parathion; 50, 100 ve 200 µg/mL'de propoksür ve 200 µg/mL'de pirimicarb, cypermethrin ve permethrinin, DNA hasarını önemli ölçüde arttırmıştır [29]. İnsan lenfositlerinde α -cypermethrin pestisitinin genotoksisitesi, kardeş kromatid değişimi (SCE), kromozomal aberasyon (CA) ve mikronükleus (MN) testleri ile in vitro olarak incelenmiştir. İnsan lenfositleri, 24 ve 48 s boyunca 5, 10, 15 ve 20 µg/mL α -cypermethrin ile muamele edilmiştir. Tüm konsantrasyon ve sürelerde SCE ve CA'da artış gözlemlenirken MN sıklığı 5 ve 10 µg/mL dozlarında artış göstermiştir. Benzer şekilde proliferasyon indeksi, mitotik indeks ve nükleer bölünme indeksinde önemli ölçüde azalma görülmüştür [30].

Rotenon'un ise merkezi sinir sistemi hücrelerinde meydana getirdiği hasar detaylı olarak araştırılmıştır [31-33]. Örneğin Rotenon'un sıçan glioma hücrelerinden türetilen hücreler olan C6 hücrelerinde etkisi 4 s inkübasyon ve 0,1, 1 ve 10 µM dozlarında araştırılmıştır. Rotenon hücre sağ kalımının azalmasına, serbest radikal oluşumuna ve sonuçta DNA hasarında artışa neden olmuştur [34]. Buna rağmen Rotenon'un lenfositlerde doz ve/veya zamana bağlı etkilerini ortaya koyan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Rotenon'un, beyinde lipid peroksidasyonunu arttırdığı farklı organlarda ve lökositlerde DNA hasarında artışa neden olduğu bildirilmiştir [35]. Bir metabolik aktivatör varlığında ve yokluğunda insan lenfosit kültürlerinde Rotenon'un farklı dozlarda (0,1, 0,25, 0,50, 1 µg/ml) genotoksisitesi değerlendirilmiştir. Rotenon'un MN sıklığını arttırdığı ve hücre döngüsünü durdurucu etkiye neden olduğu ancak CA ve SCE sıklığını arttırmadığı bildirilmiştir [36]. Bir diğer çalışmada Rotenon'un, comet ve CA metotları ile farklı hücre döngüsü aşamalarında yer alan hücrelerdeki genotoksik ve klastojenik etkileri değerlendirilmiştir. Kültürleşmiş insan lenfositleri, hücre döngüsünün G1, G1/S, S (1 ve 6s) ve G2 fazları sırasında 1, 1,5 ve 2 µg/mL Rotenon ile muamele edilmiştir. Rotenon'un klastojenik etkiye ve DNA hasarına neden olduğu bildirilmiştir [10]. Rotenon'un, nükleer DNA'nın yanı sıra mitokondriyal DNA'ya hasar verdiği de bildirilmiştir [37].

Bu araştırmadaki veriler, literatürdeki bulguları desteklemekle birlikte farklı doz/zaman ve hücre döngüsünden bağımsız sürelerin seçilmesi nedeniyle farklılık göstermektedir. Bu çalışma, Rotenon'un doz ve zamana bağlı olarak lenfositlerde meydana getirdiği DNA hasarını ortaya koymaktadır. 10 ve 50 µM Rotenon ile 1 s ve 2 s inkübasyon uygulanan grup, kontrol grubuna kıyasla DNA hasarında artışa sebep olmuş ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. 100 µM doz ile 1 ve 2 s inkübasyon uygulanan grup kontrol gruplarına kıyasla DNA hasarında anlamlı artışa sebep olmuştur. Hem doz hem de süre arttıkça DNA seviyesinde artış gözlenmekle birlikte anlamlı düzeyde artışın süre bağımlı olması Rotenon maruziyet süresinin önemini ortaya koymaktadır. 10, 50 ve 100 µM dozlar ile 4 s Rotenon uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla anlamlı seviyede DNA hasarı tespit

edilmiştir. Verilerimiz maruziyet süresi arttıkça düşük dozların da anlamlı düzeyde DNA hasarına neden olduğunu ortaya koymaktadır.

In vitro ve in situ çalışmalar, Rotenon maruziyetinin genotoksisiteye sebep olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada da Rotenon'un doza ve zamana bağlı olarak lenfositlerde DNA hasarına neden olduğu ortaya konulmuş ancak bu hasarın moleküler temeli araştırılmamıştır. Genotoksisitenin engellenmesi için Rotenon'un etki mekanizmalarını ortaya koyacak detaylı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Etik Beyanı

Bu çalışmada, "Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi" kapsamında uyulması gerekli tüm kurallara uyulduğunu, bahsi geçen yönergenin "Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiğine Aykırı Eylemler" başlığı altında belirtilen eylemlerden hiçbirinin gerçekleştirilmediğini taahhüt ederiz.

Kaynakça

- [1] Koureas M, Tsezou A, Tsakalof A, Orfanidou T, Hadjichristodoulou C. Increased levels of oxidative DNA damage in pesticide sprayers in Thessaly Region (Greece). Implications of pesticide exposure. *Science of the Total Environment*. 2014;496:358-64.
- [2] Mokarizadeh A, Faryabi MR, Rezvanfar MA, Abdollahi M. A comprehensive review of pesticides and the immune dysregulation: mechanisms, evidence and consequences. *Toxicology mechanisms and methods*. 2015;25(4):258-78.
- [3] Lee G-H, Choi K-C. Adverse effects of pesticides on the functions of immune system. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2020;235:108789.
- [4] Isman MB. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*. 2006;51:45-66.
- [5] Ramalingam M, Huh Y-J, Lee Y-I. The impairments of α -synuclein and mechanistic target of rapamycin in rotenone-induced SH-SY5Y cells and mice model of Parkinson's disease. *Frontiers in neuroscience*. 2019;13:1028.
- [6] Fitzmaurice AG, Bronstein JM. Pesticides and Parkinson's disease (Chapter) in: *Pesticides in The Modern World—Effects of Pesticides Exposure*. 2011:307. IntechOpen; London
- [7] Duty S, Jenner P. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *British journal of pharmacology*. 2011;164(4):1357-91.
- [8] Kitamura Y, Inden M, Miyamura A, Kakimura J-i, Taniguchi T, Shimohama S. Possible involvement of both mitochondria-and endoplasmic reticulum-dependent caspase pathways in rotenone-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neuroscience letters*. 2002;333(1):25-8.
- [9] Janelle D-O, Francesca C. Pesticides and Parkinson's disease (Chapter) in: *Pesticides - The Impacts Of Pesticide Exposure*. 2011:103. IntechOpen; London
- [10] de Lima PDL, Yamada ES, da Costa ET, Pessoa CdO, Rabenhorst S, Bahia MdO, et al. Genotoxic effects of rotenone on cultured lymphocytes. *Genetics and Molecular Research*. 2005;4(4):822-31.
- [11] Yarmohammadi F, Wallace Hayes A, Najafi N, Karimi G. The protective effect of natural compounds against rotenone-induced neurotoxicity. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 2020;34(12):e22605.
- [12] Franco R, Li S, Rodriguez-Rocha H, Burns M, Panayiotidis MI. Molecular mechanisms of pesticide-induced neurotoxicity: Relevance to Parkinson's disease. *Chemico-biological interactions*. 2010;188(2):289-300.
- [13] Toğay VA, Baş FY, Çelik DA, Özçelik N, Türel GY, Calapoğlu M, et al. Increased DNA Damage of Radiology Personnel Chronically Exposed to Low Levels of Ionizing Radiations. *Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2020;11(2):212-6.
- [14] Bolognesi C, Holland N. The use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay for monitoring pesticide-exposed populations. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2016;770:183-203.

- [15] Barrón Cuenca J, Tirado N, Barral J, Ali I, Levi M, Stenius U, et al. Increased levels of genotoxic damage in a Bolivian agricultural population exposed to mixtures of pesticides. *Science of The Total Environment*. 2019;695:133942.
- [16] Garaj-Vrhovac V, Zeljezic D. Evaluation of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticides using single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay: Pesticide genotoxicity revealed by comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2000;469(2):279-85.
- [17] Ündeğer Ü, Başaran N. Assessment of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticide mixtures by the alkaline comet assay. *Archives of Toxicology*. 2002;76(7):430-6.
- [18] Celik DA, Togay VA, Turel GY, Tuluçeoğlu EE, Kosar PA. DNA Damages of Widely Used Pesticides; A Comet Assay Report for Chlorothalonil and Glyphosate Potassium Salt. *Fresenius Environmental Bulletin*. 2021;30(4 A):4170-6.
- [19] Yavuz Türel G, Toğay VA, Aşçı Çelik D. Genotoxicity of thiocloprid in zebrafish liver. *Archives of Environmental & Occupational Health*. 2022:1-6. DOI: 10.1080/19338244.2022.2118212
- [20] Aşçı Çelik D, Toğay VA, Karabacak P. DNA damage assessment in pneumonia patients treated in the intensive care unit. *Biologia*. 2022;(77): 1909 - 1913.
- [21] Karabacak P, Toğay VA, Çelik DA. Lymphocyte DNA damage in sepsis and septic-shock intensive-care patients: Damage is greater in non-intubated patients. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2022;879:503516.
- [22] OECD. Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay. OECD Publishing; Paris: 2016.
- [23] Gyori BM, Venkatachalam G, Thiagarajan P, Hsu D, Clement M-V. OpenComet: An automated tool for comet assay image analysis. *Redox biology*. 2014;2:457-65.
- [24] IBM. SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. IBM Corp, Armonk, NY: 2012.
- [25] Rupa D, Reddy P, Reddi O. Analysis of sister-chromatid exchanges, cell kinetics and mitotic index in lymphocytes of smoking pesticide sprayers. *Mutation Research/Genetic Toxicology*. 1989;223(2):253-8.
- [26] Au WW, Sierra-Torres CH, Cajas-Salazar N, Shipp BK, Legator MS. Cytogenetic effects from exposure to mixed pesticides and the influence from genetic susceptibility. *Environmental health perspectives*. 1999;107(6):501-5.
- [27] Lerda D, Bistoni MB, Peralta N, Ychari S, Vazquez M, Bosio G. Fumonisin in foods from Cordoba (Argentina), presence and genotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*. 2005;43(5):691-8.
- [28] Çelik DA, Toğay VA, Türel GY, Özçelik N. Gıda Katkı Maddesi Olarak Kullanılan Sitrik Asit, Askorbik Asit Ve Sodyum Sitratin İnsan Lenfosit Hücrelerinde Genotoksitesininin Değerlendirilmesi. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*. 2022;29(3):486-92.
- [29] Ündeğer Ü, Başaran N. Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes in vitro: induction of DNA damage. *Archives of Toxicology*. 2005;79(3):169-76.
- [30] Kocaman AY, Topaktaş M. The in vitro genotoxic effects of a commercial formulation of α -cypermethrin in human peripheral blood lymphocytes. *Environmental and molecular mutagenesis*. 2009;50(1):27-36.
- [31] Alzahrani S, Ezzat W, Elshaer R, Abd El-Lateef A, Mohammad H, Elkazaz A, et al. Standardized Tribulus terrestris extract protects against rotenone-induced oxidative damage and nigral dopamine neuronal loss in mice. *J Physiol Pharmacol*. 2018;69(6):979-94.
- [32] El-Shamarka MEA, Hussein AMS, N. Sayed O, S Said E, Mwaheb MA. Spirulina Ameliorates Oxidative Damage and Inflammation in Rotenone-Induced Neurotoxicity in Male Mice. *International Journal of Medical Toxicology and Forensic Medicine*. 2022;12(1):35583.
- [33] Sun Z, Xue L, Li Y, Cui G, Sun R, Hu M, et al. Rotenone-induced necrosis in insect cells via the cytoplasmic membrane damage and mitochondrial dysfunction. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2021;173:104801.
- [34] Swarnkar S, Singh S, Goswami P, Mathur R, Patro IK, Nath C. Astrocyte Activation: A Key Step in Rotenone Induced Cytotoxicity and DNA Damage. *Neurochemical Research*. 2012;37(10):2178-89.

- [35] Kurpik M, Zalewski P, Kujawska M, Ewertowska M, Ignatowicz E, Cielecka-Piontek J, et al. Can Cranberry Juice Protect against Rotenone-Induced Toxicity in Rats? *Nutrients*. 2021;13(4):1050.
- [36] Guadaño A, González-Coloma A, de la Peña E. Genotoxicity of the insecticide rotenone in cultured human lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 1998;414(1):1-7.
- [37] Syromyatnikov MY, Gureev AP, Starkova NN, Savinkova OV, Starkov AA, Lopatin AV, et al. Method for detection of mtDNA damages for evaluating of pesticides toxicity for bumblebees (*Bombus terrestris* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2020;169:104675. DOI:10.1016/j.pestbp.2020.104675.

Burdur Ağız ve Diş Sağlığı Merkezi'nde Periodontal Bulguları Olan Hastalarda *Entamoeba gingivalis* ve *Trichomonas tenax*'ın Araştırılması

Investigation of *Entamoeba gingivalis* and *Trichomonas tenax* in Patients with Periodontal Findings in Burdur Oral and Dental Health Center

Burcu ÖZDEMİR ÖĞRÜ¹, M. Zeki YILDIRIM², Onur KÖSE³

¹ Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sağlık ve Biyomedikal Bilimler AD, Burdur, Türkiye,

² Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Bucak Sağlık Yüksekokulu, Acil Yardım ve Afet Yönetimi AD, Burdur, Türkiye

³ Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Parazitoloji AD, Burdur, Türkiye

ÖZET

Bu çalışmada Burdur Ağız ve Diş Sağlığı Merkezi'ne başvuran periodontal hastalığı olan bireylerde *Entamoeba gingivalis* ve *Trichomonas tenax* varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Ağız ve Diş Sağlığı Merkezi'ne Nisan - Kasım 2021 tarihleri arasında başvuran ve periodontal hastalığı bulunan 18-80 yaş arası 46 hasta (30 gingivitis ve 16 periodontitis) çalışmamıza dahil edilmiştir. Hastaların ağız içindeki supragingival dental plak örnekleri bir kretuar yardımıyla kazınarak lam üzerine sürme preparatlar hazırlanmış, bunlar *E. gingivalis* yönünden incelemek için Trichrome boyama ve *T. tenax* yönünden incelemek için Giemsa boyama yapılarak ışık mikroskobu altında incelenmiştir. Alınan örneklerin mikroskopik incelemesinde 25 hastada (% 54,34) *E. gingivalis* tespit edilirken, örneklerin hiçbirinde *T. tenax* ile karşılaşılmasıdır. Cinsiyet, yaş, diş fırçalama alışkanlığı, sigara kullanımı, sistemik hastalıklar, antikoagülan ilaç kullanımı ve COVID-19 hastalığı ile *E. gingivalis* varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken ($p > 0,05$), eğitim durumu ile *E. gingivalis* varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir. Sonuç olarak; ağızda yerleşen protozoonlardan *E. gingivalis*, yaygın olarak saptanmış olup, yapılacak yeni çalışmalarla Türkiye'nin farklı bölgelerinde bu parazitlerin prevalansının belirlenmesi, korunma ve kontrol yöntemlerinin geliştirilmesi gerektiği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Entamoeba gingivalis*, Gingivitis, Periodontitis, *Trichomonas tenax*

Alınış / Received: 11.06.2022 Kabul / Accepted: 25.11.2022 Online Yayınlanma / Published Online: 20.12.2022



ABSTRACT

In the present study, it was aimed to determine the presence of *Entamoeba gingivalis* and *Trichomonas tenax* in individuals with periodontal disease who applied to Burdur Oral and Dental Health Center. Forty six patients with periodontal disease (30 gingivitis and 16 periodontitis) between the ages of 18-80 who applied to the Oral and Dental Health Center between April - November 2021 were included in this study. Supragingival dental plaque samples in the mouth of the patients were scraped with the help of a scaler. Trichrome staining was performed to examine the *E. gingivalis*, Giemsa staining was performed to examine the *T. tenax*, and samples were examined under a light microscope. In the microscopic examination of the samples; *E. gingivalis* was detected in 25 patients (54.34 %), while *T. tenax* was not encountered in any of the samples. While there was no statistically significant difference between gender, age, tooth brushing habits, smoking, systemic diseases, use of anticoagulant drugs and the presence of COVID-19 disease and *E. gingivalis* in the questionnaire ($p > 0.05$), a statistically significant difference was found between education status and the presence of *E. gingivalis*. As a result; one of the protozoans settled in the mouth *E. gingivalis*, has been detected widely, and it is thought that the prevalence of these parasites in different regions of Turkey should be determined and prevention and control methods should be developed with further studies to be carried out.

Keywords: *Entamoeba gingivalis*, Gingivitis, Periodontitis, *Trichomonas tenax*



1. Giriş

Periodontal hastalıklar diş destek dokularını etkileyen, tedavi edilmezse diş kaybı gibi olumsuz durumların görülebildiği, sistemik hastalıklarla da etkileşebilen kronik iltihabi hastalıklardır. Kendi içlerinde pek çok çeşidi olsa da genel olarak 'Gingivitis' ve 'Periodontitis' olarak sınıflandırılırlar. Bu hastalıkların etiyojisi çok çeşitli olmasına rağmen oral hijyenin kötü olması en önemli sebeplerden sayılabilir [1,2].

Entamoeba gingivalis ve *Trichomonas tenax* isimli iki parazitin oral paraziter enfeksiyonlardan sorumlu olabileceği çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir [3,4,5,6]. *E. gingivalis* ve *T. tenax* ağız boşluğunda görülebilen ve dişeti olduğundan alınan örneklerde tespit edilebilen protozoonlar olup, bulaş yolları; tükürük, damlacık enfeksiyonu, öpüşmek veya ortak tabak, çatal, kaşık, bardak kullanımı vb. olabilmektedir [7].

E. gingivalis gingival dokuda kolonize olabilen, ortalama 10-30 µm boyutunda, yalancı ayakları olan, hareketli, sitoplazmasında sindirilmiş bakteri, lökosit ve epitel hücreleri içeren fırsatçı patojen bir protozoonudur. Çekirdeği içinde kromatin granülleri bulunur ve bir çekirdek zarı ile çevrilidir. Besin vakuollerinde bulunan sindirilmiş lökositler tanınmalarında yardımcı olmaktadır [8,9].

T. tenax ise insan ağız boşluğunda yaşayan tek kamçılı protozoon olup, oral hijyen bakımından zayıf insanların ağız boşluğunda görülür. Ortalama 6,5-10 µm boyutunda ve armut şeklindedir. Her iki protozoonun da kist formu yoktur, trofozoit halde bulunurlar [6,10].

Her iki protozoon da periodontal hastalıklarla ilişkilendirilse de, literatür taraması sonucunda bunların yaygınlıklarıyla ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunduğu görülmüştür. Bu konuyla ilgili daha fazla çalışma yapılmasının; bu parazitlerin sebep oldukları hastalıklar, toplumdaki yayılışı ve korunma yöntemleriyle ilgili katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Bu nedenle çalışmamızda Burdur Ağız ve Diş Sağlığı

Merkezi'ne başvuran ve periodontal hastalığı olan bir hasta grubunda *E. gingivalis* ve *T. tenax* yaygınlığının araştırılması amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

Bu çalışma için Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 23.03.2021 tarih ve 148 sayı ile etik kurul onayı alınmıştır.

Bu çalışmanın kapsamına Burdur Ağız ve Diş Sağlığı Merkezi (ADSM)'ne başvuran hastalar arasından Periodontal hastalığı (gingivitis ya da periodontitis) olan, oral hijyeni yetersiz ve 18-80 yaş aralığındaki hastalar seçilmiştir. Burdur ADSM'ye 06.04.2021-12.11.2021 tarihleri arasında başvuran ve periodontal hastalığı bulunan 46 hastadan (16 periodontitis, 30 gingivitis) toplam 92 örnek toplanmıştır. Çalışma kriterlerine uygun olan hastalara 'Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu' imzalatılmıştır. Ayrıca hastanın adı-soyadı, cinsiyeti, yaşı, eğitim durumu, sigara kullanımı, diş fırçalama alışkanlığı, sistemik hastalıkları, antikoagülan kullanımı, COVID-19 hastalığı geçirip geçirmediği gibi bilgilerin yer aldığı bir soru kağıdı uygulanmıştır.

Periodontal hastalığın teşhisinde gingivitis tanısı için Klinik Ataşman Kaybı (KAK) olmaması, ağız içinde en az % 10 bölgede sondlamada kanama olması gibi tanı kriterleri kullanılmıştır. Periodontitis tanısı için komşu olmayan en az iki dişte KAK saptanması veya en az iki dişte 3 mm ve üstünde bukkal ya da oral KAK ve 3 mm üzerinde periodontal cep bulunması gibi tanı kriterleri kullanılmıştır. Çalışma grubundaki 46 hastanın 30'una gingivitis, 16'sına periodontitis tanısı konmuştur.

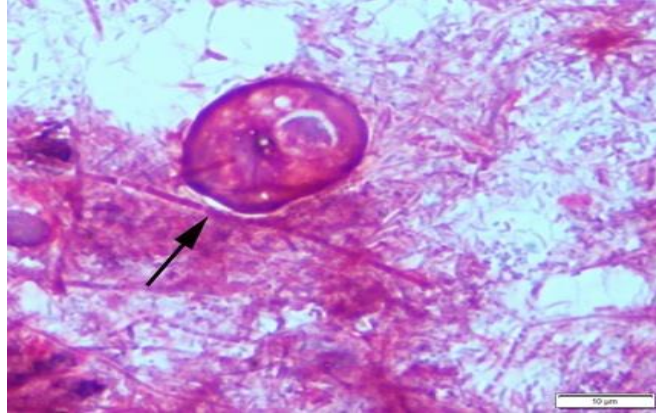
Örneklerin mikroskopik incelemesi Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji laboratuvarında Giemsa ve Trichrom boyama yöntemlerinden yararlanılarak yapılmıştır. Hasta ağızındaki üst çene 1. molar dişlerin bukkal yüzeyinden (ağızda mevcut değilse 2. molar ya da 2. premolar dişlerden) supragingival dental plak örneği bir kretuar ile kazıntı şeklinde alınarak iki adet lam üzerine yayılmıştır. Havada birkaç dakika kurumaması beklendikten sonra alınan örneklerden biri metil alkolde 3-5 dakika, diğeri ise Schaudinn fiksatifinde bir saat süre ile fikse edilmiştir. Metil alkolle fikse edilen örnek % 5'lik Giemsa solüsyonu ile 45 dk süre ile; Schaudinn fiksatif ile fikse edilen diğer örnek ise Masson Trichrome Boyama Kiti ile kit protokolüne uygun şekilde boyanmıştır. Boyama işlemi tamamlanan preparatlar immersiyon yağı kullanılarak ışık mikroskopunun x100 objektifi altında *E. gingivalis* ve *T. tenax* yönünden incelemeye tabi tutulmuştur.

Olympus CX21 model ışık mikroskopunda incelenen preparatlar Olympus DP26 model kamera ile mikroskopik dijital fotoğraflar çekilerek bilgisayar ortamına aktarılmıştır. Mikrofotografi için Database Manual Cell Sens Life Science Imaging Software System (Olympus Co. Tokyo, Japan) kullanılmıştır.

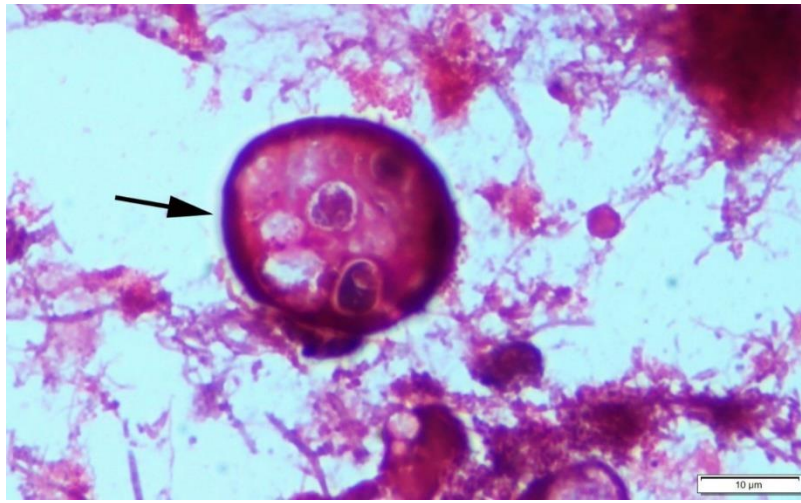
Bu çalışmada elde edilen mikroskopik sonuçların ve anket sonuçlarının istatistik analizi IBM SPSS versiyon 23.0 (IBM Corp., Armonk, NY) kullanılarak yapılmıştır. Tanımlayıcı istatistik olarak sayı, yüzde değerleri kullanılmıştır. Verilerin analizi ki-kare testi ile yapılmış ve $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3. Bulgular

Trichrome boyama yapılan 46 adet preparatın mikroskopik incelemesinde 25 hastada büyük ve sitoplazmasında granüller olan çok sayıda *E. gingivalis* trofozoiti saptanmıştır (Şekil 1., Şekil 2.). Giemsa boyama yapılan 46 preparatın mikroskopik incelenmesi sonucunda ise örneklerin hiçbirinde *T. tenax*'a rastlanmamıştır.



Şekil 1: Gingivitisli bir hastada tipik *E. gingivalis* trofozoitinin görünümü (ok), Trichrome boyama, Bar= 10µm.



Şekil 2. Periodontitisli bir hastada tipik *E. gingivalis* trofozoitinin görünümü (ok), Trichrome boyama, Bar= 10µm.

Çalışmaya katılan 16 periodontitis hastasının 10'unda (% 62,5) ve 30 gingivitis hastasının 15'inde (% 50) *E. gingivalis* tespit edilmiştir (Tablo 1). Yapılan istatistiksel analizde kişilerin periodontitis ya da gingivitisli olmaları ile parazit görülme oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p = 0,310$). Yirmi üç erkek hastanın 11'i (% 47,8), 23 kadın hastanın ise 14'ü (% 60,9) olmak üzere toplam 25 (% 54,34) hasta *E. gingivalis* açısından pozitif bulunmuştur (Tablo 2).

Tablo 1: Periodontal hastalığın türüne göre *E. gingivalis* varlığı

Periodontal hastalık	EG var	EG yok	Toplam	P
	n (%)*	n (%)*	n (%)*	
Gingivitis	15 (50,0)	15 (50,0)	30 (100,0)	0,310
Periodontitis	10 (62,5)	6 (37,5)	16 (100,0)	
Toplam*	25 (54,3)	21 (45,7)	46 (100,0)	

EG: *Entamoeba gingivalis*

Tablo 2: Bazı parametreler ile *E. gingivalis* pozitifliği arasındaki ilişki

İstatistik Parametreler		Pozitif n (%)	Negatif n (%)	P değeri
Cinsiyet	Erkek (n: 23)	11 (47,8)	12 (52,2)	0,277
	Kadın (n: 23)	14 (60,9)	9 (39,1)	
Yaş grubu	0-19 (n: 2)	1 (50,0)	1 (50,0)	> 0,05
	20-29 (n: 8)	2 (25,0)	6 (75,0)	
	30-39 (n: 9)	7 (77,8)	2 (22,2)	
	40-49 (n: 12)	8 (66,7)	4 (33,3)	
	50-59 (n: 7)	4 (57,1)	3 (42,9)	
	60 üzeri (n: 8)	3 (37,5)	5 (62,5)	
Eğitim durumu	8 yıl ve altı (n: 29)	19 (64,5)	10 (35,5)	0,046
	8 yıl üzeri (n: 17)	6 (35,3)	11 (64,2)	
Diş fırçalama alışkanlığı	Var (n: 4)	2 (50,0)	2 (50,0)	0,626
	Yok (n: 42)	23 (54,8)	19 (45,2)	
Sigara kullanma alışkanlığı	Var (n: 16)	8 (50,0)	8 (50,0)	0,451
	Yok (n: 30)	17 (56,7)	13 (43,3)	
Sistemik hastalık	Var (n: 10)	5 (50,0)	5 (50,0)	> 0,05
	Yok (n:36)	20 (55,6)	16 (44,4)	
Antikoagülan kullanımı	Var (n: 3)	1 (33,3)	2 (66,7)	0,433
	Yok (n: 43)	24 (55,8)	19 (44,2)	
Covid-19 geçirmiş olma	Evet (n: 5)	1 (20,0)	4 (80,0)	0,124
	Hayır (n: 41)	24 (58,5)	17 (41,5)	

Tablo 1 ve Tablo 2'de görüldüğü üzere; çalışmada incelenen parametrelerden periodontal hastalığın tipi, yaş grubu, cinsiyet, diş fırçalama, sigara kullanımı, sistemik hastalık, antikoagülan kullanımı ve COVID-19 geçirmiş olma ile *E. gingivalis* varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Buna karşın 8 yıl ve altı eğitim almış 29 kişinin % 64,5'inde *E. gingivalis* görülmüş ve eğitim durumu ile *E. gingivalis* varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir ($p = 0,046$).

4. Tartışma ve Sonuç

Mikrobiyal dental plakta hızlıca çoğalıp patojenite göstermeleri nedeniyle, *E. gingivalis* ve *T. tenax*'ın periodontal hastalıkların etiolojisindeki önemi son yıllarda daha iyi anlaşılmasına başlanmasına karşın bu patojenlerle ilgili hala sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır [6,10,11].

Ghabanchi ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışmada tükürük ve dişeti sıvıları incelenmiş; deney grubunun % 66,7'sinde *E. gingivalis*, % 33,3'ünde *T. tenax*, kontrol grubunda sadece bir hastada *E. gingivalis* tespit edilmiştir [4]. Bu çalışmada ise periodontal hastalığı olan 46 hastadan dental plak örnekleri alınmış, benzer şekilde *E. gingivalis* % 54,34 oranında bulunmuştur. Parazitin, ağız boşluğu içerisinde çeşitli yerlerde ve biyolojik materyallerde bulunabileceği anlaşılmaktadır.

Özçelik ve ark. (2010), tarafından yapılan bir çalışmada 220 hastadan kretuarla direkt kazıntı örnekleri alınarak bekletilmeden incelenmiş, ayrıca her hastadan ikinci bir örnek alınarak Trichrome boyama yapılmıştır. İncelenen örneklerin % 21,8'inde *E. gingivalis*, % 1'inde *T. tenax*, % 3,6'sında her ikisi birden görülmüştür. Boyama yöntemi ile direkt mikroskopik bakı yöntemine göre daha az pozitiflik saptanmıştır. Cinsiyet, yaş grupları ve sistemik hastalık ile parazit varlığı arasında anlamlı bir fark bulunmazken sigara kullanımı ve diş fırçalama alışkanlığı ile parazit varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur [10]. Benzer şekilde Hamad ve ark. (2012), periodontal hastalığın tipi ve yaş grupları ile parazitin varlığı arasında anlamlı bir ilişki bulmazken, diş fırçalama ve eğitim düzeyi ile

parazit varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulmuşlardır [12]. Çalışmamızda da bu parazitin varlığı ile düşük eğitim seviyesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmış olması yukarıdaki çalışmaların sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Bu sonuçlara göre, enfeksiyon varlığı ile istatistiksel olarak anlamlı bulunan her üç parametrenin de kişisel hijyen alışkanlığı ile yakından ilişkili olması dikkat çekicidir.

Albuquerque jr ve ark. (2011), yaptıkları çalışmada dokuzu sağlıklı olmak üzere 51 hastanın tükürük ve biofilm örneklerini *E. gingivalis* için sadece direkt mikroskopik bakı ile incelemiş, *T. tenax* için ise ayrıca Giemsa boyama da yapmışlardır. Biofilm örneklerinin % 31,37'sinde, tükürük örneklerinin % 35, 29'unda *E. gingivalis*; biofilm örneklerinin % 22,53'ünde ve tükürük örneklerinin % 9,81'inde *T. tenax* tespit etmişlerdir [13]. Bu çalışmada ise örnek alınan kişi sayısı yakın olmakla beraber sadece dental plak örnekleri Giemsa ve Trichrome ile boyanarak incelenmiştir. *E. gingivalis* görülme oranı daha yüksek bulunmakla birlikte, *T. tenax* tespit edilmemiştir. Burada tükürük, biofilm, dental plak örneği gibi birden fazla ve farklı materyallerin incelenmesinin parazit tespiti için daha sağlıklı sonuçlara ulaşma açısından önemli olduğu anlaşılmaktadır.

Giemsa ve Trichrome boyama yöntemi kullanılan benzer bir çalışmada Abualqomsa ve ark. (2010), 13'ü sağlıklı 46 kişide, *E. gingivalis* ve *T. tenax* pozitifliğini sırasıyla % 19,44 ve % 2,17 olarak tespit etmişler, bu protozoonların diş ve dişeti hastalıklarının patogeneziindeki rollerinin daha fazla araştırılmasının yararlı olacağı sonucuna varmışlardır [11]. Bu çalışmada ise örnek sayısı aynı olmakla beraber yalnızca periodontal hastalığı olan hastalardan örnek alınmış olduğu için daha yüksek bir *E. gingivalis* pozitifliği tespit edilmiş olabileceği düşünülmüştür.

Bir diğer çalışmada *E. gingivalis*, dental plak örneklerinin % 31,6'sında saptanmış, parazit varlığı ile periodontal hastalığın tipi, cinsiyet ve yaş grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmuştur [14]. Yazar ve ark. (2016) ise, Kayseri'de periodontitisli ve gingivitisli hastalarda *E. gingivalis* yaygınlığını sırasıyla % 35,5 ve % 32,4 şeklinde bulurken, periodontal hastalık türü, cinsiyet, yaş, sigara kullanımı, eğitim durumu, sistemik hastalık gibi parametrelerle parazit varlığı arasında istatistiksel olarak bir fark bulmamışlardır [6]. Bizim çalışmamızda ise yalnızca eğitim durumu ile *E. gingivalis* varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir. Daha fazla çalışma yapıldıkça farklı parametreler ve çeşitli predispoze faktörlerin bu fırsatçı patojenlerin hastalık oluşturma potansiyelleri üzerindeki etkilerinin daha iyi anlaşılacağı düşünülmektedir.

Fransa'da yürütülmüş olan bir çalışmada ise direk mikroskopik muayeneye ilaveten Polimeraz Zincir Reaksiyonu tekniğinden de yararlanılmış, *E. gingivalis* % 81 gibi yüksek bir oranda bulunarak, periodontitis ile bağlantısı kesin olarak tespit edilmiş ve moleküler tekniklerin daha hassas sonuçlar verdiği gösterilmiştir [15].

Periodontal tedavi öncesi ve sonrası, *E. gingivalis* ve *T. tenax* görülme oranının araştırıldığı bir çalışmada, tedavi sonrası bu parazitlerin tükürükteki görülme oranı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmışken, plaktaki azalma ise anlamlı bulunmamıştır [8]. Bu durum parazitlerin öncelikle dental plakta çoğalıp sonra tükürük salgısına geçiş yapıyor olabileceğini düşündürse de, daha detaylı araştırmalar yapılması gerekliliğini bir kez daha ortaya koymaktadır. Parazitlerin daha iyi tanınmasına yardımcı olabilecek böyle çalışmalardan birinde Garcia ve ark. (2018), moleküler biyoloji tekniklerini kullanarak *E. gingivalis*'in yeni bir alt tipini belirlemişler ve bu alt tipi '*E. gingivalis* ST2, kamaktlı variant' şeklinde isimlendirmişlerdir [16]. Çalışmamızda moleküler biyoloji teknikleri kullanılmadığı için örneklerde varyant değerlendirilmesi mümkün olmamıştır.

Arpağ ve Kaya (2020) 40'ı sağlıklı grup ve 101'i periimplantitis olmak üzere 141 katılımcı ile yaptıkları çalışmada; Sağlıklı implantların çevresinden alınan örneklerde parazite rastlamazken, peri-implantitis vakalarından alınan örneklerin % 30,7'sinde *E. gingivalis*, % 33,6'sında *T. tenax* saptamışlardır. Ayrıca cinsiyet, düşük eğitim seviyesi, düzenli diş hekimi ziyareti ve diş fırçalama alışkanlığı ile *E. gingivalis* varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulmuşlardır [17]. Bizim çalışmamızda sadece eğitim durumu ile *E. gingivalis* arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir.

Yine bir başka çalışmada Rosa ve ark. (2020) periodontal hastalıklar ile her iki parazitin bağlantılı olduğu sonucuna varmışlar, ayrıca gingivitisli hastalarda periodontitisli olanlara göre daha yüksek pozitiflik bulmuşlardır [5]. Bizim çalışmamızda periodontal hastalığın tipi ile *E. gingivalis* varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Bao ve ark. (2020) tarafından Berlin Üniversitesi Tıp Fakültesi Periodontoloji bölümünde yapılan bir çalışma ise *E. gingivalis*'in yüksek virulans potansiyelini göstermesi bakımından önemli görülmektedir [18].

Sadece erkeklerin katıldığı bir çalışmada dişeti hastalığı olanların % 81,35'inde, sağlıklı grubun ise % 50'sinde *E. gingivalis* tespit edilmiştir [19]. Bizim çalışmamızda çalışma grubu oluşturulurken cinsiyet ayrımı yapılmamış, hem kadın hem erkek hastalardan örnek alınmıştır.

Sonuç olarak; *E. gingivalis* ve *T. tenax*, periodontal hastalıkların tanısında göz önünde bulundurulmalı ve elimine edilmelerine yönelik tedaviler uygulanmalıdır. Epidemiyolojisi ve patojenitesi hakkında yeterli bilgi bulunmayan bu protozoonların ağız boşluğu ile ilişkilerinin ortaya konması, Türkiye'de yeni yapılacak çalışmalarla birlikte prevalansın belirlenmesi, korunma ve kontrol yöntemleri geliştirilmesi gerektiği muhakkaktır. Ağız boşluğunda bulunan protozoonlar ile ilgili var olan veriler daha çok çalışma ile desteklenmelidir. Ayrıca kişisel temizlik ve hijyen alışkanlığı ile ilişkili olduğu çeşitli çalışmalarla ortaya konmuş olan bu ve diğer hastalık etkenlerinden korunmak için toplumsal olarak ağız bakım ve hijyen alışkanlıklarının geliştirilmesi gerektiği anlaşılmaktadır.

Teşekkür

Bu çalışma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 0743-YL-21 proje numarası ile desteklenmiştir. Bu makale, Dt. Burcu ÖZDEMİR ÖĞRÜ'nün yüksek lisans tez çalışmasından üretilmiştir. 10-12 Mart 2022 tarihli "5th International Health Sciences and Life Congress, Burdur" ve 18-20 Mart 2022 tarihli "Uluslararası 2. Dental Oral Enfeksiyonlar ve 1. Ağız Mikrobiyotası Kongresi, İstanbul" kongrelerinde sözlü bildiri şeklinde sunulmuştur.

Etik Beyanı

Bu çalışmada, "Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi" kapsamında uyulması gerekli tüm kurallara uyulduğunu, bahsi geçen yönergenin "Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiğine Aykırı Eylemler" başlığı altında belirtilen eylemlerden hiçbirinin gerçekleştirilmediğini taahhüt ederiz.

Bu çalışma için Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 23.03.2021 tarih ve 148 sayı ile etik kurul onayı alınmıştır.

Kaynakça

- [1] Newman, M. G., Takei, H. H., Klokkevold, P. R., Carranza, F. A. 2019. Newman&Carranza's Clinical Periodontology, 13th Edition, Philadelphia: Elsevier, 913s.
- [2] Lindhe, J. 2003. Clinical Periodontology and Implant Dentistry. 4th Edition, Oxford: Blackwell, 1072s.
- [3] Al-Saeed, W. M. 2003. Pathogenic effect of *Entamoeba gingivalis* on gingival tissues of rats. Al-Rafidain Dental Journal, 3(1), 70-73.
- [4] Ghabanchi, J., Zibaei, M., Afkar, M., Sarbazie, A. 2010. Prevalence of oral *Entamoeba gingivalis* and *Trichomonas tenax* in patients with periodontal disease and healthy population in Shiraz, southern Iran. Indian Journal of Dental Research, 21, 89-91.
- [5] Rosa, J. A., Fernandez, M. S., Vieira, I. S., Madi, R. R., Melo, C. M., Oliveira, C. C. 2020. Detection of oral *Entamoeba gingivalis* and *Trichomonas tenax* in adult Quilombola population with periodontal disease. Odovtos - International Journal of Dental Sciences, 22, 157-164.
- [6] Yazar, S., Çetinkaya, Ü., Hamamcı, B., Alkan, A., Şişman, Y., Esen, Ç., Kolay, M. 2016. Kayseri'de periodontitis veya gingivitisli hastalarda *Trichomonas tenax* ve *Entamoeba gingivalis*'in araştırılması. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 40, 17-21.
- [7] Vundela, R. R., Sisnity, V. S., Palaparthi, R. B., Guntakanla, V. R. 2016. Role of *Entamoeba gingivalis* in periodontitis: Myth or reality. Indian journal of dental advancements, 8, 100-105.

- [8] Maybodi, F. R., Haerian Ardakani, A., Fattahi Bafghi, A., Haerian Ardakani, A., Zafarbaksh, A. 2016. The effect of nonsurgical periodontal therapy on *Trichomonas tenax* and *Entamoeba gingivalis* in patients with chronic periodontitis. *Journal of Dentistry (Shiraz, Iran)* 17(3), 171-176.
- [9] Taşbent, F., Boran, C. 2020. *Entamoeba gingivalis* ve Periodontal Hastalıklardaki Etkinliğinin Değerlendirilmesi. *Türkiye Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 50, 204-210.
- [10] Özçelik, S., Gedik, T., Gedik, E. 2010. Ağız ve diş sağlığı ile *Entamoeba gingivalis* ve *Trichomonas tenax* varlığı arasındaki ilişkinin araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 34,155-159.
- [11] Abualqomsaan, M., Töz, S. O., Yolasiğmaz, A., Turgay, N. 2010. The investigation of *Entamoeba gingivalis* and *Trichomonas tenax* in a group of patients with periodontal disease. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 34, 91-94.
- [12] Hamad, S. S., Mohammad, S. H., Kader, M. A. 2012. Relationship between the Dental health and prevalence's *Trichomonas tenax* and *Entamoeba gingivalis* among patients attending Dental Clinics in Kirkuk. *Journal of Babylon University/Pure and Applied Sciences*, 20, 1441-1447.
- [13] Albuquerque jr, R. L., Melo, C. M., Santana, W. A., Ribeiro, J. L., Silva, F. A. 2011. Incidence of *Entamoeba gingivalis* and *Trichomonas tenax* in samples of dental biofilm and saliva from patients with periodontal disease. *Revista Gaúcha de Odontologia*, 59, 35-40.
- [14] Ibrahim, S., Abbas, R. 2012. Evaluation of *Entamoeba gingivalis* and *Trichomonas tenax* in patients with periodontitis and gingivitis and its correlation with some risk factors. *Journal of Baghdad College of Dentistry*, 24(3), 158-162.
- [15] Bonner, M., Amard, V., Bar-Pinatel, C., Charpentier, F., Chatard, J. M., Desmuyck, Y., Ihler, S., Rochet, J. P., Roux de La Tribouille, V., Saladin, L., Verdy, M., Gironès, N., Fresno, M., Santi-Rocca, J. 2014. Detection of the amoeba *Entamoeba gingivalis* in periodontal pockets. *Parasite*, 21, 30.
- [16] García, G., Ramos, F., Martínez-Hernández, F., Hernández, L., Yáñez, J., Gaytán, P. 2018. A new subtype of *Entamoeba gingivalis*: 'E. *gingivalis* ST2, kamaktli variant'. *Parasitology Research*, 117,1277-1284.
- [17] Arpağ, O. F., Kaya, Ö. M. 2020. Presence of *Trichomonas tenax* and *Entamoeba gingivalis* in peri-implantitis lesions. *Quintessence International*, 51, 1-7.
- [18] Bao, X., Wiehe, R., Dommisch, H., Schaefer, A. S. 2020. *Entamoeba gingivalis* causes oral inflammation and tissue destruction. *Journal of Dental Research*, 99, 561-567.
- [19] Al-Nuaimi, B. N., Al-Tae, A. F., Al-Kattan, M. M. 2021. Conventional and molecular identification of *Entamoeba gingivalis* from periodontitis patients in Nineveh Governorate/Iraq. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 25, 1293-1306.

Aile Hekimlerinin Evlilik Öncesi Yapılan Sağlık Taramaları Hakkındaki Tutum ve Davranışlarının İncelenmesi

Investigation of Family Physicians' Attitudes and Behaviors Regarding Pre-Marriage Health Screenings in Isparta

Şerife ÜNVER¹ , Gökçe İŞCAN^{1*} , Funda YILDIRIM BAŞ¹ 

¹ Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Aile Hekimliği Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye



Ö Z E T

Amaç: Birinci basamak sağlık hizmeti sunucuları olan aile hekimleri; kapsamlı yaklaşımın birinci basamak sağlık hizmetleri içerisinde, kişileri hastalıklara yakalanmadan önce tespit etmek ve gereken taramaları yapmakla görevlidir. Koruyucu hizmetler içerisinde bulunan ve sağlıklı nesillerin devamlılığını sağlamak için yapılması gereken evlilik öncesi dönem taramaları da aile hekimleri tarafından yapılmaktadır. Bu çalışma, Isparta ilinde çalışmakta olan aile hekimlerinin evlilik öncesi taramalar hakkında bilgi ve tutumlarının öğrenilmesi, farkındalıklarının artırılması amacıyla yapılmıştır.

Materyal Metot: Kesitsel, tanımlayıcı analitik çalışmamız Isparta ilinde çalışmakta olan Tüm Aile Hekimlerine 15 Şubat – 15 Mayıs 2021 tarihleri arasında 'Google Forms' aracılığıyla çevrimiçi e-anket olarak, kişilerin e- posta adreslerine gönderilerek yapıldı. Anket çalışmasına mevcut çalışmakta olan 156 aile hekiminden anketlere yanıt veren 137 (%87,8) aile hekimi dâhil edildi.

Bulgular: Çalışmamıza katılan hekimlerin %25'i evlilik raporuna onay vermediği bir durum olduğunu belirtti. Evlilik raporu verirken istediği tetkiklerin VDRL (%99,3) hemogram (%97,8), Anti-HIV (%97,8) olduğu tespit edilip çalışma yılının evlilik öncesi rapor vermek için istenilen tetkikler ile ilişkisi anlamlı bulunmamışken ($p>0,05$) ilçedekilerin bulaşıcı hastalık tetkiklerini anlamlı derecede daha çok istediği tespit edildi ($p<0,001$).Tetkikler ise genel olarak il merkezinde çalışan hekimler tarafından daha çok istenirken, hekimlerin %68,6'sı tarama sırasında istenen tetkiklerin yeterli olduğunu belirtti. .

Tartışma-Sonuç: Isparta ilindeki aile hekimlerinin evlilik öncesi taramalar konusundaki genel bilgi düzeyleri iyi olarak çıkmış olsa da, evlilik öncesi tarama kapsamındaki istenecek tetkiklerin net bir şekilde düzenlenmesi ve standardizasyonun sağlanması gerektiği, evlilik öncesi süreçte eş adaylarına verilebilecek danışmanlık konularında hekimlere gerekli eğitimlerin dönemsel olarak yapılmasına ihtiyaç olduğu ayrıca verilecek eğitimlerin içeriğinde evlilik öncesi taramalarının hekimler açısından yasal boyutunun da tekrar vurgulanması gerektiği sonucuna ulaşıldı.

Anahtar Kelimeler: Evlilik öncesi taramalar, Talasemi, Aile Hekimliği

Alınış / Received: 25.04.2022 Kabul / Accepted: 25.11.2022 Online Yayınlanma / Published Online: 20.12.2022



ABSTRACT

Objective: Preventive care includes premarital screening, which is included in preventive care and is crucial to ensure the continuation of healthy generations. This study's purpose was to educate and inform family physicians in the Isparta province about premarital screening.

Material and Metot: Our cross-sectional, descriptive, analytical study was sent to all Family Physicians working in the province of Isparta using 'Google Forms' between February 15 and May 15 2021. 137 (87.8%) family physicians who responded to the questionnaires out of 156 currently working family physicians were included in the survey study.

Results: Twenty-five percent of the doctors in our study stated they didn't always approve the marriage report. In terms of pre-marital examinations, VDRL (99.3%), hemogram (97.8%), and anti-HIV (97.8%) were the most often requested ($p>0.05$). Residents in the district showed a greater interest in infectious illness examinations ($p=0.001$).

Discussion-Conclusion: The premarital counseling that can be given to spouse candidates throughout the premarital period, and the examinations to be requested within the scope of premarital screening, should be clearly organized and standardized. The legal component of premarital screening should be emphasized again in the content of the trainings, it was observed.

Keywords: Premarital Screening, Thalassemia, Family Medicine



1. Giriş

Birinci basamak sağlık hizmeti sunucuları olarak aile hekimleri; mevcut risk durumlarının ortaya konulması amacıyla sağlık taramaları yapmakla yükümlüdür [1]. Bu taramalar sağlıklı nesillerin devamlılığını sağlamak için çok önemlidir. Ayrıca 4721 sayılı Türk Medeni Kanunu'nun 136. maddesinde ve 18921 sayılı 07.11.1985 tarihli Resmi Gazete'de yayımlanan Evlendirme Yönetmeliği'nde de belirtildiği gibi çiftlerin evlilik öncesi muayene ve tetkiklerini yaptırmaları ve sonuçta sağlık raporu almaları zorunludur [2]. Unutulmamalıdır ki evlilik öncesi hazırlık dönemi, koruyucu sağlık hizmetini yerine getirebilmek ve olası sağlık sorunlarının önüne geçebilmek için taramaların yapıldığı bir fırsattır. Türkiye İstatistik Kurumu verilerine göre 2020 yılında 487 bin 270 kişinin evlendiği göz önüne alınırsa, yılda yaklaşık bir milyon kişinin evlilik öncesi taramaları yaptırdığı anlaşılmakta bu da aile hekimleri için fırsatın ve sorumluluğun büyüklüğünü ortaya koymaktadır [3].

Evlilik öncesi verilen sağlık raporunda, çiftlerden istenilecek tetkikler bölgesel ve hastanın durumu göz önüne alınarak doktorun kararına bağlı olarak farklılık göstermektedir. Sağlık raporu verilirken detaylı anamnez alınmalı, gerekli muayeneler yapılmalı, çeşitli enfektif hastalıklar, cinsel yolla bulaşan hastalıklar, genetik geçiş olabilecek hastalıklar, ABO ve Rh uyumsuzluğu ve psikolojik rahatsızlıklar açısından gerekli tetkikler yapılarak, engel olan bir durum yoksa rapor verilmelidir [4]. Tetkiklerin sonucuna göre bazı durumlarda sağlık raporu verilememekte ya da ertelenebilmektedir. Mevzuata göre evlenmeye engel oluşturan bulaşıcı hastalık durumlarında (sifiliz, gonore, şankroid, tüberküloz, lepra) tetkik yaptırılması mecburi olup, aksi halde rapor düzenlenmesi uygun görülmemektedir. Evlenmeye engel oluşturmayan bulaşıcı hastalık durumlarında ise (Hepatit B, Hepatit C, HIV (Human Immunodeficiency Virus)) kişinin rızasına göre hareket edilmesi gerekmektedir [5, 6]. Sağlık raporu verileceğinde çiftlere; cinsel yolla/kan yoluyla bulaşabilecek hastalıklar, genetik açıdan aktarılan

hastalıklar, kontrasepsiyon ve sağlıklı cinsel yaşam, gebelik durumları ve çeşitli riskler ile ilgili danışmalık da verilmelidir. Çalışmamızda da bahsedilen konular üzerinde verilecek danışmalık hizmetleri birinci basamaktaki fırsatları değerlendirmek adına çok önemli olduğundan Isparta ilinde çalışmakta olan aile hekimlerinin raporlarda istedikleri tetkikler, verdikleri danışmanlıklar hakkında bilgi ve tutumlarını öğrenmek ve farkındalıklarını arttırmak amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

Tanımlayıcı, kesitsel, özellikte olan bu çalışma; 15 Şubat – 15 Mayıs 2021 tarihleri arasında 'Google Forms' aracılığıyla çevrimiçi e-anket olarak hazırlanıp uygulandı. Çalışma evrenini Isparta'da il merkezi ve ilçelerde aile sağlığı merkezlerinde çalışan 156 aile hekimi oluşturmaktadır. Araştırmada bütün evrene ulaşılmaya çalışıldı.

Etik Kurul Onayı

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı'ndan 27.11.2020 tarih ve 72867572-050.01.04-638 sayısı ile etik kurul onayı alındı.

Veri toplama araçları

Hekimlerin evlilik öncesi yapılan sağlık taramaları hakkındaki tutum ve davranışlarını değerlendirmek için tarafımızca literatür taranarak 22 soruluk anket hazırlandı. Anketin ilk bölümünde; hekimlerin yaşı, cinsiyeti, medeni hali, meslekteki çalışma yılı, görev yeri, aile sağlığı merkezine bağlı toplam nüfusları, evlilik raporuna onay verilmeyen çiftlerin olup olmadığı, varsa nedeni ve evlilik öncesi muayene için başvuran kişilerden istenilen tetkikler sorgulandıktan sonra diğer bölümde hekimlerin evlilik öncesi muayene, taramalar ve danışmanlık ile ilgili tutum ve davranışlarını ölçen sorular uygulandı.

Verilerin Değerlendirilmesi

SPSS 26.0 programı kullanılarak istatistiksel analizler yapıldı. Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildikten sonra, Normal dağılan verilerde ortalama \pm standart sapma; normal dağılmayan verilerde medyan (IQR), frekans belirten ifadeler sayı ve yüzde (%) olarak verildi. Bağımsız gruplarda çoklu karşılaştırmalarda non-parametrik testlerden Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney-U testleri; iki ve daha fazla kategorik değişken analizi için ki-kare, gerekli durumlarda Fisher Exact testi kullanıldı. %95 güven aralığında p değeri 0.05 'in altında olanlar anlamlı kabul edildi.

3. Bulgular

Çalışmaya 137 aile hekimi katıldı. Hekimlerin yaş ortalaması $43,94 \pm 8,08$ (min:27, max:63), % 68,6'sı (n=94) erkekti. Hekimlerden % 91,2'si (n=125) evli, % 60,6'sı (n=83) il merkezinde görev yapmaktaydı. Meslekteki çalışma yılı ortalamaları $18,85 \pm 7,98$ (min:1, max:38) olarak saptandı. Çalışmaya dahil olan aile hekimlerinin tanımlayıcı verileri Tablo 1 de detaylı olarak verildi.

Tablo 1: Çalışmaya Katılan Aile Hekimlerinin Sosyodemografik Özellikleri

Özellikler	n	%
Cinsiyet		
Kadın	43	31,4
Erkek	94	68,6
Medeni Hal		
Evli	125	91,2
Bekar	12	8,8
Görev Yeri		
İl Merkezi	83	60,6
İlçe	54	39,4
	Ort±SS	Ortanca (Min-Max)
Yaş	43,94±8,08	45 (27-63)
Meslekteki çalışma yılı	18,85±7,98	20 (1-38)

Ankette hekimlere yöneltilen ‘Daha önce evlilik raporuna onay vermediğiniz çiftiniz oldu mu?’ sorusuna hekimlerin %24,8’i (n=34) ‘evet’ cevabını verirken, onay vermeme sebebi olarak %6,6’sı (n=9) ‘bulaşıcı hastalık’, % 8’i (n=11) ‘mental durum’, % 2,9’u (n=4) ‘psikiyatrik hastalık’, % 2,9’u (n=4) ‘talasemi’, % 2,9’u (n=4) ‘yaş’, % 1,4’ü (n=2) ‘diğer’ (Diğer seçeneğinde ‘test sonuçlarının tekrarını istedim.’, ‘Sevk ettim.’) olarak belirtti. Görev yerinin il merkezi ya da ilçe olması ve çalışma süresi ile evlilik öncesi sağlık raporuna onay verme durumu (p=0,169, p=0,083) ve onay vermeme sebepleri (p=0,415, p=0,238) arasında anlamlı bir fark saptanmadı.

Hekimlerin, evlilik öncesi rapor almak için başvuran çiftlerden en çok VDRL (Venereal Diseases Research Laboratory) tetkikini istedikleri tespit edildi. İstenen tetkikler açısından görev yerinin İl merkezi veya ilçe olması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu (p<0,001). Hemogram ve diğer istenilen tetkikleri ilçede çalışan hekimlerin daha yüksek oranda istediği, fakat genel olarak bakıldığında il merkezinde görev yapanların ilçedekilere göre anlamlı derecede daha fazla tetkik istediği saptandı. Çalışma süresi ile istenilen tetkikler arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (p=0,229). Görev yerlerine göre anket sorularına verilen yanıtlar incelendiğinde ise; “Evlilik öncesi gelen çiftlere kontrasepsiyon açısından danışmanlık veririm.” sorusuna ‘kesinlikle evet’ yanıtını veren hekimlerin %37,3’ü (n=31) il merkezinde, %31,5’i (n=17) ilçede görev yapmaktaydı. İl merkezinde görev yapmakta olan hekimlerin ilçedekilere kıyasla anlamlı derecede daha yüksek oranda kontrasepsiyon ile ilgili danışmanlık verme fikrine sahip oldukları görüldü (p=0,024). Görev yerinin diğer sorularla karşılaştırılmasında anlamlı bir fark saptanmadı. “Evlilik öncesi tarama testlerinin yapılması gereklidir.” sorusuna “Kararsızım” yanıtını sadece il merkezinde çalışanlar, “Hayır” yanıtını ise sadece ilçedeki hekimlerin verdiği görüldü. “Evlilik öncesi tarama testleri sadece aile hekimleri tarafından yapılmalıdır.” sorusuna ve “Yapılan tetkikler yeterlidir.” sorusuna “Kesinlikle hayır” yanıtını sadece il merkezinde çalışanlar vermiş olup, diğer sorularda bu şekilde belirgin bir ayrım saptanmadı.

Hekimlerin evlilik öncesi muayenede istedikleri tetkiklerin görev yerine göre değerlendirilmesi Tablo 2 de verilmektedir.

Tablo2: Hekimlerin Evlilik Öncesi Muayenede İstedikleri Tetkiklerin Görev Yerine Göre Değerlendirilmesi

	İl Merkezi		İlçe		p*
	n	%	n	%	
Tetkikler					
Kan grubu	65	78,3	37	68,5	
Serum demir düzeyi	69	83,1	43	79,6	
Total demir bağlama kapasitesi	68	81,9	44	81,5	
Ferritin	69	83,1	42	77,8	
Folik asit	64	77,1	35	64,8	
B12	64	77,1	34	63	
Hepatit paneli	82	98,8	51	94,4	
Akciğer grafisi	58	69,9	32	59,3	<0,001
Tüberküloz olmadığına dair rapor	74	89,2	25	46,3	
Anti-HIV	82	98,8	52	96,3	
VDRL	82	98,8	53	98,1	
Hemogram	80	96,4	54	100	
Hemoglobin elektroforezi	80	96,4	51	94,4	
Diğer	3	3,6	2	3,7	

Hekimlerin %97,8'i (n=134) "Evlilik öncesi tarama testlerinin yapılması gereklidir." sorusuna "kesinlikle evet" ve "evet" yanıtlarını verdiği görülürken, "Evlilik öncesi tarama testleri aile hekimleri tarafından yapılmalıdır." sorusuna ise aile hekimlerinin %73'ü (n=100) "kesinlikle evet" ve "evet" cevabını verdi. Aile hekimlerinin evlilik öncesi taramalarla ilgili tutum ve davranışlarının değerlendirilmesi Tablo 3 te verilmektedir.

Tablo 3: Aile Hekimlerinin Evlilik Öncesi Taramalarla İlgili Tutum ve Davranışlarının Değerlendirilmesi

	Kesinlikle evet	Evet	Karasızım	Hayır	Kesinlikle hayır
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Evlilik öncesi tarama testlerinin yapılması gereklidir.	110 (80,3)	24 (17,5)	1 (0,7)	2 (1,5)	0
Evlilik öncesi tarama testleri aile hekimleri tarafından yapılmalıdır.	47 (34,3)	53 (38,7)	24 (17,5)	11 (8)	2 (1,5)
Evlilik öncesi yapılan taramalarla bulaşıcı ve genetik hastalıklar engellenir.	54 (39,4)	71 (51,8)	7 (5,1)	5 (3,6)	0
Yapılan tetkikler yeterlidir.	30 (21,9)	64 (46,7)	24 (17,5)	17 (12,4)	2 (1,5)
Evlilik öncesi tarama için gelen çiftlerden yazılı/sözlü onam alırım.	60 (43,8)	58 (42,3)	8 (5,8)	11 (8)	0
Cinsel yolla bulaşan hastalıklar açısından tarama gereklidir.	78 (56,9)	52 (38,0)	4 (2,9)	3 (2,2)	0
Cinsel yolla bulaşan hastalıklar için tedavi ve danışmanlık hizmeti veririm.	51 (37,29)	71 (51,8)	6 (4,4)	9 (6,6)	0
Hastanın VDRL/HIV/Hepatit testi pozitif çıkarsa hastanın eşine haber veririm.	33 (24,1)	34 (24,8)	29 (21,2)	26 (19)	15 (10,9)
Hastanın VDRL/HIV/Hepatit testi pozitif çıkarsa hastanın eşine haber vermesi için yasal kuralları hatırlatırım.	75 (54,7)	52 (38,0)	8 (5,8)	2 (1,5)	0

Hepatit göre aşılamalarını yaparım.	testlerine kişilerin	53 (38,7)	66 (48,2)	9 (6,6)	9 (6,6)	0
Talasemi taramasında durumlarda analiz isterim.	şüpheli genetik	69 (50,4)	45 (32,8)	12 (8,8)	11 (8)	0
Evlilik öncesi gelen çiftlere kontrasepsiyon açısından danışmanlık veririm.		48 (35,0)	69 (50,4)	9 (6,6)	11 (8)	0
Evlilik öncesi yapılan taramalarda psikiyatrik muayene gereklidir.		67 (48,9)	51 (37,2)	12 (8,8)	7 (5,1)	0

Cinsiyete göre incelendiğinde, “Evlilik öncesi tarama için gelen çiftlerden test öncesi yazılı/sözlü onam alırım.” sorusuna kadınların %65,1’i (n=28), “Hepatit testlerine göre kişilerin aşılamalarını yaparım” sorusuna ise %58,1’i (n=25) “kesinlikle evet” cevabını verdi. Her iki soruda da kadınların erkeklere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla olumlu yanıt verdiği görüldü (p=0,004; p=0,004). “Kararsızım” yanıtını ise her iki soruda da sadece erkekler vermiş olası dikkat çekiciydi “Cinsel yolla bulaşan hastalıklar açısından tarama gereklidir” sorusuna verilen yanıtlarda kadınların anlamlı şekilde daha olumlu yanıt verdiği bulundu (p<0,001). “Evlilik öncesi gelen çiftlere kontrasepsiyon açısından danışmanlık veririm.” sorusu ile “Evlilik öncesi yapılan taramalarda psikiyatrik muayene gereklidir.” sorusuna verilen yanıtlarda “kesinlikle evet” cevabı kadınlarda anlamlı derecede yüksek tespit edilmiş olup (p=0,004; p=0,001), diğer sorularla cinsiyet arasında anlamlı fark saptanmadı. “Yapılan tetkikler yeterlidir.” ve “Hastanın VDRL/HIV/Hepatit testi pozitif çıkarsa eşine haber veririm.” soruları haricinde kararsız olma ve olumsuz yanıt verme oranı erkeklerde daha fazla bulundu.

Çalışma yılına göre cevaplar incelendiğinde ise “Hastanın VDRL/HIV/Hepatit testi pozitif çıkarsa hastanın eşine haber vermesi için yasal kuralları hatırlatırım.” sorusuna 19 yıl üzerinde çalışmış olanlar anlamlı derecede yüksek oranda (%64,9 (n=48)) “kesinlikle evet” yanıtını vermiş iken, çalışma yılı 19 ve altında olanların (%50,8 (n=32)) daha yüksek oranda “evet” yanıtını verdiği görüldü (p=0,022). Diğer sorular ile çalışma yılı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

4. Tartışma ve Sonuç

Aile hekimlerinin birinci basamaktaki görevlerinden birisi de evlilik öncesi sağlık raporu vermek ve bunun için gerekli muayene, tetkik, tarama ve danışmanlık hizmetlerini yerine getirmektir. Türk Medeni Kanunu’nun 136. maddesinde ve Evlendirme Yönetmeliği’nde de yer aldığı üzere evlenecek çiftlerin almak zorunda olduğu sağlık raporunu verirken yapılan hizmetlerin, çiftler ve gelecek nesillerin sağlığı açısından önemi büyüktür [7, 8]. Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi 2002 yılı basımında Türk Tabipler Birliği’nin (TTB) evlilik öncesi sağlık raporları ile ilgili toplantısına yer verilmiştir. Bu toplantıda gerek psikiyatrik muayene gerekse genetik ve enfeksiyon hastalıkları açısından zorunlu bir muayene veya zorunlu tetkik isteminin, tıp ahlakına uygun olmadığı belirtilmiştir. Ruhsal değerlendirmede, kişinin söylenenleri anlayabilmesi ve kendi yararını gözetebilmesi, durumunu ayırt edebilir olması yeterlidir. Ancak diğer eş adayları tarafından belirtilecek şikayet, itiraz veya talep olması durumunda kişinin kendi isteği ile bir psikiyatri uzmanı tarafından değerlendirme yapılabileceği belirtilmiştir. Enfeksiyon hastalıkları açısından hastanın şikayetleri doğrultusunda şüphelenilip, halen yürürlükte olan Umumi Hıfzısıhha Kanunu’nun 122. maddesinde gönderme yapılan 17 Ağustos 1931 tarihli “Evlenme Muayenesi Hakkında Nizamname” nin 4. ve 5. maddesinde kadın ve erkek için ayrı ayrı belirtilen

esaslara uygun olarak muayene yapılması, bulgu saptanmazsa kişinin kendi rızası olmadan herhangi bir muayene veya tetkik yapılmaması uygun görülmüştür [9] Anayasanın 20. maddesine göre "herkes özel hayatına ve aile hayatına saygı gösterilmesini isteme hakkına sahiptir". Bu madde uyarınca Türk Tabipler Birliği'nin toplantısında kişileri zorunlu muayene ve tetkiklere tabii tutmak yerine onların durum hakkında bilgilendirilmesi ve onların onayı doğrultusunda test ve muayenelerin yapılmasının insan haklarına uygun olan uygulama olduğu belirtilmiştir [10]

'Evlilik öncesi tarama testlerinin yapılması gereklidir.' sorusuna hekimlerimizin %97,8'i olumlu cevap vermiştir. Benzer olarak Barış ve arkadaşları tarafından 2017'de Malatya'da yapılan çalışmada "Evlilik öncesi muayene ve testler bir toplumun daha sağlıklı olmasını sağlayan bir süreç olduğundan zorunlu olmasının gelecek nesiller için faydalı olduğunu düşünüyorum." ifadesine hekimlerden %84,9'u 'evet' cevabını vermiş olup, hekimlerin büyük bir çoğunluğu muayene ve testleri gerekli görmektedir. Aynı çalışmadaki "Türkiye'deki mevcut hukuki düzenlemeler bu zorunlu muayene ve testler yerine evlilik öncesi aile hekimlerinin kişilere danışmanlık yapması şeklinde olursa insan haklarına daha uygun olacaktır." ifadesini ise hekimlerin %54,6'sı 'evet' şeklinde yanıtlamıştır. Bu sonuç, çoğu hekimin zorunlu muayene ve test yerine danışmanlık olmasını etik olarak daha uygun bulduğu fakat zorunlu muayene ve testlerin faydasını da göz ardı edemediklerini ortaya koymaktadır [10]. "Evlilik öncesi tarama testleri aile hekimleri tarafından yapılmalıdır." sorusunu hekimlerin %73'ü olumlu olarak yanıtlamıştır. Fakat muayene ve danışmanlık sonunda verilen sağlık raporunun aile hekimlerine önemli bir sorumluluk yüklemesi ve gerektiğinde diğer bölümlere danışılması gerekliliği gibi nedenlerle bazı hekimlerin bu konuya katılmadığını düşündürmektedir.

"Evlilik öncesi yapılan taramalarla bulaşıcı ve genetik hastalıklar engellenir." sorusuna hekimlerden %91,2'si olumlu yanıt vermiştir. Hemoglobinopatilerin fazla görüldüğü ülkemizde verilecek genetik danışmanlığın etkin olması, bulaşıcı hastalıkların tespiti ve tedavisinin mümkün olması, Rh uyumsuzluğunun gebelikte anne ve çocuk için yaratabileceği sorunların da çözümünün mümkün olması hekimlerimizin çoğunluğunun olumlu yanıt vermesine sebep olabilmektedir. Talasemi taşıyıcılarının laboratuvar tetkikleri sonucu saptanıp, danışmanlık verilerek engellenebilir bir hastalık olduğu bilinmesine rağmen gösterilmiştir ki her yıl dünyada 60.000 ve üzerinde talasemili bebek dünyaya gelmektedir [11]. Ülkemizde de yapılan evliliklerin %24'ünün akraba evliliği olduğu ve halen önüne geçilemeyen bu durumun sebep olduğu bazı genetik hastalıklardaki artış göz önüne alındığında, bu konuda verilen danışmanlığın önemsenmediğini düşündürmekte ve bu durum yorumlarımızı desteklemektedir [12].

Ankette yer alan 'Daha önce evlilik raporuna onay vermediğiniz çiftiniz oldu mu?' sorusuna hekimlerin %24,8'i 'evet' cevabını vermiştir. En sık saptanan onay vermeme sebebi mental durumdan şüphe edilmesi olmuştur. Akıl sağlığının dolayısıyla ayırt etme gücünün olmayışı yasalarda da belirtildiği üzere evlenmeye engel bir durum olduğu için hekimlerin onay vermemesi beklenen bir sonuçtur. Bulaşıcı hastalık seçeneği kapsamında onay verilmeme sebebi olarak Sifiliz ve HIV cevapları verilmiştir. Umumi Hıfzısıhha Kanunu'nda da belirtildiği gibi sifiliz evlenmeye engel bir hastalık olup hekimlerin yaklaşımı doğru olarak değerlendirilmektedir [5]. Fakat verilen cevaplarda bulunan HIV pozitifliği, yasal olarak evlenmeye engel değildir. HIV nedeniyle gelişen AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) tablosunun ölümcül boyutlara ulaşabilmesi, hem eş adayı hem de sahip olunabilecek çocuklar açısından risk oluşturabileceği için hekimler rapor vermeme nedeni olarak gösterebilmektedir. Bulaşıcı hastalığa sahip kişilerin sevk edilip, ilgili bölümden onay alınması gerekebilmektedir. HIV, Hepatit B/C gibi hastalıkların ilerleyişi, komplikasyonları ve dolayısıyla tedavi süresi öngörülemeyeceği için bu hastalıklara sahip olan kişilere evlilik için sağlık raporu verilip verilmemesi konusunda yasal düzenlemeler getirilmeli ve standardize edilmelidir. Talasemi taşıyıcılığı evlenmeye engel olmamasına rağmen genetik tetkikler açısından hekimlerin ilgili kişileri bir üst basamağa sevk ettiği, bu sebepten dolayı onay vermedikleri tespit edilmiştir. Hekimlerin "Evlilik öncesi sağlık raporu almak için başvuran çiftlerden hangi tetkikleri istiyorsunuz?" sorusuna verdiği cevaplarda; VDRL, hemogram ve Anti-HIV testlerinin en çok istenen tetkikler olduğu saptanmıştır. Barış tarafından 2017'de Malatya'da 152 hekim ile yapılan bir çalışmada benzer şekilde en çok istenen 3 tetkik; "hepatit paneli, Anti-HIV ve VDRL" olarak belirtilmiştir [12]. Mevzuatta evliliğe engel olan bulaşıcı hastalıklar arasında sifilizin de bulunması çalışmamızda en çok istenen tetkikin VDRL olmasını açıklamaktadır. Talasemiden şüphelenilebilmesi için basit bir test olan hemogramın ve kişinin kendisi, diğer eş adayı ve çocuklar açısından önemli morbidite ve mortalite riski taşıdığı için tespit ve tedavi edilebilmesi gereken AIDS hastalığı için anti-HIV testinin diğerlerinden fazla istenmiş olması beklenen bir sonuçtur. Ülkemizde ilk defa 1985 yılında görülen HIV enfeksiyonunun yıllar içinde katlanarak artması ve 2018 yılında vaka sayısının 21.520'ye ulaşması bu hastalığın taranmasının gerekliliğini gözler önüne sermektedir[13].

Çalışma yılının istenilen tetkikler üzerinde anlamlı bir etkisi bulunmazken, görev yerinin anlamlı bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. İl merkezinde bulunan hekimlerin, ilçede çalışanlara göre daha fazla tetkik istedikleri görülmektedir. Tetkik isteme ve çalışılma durumlarının il merkezinde daha kolay olması nedeniyle bu farklılığın ortaya çıkabileceği düşünülmektedir. İstenen tetkiklerin farklılık göstermesinin, kılavuzdaki kanunen zorunlu olan durumların haricinde değerlendirilmesi gereken kısımların hekime bırakılması kaynaklı olduğunu düşündürmektedir.

Evlilik öncesi tarama için gelen çiftlerden yazılı/sözlü onam alırım.” ifadesini hekimlerin %86,1’i “olumlu olarak cevaplamıştır. Tıbbi etik açısından hastaların özerkliğine saygı gösterilmesi gerekliliği ve aydınlatılmış onam almanın sağlık çalışanlarının etik ve hukuki sorumluluğu olduğu düşünüldüğünde hekimlerimizin bu cevabı vermesi beklenmektedir [14]. 2017’de Barış tarafından Malatya’da yapılan çalışmada hekimlere tetkik istemeden önce kişilerden onay alıp almadıkları sorulmuş, benzer şekilde katılımcıların %71,1’i evet yanıtını vermiştir [11].

“Hastanın VDRL/HIV/Hepatit testi pozitif çıkarsa hastanın eşine haber veririm.” ifadesini hekimlerin %48,9 u olumlu olarak cevaplamıştır. Aile hekimleri, evlilik öncesi süreçte bahsi geçen hastalıklarla ilgili tetkik yaptırılmak istenmediğinde veya testler pozitif çıktığında eğer pozitif çıkan taraf bunu diğer eş adayına söylemek istemezse de kişiye hastalığının söylendiğine dair tebliğ- tebellüğ belgesi almak ve hasta kişiye eş ile ilgili yasal sorumluluklarını hatırlatmak zorundadır. Yani eş adayına kişinin izni olmadan test sonucu hakkında bilgi vermekle değil, test yaptırmak/sonuç bildirmek istemeyen kişinin bunları istemediğini bildirmekle yükümlüdür [13]. Ayrıca Anayasa’nın 20. Maddesinde “özel hayatın ve aile hayatının gizliliğine dokunulamayacağı ve herkesin kişisel verilerin korunmasını isteme hakkına sahip olduğu” açıkça belirtilmiştir [15]. Ancak Türk Medeni Kanunu 150, maddeye göre “2. Davacının veya altsoyunun sağlığı için ağır tehlike oluşturan bir hastalık kendisinden gizlenmişse” eşlerden diğeri evliliğin iptali için dava açabilir [16].] Bu nedenle bahsi geçen enfeksiyon hastalıklarının bildirimini zorunlu olması fakat bildirildiği takdirde anayasaya aykırı davranılıp hak ihlali yapılacağı ikilemi, hekimlerimizin kararsız kalma sebebi olabilmektedir. 2017 yılında Barış tarafından Malatya’da yapılan çalışmada yer alan “Çiftlerden birinde zührevi hastalık tespit edildiğinde bu durum sizce hasta olan eşin rızası aranmaksızın diğer eşe söylenmeli midir?” sorusuna katılan hekimlerin %42,1’i “evet”, %44,1’i “hayır” cevabını vermiştir [11]. Bizim çalışmamızda diğer eşe haber verme taraftarı olanların oranının, bu çalışmadakilerden daha fazla olduğu saptanmıştır. “Hastanın VDRL/HIV/Hepatit testi pozitif çıkarsa hastanın eşine haber vermesi için yasal kuralları hatırlatırım.” ifadesine hekimlerden %92,7 si olumlu yanıt vermiştir. Çoğu hekimin olumlu yanıt vermesi aile hekimi olarak yasalara uygun şekilde yükümlülüklerin yerine getirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Ancak hekimlerin yasalar ve vicdanları arasında kalmaya zorlanmayacakları şekilde, bireyin mahremiyetini yok saymadan karşı tarafın sağlığını korumaya yönelik yeni yasal düzenlemelere ihtiyaç olduğu da aşikârdır.

“Evlilik öncesi gelen çiftlere kontrasepsiyon açısından danışmanlık veririm.” ifadesine hekimlerden % 85,4 ü olumlu yanıt vermiştir. Eş adaylarının evlilik sürecinde sağlıklı bir cinsel yaşam sürdürebilmeleri, sahip olacakları çocuk veya çocukların zamanına ve sıklığına karar verebilmeleri, cinsel yolla bulaşan hastalıkların önüne geçilebilmesi ve sahip olunacak çocuklarda herhangi bir hastalık durumunun, sık doğumdan dolayı olabilecek düşüklerin, istenmeyen çocuk sahibi olma durumunda yapılacak küretajların ve bu durumlardan kaynaklanabilecek komplikasyonların önüne geçilebilmesi kontrasepsiyon yöntemleri ile mümkün olabilmektedir. Her yıl dünya çapında yaklaşık 73 milyon isteyerek kürtaj gerçekleştirilmektedir. İstenmeyen tüm gebeliklerin 10’undan altısı (%61) ve tüm gebeliklerin 10’undan 3’ü (%29) isteyerek düşükle sonuçlanır. Evli kadınların %53’ünün daha fazla çocuk istemediği, %14’ünün ise sonraki çocuk için en az 2 yıl beklemek istediği, halen evli olan kadınların %12’sinin karşılanmamış aile planlaması ihtiyacı olduğu bilinmektedir [17]. Artan kontraseptif yöntem kullanımı ve halen daha kullanıma ihtiyaç olduğu bu verilerle anlaşılmakta ve bu durum verilecek danışmanlığın önemini artırmaktadır. Kırıcı ve arkadaşlarının 2020’de Adıyaman’da yaptığı çalışmada, araştırmaya katılan kadınların %95,2’sinin aile planlaması danışmanının ilk önerdiği yöntemi tercih ettiği saptanmış ve yöntemlerin etkinliği ve yan etkileri konusunda verilen danışmanlığın kadınların uygun yöntemi seçmesini kolaylaştırabileceği sonucuna ulaşılmıştır [18]. 2020 yılında Gaziantep’te Mutlu tarafından yapılan tez çalışmasında ise katılımcılardan %80,4’ünün ebe-hemşirelerden, %36’sının hekimlerden danışmanlık aldığı tespit edilmiştir [19]. Öztaş ve arkadaşlarının 2015’te Ankara’da yaptığı bir çalışmada sağlık personeli önerisiyle kontraseptif yöntem kullanım oranı %64,7 olarak saptanmış, kadınlardan %26,1’inin plansız gebeliği olduğu ve %6,1’inin ise kontraseptif yöntemler hakkında bilgisinin olmadığı anlaşılmıştır [20]. Bunlar ve literatürdeki diğer çalışma sonuçları verilen danışmanlığın önemini ve danışmanlığa duyulan ihtiyacı göstermektedir.

“En çok “Kararsızım” cevabı verilen soru “Hastanın VDRL/HIV/Hepatit testi pozitif çıkarsa hastanın

eşine haber veririm.” olmuştur. Bu konunun hekimler arasında en çok tartışılan, hekimlerin vicdanı ve kanun arasında en çok kaldıkları, kanunlarla net açıklık getirilemeyen bir konu olduğu bilinmektedir. Bu konuda verilecek eğitimler net bir tutum sergilemek açısından önemlidir. İhtiyaç duyulan konular kesin bir şekilde belirlenmeli ve bu konular üzerinde eksiklikler belirlenerek eğitimde değinilecek konular bunlara göre yeniden oluşturulmalıdır.

Evlilik öncesi taramaların koruyucu hekimlik yapılabilmesi açısından bir araç olarak görüldüğü açıktır. Hekimlerin çoğunluğunun taramaları ve bu taramalar sonucunda gerekli tedavi ve danışmanlık verme, aşılama, ileri tetkik isteme gibi davranışları gerekli görmelerine rağmen gerekli görmeyenlerin az oranda da olsa mevcut oluşu ve onay vermeme sebepleri göz önüne alındığında, bu durum bazı hekimlerde bilgi eksikliğinin olabileceğini düşündürmüştür. Bu sebeple evlilik öncesi taramaların kapsamı ve tetkik sonuçlarına göre yapılması gerekenler ve rapor düzenleme konusunda bilgi ve deneyim eksikliklerini giderecek şekilde uygun eğitimlerin verilmesi ve yasal düzenlemelerin yapılması önerilebilir.

Etik Beyanı

Bu çalışmada, “Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi” kapsamında uyulması gerekli tüm kurallara uyulduğunu, bahsi geçen yönergenin “Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiğine Aykırı Eylemler” başlığı altında belirtilen eylemlerden hiçbirinin gerçekleştirilmediğini taahhüt ederiz.

Kaynakça

1. Elkin N. Bir Aile Sağlığı Merkezine Evlilik Raporu İçin Başvuran Kişilerin Değerlendirilmesi. İstanbul Gelişim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi [İnternet]. 2019;7:631-640.
2. Evlendirme Yönetmeliği. Evlendirme Yönetmeliği 1985. <https://www.mevzuat.gov.tr/MevzuatMetin/3.5.859747.pdf> (Erişim Tarihi :20.04.2022)
3. Türkiye İstatistik Kurumu. Evlenme ve Boşanma İstatistikleri 2020. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Evlenme-ve-Boşanma-İstatistikleri-2021-45568#:~:text=Evlenen%20%C3%A7iftlerin%20say%C4%B1s%C4%B1%202020%20y%C4%B1%C4%B1nda,binde%206%20C68%20olarak%20ger%C3%A7ekle%C5%9Fti.&text=Bo%C5%9Fanan%20%C3%A7iftlerin%20say%C4%B1s%C4%B1%202020%20y%C4%B1%C4%B1nda,y%C4%B1%C4%B1nda%20174%20bin%2085%20oldu.> (Erişim Tarihi :21.04.2022)
4. T.C. Sağlık Bakanlığı. Evlilik Öncesi Danışmanlık Rehberi 2014. <https://sbu.saglik.gov.tr/Ekutuphane/kitaplar/Evlilikoncesi%20DanismanlikRehberi.pdf>. (Erişim Tarihi :21.04.2022)
5. Umumi Hıfzısihha Kanunu. 24.04.1930. <https://www.saglik.gov.tr/TR,10384/tarihi24041930--sayisi1593--rg-tarihi06051930--rg-sayisi1489--umumi-hifzissihha-kanunu.html#:~:text=Say%C4%B1s%C4%B1%3A1489%20Umumi%20H%C4%B1fz%C4%B1ss%C4%B1hha%20Kanunu,-AddThis%20Sharing%20Buttons&text=Madde%201%20%2D%20Memleketin%20s%C4%B1hhi%20C5%9Fartlar%C4%B1n%C4%B1,mazhar%20eylemek%20umumi%20Devlet%20hizmetlerindendir.> (Erişim Tarihi :20.04.2022)
6. T.C. Sağlık Bakanlığı. Aile Hekimliği Uygulama Yönetmeliği 25.01.2013. <https://www.mevzuat.gov.tr/mevzuat?MevzuatNo=17051&MevzuatTur=7&MevzuatTertip=5>. (Erişim Tarihi :20.04.2022)
7. Demirel N ÖS. Yuvarlak Masa Toplantısı: Evlilik Raporları. Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi [İnternet]. 2002; 11(6):210-214.
8. T.C. Devleti. Evlenme Muayenesi Hakkında Nizamname1931. <https://www.mevzuat.gov.tr/MevzuatMetin/2.3.11682.pdf> (Erişim Tarihi :20.04.2022)
9. Evlenme muayenesi hakkında nizamname. 1931 <https://www.mevzuat.gov.tr/MevzuatMetin/2.3.11682.pdf>. (Erişim Tarihi :20.04.2022)
10. T.C. Devleti. T.C Anayasası 1982. https://www.tbmm.gov.tr/anayasa/anayasa_2018.pdf. (Erişim Tarihi :20.04.2022)

11. Barış Ş. Aile hekimlerinin evlilik öncesi muayene ve testlere bakışının değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi 2017.
12. Aydınok Y. Thalassemia. Hematology. 2012;17(sup1):28-31.
13. T.C. Sağlık Bakanlığı. Türkiye HIV/AIDS Kontrol Programı 2019. https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Bulasici-hastaliklar-db/hastaliklar/HIV-ADS/Tani-Tedavi_Rehberi/HIV_AIDS_Kontrol_Programi.pdf (Erişim Tarihi :20.04.2022)
14. Türk Tabipler Birliği. Türk Tabipler Birliği ve Tabip Odalarının Tıbbi Deontolojiyi Koruma Sorumluluğu2018:96. https://www.tb.org.tr/kutuphane/tibbi_etik_deontolojiyi_koruma.pdf
15. T.C. Devleti Anayasası. Madde 20. 1982:4. <https://www.mevzuat.gov.tr/mevzuatmetin/1.5.2709.pdf> (Erişim Tarihi :20.04.2022)
16. T.C. Devleti. Türk Medeni Kanunu 22.11.2001. <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2001/12/20011208.htm#:~:text=T%C3%BCrk%20Meden%C3%AE%20Kanununun%20y%C3%BCr%C3%B CrI%C3%BC%C4%9Fe%20girmesinden%20%C3%B6nce%20eski%20hukuka%20g%C3%B6re%20okurulmu%C5%9F,T%C3%BCrk%20Meden%C3%AE%20Kanunu%20h%C3%BCK%C3%BCmlerin e%20t%C3%A2bidir.> (Erişim Tarihi :20.04.2022)
17. Bearak J, Popinchalk A, Ganatra B, Moller A-B, Tunçalp Ö, Beavin C, et al. Unintended pregnancy and abortion by income, region, and the legal status of abortion: estimates from a comprehensive model for 1990–2019. The Lancet Global Health. 2020;8(9):e1152-e61.
18. Kırıcı P, Kaplan S, Karaçor T, Nacar MC. Aile planlaması danışmanlık hizmetinin kadınların kontraseptif yöntem tercihine etkisi: Bir tersiyer merkez deneyimi. Jinekoloji-Obstetrik ve Neonatoloji Tıp Dergisi. 2020;17(3):425-430.
19. Mutlu SN. Üreme çağı kadınlarının kontraseptif yöntem tercihlerine etki eden faktörlerin belirlenmesi: Hasan Kalyoncu Üniversitesi; 2020.
20. Öztaş Ö, Artantaş AB, Tetik BK, Yalçıntaş A, Yusuf Ü, Uğurlu M. 18-49 yaş grubu evli kadınların üreme sağlığı ve kontrasepsiyon hakkındaki bilgi, tutum ve davranışları. Ankara Medical Journal. 2015;15(2).
21. 1982 Türkiye Cumhuriyeti Anayasası. https://www.tbmm.gov.tr/anayasa/anayasa_2018.pdf. (Erişim Tarihi :20.04.2022)

Design of Thymol Loaded Dental In Situ Gels; In Vitro Evaluation Timol Yüklü Diş İn Situ Jellerin Tasarımı; In Vitro Değerlendirilmesi

Heybet Kerem POLAT ^{1*}, Sefa GÖZCÜ ², Hüseyin AKŞİT ³

¹ Republic of Turkey Ministry of Health, Turkish Medicines and Medical Devices Agency, Ankara, Turkey

² Erzincan Binali Yıldırım University, Faculty of Pharmacy Department of Pharmacognosy, Erzincan, Turkey

³ Erzincan Binali Yıldırım University, Faculty of Pharmacy, Department of Analytical Chemistry, Erzincan, Turkey

ABSTRACT

Objective: The aim of the study was to develop thymol thermosensitive in situ gels based on poloxamers in order to prolong dental contact time, control drug release, and enhance dental bioavailability.

Materials and Methods: Poloxamer 188 (P188) and poloxamer 407 (P407) were used in varying amounts to designed the in situ gels. Mucoadhesive excipient, like hydroxypropyl methylcellulose (HPMC), was transferred to the in situ gels to improve the formulation's ability to adhere to biological surfaces. For the created formulations, in vitro drug release, pH, clarity, and sol-gel transition temperature were all evaluated.

Results: The all of in situ gels gelation temperatures of the developed formulations range from 33 to 37°C, pH values are around 7, and syringeability is defined as the amount of force necessary to discharge each formulation from a syringe fitted with a 20-gauge needle. The quantities of P407 and HPMC with the preparations, decreasing in vitro burst release while also increasing the viscosity but every in situ gel formulation releases for six hours.

Conclusion:The results show that in situ gels containing P407 and P188 show promise for thymol dental application.

Keywords: Thymol, Poloxamer, In Situ Gel, Dental, Drug Delivery System, Hydroxypropyl methylcellulose

Alınış / Received: 29.07.2022 Kabul / Accepted: 28.11.2022 Online Yayınlanma / Published Online: 20.12.2022



Ö Z E T

Amaç: Bu çalışmanın amacı, dental temas süresini uzatmak, ilaç salımını kontrol etmek ve dental biyoyararlanımı arttırmak için poloksamerlere dayalı timol yüklü in situ jel formülasyonları geliştirmektir.

Gereç ve Yöntem: İn situ jellerin tasarımında Poloksamer 188 (P188) ve Poloksamer 407 (P407) farklı oranlarda kullanılmıştır. Jelin biyolojik yüzeylere yapışma yeteneğini geliştirmek için formülasyonlara hidroksipropil metilselüloz (HPMC) gibi muko-yapışkan bir yardımcı madde eklenmiştir. Oluşturulan formülasyonlar için in vitro ilaç salımı, pH, berraklık ve sol-jel geçiş sıcaklığı değerlendirilmiştir.

Bulgular: Geliştirilen formülasyonların jelleşme sıcaklıkları 33 ila 37°C arasında olduğu, pH değerlerinin yaklaşık 7 olduğu ve 20 numaralı iğne ile şırıngalanabilir olduğu görülmüştür. Preparat içerisindeki, P407 ve HPMC miktarları yükseldikçe, in vitro patlama salım azalırken aynı zamanda viskozitenin arttığı tespit edilmiştir, bütün in situ jel formülasyonlarının altı saat süre ile salım yaptığı belirlenmiştir.

Sonuç: Sonuçlar, timol içeren P407 ve P188 in situ jellerin timol diş uygulaması için umut verici olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Timol, Poloksamer, İn Situ Jel, Dental İlaç Taşıyıcı Sistemler, Hidroksipropil metilselüloz



1. Introduction

Up to 90% of people worldwide are affected by periodontal diseases, which are quite frequent. The least serious type of periodontal disease, gingivitis, is a nondestructive periodontal condition brought on by bacterial biofilm that grows on teeth close to the gingiva. The most typical indications of gingivitis are bleeding, sore, or swollen gums as well as bad breath.

Although gingivitis may be treatable, if it isn't treated, it can progress into a serious form of periodontal disease that can obliterate the connective tissue and bone that support the teeth, resulting in tooth loss in adults [1]. Periodontitis has been linked to infectious endocarditis, cardiovascular illness, diabetes mellitus, respiratory problems, and poor pregnancy outcomes.

Various approaches are often used to treat periodontal disorders, namely the use of systemic antibacterial and anti-inflammatory medications [2]. However, prolonged use of systemic medications has possible risks, such as superimposed infections and resistant strains [3]. The interest in finding novel anti-infective natural compounds originating from plant origin increased as many prevalent infections developed growing resistance to treatment medicines already in use. In light of this, thymol has intriguing properties for oral treatment. Thymus, Origanum, and Satureja are plants that contain thymol and carvacrol, have long been utilized, particularly in the treatment of a variety of medical ailments [4]. In diverse locations of the eastern Mediterranean, *Thymus pectinatus* (Lamiaceae) grows wild [5]. Thymol is the most common monoterpene phenol found in *Thymus* sp. volatile oils [6-8]. It possesses appropriate organoleptic qualities for oral administration as well as antibacterial [9, 10] and antioxidant [11] capabilities. It is volatile and only very little soluble in water. Through the avoidance of considerable gut and first pass metabolism and the extension of drug residency at the site of action, local thymol delivery to the mouth cavity has the potential to maximize its local impact. Thus, a highly promising method for treating periodontitis can be achieved by locally injecting thymol into a system while maintaining its chemical stability and improving its solubility.

The use of in-situ gel formulations, which first administer medications in a liquid dosage form before forming strong gels at the delivery site to prolong the time that the active ingredient remains in the body, is currently a novel method for doing so [3]. Thermosensitive systems, such as pluronic, have been investigated as an appropriate dosage form for injection into dental pockets among in-situ gelling polymers. In addition, semisolid formulations containing mucoadhesive polymers as carbopol, polycarbophil, and hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) have been suggested to enhance contact intimacy and lengthen the dose form's stay in the periodontal pocket [12].

In this study, thymol in-situ gels were created and evaluated as a local medication delivery system for treating periodontitis in pockets. These formulations included a thermosensitive polymer, " poloxamer 407 (P407) and poloxamer 188 (P188)," as well as a mucoadhesive one, " (HPMC)." The developed formulations were designed to stabilize thymol in order to ensure its effectiveness over the whole application period. In order to improve clinical efficacy and patient compliance, such formulations combine the benefits of simple administration, decreased frequency of administration, and prolonged drug release.

2. Material and Method

A phosphate buffered saline (PBS) tablet, hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) (4K), pluronic (poloxamer) 407 (P407) and pluronic poloxamer 188 (P188) were all received from Sigma in Steinheim, Germany.

Plant material

Thymus pectinatus specimens were gathered in Erzincan in 2021 and verified by Prof. Dr. Ali Kandemir of the biology department of Erzincan Binali Yildrm University's Faculty of Science and Art. The dried aerial parts of *T. pectinatus* were chopped into little pieces and powdered in a mill after drying in the shade.

Isolation procedure

The dried aerial parts of *T. pectinatus* (650 g) were hydro-distilled for 4 hours in 2 L of water using a Clevenger-type equipment with a water-cooled oil receiver to stop the formation of artifacts as a result of hydrodistillation overheating. The volatile oils were collected, dried over anhydrous sodium sulfate (Merck), and kept at refrigerator 4-6 °C. The volatile oils (5 mL) which was dissolved hexane:DMSO (9:1) were subjected to column chromatography (CC) over silica gel (200-300 mesh) and eluted with *n*-hexane:ethylacetate (100:0 → 50:50 v/v). This elution gave the fractions Fr. A (520 mg) and Fr. B (1240 mg). Fr. A (520 mg) was subjected to Sephadex LH-20 using MeOH and gave thymol (480 mg). Its structure was compared with the literature information [13] and was identified by means of spectral method [1D-NMR (Varian Mercury Plus 400 MHz, USA) (Figure 1-2).

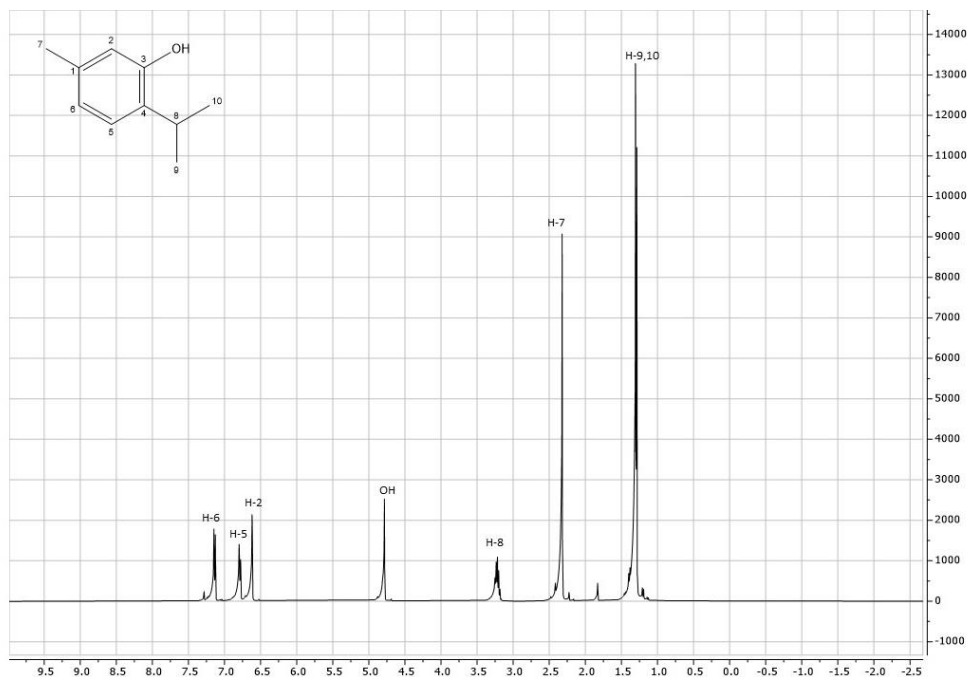


Figure 1: $^1\text{H-NMR}$ Spectra of Thymol

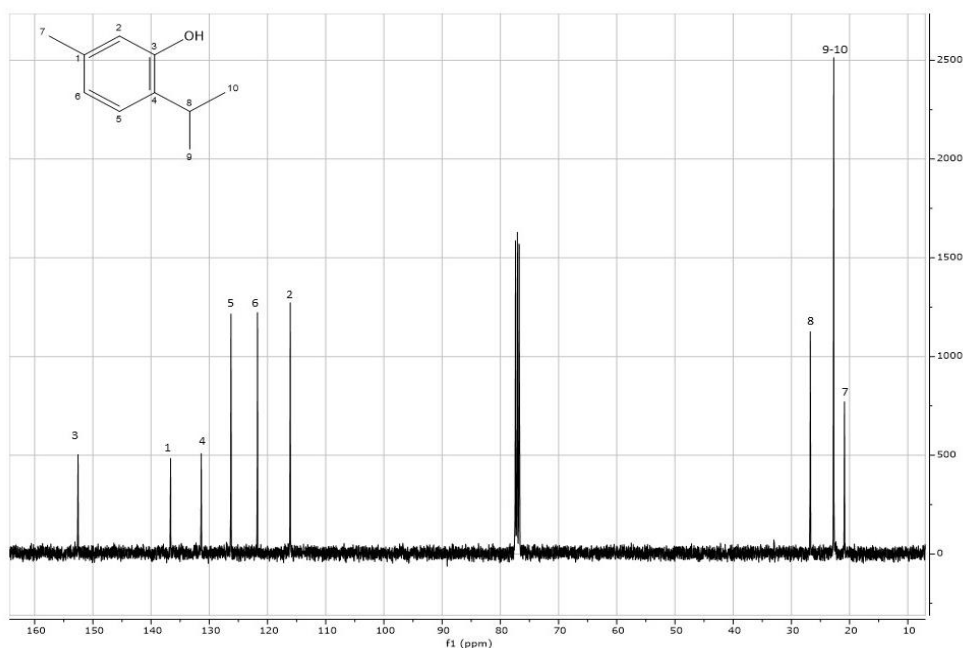


Figure 2: $^{13}\text{C-NMR}$ Spectra of Thymol

The process of making the in-situ gels

Various amount of P188 and P407 with mucoadhesive like HPMC were used to create thymol in situ forming gels. To create medicated in situ forming gels depending on weight, a modified cold method was applied [14]. The ingredients in the produced formulations are listed in Table 1.

In this method, P188 and P407 were dispersed in distilled water and then mixed for 1 hour. The partly dissolved poloxamer solutions were maintained in the refrigerator and sometimes mixed to get clear, kept in the refrigerator at 4°C overnight. During manufacture, additional amounts of the mucoadhesive polymers HPMC were combined with the total poloxamer content, each at concentrations of 0.5-1 % (w/w) (Table 1). Finally, 0.5% thymol was added.

Table 1: Ingredients in in situ gels

Code	Content of ingredients in each formulation (% w/w)				
	Thymol	Poloxamer 407	Poloxamer 188	HPMC (4K)	Water (qs)
FB-1	0.5	15	5	0	100
FB-2	0.5	15	5	0.5	100
FB-3	0.5	15	5	1	100
FB-4	0.5	16	5	0	100
FB-5	0.5	16	5	0.5	100
FB-6	0.5	16	5	1	100
FB-7	0.5	17	5	0	100
FB-8	0.5	17	5	0.5	100
FB-9	0.5	17	5	1	100

pH

The pH was measured with a pH meter (Germany's HANNA). Three measurements (n=3) were taken in total.

Clarity

After gelation, the clarity of the in situ gels was evaluated on a black background. [15].

Syringeability Study

Using the same technique as Maheshwari et al., the produced formulations' capacity to flow readily through a syringe with a 20 gauge needle was evaluated. A 20 gauge needle syringe was loaded with one ml of the cold gel before testing its flowability at standard handling pressure. It has been determined whether the formulation flows from the tip of the syringe number 20 used in dental applications [16]

Gelation Temperature

Each polymer solution (10 ml) was stirred with a magnetic stirrer in a water bath. The heated polymer solutions were swirled at 100 rpm at 1 °C/min (Thermomac-TM19). The temperature at which the magnetic bar stopped moving was marked as the gelling temperature. Each was subjected to three measurements.

Viscosity

The Brookfield, DV2T-RV Viscometer (Essex, UK) was used to gauge the viscosity of in situ gels using a CP 52 spindle. Viscosity at 10 rpm was also shown for comparison (Table 2). Each was subjected to three measurements [17].

Drug Content

To determine the amount of MHL in in situ gel, 1 mL of in situ gel was diluted in 1 mL of ethanol water mixture (Ethanol:Water) 50:50. Thymol concentrations were determined using a UV spectrophotometer (UVmini-1240 Shimadzu) at 278 nm [18, 19]. (Calibration of the method was carried out by measuring a series of standards of diluted stock solutions of Thymol. Absorbance values were plotted against Thymol concentrations over a range of 0,5-15 ppm).

$$\text{Drug Loading (\%)} = [\text{Amount to encapsulated thymol} / \text{Total Weighted}] \times 100$$

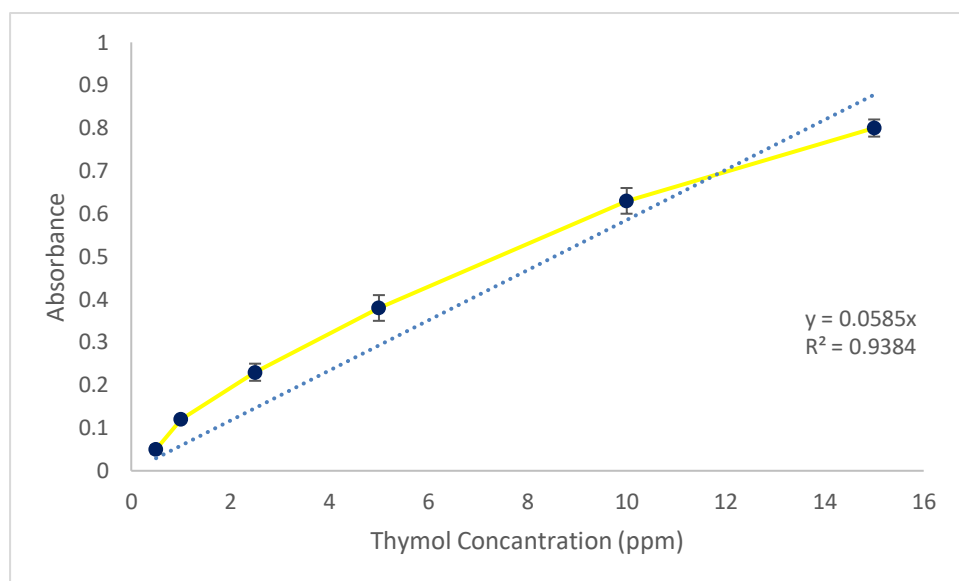


Figure 3:Thymol calibration curve with the calibration equation and correlation coefficient The linear regression equation Thymol was found as $y=0.0585x$ where y is the average and X is concentration (ppm), with a correlation 0.9384.

In Vitro Release Studies

The dialysis bag method was used to examine the in vitro release of thymol [20]. Closing the dialysis bags, adding 100 μ L of thymol, and depositing them at 37 °C in 25 mL of an isotonic phosphate buffer with a pH of 7.4 were the next steps. The sink condition is provided in this way. At several time point (15 minute, 30 minute, 60 minute, 120 minute, 180 minute, 240 minute, and 360 minutes), equal amounts of the medium were taken out and replaced with equal portions of the new buffer media. UV-vis spectrophotometer measurements of thymol concentrations were made. The amount of medication released from in situ gel over time was utilized to develop a thymol release profile. The experiment was repeated three times.

3.Results

Thymol Isolation from *T. pectinatus*

T. pectinatus was used to isolate thymol (Figure 1). Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy was used to determine the chemical structure. The isolated substance's spectrum data are as follows:¹H NMR (400 Hz), δ : 1.29 (6H, d, $J=6.8$ Hz, H-9, 10), 2.33 (3H, s, H-7), 3.22 (1H, m, $J=6.8$ Hz, H-8), 4.79 (1H, s, -OH), 6.62 (1H, s, H-2), 6.79 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-5), 7.14 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-4);¹³C NMR (400 Hz), δ : 20.9 (C-7), 22.72 (C-9,10), 26.75 (C-8), 116.39 (C-2), 121.95 (C-6), 126.47 (C-5), 131.52 (C-4), 137.08 (C-1), 152.44 (C-3). These data are similar to those previously reported The information is comparable to what has already been published [13].

Characterization of in situ gel formulations

All of the thymol in situ gel were observed to gel between 33 and 37 °C, making them suitable for dental administration. The data in Table 2 demonstrated that the pH of all formulations ranges between 7.01 to 7.11. It has been found to be syringable from a 20 gauge needle.

As a consequence, viscosity coefficients were obtained for all formulations at 10 rpm at both 25 °C and 37 °C. The results indicated that the viscosity values changed depending to the polymer concentrations (Table 2)

Table 2: Results of in situ gels' in vitro characterization analysis

Formulation	pH (\pm SD)	Gelation temperature ($^{\circ}$ C \pm SD)	Viscosity (centipoise) 25 $^{\circ}$ C	Viscosity (centipoise) 37 $^{\circ}$ C	Clarity
FB-1	7.02 \pm 0.01	37 \pm 0.7	224 \pm 19	6842 \pm 124	Clear
FB-2	7.05 \pm 0.02	37 \pm 0.3	263 \pm 25	7338 \pm 163	Clear
FB-3	7.01 \pm 0.03	36 \pm 0.1	287 \pm 32	7545 \pm 212	Clear
FB-4	7.05 \pm 0.02	35 \pm 0.2	268 \pm 19	7152 \pm 128	Clear
FB-5	7.1 \pm 0.08	35 \pm 0.4	296 \pm 38	7948 \pm 132	Clear
FB-6	7.01 \pm 0.02	35 \pm 0.6	312 \pm 29	8442 \pm 222	Clear
FB-7	7.03 \pm 0.07	34 \pm 0.4	310 \pm 31	9041 \pm 432	Clear
FB-8	7.02 \pm 0.05	34 \pm 0.8	324 \pm 35	10874 \pm 467	Clear
FB-9	7.11 \pm 0.03	33 \pm 0.2	344 \pm 43	11231 \pm 424	Clear

Drug Loading

All formulations have loading capabilities of more than 97 percent, according to tests (Figure 4). The 3% loss is thought to occur during the addition of Thymol. This reveals that polymer concentration has no effect on drug loading.

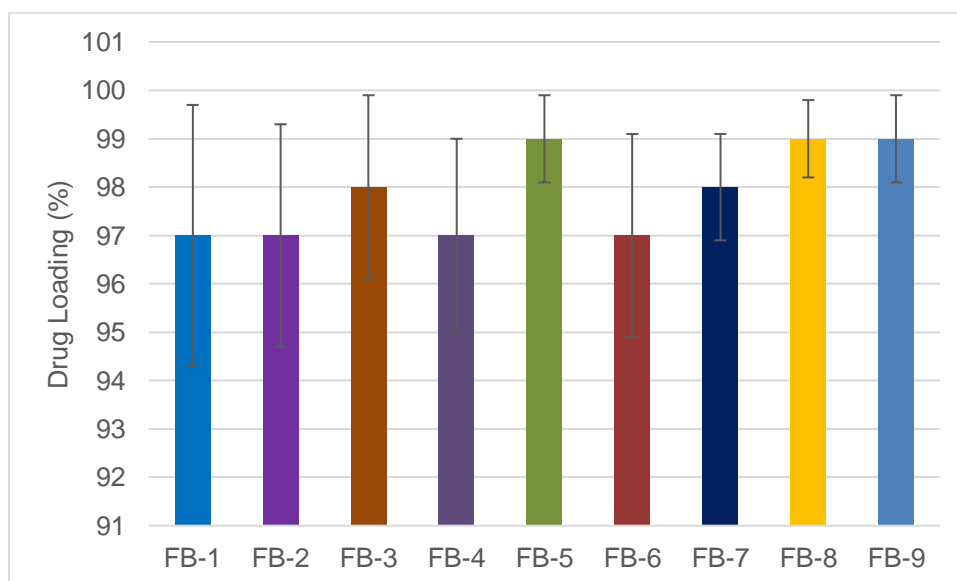


Figure 4: Drug loading given in percentages for Thymol (n=3)

Drug Release

In situ gels were submitted to in vitro drug release experiments at 37 °C and pH 7.4 isotonic phosphate buffer containing thymol (% 0.5). Figure 5 illustrates the in vitro release profiles of thymol. When the two-hour formulation releases are investigated, it is observed that as the HPMC concentration increases, the burst release drops to 56%. The burst impact is reported to approach 70% in formulations that do not include any HPMCs, such as FB-1. However, at the end of the sixth hour, 95 percent of the thymol had been released for all formulations. As a consequence, the sixth hour was considered as a final time the drug was administered.

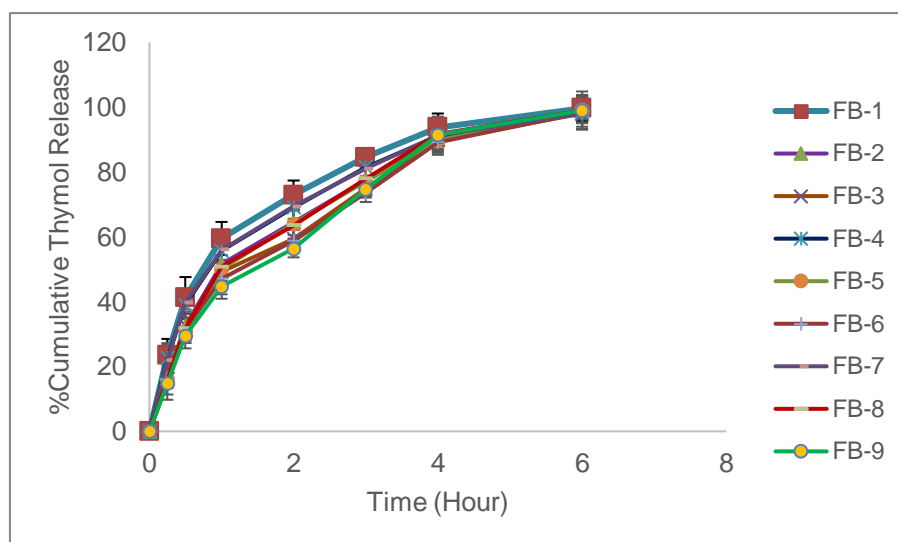


Figure 5: Cumulative release of thymol from in situ gel

4. Discussion and Conclusion

Two different temperatures—room temperature of 25°C and the administration dental pocket area temperature of 37°C—were used in the sol-gel transition studies to determine if the formulations were suitable for in-situ application as well as storage conditions [21]. Depending on the grade, thermoreversible gelation of poloxamer solutions has been seen, concentration, and other formulation factors utilized. When the two poloxamer grades are combined, the gelation temperature may be regulated to fall within an appropriate range (25-37°C) [22].

Two combinations of polymer grades were studied and used to produce in situ forming gels in order to choose formulations with an adequate sol-gel transition temperature and the lowest overall pluronic concentrations. The results of thymol in situ forming gel formulations containing P407/P188 (15/5, 16/5, and 17/5 percent, w/w) were remarkable. All of the thymol in situ forming gel formulations were observed to gel between 33 and 37 °C, making them suitable for dental administration. The data was demonstrated in Table 2.

The inclusion of mucoadhesive polymers, which allow formulations to adhere to the dental surface, would dramatically reduce dental formulation drainage from the dental surface. According to Table 3, the transition temperature of the in situ forming gels gradually reduced as the concentration of the mucoadhesive polymers raised from 0% to 1%. This was caused by the mucoadhesive polymer HPMC, which reduced the gelation temperature of the gels.

The ability of such bioadhesive polymers to attach to polyoxyethylene chains present in pluronic molecules may explain their ability to reduce gelation temperature. This promotes dehydration, which increases intermolecular hydrogen bonding and entanglement of adjacent molecules, resulting in dramatically greater gelation at lower temperatures [22].

Table 2 shows the in vitro characterization findings of in situ gels. The look of all formulations was clear. The pH of all formulations ranges between 7.01 to 7.11. Hypodermic syringes with gauges 19–27 are used for oral injection. An extremely viscous solution requires the use of a needle with a

smaller gauge [23]. Syringeability is defined as the amount of force necessary to discharge each formulation from a syringe fitted with a 20-gauge needle. The syringeability requirements are met by all formulations. The formulation, on the other hand, should have an optimal viscosity to readily infuse in the periodontal pocket.

As a consequence, viscosity coefficients were obtained for all formulations at 10 rpm at both 25 °C and 37 °C. The results showed that the viscosity values changed depending to the polymer concentrations (Table 2). This example demonstrates how polymer concentration has a substantial influence on viscosity. The results are compatible when the findings were examined in the literature [24].

When all in situ gel formulations are examined, it is seen that there is a drug loading over 97%. This situation is similar to the literature.

The release results from in situ gels show that when the concentration of P407 enhanced from 15% to 17%, the amount of medicine discharged decreased. These data reveal that as the quantity of P407 increased, the structure of the gel became a more formidable barrier to drug release. A decrease in the quantity and size of water channels and an enhance in the quantity and size of micelles inside the gel structure could be the mechanisms producing this improved resistance [25]. Higher viscosity and slower drug release are caused by more cross-links between surrounding micelles as a result of the smaller intermicellar distance [17,26].

In conclusion, multiple polymer solutions with varying concentrations of P407, P188, the mucoadhesive polymer HPMC, and thymol were prepared as part of the experiment. All of these formulations were tested in vitro (pH, clarity, gelation temperatures and syringeability). When the gelation temperatures were compared to the poloxamer concentrations, the gelation temperature decreased. The pH of all formulations, however, was found to be near to 7. It has been determined that the formulations would not irritate the dental. Furthermore, both formulations drug loading capabilities surpassed 97 %. Regardless, all formulations were made available for six hours. All formulations can be applied dentally. The dental surface is thought to increase the interaction of a drug with its bioavailability. Thymol is one example of such drug. In vitro characterization tests suggest that all formulations may be used to treat periodontitis effectively

Declaration of Ethical Code

In this study, we undertake that all the rules required to be followed within the scope of the "Higher Education Institutions Scientific Research and Publication Ethics Directive" are complied with, and that none of the actions stated under the heading "Actions Against Scientific Research and Publication Ethics" are not carried out.

References

- [1]. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. 2005. Periodontal diseases. *The Lancet*,366(9499),1809-20.
- [2]. Babu J, Ayyappan T, Vetrichelvan T. 2011. Novel site specific delivery system containing ofloxacin for the treatment of periodontal infection. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* .2,590-602.
- [3]. Garala K, Joshi P, Shah M, Ramkishan A, Patel J. 2013. Formulation and evaluation of periodontal in situ gel. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*.,3(1),29.
- [4]. Mueller-Riebau F, Berger B, Yegen O. 1995. Chemical composition and fungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.43(8),2262-6.
- [5]. Aksit H, Bayar Y, Simsek S, Ulutas Y. 2022. Chemical Composition and Antifungal Activities of the Essential Oils of Thymus Species (*Thymus pectinatus*, *Thymus convolutus*, *Thymus vulgaris*) Against Plant Pathogens. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*.,25(1),200-7.
- [6]. Braga PC, Dal Sasso M, Culici M, Bianchi T, Bordoni L, Marabini L. 2006. Anti-inflammatory activity of thymol: inhibitory effect on the release of human neutrophil elastase. *Pharmacology*.,77(3),130-6.

- [7]. Ivanovic J, Misic D, Zizovic I, Ristic M. 2012. In vitro control of multiplication of some food-associated bacteria by thyme, rosemary and sage isolates. *Food Control*,25(1),110-6.
- [8]. Tian H, Lai D. 2006. Analysis on the volatile oil in *Origanum vulgare*. *Zhong yao cai= Zhongyaocai= Journal of Chinese Medicinal Materials*,29(9),920-1.
- [9]. Nabavi SM, Marchese A, Izadi M, Curti V, Daglia M, Nabavi SF. 2015. Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: From farm to pharmacy. *Food Chemistry*,173,339-47.
- [10]. Patole VC, Chaudhari SP. 2021. Development of Thymol Microsponges Loaded in situ Gel for the Treatment of Periodontitis. *Current Drug Delivery*,18(1),71-87.
- [11]. Embuscado ME. 2015. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants—a mini review. *Journal of Functional Foods*,18,811-9.
- [12]. Nasra MM, Khiri HM, Hazzah HA, Abdallah OY. 2017. Formulation, in-vitro characterization and clinical evaluation of curcumin in-situ gel for treatment of periodontitis. *Drug Delivery*,24(1),133-42.
- [13]. Salager E, Stein RS, Pickard CJ, Elena B, Emsley L. 2009. Powder NMR crystallography of thymol. *Physical Chemistry Chemical Physics*,11(15),2610-21.
- [14]. Schmolka IR. Artificial skin I. 1972. Preparation and properties of pluronic F-127 gels for treatment of burns. *Journal of Biomedical Materials Research*,6(6),571-82.
- [15]. Ribeiro A, Figueiras A, Santos D, Veiga F. 2008. Preparation and solid-state characterization of inclusion complexes formed between miconazole and methyl- β -cyclodextrin. *AAPS PharmSciTech*,9(4),1102-9.
- [16]. Maheshwari M, Miglani G, Mali A, Paradkar A, Yamamura S, Kadam S. 2006. Development of tetracycline-serratiopeptidase-containing periodontal gel: formulation and preliminary clinical study. *AAPS PharmSciTech*,7(3),E162-E71.
- [17]. Alexandridis P, Hatton TA. 1995. Poly (ethylene oxide) \square poly (propylene oxide) \square poly (ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*,96(1-2),1-46.
- [18]. Zhang, Y., Zhang, Y., Zhu, Z., Jiao, X., Shang, Y., & Wen, Y. 2019. Encapsulation of thymol in biodegradable nanofiber via coaxial eletrospinning and applications in fruit preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(6), 1736-1741.
- [19]. Lade B, Kamdi A, Shanware A. 2021. Enhanced Antibacterial and Antioxidant Properties of Chitosan Films Blended with Gallic Acid and Incorporated with Thymol Silver Nanoparticles. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*,11(6-S),53-69.
- [20]. Karataş A, Sonakin O, KiliÇarslan M, Baykara T. 2009. Poly (ϵ -caprolactone) microparticles containing levobunolol HCl prepared by a multiple emulsion (W/O/W) solvent evaporation technique: Effects of some formulation parameters on microparticle characteristics. *Journal of Microencapsulation*,26(1),63-74.
- [21]. Pham DT, Phewchan P, Navesit K, Chokamonsirikun A, Khemwong T, Tiyaboonchai W. 2021. Development of metronidazole-loaded in situ thermosensitive hydrogel for periodontitis treatment. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*,18(4),510.
- [22]. Gilbert JC, Richardson JL, Davies MC, Palin KJ, Hadgraft J. 1987. The effect of solutes and polymers on the gelation properties of pluronic F-127 solutions for controlled drug delivery. *Journal of Controlled Release*,5(2),113-8.
- [23]. Benoliel, R., & Sharav, Y. 2008. Masticatory myofascial pain, and tension-type and chronic daily headache. *Orofacial pain and headache*. Edinburgh: Elsevier, 109-28.
- [24]. Fathalla ZM, Vangala A, Longman M, Khaled KA, Hussein AK, El-Garhy OH, et al. 2017. Poloxamer-based thermoresponsive ketorolac tromethamine in situ gel preparations: Design, characterisation, toxicity and transcorneal permeation studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*,114,119-34.
- [25]. Schmolka IR. 1991. *Poloxamers in the pharmaceutical industry*: CRC Press: Boca Raton, FL, USA.
- [26]. El-Kamel 2002. A. In vitro and in vivo evaluation of Pluronic F127-based ocular delivery system for timolol maleate. *International Journal of Pharmaceutics*,241(1),47-55.

Genomik Veri Setlerinin LASSO ve Elastik Net Regresyon Yöntemleri ile Analizi Analysis of Genomic Data Sets by LASSO and Elastic Net Regression Methods

Hikmet ORHAN ¹, Merve VERGİLİ ^{1*}

¹ Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim AD, Isparta, Türkiye



Ö Z E T

Amaç: Bu çalışmanın amacı büyük boyutlu genomik veri setlerinin değişken seçim yöntemleri kullanılarak daha küçük boyutlara indirgenip daha az maliyet ve zaman ile analizlerin gerçekleştirilebileceğini göstermektir.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada NCBI veri tabanından Bioconductor yardımı ile R programına aktarılan GDS4906 numaralı veri seti kullanılmıştır. Veri seti 10-katlı çapraz doğrulama ile LASSO ve Elastik Net regresyon yöntemleri kullanılarak analiz edilmiştir.

Bulgular: Veri seti LASSO regresyon yöntemi ile analiz edildiğinde veri setinden 5 adet gen seçilmiş olup, sonrasında farklı iterasyonlarda seçilen değişkenler ve değişken sayılarında farklılık gözlemlendiğinden kararlılık seçimi yöntemi uygulanarak 2 adet gen seçilmiş ve modelin R^2 değeri 0,85 olarak bulunmuştur. Aralıklı arama yöntemi kullanılarak uygulanan Elastik Net regresyon yönteminde 19 adet gen seçilmiş ve R^2 değeri 0,92 olarak bulunmuştur.

Sonuç: Elde edilen sonuçlara göre LASSO ve Elastik Net regresyon yöntemlerinin genomik veri setlerinde iyi bir performans gösterdiği anlaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Çoklu bağlantı, Elastik Net, Genomik Veri, LASSO

Alınış / Received: 10.11.2022 Kabul / Accepted: 29.11.2022 Online Yayınlanma / Published Online: 20.12.2022



ABSTRACT

Objective: The purpose of this study is to show that large-sized genomic datasets can be reduced to smaller sizes using variable selection methods, and that analysis can be performed with less cost and time.

Materials and methods: This study uses dataset number GDS4906, which is transferred from the NCBI database to the R program using Bioconductor. The dataset was analyzed using LASSO and Elastic Net regression methods with 10-fold cross-validation.

Results: When the dataset is analyzed using the LASSO regression method, 5 genes were selected from the dataset and 2 genes were selected and the R^2 values of the model were found as 0.85 by applying the determination selection method, as the variables and variable numbers selected in different iterations were then different. In the Elastic Net regression method applied using the interval search method, 19 genes were selected and R^2 were found as 0.92.

Conclusion: According to the results obtained, LASSO and Elastic Net regression methods have shown a good performance in the genomic datasets.

Keywords: Elastic Net, Genomic Data, Multicollinearity, LASSO



1. Giriş

Regresyon analizi, değişkenler arasındaki ilişkiyi modellemek ve keşfetmek amacıyla kullanılan istatistiksel bir tekniktir. Regresyonun mühendislik, fizik ve kimya bilimleri, iktisat, yaşam ve biyoloji bilimleri ve sosyal bilimler gibi birçok kullanım alanı olması sebebiyle en yaygın kullanılan istatistiksel teknik sayılabilmektedir. Regresyon yöntemlerinden çoklu doğrusal regresyonun sağlaması gereken varsayımlar vardır. Bunlardan biri regresyon modelindeki değişkenlerin birbirleri arasında ilişkinin olmamasıdır. Bu varsayımın sağlanmadığı durumlarda çoklu doğrusal bağlantı sorunu meydana gelir ve gerçektekinden önemli ölçüde farklı kestirim ile sonuçlanabilmektedir [1].

Çoklu doğrusal bağlantı sorunu sağlık, kimya ve biyoloji verilerinde yaygındır. Çoklu doğrusal bağlantı sorununa çözüm olarak kararlı tahminler yapabilmek amacıyla yanlı tahmin ediciler kullanılmaktadır. Genomik veri setleri içinde benzer işleve sahip genler arasındaki yüksek korelasyon nedeniyle çoklu doğrusal bağlantı sorunu olmasından dolayı bu çalışmada yanlı tahmin edicilerden Tibshirani tarafından (1996) önerilmiş olan LASSO, Zou ve Hastie (2005) tarafından önerilmiş olan Elastik Net regresyon yöntemleri kullanılmıştır.

Pripp ve Stanis (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, lezyon bölgesindeki 30 inflamasyon ve anjiyogenez biyobelirteçleri ile 93 hastanın seçilmiş klinik ve radyolojik özellikleri arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için LASSO regresyonu kullanılmıştır [2].

Kohannim ve arkadaşları tarafından (2012) Alzheimer Hastalığı Nörogörüntüleme Girişimi'nin (ADNI) bir parçası olarak taranan 729 denekten MRI'dan türetilen bir temporal lob hacmi ölçümleri kullanılarak, beyin görüntülemenin genom çapında ilişkilendirme çalışmalarında (GWAS) gen etkilerini LASSO regresyonu kullanılarak değerlendirmişlerdir [3].

Çiftsüren ve Akkol (2018), düzenleme yöntemlerini kullanarak iç yumurta kalitesi özelliklerinin tahmini ve değişken seçimini Ridge, Lasso ve Elastik Net regresyon yöntemlerini kullanarak yapmıştır. Çalışmada 117 Japon bildircini kullanarak yumurtaların iç kalite özellikleri yumurta sarısı ağırlığı ve yumurta akı ağırlığı; dış kalite özellikleri yumurta genişliği, yumurta uzunluğu, yumurta ağırlığı, şekil indeksi ve kabuk ağırlığı ölçümleri yapılmıştır. Veri setindeki çoklu doğrusallık olması sebebiyle Ridge, LASSO ve Elastik Net yöntemleri uygulanmıştır. Hem yumurta sarısı ağırlığı hem de yumurta akı ağırlığı için iki tahmin edici içeren LASSO regresyon yönteminin modelin tahmin doğruluğu açısından en iyi sonuçları verdiği bulunmuştur [4].

Cho ve ark (2009), romatoid artrit GWAS'da bütün bir genom boyunca hastalığa neden olan genleri tespit etmek için Elastik Net çoklu lojistik regresyon modelini kullanan basit bir aşamalı yaklaşım önermişlerdir. Elastik Net regresyon yöntemi, GWAS'da hastalığa neden olan SNP'leri birlikte tanımlamada bazı avantajlara sahip olduğunu belirtmişlerdir. Bu avantajlardan ilki, otomatik değişken seçimi ve sürekli daraltma aynı anda gerçekleştirilebilmekte; ikincisi, klasik çoklu doğrusal regresyonlarda çoklu bağlantı probleminde neden olabilen yüksek korelasyona sahip SNP'lerden oluşan grupları seçebilmekte; üçüncüsü, Elastik Net regresyonun daraltma özelliği sayesinde, SNP'ler ve genotipik olmayan faktörler arasındaki tüm etkileşim terimlerinin yanı sıra SNP ana etkilerinin de modele dahil edilmesini sağlamakta olduğunu belirtmişlerdir. Ek olarak, doğrudan kromozomlar arasında potansiyel SNP'leri aramak yerine, bu yaklaşımın GWAS'ta çok sayıda potansiyel SNP modelini işlemek için çok adımlı bir prosedür kullanarak verimli arama sağladığını bulmuş ve rapor etmişlerdir [5].

Bu çalışmada, NCBI veri tabanından alınan GDS4906 numaralı KOAH isimli büyük boyutlu genomik veri setinin R yazılımı kullanılarak LASSO ve Elastik Net regresyon yöntemleri ile daha basit ve başarılı modeller oluşturulabileceğinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

Çalışmada kullanılan veri seti NCBI (National Center for Biotechnology Information) Gene Expression Omnibus (GEO) veri tabanından alınmıştır (6). "Egzersiz eğitiminin kronik obstrüktif akciğer hastalığı hastalarına etkisi: vastus lateralis kası" başlıklı veri seti GSE27536 referans serisi altında bulunan GDS4906 numaralı, GPL570: Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array (HG-U133_Plus_2) mikroarrayleri ile ölçülmüş 54 hastanın gen ekspresyon verilerini içermektedir. Veri seti kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) olan hastalara 8 haftalık egzersiz öncesi ve sonrası alınan kas analizinden oluşmaktadır. İskelet kasının işlev bozukluğu, kasların zayıflaması, küçülmesi ve kaybı sonucu güç ve hareket kabiliyeti düşüklüğü KOAH'ın ayırt edilebilen sistemik etkilerindedir.

LASSO Regresyon Yöntemi

Yanlı tahmin yöntemlerinden LASSO (Least Absolute Shrinkage and Selection Operator) regresyon yöntemi Tibshirani tarafından 1996 yılından önerilmiştir. Ridge regresyon yöntemine benzeyen LASSO regresyon yöntemi katsayılar üstüne ceza terimi uygulanması ile bazı katsayıları sıfıra indirgeyerek çalışmaktadır. LASSO regresyon yönteminin tahmin edicisi eşitlik (1)'de verilmiştir.

$$\hat{\beta}_{lasso} = \arg \min_{\beta} \left\{ \sum_{i=1}^n (y_i - \beta_0 - \sum_{j=1}^p x_{ij} \beta_j)^2 + \lambda \sum_{j=1}^p |\beta_j| \right\} \quad (1)$$

Bu eşitlikte, n gözlem sayısı, y bağımlı değişken, p değişken sayısı, β_0 ve $\beta = (\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_p)$ bilinmeyen parametreler, $x_i = (x_{i1}, x_{i2}, \dots, x_{ip})^T$ bağımsız değişkenleri ve λ ceza terimini (ayar parametresi) ifade etmektedir. Ceza terimi (λ), daralma (shrinkage) miktarını kontrol eden parametredir ve λ 'nın aldığı değer ne kadar artarsa daralma miktarı aynı oranda artmaktadır [7]. Ceza terimi sıfırdan büyük bir değer ($\lambda > 0$) olmalıdır.

$l_1 = \sum_{j=1}^p |\beta_j|$ ifadesi ise ceza fonksiyonu olarak adlandırılmaktadır. Ceza fonksiyonun alacağı değer regresyon modeline girecek olan değişken sayısını etkilemektedir ve aldığı değer büyüdükçe modele giren değişken sayısı artmaktadır.

LASSO regresyon yöntemi katsayıları sıfıra indirgeyebilmesi sayesinde modelde daha az değişken bulunmasına imkân sağlayarak yorumlanması kolay ve net regresyon modelleri elde edilmesini

sağlamaktadır. Bu sayede çok fazla sayıda gözlem ve değişken barındıran büyük veri setlerinde (big data) ya da değişken sayısı gözlem sayısından büyük olan ($p > n$) verilerde fayda sağlamaktadır.

Elastik Net Regresyon Yöntemi

Zou ve Hastie (2005), LASSO regresyonun bazı eksikliklerine çözüm getirebilmek için Ridge ve LASSO regresyon yöntemlerinin birlikte kullanılması ile Elastik Net regresyon yöntemini önermişlerdir. Kısaca bu eksikliğe değinilecek olunursa; değişken sayısının gözlem sayısından büyük olduğu durumlarda ($p > n$) LASSO regresyon modele en fazla n değişken seçebilmekte ve bu durum kısıtlayıcı olabilmektedir. Ayrıca veri seti içerisinde aralarında yüksek korelasyona sahip değişken grupları bulunduğu durumlarda LASSO regresyon değişken grubu içerisinde yalnızca birini modele dahil eder ve diğer değişkenleri modelden dışarı atmaktadır.

Genomik veri setlerinde (gen ekspresyonu) benzer işlevlere sahip genler arasında yüksek korelasyon olmasından kaynaklı grup halinde modellenmesi gerekmektedir. Bu durumda LASSO regresyonun tahmin performansı Ridge regresyona göre daha düşük olduğu söylenmektedir. Bu sebeplerden ötürü Elastik Net regresyon yöntemi değişken seçimi ve katsayıları daraltma yaparken ilişkili değişken gruplarını da seçebilmektedir [8]. Elastik Net tahmin edicisi eşitlik (2)'de verilmiştir.

$$\hat{\beta}_{EN} = \arg \min_{\beta} \left\{ \sum_{i=1}^n (y_i - \beta_0 - \sum_{j=1}^p x_{ij} \beta_j)^2 + \lambda_1 \sum_{j=1}^p |\beta_j| + \lambda_2 \sum_{j=1}^p \beta_j^2 \right\} \quad (2)$$

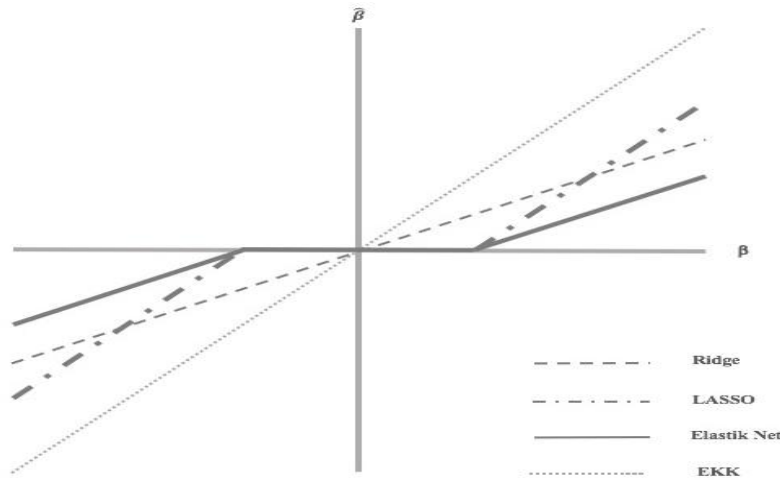
Bu eşitlikte yer alan $\lambda_1 \sum_{j=1}^p |\beta_j| + \lambda_2 \sum_{j=1}^p \beta_j^2$ Elastik Net tahmin edicisinin ceza terimini ifade etmektedir. Buradan anlaşıldığı üzere Ridge (λ_2) ve LASSO (λ_1) tahmin edicilerin birlikte kullanılmasından oluştuğu anlaşılmaktadır.

$\alpha = \lambda_2 / (\lambda_1 + \lambda_2)$, $y = (y_1, y_2, \dots, y_n)^T$ yanıt değişkeni, $X = (x_1 | \dots | x_p)$ model matrisi, $|\beta|^2 = \sum_{j=1}^p \beta_j^2$ ve $|\beta|_1 = \sum_{j=1}^p |\beta_j|$ olsun. Böylece t kısıtı altındaki $\hat{\beta}$ tahmin edicisi Eşitlik (3)'te verilmiştir.

$$\hat{\beta} = \arg \min_{\beta} |y - X\beta|^2, (1 - \alpha)|\beta|_1 + \alpha|\beta|^2 \leq t \text{ iken} \quad (3)$$

Bu eşitlikteki $(1 - \alpha)|\beta|_1 + \alpha|\beta|^2$ ifade LASSO ve Ridge ceza terimlerinin konveks birleşimi olan Elastik Net ceza terimini (ayar parametresi) ifade etmektedir. Ceza terimindeki α ifadesi ($0 \leq \alpha \leq 1$), $\alpha = 1$ iken Ridge regresyon yöntemine; $\alpha = 0$ iken LASSO regresyon yöntemine denk gelmektedir [8].

Ridge, LASSO ve Elastik Net tahmin edicilerin katsayılarına etkisi



Şekil 1: Ridge, LASSO ve Elastik Net tahmin edicilerin katsayılarına etkisi (Zou ve Hastie (2005))

Ridge, LASSO ve Elastik Net tahmin edicilerinin katsayılarına etkisi Şekil 1'de verilmektedir. 45°'lik noktali gri çizgi, referans çizgisi olarak kısıtlamasız EKK tahminini göstermektedir. Grafiğe

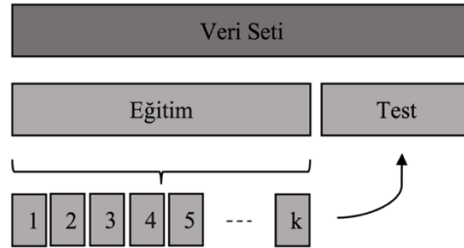
bakıldığında Elastik Net tahmin edicisinin LASSO gibi katsayıları sıfıra indirgeyebildiği ve Ridge tahmin edicisine paralel bir çizgide olduğu görülmektedir. Böylelikle Elastik Net regresyonun Ridge ve LASSO arasında bir ayarlama yapmakta olduğu anlaşılmaktadır.

Gruplama Etkisi (The Grouping Effect)

Bir veri setindeki gözlem sayısının değişken sayısından küçük olması durumuna literatürde gruplandırılmış değişkenler (grouped variables) denmektedir. Genomik veri setleri de bu tip bir veri olmasından dolayı Segal ve Conklin (2003) gruplandırılmış genleri bulmak amacıyla düzenleme kullanmasını önermişlerdir [8,9]. Gruplama etkisi (grouping effect), herhangi bir regresyon yönteminde aralarında yüksek korelasyon olan bağımsız değişkenlerin oluşturduğu değişken gruplarındaki regresyon katsayılarının eşit olması durumuna verilen isimdir. Elastik Net regresyon yönteminde gruplama etkisini ortadan kaldırmak amaçlanarak eş katsayılara aynı katsayı ataması yapılır [8].

Model parametrelerinin seçimi

LASSO regresyonda yalnızca λ parametresi belirlenirken, Elastik Net regresyonda α parametresinin de ayarlanması gerekmektedir. LASSO ve Elastik Net regresyon yöntemlerinin ayar parametresi (ceza terimi) seçimi çapraz doğrulama ile yapılabilmektedir.



Şekil 2: k-katlı çapraz doğrulama gösterim şeması

k-katlı çapraz doğrulama (n-folds cross validation) yönteminde veri seti ilk olarak eğitim ve test olarak ikiye ayrılmakta sonrasında eğitim seti k eşit parçaya bölünmektedir. Veri setinin büyüklüğüne göre k değeri belirlenmekte ve genellikle 5 veya 10 değerini almaktadır. Doğrulama yönteminde k adet bölünmüş olan gruplardan sırasıyla bir grup doğrulama grubu (validation group) olarak ayrı tutularak geriye kalan k-1 adet grup ile model oluşturulur ve daha sonra ayrı tutulan grup ile model test edilir. Oluşturulan k-1 modelin beklenen tahmin hataları karşılaştırılarak minimum hataya sahip olan model seçilir. Böylece doğru tahmin sonucunu veren ayar parametreleri belirlenmiş olmaktadır.

Kararlılık Seçimi

Cezalı regresyon modelleri daha az değişken (öznitelik) ile yüksek tahmin performanslı regresyon modelleri kurmaya yardımcı olmaktadır. Fakat iterasyon veya n-folds değeri değiştirildiğinde her seferinde farklı değişkenler seçiliyorsa, seçilen değişkenlerin kararlı olmadığı durumda modele olan güven azalmaktadır. Bu sebeple Meinshausen ve Bühlmann (2010), kararlılık seçimi (stability selection) yaklaşımını önermişlerdir [10].

Kararlılık seçimi, LASSO regresyon gibi değişken seçme yöntemlerinin yeniden örnekleme ile birleştirilerek uygulandığı bir yöntemdir. Yerine koyulmadan çekilmiş alt örneklere karşılık gelen değişken seçim yöntemi uygulanarak, her değişken için değişkenin uygun modele dahil edildiği alt örneklemlerin oranı olarak seçim olasılıkları tahmin edilebilmektedir. Tahmin edilen seçim olasılıkları yardımıyla kararlı değişkenler belirlenebilmektedir. Kararlılık seçimi, tahmini kararlı değişken setine yanlış şekilde değişken atayan I. Tip Hata oranlarını kontrol etmek için teorik bir çerçeve sağlamaktadır [10].

Her bir değişkenin düzenleme yolu (regularization path) boyunca seçim olasılığı, kararlılık yolu (stability path) olarak adlandırılmaktadır. Koordinat iniş algoritması yeniden örnekleme yöntemleri ve

düzenleştirme yolu için hesaplama verimliliği açısından kullanılabilir. Sill ve ark. koordinat iniş algoritmasını kullanılmak için öncelikle alt örnekleme ile alt kümeler oluşturulur, ardından koordinat iniş algoritması yardımıyla her alt örneklem için düzenleştirme yolları hesaplanır ve ortalaması alınarak bir kararlılık yolu hesaplanır [11].

Analiz için kullanılacak araç ve paketler

Sill ve ark. (2014), genomik veriler gibi yüksek boyutlu tahmin modelleri için R programının işlevselliğini geliştirmeyi amaçlayarak geliştirdikleri “c060” isimli R paketi kullanılmıştır [11]. Ek olarak R programında bulunan “glmnet”, “epsgo” ve “penalizedSVM” paketleri kullanılarak analize ayarlamalar yapılmıştır [12,13]. Ayrıca Bioconductor isimli açık kaynaklı yazılımlar geliştiren oluşum yardımıyla genomik verilerin analizi yapılabilmektedir [14]. NCBI veri tabanından alınan genomik veri setini analize uygun hale getirilebilmek için Bioconductor’de bulunan “GEOquery”, “Biobase” ve “hgu133plus2.db” isimli paketler kullanılmıştır.

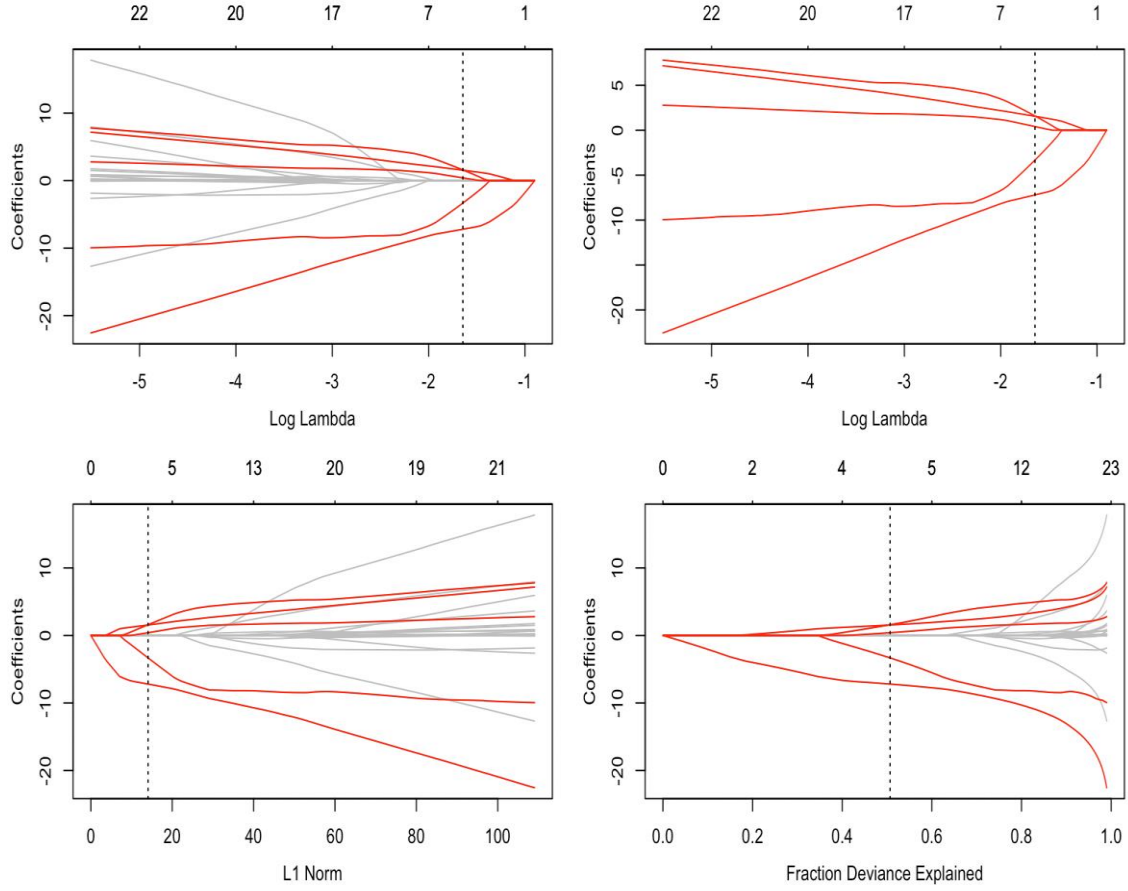
3. Bulgular

Bioconductor yardımıyla NCBI’den R programına çekilen genomik veri setinin, ekspresyon seti ve fenotip bilgilerini içeren veri matrisi birleştirilerek modelde kullanılacak olan veri oluşturulmuştur. Veri setinde, 30’u hasta ve 24’ü sağlıklı birey olmak üzere toplamda 54 hasta bulunmaktadır. Analize başlamadan önce oluşturulan veri setinin %80’i eğitim, %20’si test olarak ikiye ayrılmıştır. Bu çalışmanın amacı, gen ekspresyonunu içeren veri setleri üzerinde oluşturulan regresyon modellerine uygun genlerin bulunmasıdır. Veri setindeki hastalık durumu (disease state) regresyon modelinin bağımlı değişkeni olarak seçilmiştir. Hastalık durumu iki düzeyli bir değişken (health: 1, chronic obstructive pulmonary disease: 2) olmasından dolayı “glmnet” ve “cv.glmnet” fonksiyonlarında “family” argümanı “binomial” olarak seçilmiştir. Regresyon modeline en uygun LASSO ceza parametresi değerinin belirlenmesi için “cv.glmnet” fonksiyonu kullanılarak 10-katlı çapraz doğrulama (10-folds cross validation) yapılmıştır. Çapraz doğrulama sonucunda minimum lamda değeri $\lambda=0,193$ ($\log \lambda=-0,714$) olarak bulunmuştur. Optimum lamda değeri ile kurulan model sonuçları ve seçilmiş olan özelliklerin katsayı tahminleri Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1: KOAH veri seti için LASSO regresyon modelinin sonuçları

Gen İfadeleri	Gen Sembolü	Gen Adı	Katsayı Tahmini
Regresyon sabiti	-	-	26,499
200009_at	GDI2	GDP dissociation inhibitör 2	-3,328
203984_s_at	CASP9	Caspase 9	1,586
204491_at	PDE4D	Phosphodiesterase 4D	-7,197
222315_at	LOC100996756	Uncharacterized LOC100996756	1,549
232810_at	AIG1	Androgen induced 1	0,406
Lamda: 0,02 HKO: 3,026 HKOK: 1,739 HMO: 1,416 R²:0,85			

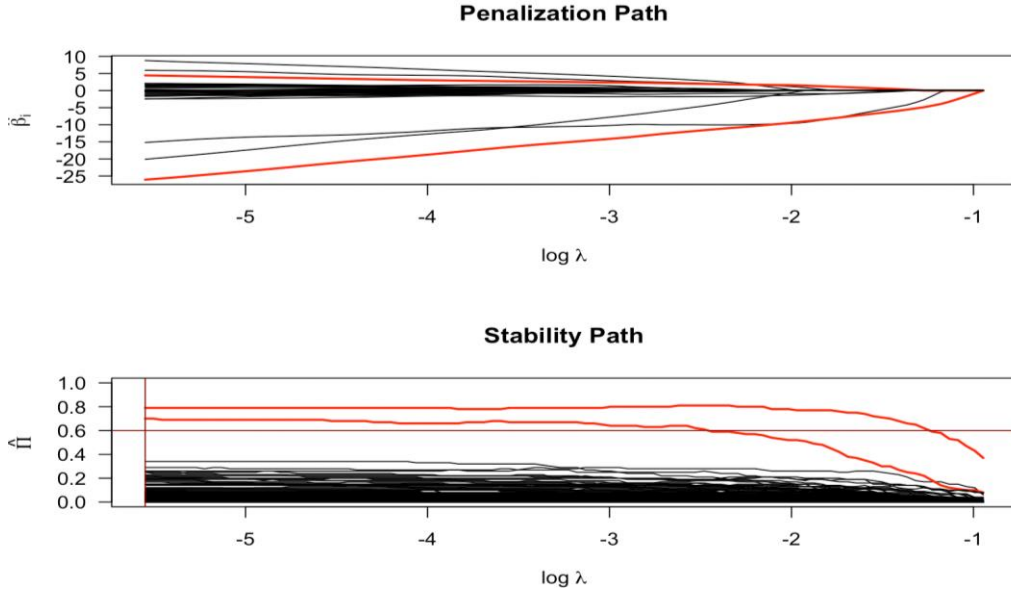
LASSO regresyon modeline göre veri setindeki 54676 adet özellik içerisinde 5'inin modele seçilmiş olduğu görülmektedir. GDI2, CASP9, PDE4D, LOC100996756 ve AIG1 gen sembollerine sahip özelliklerin katsayı tahminleri sırasıyla -3,328, 1,586, -7,197, 1,549 ve 0,406 olduğu görülmektedir. Kurulan LASSO regresyon modelinin HKO 3,026, R^2 değeri ise %85 (0,85) olarak bulunmuştur.



Şekil 3: KOAH veri setine uygulanan LASSO regresyonun katsayılarına etkisi

LASSO regresyon modeline göre seçilen özelliklerin regresyon katsayılarının ceza parametresine karşı göstermiş olduğu değişim Şekil 3'te verilmiştir. Grafikteki kırmızı çizgi, 10-katlı çapraz doğrulama ile belirlenen en düşük lamda değeriyle oluşturulan model tarafından seçilen sıfır olmayan katsayıları temsil etmektedir. Sol üstteki grafik bütün katsayıları içerirken sağ üstteki ise yalnızca seçilmiş olan katsayıları içermektedir. Sol alttaki grafik katsayıların L1 normu için katsayı yollarını gösterirken, sağ alttaki grafik ise açıklanan sıfır kısmi en çok olabilirlik sapmasının (the null partial log-likelihood deviance explained) kesrine göre katsayı yollarını göstermektedir [11]. Grafiklerde bulunan dikey çizgiler λ değerini temsil etmektedir. Her grafikte bir dikey çizgi olmasının sebebi minimum sapma ve minimum sapmanın bir standart sapması içindeki en büyük λ değerlerinin aynı çıkmasından kaynaklanmaktadır. λ 'nın değeri arttıkça yani log λ 'nın değeri düştükçe, modele girecek olan en fazla etki büyüklüğüne sahip özelliklerin sayısı azalmaktadır.

KOAH veri setinde bireylerin hasta veya sağlıklı olmalarının üstünde etkili olan prognostik özellikleri belirlemek amacıyla kararlılık seçimi yöntemi kullanılmıştır. Kararlılık seçiminin performansını arttırmak amacıyla LASSO regresyon modelinin kararlılık yolunu hesaplamak için R'da bulunan "c060" paketindeki "stabpath" fonksiyonu ve bu fonksiyonda yer alan "weakness argument" yardımıyla her özelliğe uygulanan cezalandırmanın üzerine ek olarak yeniden ağırlıklandırma ile "rastgele LASSO" olarak da geçen "ek rastgeleleştirme" yapılmaktadır [10,11]. Stabpath fonksiyonu, ilk olarak alt kümeleri oluşturur takiben "paralel" paketi yardımıyla paralel olarak kararlılık yolunu hesaplar ve stabsel fonksiyonu ile kararlı özellikler tahmin edilir. Tüm işlemler sonucunda PDE4D ve LOC100996756 genlerinin kararlı olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 4: KOAH veri setine uygulanan LASSO regresyonun katsayı ve kararlılık yolları

KOAH veri setine uygulanan LASSO regresyonun katsayı ve kararlılık yolları Şekil 4'te verilmiştir. Kırmızı çizgiler ile vurgulanmış olan iki özellik PDE4D ve LOC100996756 isimli kararlı gen ifadelerini belirtmektedir. Çapraz doğrulama (10-folds) ile kurulan LASSO regresyon modeli sonucunda 5 özellik seçilmiştir. Fakat kararlılık seçimi ile bu değişkenlerin tümünün çok kararlı olmadığı ve düzenleme (regularization) miktarı azaldığında ($\log \lambda$ azaldığında) modele giren özellik sayısının arttığı gözlemlenmektedir.

Veri setine Elastik Net regresyon uygulandığında LASSO regresyondan farklı olarak α ve λ parametre değerlerinin birlikte seçilmesi gerekmektedir. Bunun için aralıklı arama algoritması (the interval search algorithm) kullanılmıştır. KOAH veri setine 10-katlı çapraz doğrulama ile uygulanan Elastik Net regresyonun aralıklı arama çıktısının ilk 5 satırı Tablo 2.'de verilmiş ve tablonun altında optimal modelin sonuçları belirtilmiştir. Optimal modelde $\alpha=0,99$ ve $\lambda=0,07$ olarak tespit edilmiştir. Belirlenmiş olan ayar parametrelerine göre model kurulduğunda modelin R^2 değeri 0,92 olarak bulunmuştur.

Tablo 2: KOAH veri setine uygulanan Elastik Net regresyonun aralıklı arama çıktısı

Model	Alfa	Lamda	Sapma	Değişken Sayısı
1	0,734	0,086	0,163	40
2	0,853	0,081	0,161	25
3	0,532	0,078	0,158	77
4	0,131	0,530	0,183	234
5	0,608	0,086	0,161	57
Optimal	0,992	0,07	0,150	19
Optimal modelin; SH:0,033 R²: 0,92				

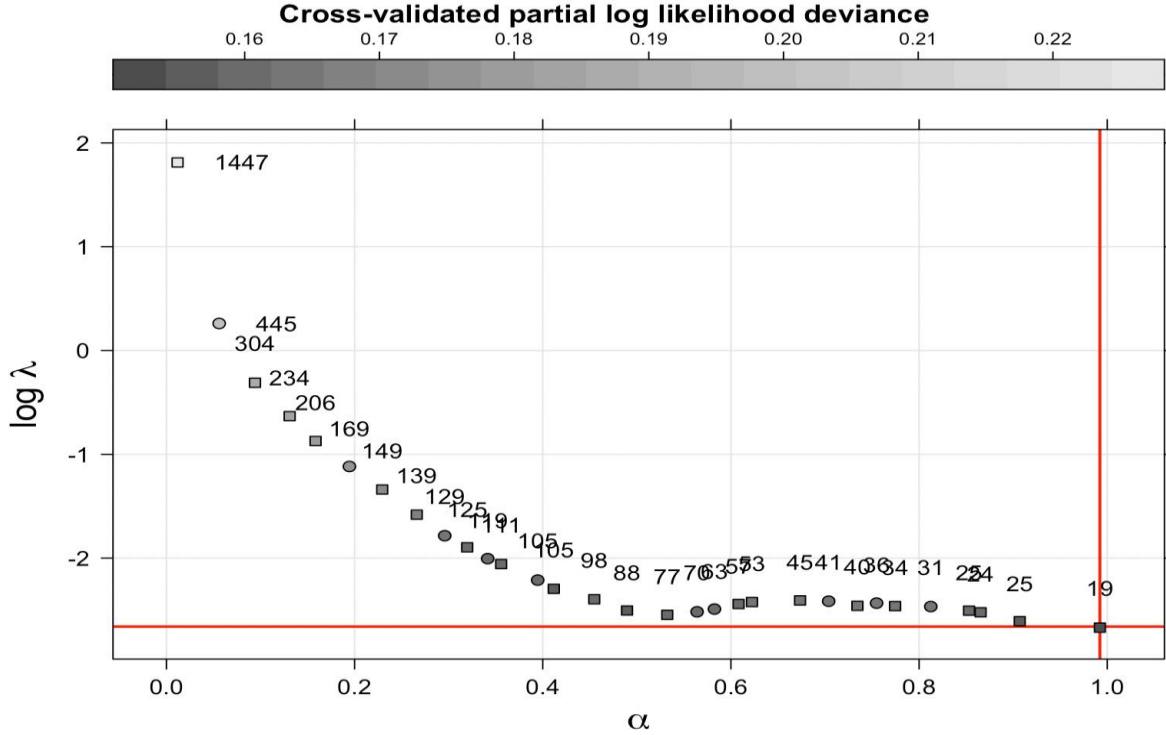
Tablo 3: KOAH veri seti için $\alpha=0,99$ ve $\lambda=0,07$ iken Elastik Net regresyonun katsayı tahmini

Gen İfadeleri	Gen Sembolü	Gen Adı	Katsayı Tahmini
(Intercept)	-	-	77,494
1561445_at	-	-	0,714
1563318_s_at	MAGIX	MAGI family member, X-linked	3,373
200009_at	GDI2	GDP dissociation inhibitor 2	-9,840
200704_at	LITAF	lipopolysaccharide induced TNF factor	-0,290
200862_at	DHCR24	24 dehydrocholesterol reductase	-1,751
204491_at	PDE4D	phosphodiesterase 4D	-12,297
205757_at	ENTPD5	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5	0,170
208112_x_at	EHD1	EH domain containing 1	-5,784
209077_at	TXN2	thioredoxin 2	0,847
217879_at	CDC27	cell division cycle 27	-0,242
218158_s_at	APPL1	adaptor protein, phosphotyrosine interacting with PH domain and leucine zipper 1	2,341
220786_s_at	SLC38A4	solute carrier family 38 member 4	-0,108
222315_at	LOC100996756	uncharacterized LOC100996756	2,127
222629_at	REV1	REV1, DNA directed polymerase	0,694
225420_at	GPAM	glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial	-0,377
227340_s_at	RGMB	repulsive guidance molecule family member b	0,281
229679_at	LOC101060443 ///C12orf76	uncharacterized LOC101060443/// chromosome 12 open reading frame 76	-0,254
231935_at	ARPP21	cAMP regulated phosphoprotein 21	-1,073
242842_at	-	-	0,209

Optimal model sonucunda 19 gen ifadesi seçilmiş ve katsayı tahminleri Tablo 3'te verilmiştir. Gen ifadelerine bakıldığında LASSO regresyon modeli yardımıyla GDI2, PDE4D ve LOC100996756 özelliklerinin Elastik Net regresyon modelinde de seçilmiş olduğu görülmektedir. PDE4D ve

LOC100996756 özelliklerinin, kararlılık seçimiyle de seçilmiş olması bu özelliklerin tutarlı ve kararlı olmasının bir göstergesi olarak yorumlanabilmektedir.

Elastik Net regresyonun α ve $\log \lambda$ parametrelerini ayarlamasının bir fonksiyonu olan çapraz doğrulanmış kısmi log-olabilirlik sapmasının grafiği Şekil 5'te yer almaktadır. Grafikteki yer alan noktalar α değerlerine karşılık gelmekte ve kısmi log-olabilirlik sapması azaldıkça α değerleri açık griden siyaha doğru gitmektedir. Kare sembol başlangıç noktalarını ve daire sembol ise iterasyon noktalarını temsil etmektedir. Her noktanın yanında yer alan sayılar ise o noktaya denk gelen α ve $\log \lambda$ parametreleri ile oluşturulan model sonucunda seçilen gen sayısını belirtmektedir. Kırmızı çizgilerin kesişimindeki nokta ise kayıp fonksiyonun minimum standart hatadaki nihai çözüm noktasını yani optimum modeli temsil eder. Bu nokta $\alpha=0,99$ ve $\lambda=0,07$ olduğu noktaya denk gelerek log-olabilirlik sapmasını minimum yapmaktadır. Bu noktadan 19 genin modele seçildiği tespit edilmektedir.



Şekil 5: KOAH veri seti Elastik Net regresyon modelinin α ve $\log \lambda$ parametrelerini ayarlamasının bir fonksiyonu olan çapraz doğrulanmış kısmi log-olabilirlik sapmasının görselleştirilmesi

4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada büyük boyutlu genomik veri setlerinin LASSO ve Elastik Net regresyon yöntemleri kullanılarak analiz edilebileceği, gen setlerinin daha küçük boyutlara indirgenebileceği ve hastalık durumunun daha az değişken ile tahmin edilebileceği gösterilmek istenmiştir. Bunun için NCBI veri tabanından Bioconductor yardımıyla alınan veri seti R programında bulunan "c060", "glmnet", "penalizedSVM" ve "epsgo" paketleri ile analiz edilmiştir.

Model parametrelerini ayarlamak ve optimum modele ulaşabilmek amacıyla 10-katlı çapraz doğrulama yöntemi kullanılmıştır. LASSO regresyon yönteminde ek olarak kararlı ve tutarlı değişkenlerin seçilebilmesi için kararlılık seçimi yöntemi uygulanmıştır. Elastik Net regresyon yönteminde iki parametre birden ayarlanacağından aralıklı arama algoritması kullanılarak α ve λ parametreleri belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar ile Elastik Net regresyon yönteminin katsayıları daraltma yaparken aynı zamanda ilişkili değişken gruplarını da seçebilmesinden dolayı genomik veri setlerinde iyi bir performans gösterdiği anlaşılmıştır.

Yaptığımız çalışma ile benzer bir çalışmada Kohannim ve arkadaşları, gen merkezli bir LASSO regresyon yaklaşımı kurarak beyin yapısı üzerindeki gen etkilerini keşfetmek istemişler ve büyük miktardaki genomik veriyi eleyerek verimli bir varyant seti oluşturmayı amaçlamışlardır. LASSO regresyon yönteminden faydalanarak her bir gen içindeki ilişkili SNP'ler (Single-nucleotide polymorphism) arasından seyrek SNP alt kümelerini seçerek çalışmalarını desteklemişlerdir. Genom çapında önemli 22 gen keşfetmişler ve LASSO regresyon ile bulunan SNP'lerin p değerlerine göre tek değişkenli GWAS ile bulunanlara göre önemli genler oldukları araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur [3]. Cho ve arkadaşları, genom çapında ilişkilendirme (GWAS) çalışmalarında birçok SNP arasından hastalığa neden olan genleri bulmanın çoklu bağlantı sorunu açısından zorluğu olmasından dolayı, çoklu bağlantıyı ele almaya izin veren değişken seçim yöntemi olan Elastik Net regresyonu kullanarak hastalığa neden olan SNP'leri aynı anda tanımlayan bir prosedür önermişlerdir. Birinci adımda, SNP'leri taramak amacıyla tek işaretli ilişkilendirme analizi (the single -marker association analysis) yapılmış ikinci adımda Elastik Net düzenlemesine dayalı çoklu ilişkilendirme analizi (the multiple-marker association) ile taranmıştır. Tarama adımında seçilen SNP'ler genellikle 6. Kromozom üzerinde yer alırken, Elastik Net yaklaşımı artan bir oranda diğer kromozomlar üzerindeki hastalık ile ilişkili olduğu düşünülen SNP'leri tanımlamıştır. Elastik Net regresyon yönteminin SNP belirlemede çeşitli avantajları olduğu belirtilmiştir. Otomatik değişken seçimi ve sürekli daraltma aynı anda gerçekleştirilmesi, çoklu doğrusal regresyonda çoklu bağlantı sorunu oluşturabilecek yüksek derecede ilişkili SNP'den oluşan grupları seçebilmesi, son olarak Elastik Net'in daraltma özelliği sayesinde SNP'ler ve genotipik olmayan faktörler arasındaki etkileşim terimlerini olduğu gibi SNP ana etkilerini de modele dahil etmeyi sağladığını belirtmişlerdir [5]. Yaptığımız çalışma ve yapılan çalışmalarda LASSO ve Elastik Net regresyon yönteminin değişken seçimi ve daraltma özelliği sayesinde genomik veri setleri üzerinde etkili olması konusunda benzerlik göstermiştir.

LASSO ve Elastik Net regresyon yöntemleri sağlık alanında çoklu bağlantı sorununa çözüm olarak farklı çalışmalarda da kullanılabilir.

Etik Beyanı

Bu çalışmada, "Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi" kapsamında uyulması gerekli tüm kurallara uyulduğunu, bahsi geçen yönergenin "Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiğine Aykırı Eylemler" başlığı altında belirtilen eylemlerden hiçbirinin gerçekleştirilmediğini taahhüt ederiz. Bu çalışma "DOĞRUSAL REGRESYONDA RIDGE, LASSO VE ELASTİK NET YÖNTEMLERİNİN SAĞLIK ALANINDA UYGULANMASI" isimli yüksek lisans tezinden uyarlanmıştır.

Kaynakça

- [1] Khuri, A. I. 2013. Introduction to Linear Regression Analysis. 4th edition by Douglas C. Montgomery, Elizabeth A. Peck, G. Geoffrey Vining. International Statistical Review.
- [2] Pripp, A. H., Stanišić, M. 2017. Association between biomarkers and clinical characteristics in chronic subdural hematoma patients assessed with lasso regression. PLoS ONE 12(11).
- [3] Kohannim, O., et al. 2012. Discovery and Replication of Gene Influences on Brain Structure Using LASSO Regression. Front Neurosci, 6(115).
- [4] Çiftsüren, N. M., Akkol, S. 2018. Prediction of internal egg quality characteristics and variable selection using regularization methods: ridge, LASSO and elastic net. Archives Animal Breeding, 61(3), 279-284.
- [5] Cho, S., Kim, H., Oh, S., Kim, K., Park, T. 2009. Elastic-net regularization approaches for genome-wide association studies of rheumatoid arthritis. BMC Proc., 3(7), 25.
- [6] KOAH Veri seti. 2013. NCBI, National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/GDSbrowser?acc=GDS4906> (Erişim Tarihi: 10.01.2022).
- [7] Tibshirani, R. 1996. Regression Shrinkage and Selection via the Lasso. Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology), 58(1), 267-288.
- [8] Zou, H., Hastie, T. 2005. Regularization and Variable Selection via the Elastic Net. Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology), 67(2), 301-320.

- [9] Segal, M., Dahlquist, K., Conklin, B. 2003. Regression approach for microarray data analysis. *J Computnl Biol.*, 10(6), 961–980.
- [10] Meinhausen, N., Bühlmann, P. 2010. Stability selection. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology)*,72(4), 417-473.
- [11] Sill, M., Hielscher, T., Becker, N., Zucknick, M. 2014. c060: Extended Inference with Lasso and Elastic-Net Regularized Cox and Generalized Linear Models. *Journal of Statistical Software*, 62(5), 1-22.
- [12] Becker, N., Werft, W., Benner, A. 2012. Benner A. penalizedSVM: Feature Selection SVM Using Penalty Functions. R package version 1.1. [http://CRAN.R-project.org/package= penalizedSVM](http://CRAN.R-project.org/package=penalizedSVM). (Erişim Tarihi: 11.10.2022).
- [13] Froehlich, H., Zell, A. 2005. Efficient Parameter Selection for Support Vector Machines in Classification and Regression via Model-Based Global Optimization. In *Proceedings of the International Joint Conference of Neural Networks.*, 31 Temmuz-4 Ağustos, Canada.
- [14] Bioconductor. <https://bioconductor.org> (Erişim Tarihi: 07.11.2022).

Sağlıklı Gençlerde Kısa Dönem Tüm Vücut Vibrasyon Egzersizinin Esneklik, Endurans ve Dinamik Denge Üzerine Etkisinin İncelenmesi: Randomize Kontrollü Çalışma

Examination of the Effect of Short-term Whole Body Vibration Training on Flexibility, Endurance and Dynamic Balance In Healthy Young People: A Randomized Controlled Study

Elif GUR KABUL ¹, Bilge BAŞAKCI ÇALIK ², Ummuhan BAŞ ASLAN ², Fatma TAŞKIN ^{2*}

¹ Uşak Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Fizyoterapi ve Rehabilitasyon Bölümü, Uşak, Türkiye

² Pamukkale Üniversitesi, Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksekokulu, Fizyoterapi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı, Denizli, Türkiye

ABSTRACT

Objective: To investigate the effect of short-term (3 weeks) whole body vibration training (WBVT) in healthy young people.

Materials and Methods: Seventy six healthy individuals (mean age=22.55±1.22 years, 41 females and 35 males) were included in the study. Participants were randomly divided into two groups as WBVT group (n = 41) and control group (n =35). WBVT, consisting of 14 exercises for the trunk and lower extremities, was applied to the WBVT group 3 times a week for 3 weeks. The control group did not receive any training. Flexibility, lower extremity endurance, trunk endurance and dynamic balance respectively; measured with sit and reach test, sit and stand test, Biering Sorensen tests, lateral bridge and shuttle, Y balance test. All measurements were made at baseline and at the end of the 3rd week.

Results: After 3 weeks, in WBVT group, curl up test (p=0.023), chair stand test (p=0.015) and Y balance test were performed on right anterior (p=0.003), right posteromedial (p=0.001), right posterolateral (p=0.001), left anterior (p=0.001), left posterolateral (p=0.000), and left posteromedial (p=0.000) aspects were significant. In the control group, the results in the right anterior (p=0.019) and left anterior (p=0.025) aspects of the Y balance test were significant. When the delta values were compared, the difference in the right (p=0.018) and left (p=0.006) posterolateral directions of the Y balance test; it was significant in favor of the WBVT group.

Conclusion: It was observed that short-term whole body vibration training had positive effects on trunk flexor endurance and dynamic balance in healthy young people. New insights into the use of musculoskeletal rehabilitation and sports training programs can be provided by WBVT. Further studies are needed to examine the effectiveness of whole-body vibration training by comparing different loads, volumes and types.

Anahtar Kelimeler: Vibration, Postural balance, Exercise training

Alınış / Received: 14.02.2022 Kabul / Accepted: 29.11.2022 Online Yayınlanma / Published Online: 20.12.2022



ÖZET

Amaç: Sağlıklı gençlerde kısa süreli (3 hafta) tüm vücut vibrasyon eğitiminin (TVVE) etkisini incelemektir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya, 76 sağlıklı birey (yaş ort=22,55± 1,22 yıl, 41 kadın 35 erkek) dahil edildi. Katılımcılar randomize olarak iki gruba ayrıldı (TVVE grubu n = 41 ve kontrol grubu n =35). Gövde ve alt ekstremiteye yönelik 14 egzersizden oluşan tüm vücut vibrasyon eğitimi, haftada 3 kez, 3 hafta boyunca TVVE grubuna uygulandı. Kontrol grubuna, herhangi bir eğitim uygulanmadı. Esneklik, alt ekstremita endüransı, gövde endüransı ve dinamik denge sırasıyla; otur uzan testi, otur kalk testi, Biering Sorensen testleri, lateral köprü ve mekik, Y denge testi ile ölçüldü. Tüm ölçümler, başlangıçta ve 3. haftanın sonunda yapıldı.

Bulgular: 3 hafta sonra, TVVE grubunda mekik testi (p=0,023), otur kalk testi (p=0,015) ve Y denge testinin sağ anterior (p=0,003), sağ posteromedial (p=0,001), sağ posterolateral (p=0,001), sol anterior (p=0,001), sol posterolateral (p=0,000) ve sol posteromedial (p=0,000) yönlerindeki sonuçları anlamlı iken; kontrol grubunda ise Y denge testinin sağ anterior (p=0,019) ve sol anterior (p=0,025) yönlerindeki sonuçlar anlamlı idi. Delta değerleri karşılaştırıldığında, Y denge testinin sağ (p=0,018) ve sol (p=0,006) posterolateral yönlerindeki fark; TVVE grubu lehine anlamlı idi.

Sonuç: Kısa süreli tüm vücut vibrasyon eğitiminin, sağlıklı gençlerde gövdenin fleksör yöndeki endüransı ve dinamik denge üzerine olumlu etkilerinin olduğu görüldü. TVVE ile kas-iskelet rehabilitasyonu ve spor eğitim programlarının kullanımına ilişkin yeni bilgiler sağlanabilir. Farklı yükleri, hacimleri ve türleri karşılaştırarak tüm vücut vibrasyon eğitiminin etkinliğini inceleyen daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Keywords: Vibrasyon, Postüral denge, Egzersiz eğitimi



1. Introduction

Whole body vibration training (WBVT) is a new biophysical method that provides systemic vibration signals with mechanical stimuli. For many years it has been advocated that low amplitude, low frequency vibration does not harm the human body and is an effective approach to increase muscle strength [1].

WBVT was first administered on astronauts to reduce muscle atrophy and loss of bone mass due to the lack of gravitational force in space. Recently, it has become a popular method to improve health with clinical use extended from athletes to rehabilitation [2].

The stimulating effect of vibration on muscle tone has been demonstrated during the administration of WBVT. Mechanical vibrations stimulate sensory receptors in the tendons and skin, and more importantly, in the muscle spindles. Activation of muscle spindles reveals a stimulating effect in alpha motor neurons that cause muscle contraction [3]. A myostatic tension reflex, called "Tonic Vibration Reflex", occurs in monosynaptic (Ia-afferents) and polysynaptic (II-afferents) pathways in muscle activity. With the application of vibration, the muscle starts to contract within a few seconds and the muscle contractions continue to increase until the end of the application. It has also been discussed that vibrational excitations enable the use of motor units that not normally used, in addition to this effect, increase neurotransmitter release via mechanosensors (primary afferents in muscle fibrils), thereby facilitating neuromuscular transmission [4].

WBVT also improves the complex interaction of postural control and agonist-antagonist muscles. Rees SS et al., in which WBVT was applied 3 times a week for 8 weeks, lower extremity muscle strength and postural balance were reported to increase [5]. WBVT stimulates proprioceptive pathways and increases positive feedback by creating wide sensory stimulation. Thus, this cycle can be used more effectively. As a result, isometric power increases. This mechanism shows that WBVT increases proprioception [6].

Although many studies in the literature indicate that WBVT interventions provide increased lower extremity muscle strength [7-9], to our knowledge, only one study investigated the effect of an 8-week WBVT on trunk muscle strength and dynamic balance, and the results were found to be positive. [7]. Muscle strength increases with the first week of training [8]. However, in the literature, there is a general information that at least 8 weeks of force training should be completed to be able to observe hypertrophic changes in muscle [11]. The lack of time is the most common reason for abandoning treatment programs [12,13]. Therefore, we planned to conduct this study within 3 weeks.

The aim of the study was to investigate short-term effects (3 weeks) of WBVT on muscular endurance, dynamic balance and flexibility in healthy young individuals.

2. Material and Method

Ethical approval of the study was obtained from XXX University local ethics committee at the board meeting dated 05.03.2019 and numbered 05. All procedures were undertaken in compliance with the Declaration of Helsinki. All individuals were informed verbally and informed consent forms were signed. This study was planned with randomized controlled parallel groups to evaluate adaptations after WBVT through comparisons with the control group. Training and evaluations before and after the treatment were done by different physiotherapists. The physiotherapist performing the evaluations was blinded to the two groups.

Participants

As a result of the power analysis, it was calculated that 80% power could be obtained with 95% confidence when at least 42 subjects (at least 21 per group) were included in the study. A total of 82 volunteers who met the inclusion criteria of the study were randomly separated into two groups as the WBVT group (n=41) and the control group (n=41). Six participants from the control group were excluded from the study because their final assessment could not be made. Thus the study was completed with a total of 76 participants, 41 in the WBVT group and 35 in the control group. The flowchart of the study design is shown in Figure 1.

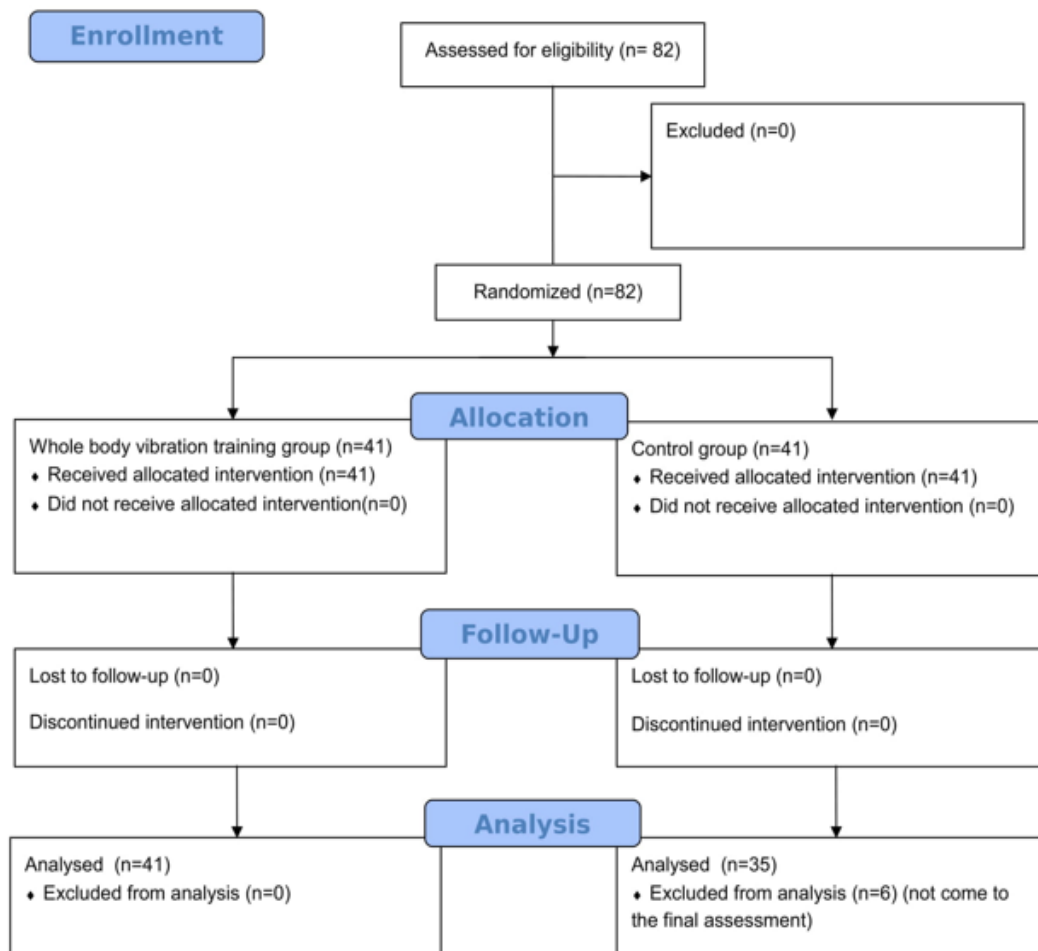


Figure 1: Flowchart of progress through the phases of the study

Inclusion criteria were voluntary participation and in the 20-30 age range.

Exclusion criteria were as follows: (a) regularly performing aerobic and strength training at least 3 days a week for the past three months. (b) the presence of, pulmonary, cardiovascular, neurological or orthopedic problems that may interfere with exercise. (c) any lower extremity surgery, history of severe trauma or fracture (d) diabetes, neuropathies, balance disorders and other conditions affect balance. (e) to have previously received WBVT training. (f) taking any medication that could affect neuromuscular performance during the previous two weeks. (g) failure to attend at least 75% of the program. Data from any participant showing symptoms and signs of injury, such as swelling, loss of function or pain, before or during data collection, were not included in the study, the participation of that individual was discontinued.

Evaluation

All assessments were performed at the beginning and at the end of the third week by the same experienced physiotherapist according to standard test protocols and under the same conditions. Before starting the tests, participants were allowed to adapt by the same therapist. Flexibility was assessed with the sit-and-reach test, trunk endurance was assessed with curl up, lateral bridge and Biering Sorensen tests, lower extremity endurance was assessed with the chair stand test and dynamic balance was assessed with the Y balance test. Instead of instrumental tests (such as isokinetic dynamometer) for evaluation, we chose to use functional tests because they involve activities of daily living.

Sit and Reach Test: The standard sized sit and reach test table was placed in full contact with the participant's bare soles of feet. The patients were asked to extend forward with their trunk without disturbing the full extension of their arms, fingers and knees. A value of >100 cm means that the participant can extend further than the toes (good flexibility), a value of <100 cm indicated that participant could not reach the toes (poor flexibility). The average of three trials was recorded [14].

Curl Up Test: The participant, who was in the supine hooked position on the mat with hands clamped on the neck was instructed to raise the trunk until the scapula was off the ground. The number of repetitions in 30 seconds was recorded [15].

Lateral Bridge Test: The participant lying on the non-dominant side was asked to form a support surface from the lower arm and elbow, to place the other hand on the waist and to bridge the hip and knee. The time of maintained balance, was recorded [16].

Biering Sorensen Test: The participant lay prone on the bed with the body suspended from the anterior superior of the spina iliaca, fixed at the level of the gastrocnemius muscle. The patient was instructed to hold the body parallel to the ground by clamping their hands on the chest and the time of maintaining this parallel position was recorded [17].

Chair Stand Test: The participant, sitting on a standard 43 cm high chair with her/his arms crossed at the shoulders, was asked to stand up and sit quickly for 30 seconds, and the number of repetitions at which the full take-off occurred was recorded [18].

Y balance test: Starting on the right foot, the subject was instructed to place the other foot with the toes pointing in three directions (anterior, postero-medial and posterolateral) while standing on one foot. Care was taken to maintain balance by placing the heel of the foot on the ground, and lightly extending the toes then bringing that foot to the standing foot without touching the ground. The test was repeated 3 times with 15 seconds rest intervals for each direction and the best score was recorded in cm [19].

Intervention

The WBVT was performed with Compex® Winplate (Germany). The training was conducted 3 times a week for 3 weeks and in each session, all 14 exercises were performed with one repetition. Rest intervals were given for at least 1 day between treatment sessions. The treatment sessions lasted approximately 30 minutes. Before starting the study, the participants were explained and shown the exercises in detail. The participants were told that they could leave the study at any time.

In Figure 2, the 14 exercises for the lower extremity and trunk, which were performed in a single session of the WBVT, are shown. The exercises included both extremities. Figure 3 shows the details of the WBVT program. Participants in the WBVT group stood barefoot, sat, or placed their foot or knee on a vibration platform. They were told to hold onto the handlebars for standing exercises. The training was carried out under the supervision of a physiotherapist. During the exercise, joint angles were measured with a goniometer to standardize the positions. In order to increase the effectiveness of the training, the frequency and duration of application were increased and the rest period was shortened as the weeks progressed. Training related injuries related were not reported. The rate of participation in the treatment sessions was 95%.

The participants in the control group were instructed to continue their daily activities and no training was given. Each week, telephone calls were made to check if they had started any exercise.


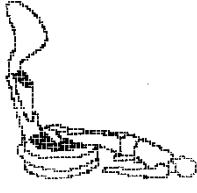





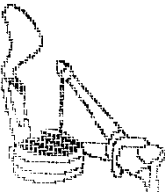






1st exercise		8th exercise	
2nd exercise		9th exercise (right)	
3rd exercise		10th exercise (left)	
4th exercise (right)		11th exercise (right)	
5th exercise (left)		12th exercise (left)	
6th exercise		13th exercise (right)	
7th exercise		14th exercise (left)	

Figure 2. Fourteen exercises performed in a single session of the WBVT

Table 1: The details of the whole body vibration training program

	Level I (first week)			Level II (second week)			Level III (third week)		
	Frequency (Hz)	Active (sec)	Rest (sec)	Frequency (Hz)	Active (sec)	Rest (sec)	Frequency (Hz)	Active (sec)	Rest (sec)
1 st exercise	30	30	30	30	40	30	35	40	25
2 th exercise	35	30	30	35	40	30	40	40	25
3 rd exercise	35	40	30	35	50	30	40	40	25
4 th exercise	35	30	30	35	40	30	35	40	25
5 th exercise	35	30	30	35	40	30	40	50	25
6 th exercise	30	30	30	30	35	30	40	40	25
7 th exercise	30	30	30	30	35	30	40	40	25
8 th exercise	35	40	30	35	40	30	35	35	25
9 th exercise	35	30	30	35	35	30	35	35	30
10 th exercise	35	30	30	35	35	30	35	35	25
11 th exercise	30	30	30	35	35	30	35	35	25
12 th exercise	30	30	30	35	35	30	40	40	25
13 th exercise	30	30	30	35	35	30	40	35	25
14 th exercise	30	30	30	30	35	30	40	35	25

Statistical analysis

Data were analyzed with SPSS 21.0 version package program. To determine whether continuous variables showed normal distribution, Kolmogorov-Smirnov Test was used. Paired sample t –test was used within groups and Independent t – test was used between groups, if the data distribution is normal. Wilcoxon signed rank test was used within groups and Mann Whitney U test was used between groups if the data is not normal. Continuous variables were given as mean \pm standard deviation, and categorical variables as numbers and percentages. Mann Whitney U test was used to analyze the demographic data of the groups and Wilcoxon test to analyze the data obtained at the beginning and at the end of the 3rd week. P value of <0.05 was considered statistically significant.

3. Results

The study included 76 healthy volunteers aged 20-30 years (41 females, 35 males, age: 22.55 ± 1.22 years, BMI: 22.06 ± 3.11 kg/m²). The WBVT group consisted of 41 participants (26 females, 15 males, age = 22.58 ± 1.11 years, BMI = 21.96 ± 3.12 kg/m²) and the control group consisted of 35 participants (19 females, 16 males, age = 22.51 ± 1.35 year, BMI = 22.18 ± 3.14 kg/m²).

The demographic data of the participants before the evaluations is shown in Table 1. There was no statistical difference between the demographic data of the groups ($p>0.05$).

Table 2: Demographic characteristics of the patients

Variables	WBVT Group (n=41) M±SD	Control Group (n=35) M±SD	p
Age (years)	22.58±1.11	22.51±1.35	0.961*
Body weight (kg)	63.97±13.71	66.31±14.64	0.514*
Height (m)	1.69±0.09	1.72±0.08	0.353*
BMI (kg/m²)	21.96±3.12	22.18±3.14	0.731*
Gender (female/male) (n)	26/15	19/16	0.420**

M=mean, SD=standard deviation, WBVT= Whole body vibration training, * Mann Whitney U test, **Chi-Square Test

When comparing the data at the beginning and end of the 3rd week, in the WBVT group; the difference in curl up ($p=0.023$), chair stand ($p=0.015$), right anterior ($p=0.003$), right posteromedial ($p=0.001$), right posterolateral ($p=0.001$), left anterior ($p=0.001$), left posterolateral ($p=0.000$), and left posteromedial ($p=0,000$) reach of Y balance test was significant, the difference in Biering Sorensen ($p=0.693$), sit and reach ($p=0.539$) and lateral bridge ($p=0.120$) test was not significant ($p=0.671$). In the control group, the difference in right anterior ($p=0.019$) and left anterior reach ($p=0.025$) of Y balance test was significant and no significant difference was found in all other tests ($p>0.05$) (Table 2).

The Delta values of the participants were calculated by subtracting the pre-treatment result from the post-treatment result. When the delta values were compared, difference was significant in right ($p=0.018$) and left ($p=0.006$) posterolateral dynamic balance in favor of WBVT group (Table 3).

Table 3: The comparison of baseline and the end of the 3rd week results of groups

Variables	WBVT Group (n=41)			Control Group (n=35)		
	Baseline	End of 3 weeks	p*	Baseline	End of 3 weeks	p*
	M±SD	M±SD		M±SD	M±SD	
Sit-And-Reach Test (cm)	99.65±11.32	100.02±10.84	0.539	99.25±11.65	99.75±11.35	0.321
Curl Up Test (repetition)	14.87±4.49	16.09±5.41	0.023	14.05±4.19	14.57±4.46	0.253
Side Bridge Test (sec)	39.05±21.18	42.34±23.16	0.120	34.29±20.35	35.81±17.97	0.325
Biering Sorensen Test (sec)	81.49±33.24	83.08±36.20	0.693	70.60±37.16	71.36±37.42	0.707
Chair Stand Test (repetition)	17.75±4.07	18.80±4.51	0.015	16.82±4.12	17.48±4.75	0.132
Y Balance Test (cm)						
Right-anterior	65.02±6.89	67.31±6.46	0.003	71.09±9.33	73.78±8.12	0.019
-posteromedial	99.15±13.18	102.56±12.43	0.001	101.45±12.11	104.01±10.39	0.072
-posterolateral	98.20±12.65	101.69±11.34	0.001	102.22±13.78	102.07±13.14	0.963
Left -anterior	65.37±7.98	68.01±7.08	0.001	71.14±10.04	73.91±6.54	0.025
-posteromedial	98.99±12.82	102.35±11.96	0.000	101.48±11.75	103.21±10.47	0.116
-posterolateral	97.28±12.37	101.12±12.04	0.000	100.42±13.87	101.58±13.65	0.421

Significant values are shown in bold

M=mean, SD=standard deviation, WBVT= Whole body vibration training, *Wilcoxon Test

Table 4: The comparison of delta values with groups

Variables	WBVT Group (n=41) Δ M \pm SD	Control Group (n=35) Δ M \pm SD	p
Sit-And-Reach Test (cm)	0.36 \pm 3.94	0.50 \pm 3.67	0.777**
Curl Up Test (repetition)	1.21 \pm 2.96	0.51 \pm 2.63	0.402**
Side Bridge Test (sec)	3.29 \pm 13.23	1.51 \pm 12.05	0.495**
Biering Sorensen Test (sec)	1.59 \pm 23.90	0.76 \pm 17.12	0.770**
Chair Stand Test (repetition)	1.04 \pm 2.58	0.65 \pm 2.53	0.509*
Y Balance Test (cm)			
Right -anterior	2.29 \pm 4.60	2.68 \pm 5.66	0.942**
-posteromedial	3.40 \pm 6.78	2.55 \pm 7.01	0.184**
-posterolateral	3.49 \pm 6.05	-0.15 \pm 7.13	0.010**
Left -anterior	2.63 \pm 4.75	2.77 \pm 6.58	0.914*
-posteromedial	3.35 \pm 4.36	1.72 \pm 7.05	0.240*
-posterolateral	3.84 \pm 5.96	1.16 \pm 8.23	0.104*

Significant values are shown in bold

M=mean, SD=standard deviation, WBVT=Whole body vibration training, Δ =Posttreatment-pretreatment.

* Independent Samples Test, ** Mann-Whitney U Test.

4. Discussion and Conclusion

The aim of this study was to investigate the effects of short-term (3 weeks) WBVT on flexibility, muscular endurance and dynamic balance in healthy young individuals. The results showed that WBVT had an effect on trunk flexor endurance, lower extremity muscle strength and dynamic balance.

In this study, the flexibility changes of the subjects were evaluated by sit and reach test. When we examined the flexibility scores of the WBVT group and control group, the difference between the pre and post-treatment scores of the WBVT and the control group was not found to be statistically significant. The WBVT group scores increased between the pre and post-treatment results in terms of the flexibility values. There were no changes in the control and post-treatment scores. According to the literature, there are findings showing that acute WBVT might increase flexibility [20,21].

Although many studies in the literature have indicated WBVT interventions provide increased lower extremity muscle strength, to the best of our knowledge, only one study has focused on trunk muscle strength [7-9].

In studies investigating EMG signal response, rectus abdominus muscle activity during WBVT, leg muscle activities were obtained more and with significant activation at high frequency (15 Hz, maximum of 40 Hz, respectively) [22,23]. In the current study, in which high frequency (30 35 Hz) was used, according to the curl up and chair stand test results, an increase in abdominal and lower extremity muscle strength was obtained. Muscles often need more energy to maintain balance on unstable ground [24]. The increase in strength in these muscle groups can be considered to be the result of the need to meet this energy deficiency.

In addition, OxyHb concentrations of the motor, prefrontal, and somatosensory cortex areas, were shown to be higher at higher frequencies (27 Hz) in the study by Choi DS et al. [25]. Increased

concentration of OxyHb results in arteriolar vasodilation in that area and increases blood flow [26]. Maikala et al. reported that a high frequency (27 Hz) of WBVT increased cerebral oxygenation responses in the prefrontal cortex [27]. Cerebral oxygenation and an increase in blood flow are closely associated with greater neural activation [26]. In the light of this information, the results obtained from the current study using high frequency can be considered to have been caused not only by changes in the motor unit, but also by adaptations at a high cortical level contributing to this development.

In the literature related to this subject, it has been emphasized that by enhancing alpha motor neuron activation with WBVT training, a significant improvement can be achieved in coordination and proprioception, and consequently increased postural control [28].

Muscle strength is defined as an important component in the development of proximal stabilization in dynamic trunk activity [29]. Improvements in strength are not only achieved by an increase in muscle mass, but neural adaptation is one of the main components of early development of strength [30]. The increase in the extension directions of the Y balance test may be the likely result of progression in postural control due to the development of neural adaptation in parallel with the increase in trunk strength. In addition, this relationship with lower extremity muscle strength has been shown in previous studies [31,32].

When the literature is examined related to healthy individuals, Schlee G et al. [11] reported that a single session of WBVT treatment had positive effects on static balance and Maeda N et al. [9] reported that WBVT applied for 8 weeks had positive effects on dynamic balance. In line with the literature, Y balance test results of our study showed that WBVT could improve dynamic balance. Dynamic balance plays an important role in providing daily living activities for example; running, climbing stairs and walking is an important element in demonstrating complex movement skills. Stability control is dynamic when a person is on the move. Therefore, dynamic balance has a more complex mechanism than static balance [33].

When the studies to date are examined, to the best of our knowledge, there is only one study focusing on the long-term effects of WBVT on trunk muscle and dynamic balance. This is a study conducted by Maeda et al. [9] on WBVT with a vibration frequency of 30 Hz applied to recreationally active, healthy, young males 3 days a week for 8 weeks. As a result of this study, a difference was determined in the flexor muscles of the trunk muscles and only in anterior extension of the Y balance test. In the current study, improvements were determined in both trunk flexor muscle strength and all extensions of the Y balance test in 3 weeks. Also, the delta values WBVT were showed improvement in both right and left posterolateral dynamic balance. It is important that WBVT makes this difference in a short period of three weeks. Similarly, in both studies, there was no improvement in muscle groups other than flexor muscles of the trunk. This suggests that this training method requires additional methods for the development of trunk extensor and lateral muscle strength.

It is an important result of the current study that trunk flexor muscle strength and dynamic balance were achieved in the short period of 3 weeks, rather than 8 weeks. This difference in a shorter time can be attributed to the gradual increase in the vibration frequency in this study and to the sedentary nature of the sample group, because it is thought that the performance changes usually caused by WBVT are mainly dependent on the vibration model and the duration of the intervention [34].

The strong aspect of this study were that the results of WBVT were compared with a control group, power analysis was applied when forming the sample, the sample size was sufficient and the age range was narrow.

A limitation of the study is that the results can only be generalized to healthy young adults and the experimental results do not fully reflect the situation of healthy individuals at different ages. A second limitation was the lack of monitoring of the duration of maintaining the effectiveness of WBVT.

As a result of this study, short-term WBVT was seen to have increased trunk flexor muscle strength and dynamic balance. However, short-term WBVT did not improve the extensor and lateral muscle strength of the trunk. In order to maintain lumbar health in healthy individuals and for more independent mobility of individuals in daily life, extensor and lateral muscle groups should be strong in addition to flexor muscle strength for stabilization of the trunk [35]. Therefore, it can be recommended that additional exercises can be planned for the development of the trunk extensor and flexor muscles

of individuals receiving WBVT. New insights into the use of musculoskeletal rehabilitation and sports training programs can be provided by WBVT.

In further studies, there is a need for studies in which short-term efficacy is examined by comparing different load, volume and types of whole body vibration training in controlled studies.

Declaration of Ethical Code

In this study, we undertake that all the rules required to be followed within the scope of the "Higher Education Institutions Scientific Research and Publication Ethics Directive" are complied with, and that none of the actions stated under the heading "Actions Against Scientific Research and Publication Ethics" are not carried out.

References

- [1] Cardinale M, Bosco C. 2003. The use of vibration as an exercise intervention. *Exerc Sport Sci Rev*, 31(1), 3-7.
- [2] Marin PJ, Rhea MR. 2010. Effects of vibration training on muscle strength: a meta-analysis. *J Strength Cond Res*, 24(2), 548-556.
- [3] Nishihira Y, Iwasaki T, Hatta A. et al. 2002. Effect of whole Body Vibration Stimulus and Voluntary Contraction on Motoneuron Pool. *Adv Exerc Sports Physiol*, 8(4), 83-86.
- [4] Jordan MJ, Norris SR, Smith DJ, Herzog W. 2005. Vibration Training: An Overview of the Area, Training Consequences, and Future Considerations. *J Strength Cond Res*, 19(2), 459-466.
- [5] Rees SS, Murphy AJ, Watsford ML. 2008. Effects of wholebody vibration exercise on lower-extremity muscle strength and power in an older population: a randomized clinical trial. *Phys Ther*, 88(4), 462-470.
- [6] Roelants M, Delecluse C, Verschueren SM. 2004. Whole-body-vibration training increases knee extension strength and speed of movement in older women. *J Am Geriatr Soc*, 52(6), 901-908.
- [7] Maeda N, Urabe Y, Sasadai J, Miyamoto A, Murakami M, Kato J. 2016. Effect of Whole-Body-Vibration Training on Trunk-Muscle Strength and Physical Performance in Healthy Adults: Preliminary Results of a Randomized Controlled Trial. *J Sport Rehabil*, 25(4), 357-363.
- [8] Issurin VB, Tenenbaum G. 1999. Acute and residual effects of vibratory stimulation on explosive strength in elite and amateur athletes. *J Sports Sci*, 17, 177-182.
- [9] Schlee G, Reckmann D, Milani TL. 2012. Whole body vibration training reduces plantar foot sensitivity but improves balance control of healthy subjects. *Neurosci Lett*, 506(1), 70-73.
- [10] Coburn JW, Housh TJ, Malek MH. et al. 2006. Neuromuscular responses to three days of velocity-specific isokinetic training. *J Strength Cond Res*, 20(4), 892-898.
- [11] Sakamoto A, Sinclair PJ. 2006. Effect of movement velocity on the relationship between training load and the number of repetitions of bench press. *J Strength Cond Res*, 20(3), 523-527.
- [12] Dishman RK. 1982. Compliance/adherence in health-related. exercise. *Health Psychol*, 1, 237-267.
- [13] Martin JE, Dubbert, PM. 1982. Exercise applications and promotion in behavioral medicine: current status and future directions. *J Consult Clin Psychol*, 50, 1004-1017.
- [14] Bös K, Schlenker L, Büsch D. et al. 2009. *Deutscher Motorik-Test 6-18 (DMT 6-18)*. Hamburg: Feldhaus.
- [15] Juker D, McGill S, Kropf P, Steffen T. 1998. Quantitative intramuscular myoelectric activity of lumbar portions of psoas and the abdominal wall during a wide variety of tasks. *Med Sci Sports Exerc*, 30, 301-310.
- [16] McGill SM, Childs A, Liebenson C. 1999. Endurance times for low back stabilization exercises: clinical targets for testing and training from a normal database. *Arch Phys Med Rehabil*, 80, 941-944.
- [17] Biering-Sorensen F. 1984. Physical measurements as risk indicators for low-back trouble over a oneyear period. *Spine*, 9, 106-119.

- [18] Jones CJ, Rikli RE, Beam WC. 1999. A 30-s ChairStand Test as a measure of lower body strength in community-residing older adults. *Res Q Exerc Sport*, 70, 113-119.
- [19] Kinzey SJ, Armstrong CW. 1998. The reliability of the Star-Excursion Test in assessing dynamic balance. *J Orthop Sports Phys Ther*, 27, 356-360.
- [19] Fagnani Federica BS, Giombini Arrigo MD, Di Cesare Annalisa MD et al. Pigozzi, Fabio MD. 2006. The Effects of a Whole-Body Vibration Program on Muscle Performance and Flexibility in Female Athletes, *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*, 85(12), 956-962. doi: 10.1097/01.phm.0000247652.94486.92
- [21] Cochrane DJ, Stannard SR. 2005. Acute whole body vibration training increases vertical jump and flexibility performance in elite female field hockey players. *British Journal of Sports Medicine*, 39, 860–865. <https://doi.org/10.1136/bjism.2005.019950>.
- [22] Chen B, Dong Y, Guo J, Zheng Y, Zhang J, Wang X. 2019. Effects of Whole-Body Vibration on Lumbar-Abdominal Muscles Activation in Healthy Young Adults: A Pilot Study. *Med Sci Monit*, 25, 1945-1951.
- [23] Simsek D. 2017. Different fatigue-resistant leg muscles and EMG response during whole-body vibration. *J Electromyogr Kinesiol*, 37, 147–154.
- [24] Cug M, Wikstrom EA, Golshaei B, Kirazcı S. 2016. The effects of sex, limb dominance and soccer participation on knee proprioception and dynamic postural control. *J Sport Rehabil*, 25, 31–39.
- [25] Choi DS, Lee HJ, Shin YI, Lee A, Kim HG, Kim YH. 2019. Modulation of Cortical Activity by High-Frequency Whole-Body Vibration Exercise: An fNIRS Study. *J Sport Rehabil*, 19, 1-6.
- [26] Villringer A, Chance B. 1997. Non-invasive optical spectroscopy and imaging of human brain function. *Trends Neurosci*, 20(10), 435-442.
- [27] Maikala RV, King S, Bhambhani YN. 2005. Cerebral oxygenation and blood volume responses to seated whole-body vibration. *Eur J Appl Physiol*, 95(5-6), 447-453.
- [28] Rendos NK, Jun HP, Pickett NM. et al. 2017. Acute effects of whole body vibration on balance in persons with and without chronic ankle instability. *Res Sports Med*, 25(4), 391-407.
- [29] McGill SM, Karpowicz A, Fenwick CM. 2009. Ballistic abdominal exercises: muscle activation patterns during three activities along the stability/mobility continuum. *J Strength Cond Res*, 23, 898-905.
- [30] Behm DG. Neuromuscular implications and applications of resistance training. 1995. *J Strength Cond Res*, 9, 264-274.
- [31] Srivastav P, Nayak N, Nair S, Sherpa LB, Dsouza D. 2016. Swiss ball versus mat exercises for core activation of transverse abdominis in recreational athletes. *J Clin Diagn Res*, 10, 1-3.
- [32] Thorpe JL, Ebersole KT. 2008. Unilateral balance performance in female collegiate soccer athletes. *J Strength Cond Res*, 22, 1429-1433.
- [33] Chaudhari AM, Andriacchi TP. 2006. The mechanical consequences of dynamic frontal plane limb alignment for non-contact ACL injury. *J Biomech*, 39(2), 330–338.
- [34] Delecluse C, Roelants M, Diels R, Koninckx E, Verschuere S. 2005. Effects of whole body vibration training on muscle strength and sprint performance in sprint-trained athletes. *Int J Sports Med*, 26, 662-668.
- [35] Borghuis J, Hof AL, Lemmink KAPM. 2008. The importance of sensory-motor control in providing core stability: Implications for measurement and training. *Sport Med*.

Evde Yaşayan Yaşlı Bireylerde Yalnızlık ve Yaşam Doymu İlişkisi

The Relationship between Loneliness and Life Satisfaction in Elderly People Living at Home

Fatma ARPACI¹ , Ülkü POLAT^{2*} , Giray KOLCU³ 

¹ Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Sosyal Hizmet Bölümü, Ankara, Türkiye

² Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Hemşirelik Bölümü, Ankara, Türkiye

³ Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıp Eğitimi ve Bilişimi Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye



ÖZET

Amaç: Bu çalışma evde yaşayan yaşlı bireylerde yalnızlık ve yaşam doymu ilişkisini değerlendirmek amacıyla yapılmıştır.

Materyal ve Metot: Tanımlayıcı tipteki araştırmanın örneklemini Ocak-Mart 2020 tarihleri arasında Ankara'da evde yaşayan 60 yaş ve üzerindeki 354 yaşlı birey oluşturmuştur. Verilerin toplanması "Birey Bilgi Formu", "Yaşlılar İçin Yalnızlık Ölçeği", "Yaşam Doymu Ölçeği" kullanılmıştır.

Bulgular: Bu çalışmada erkek, evli ve eğitim düzeyi düşük olan yaşlı bireylerde yalnızlık düzeyinin daha fazla olduğu belirlendi ($p < 0,05$). Gelir düzeyi düşük, sosyal güvencesi olmayan ve sosyal medya kullanmayan yaşlılarda ise yaşam doymununun daha düşük olduğu belirlendi ($p < 0,05$). Ayrıca yaşlı bireylerin yalnızlık ölçeği duysal yalnızlık alt boyutu puan ortalamaları ile yaşam doymu ölçeği puan ortalamaları arasında zayıf derecede, pozitif yönde ($r: 0.384, p: 0.000 < 0.05$) ve sosyal yalnızlık alt boyut puan ortalaması ile ise orta derecede negatif yönde anlamlı bir ilişki olduğu bulunmuştur ($r: -0.437, p: 0.000$).

Sonuç: Bu çalışma yaşlı bireylerde yaşam doymu ve yalnızlık düzeyinin bazı tanıtıcı özelliklere göre farklılık gösterdiğini ve sosyal yalnızlık ve emosyonel yalnızlığın yaşam doymu ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda yaşlı bireylere yönelik sosyal desteklerin artırılması ve sosyal medyanın bilinçli ve güvenli kullanımına teşvik edilmesi önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Yaşlı, Yalnızlık, Yaşam Doymu, Emosyonel Yalnızlık, Sosyal Yalnızlık

Alınış / Received: 25.11.2022 Kabul / Accepted: 14.12.2022 Online Yayınlanma / Published Online: 20.12.2022



ABSTRACT

Objective: This study was conducted to evaluate the relationship between loneliness and life satisfaction in elderly individuals living at home.

Materials and Methods: The sample of the descriptive study consisted of 354 elderly individuals aged 60 and over, living at home in Ankara between January and March 2020. "Individual Information Form", "Loneliness Scale for the Elderly", "Life Satisfaction Scale" were used to collect data.

Results: In this study, it was determined that the level of loneliness is higher in male, married and elderly individuals with low education level ($p<0,05$). It was determined that the life satisfaction was lower in the elderly who had low income, did not have social security and did not use social media. ($p<0,05$). In addition, there is a weak, positive ($r:0.384, p:0.000<0.05$) relationship between the mean scores of emotional loneliness sub-dimension of the elderly individuals and the mean scores of the life satisfaction scale, and a moderately negative relationship with the mean score of the social loneliness sub-dimension ($r:-0.437, p:0.000$).

Conclusion: This study showed that the level of life satisfaction and loneliness in elderly individuals differ according to some the descriptive characteristics and that social and emotional loneliness are associated with life satisfaction. In line with these results, it is recommended to increase social support for elderly individuals and to encourage the conscious and safe use of social media.

Keywords: Elderly, Loneliness, Life Satisfaction, Emotional Loneliness, Social Loneliness.



1. Giriş

Günümüzde yaşlı nüfusu sağlık ve teknolojideki gelişmelere, eğitim düzeyinin yükselmeye ilişkin sağlık bilincinin artmasına ve doğurganlığın azalması ve yaşam beklentisinin artmasına bağlı olarak dünyada hem de ülkemizde giderek artmaktadır [1]. Dünya Sağlık Örgütü nüfusun yaşlanma hızının geçmişe göre çok daha hızlı olduğunu ve 2030 yılına kadar dünyadaki her 6 kişiden 1'inin 60 yaş ve üzerinde olacağını, 2050 yılına kadar, 60 yaş ve üzeri dünya nüfusunun iki katına çıkacağını (2,1 milyar), 80 yaş ve üzeri kişilerin sayısının ise 2020 ile 2050 yılları arasında üç katına çıkması ve 426 milyona ulaşması beklendiğini belirtmektedir [2]. Ülkemizde Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre 65 yaş ve üstü nüfusun 2021 yılında 8 milyon 245 bin 124 kişi olduğu ve yaşlı nüfus oranının 2025 yılında %11,0, 2030 yılında %12,9, 2040 yılında %16,3, 2060 yılında %22,6 ve 2080 yılında %25,6 olacağı öngörüldüğü belirtilmektedir [3].

Yaşlanma evrensel normal bir fizyolojik yönünün yanı sıra kronolojik ekonomik, sosyal ve psikolojik yönleri ve sorunları da olan bir süreçtir [4,5]. Yaşlılık döneminde bireyler emeklilik, eş, arkadaş ve diğer aile üyelerinin ölümü, kuşaklar arası değer çatışmaları, kronik hastalıklar, temel gereksinimlerini karşılamada başkalarına bağımlı hale gelme, sosyal rollerinin değişimi, statü ve ekonomik kayıplar, ailevi ve toplumsal çevrenin sınırlı olması, kişisel ilişkilerin ve ilgi alanlarının kısıtlı olması, sosyal paylaşım alanlarının kaybı gibi birçok sorunlar yaşayabilmektedir. Bu sorunlarla ilişkili olarak bağlı yaşlı bireylerde yalnızlık ve sosyal izolasyon sorunu sıklıkla görülebilmektedir. Özellikle yaşlı bireylerde sosyal ilişkiler ve bilişsel fonksiyonları azalınca yalnızlık hissi artmaya başlar [6,7].

Yalnızlık he yaştan insanın yaşayabileceği olumsuz bir duygu durumu olup, bireyin sosyal ilişkilerinden ya da desteklerden sübjektif hoşnutsuzluğu olarak tanımlanmaktadır. Yalnızlığın fiziksel ve mental sağlıkta bozulmaya neden olarak yaşam kalitesini olumsuz olarak etkilediği, depresyon ve intihar davranışı için önemli bir risk oluşturduğu belirtilmektedir[6,8]. Yapılan çalışmalarda yalnızlığın yaşlılarda yaşam doyumunu etkilediği gösterilmiştir[9,10]. Yaşlılarda algılanan sosyal desteğin azalması ve yalnızlığını artmasının yaşam doyumunu ve yaşam kalitesini olumsuz etkilediği belirtilmektedir [11,12].

Yaşam doyumunu, bireyin evlilik, iş gibi yaşam alanlarını olumlu veya olumsuz olarak kendi belirlediği kriterlere dayalı öznel bir değerlendirmesidir[13]. Bir başka tanıma göre ise ruh sağlığının bilişsel bileşenlerini yansıtmak için kullanılan öznel bir ölçüsüdür [14]. Yaşam doyumunun özellikle yaşlı bireylerde sosyal yaşama katılımlarını etkileyen önemli bir faktör olduğu belirtilmektedir [15]. Yaşam doyumunu, yaşam kalitesini ölçmek için önemli göstergelerden biridir ve yalnızca fiziksel ve ruhsal sağlığı değil, aynı zamanda insanların yaşamını kapsamlı bir şekilde değerlendirebilen sosyal uyum yeteneğini de içermektedir [13].

Yaşlı bireylerde yaşam doyumunun artırılması yerinde ve başarılı yaşlanmayı olumlu etkilemektedir. Başarılı yaşlanma yaşlı bireyde sakatlık ve hastalığın olamaması, fiziksel ve zihinsel işlevselliğini sürdürmesi böylece toplumda üretken, yaşam doyumunu yüksek ve sosyal katılımın devam etmesini ifade eder[16]. Yerinde yaşlanmada günümüzde sıklıkla kullanılan bir kavram olup kişinin kendi evinde ve toplumda güvenli, bağımsız ve rahat yaşaması ve değişen ihtiyaç ve koşullara adapte olarak yaşamını sürdürebilmesini ifade eder [16,17]. Bu tanımlardan anlaşılacağı gibi evde yaşayan yaşlı bireylerde yaşam doyumunun artırılması ve yalnızlığın azaltılmasında başarılı ve yerinde yaşlanmanın sağlanması önemlidir. Bu çalışma bu konu hakkında sağlık profesyonellerinde farkındalık yaratmak ve yaşlıları özellikle yaşam doyumunu ve yalnızlık açısından değerlendirmelerinin önemini vurgulamak amacı ile yapılmıştır.

2. Materyal ve Metot

Araştırmanın Tipi: Çalışma tanımlayıcı tipte olup, Ocak-Mart 2020 tarihleri arasında evde yaşayan yaşlılar ile yapılmıştır.

Araştırmanın Yeri ve Örneklemi: Çalışmanın evrenini Ankara'da evde yaşayan 60 yaş ve üzeri yaştaki bireyler oluşturmaktadır. Araştırmanın örneklemini ise gönüllülük esasına dayalı olarak, sağlıklı bilgi alınabileceği değerlendirilen ve olasılıklı olmayan kolayda örnekleme yöntemi ile ulaşılan 354 yaşlı birey oluşturmuştur.

Veri Toplama Araçları: Verilerin toplanması "Birey Bilgi Formu", "Yaşlılar İçin Yalnızlık Ölçeği", "Yaşam Doyumu Ölçeği kullanılmıştır.

Birey Bilgi Formu: Bu form araştırmacı tarafından literatürden yararlanılarak oluşturulmuştur [8-17]. Bu formda yaşlı bireylerin yaş, cinsiyet, eğitim gibi sosyo-demografik özellikleri ile arkadaş, akraba ve çocuklarını görme durumu ve sosyal medya kullanma durumuna ilişkin 13 soru yer almaktadır.

Yaşlılar İçin Yalnızlık Ölçeği (YYÖ): Ölçek 1985 yılında de Jong Gierveld ve Kamphuis tarafından geliştirilmiştir[18]. Ölçeğin Türkçe geçerlik güvenirlik çalışması ise Akgül ve Yeşilyaprak (2015) tarafından yapılmıştır [19]. Yalnızlık duygusunu ölçmek amacıyla geliştirilen ölçek üçlü likert tipi 11 madde içermektedir. Ölçeğin duygusal yalnızlık (2,3,5,6,9,10) ve sosyal yalnızlık (1,4,7,8,11) olmak üzere iki alt boyutu bulunmaktadır. Bu iki boyutun toplamı genel yalnızlık puanını oluşturmaktadır. Ölçekte olumlu yöndeki ifadeleri içeren maddeler (1,4,7,8,11) 0=evet, 1=olabilir, 2=hayır, olumsuz yöndeki ifadeleri içeren maddeler (2,3,5,6,9,10) 2=evet, 1=olabilir, 0=hayır şeklinde puanlanmaktadır. Ölçekten alınacak en düşük puan 0, en yüksek puan 22'dir. Ölçekten alınan puan yükseldikçe, bireyin yalnızlık düzeyinin de yüksek olduğu kabul edilmektedir. Ayrıca ölçekten elde edilen toplam puan; 0-4 puan yalnız değil / yalnızlık hissetmiyor, 5-14 puan kabul edilebilir yalnızlık, 15-18 puan çok yalnız, 19-22 puan çok yoğun yalnızlık olarak gruplandırılabilir. Ölçeğinin güvenirlik katsayısı ise 0.85 olup Duygusal yalnızlık alt boyutunun güvenirlik katsayısı 0.79 ve sosyal yalnızlık alt boyutunun ise 0.81'dir [19]. Bu çalışmada ise cronbach alfa değeri ölçeğin duygusal yalnızlık alt boyutu için 0,776, sosyal yalnızlık alt boyutu için ise için 0,80 olarak bulunmuştur.

Yaşam Doyumu Ölçeği: Bu ölçek Diener, Emmons, Larsen ve Griffin (1985) tarafından geliştirilmiştir ve likert tipinde ve beş maddeden oluşmaktadır [20]. Ölçek puanlaması “kesinlikle katılmıyorum” ve “kesinlikle katılıyorum” arasında değişmekte, 1-7 puanla değerlendirilmektedir. Ölçekten alınabilecek puan 5-35 arasında değişmektedir [21]. Ölçekten alınan yüksek puan, yaşam doyumunun yüksekliğini ifade etmektedir. Ölçeğin Türkçe geçerlik, 1993 yılında Yetim tarafından yapılmıştır ve ölçeğin güvenilirlik katsayısı 0.86 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada Yaşam Doyumu Ölçeğinin Cronbach's alpha değeri 0.879 olarak bulunmuştur [21].

Verilerin Değerlendirilmesi: Araştırmanın verileri SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 15.0 programı ile analiz edilmiştir. Verilerin değerlendirilmesinde tanımlayıcı istatistiksel yöntemlerden sayı, yüzde ve ortalama kullanılmıştır. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirilmiştir. Üç ya da daha fazla grubun puan ortalamalarının karşılaştırılmasında normal dağılım gösteren veriler için tek yönlü ANOVA testi, göstermeyenler için ise Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. Normal dağılım göstermeyen iki grubun puan ortalamalarının değerlendirilmesinde ise Mann Whitney U testi kullanılmıştır.

Etik Boyutu: Araştırmanın yapılabilmesi için Gazi Üniversitesi Etik Komisyonu'ndan onay alınmıştır (Araştırma kod no: 2022 – 1091, tarih:13.09.2022). Çalışmaya katılan yaşlı bireylere çalışma hakkında bilgi verilmiştir ve gönüllülük ilkesi dikkat edilerek bilgilendirilmiş onamları alınmıştır. Araştırma Helsinki Deklerasyonu Prensipleri'ne uygun şekilde yürütülmüştür.

3. Bulgular

Yaşlı bireylerin Tanıtıcı Özellikleri: Araştırma kapsamına alınan yaşlı bireylerin %35.3'ü 68-74 yaş grubundadır. Yaşlı bireylerin yarısından biraz fazlası (%57.6) kadın ve %42.4'ü erkek yaşlıdır. Okuryazar ya da ilkökul mezunu yaşlı bireyler %48.3 oranında olup, %59.3'ü evlidir ve evli olanların %47.6'sı 41-50 yıldan beri evlidir. Büyük çoğunluğu (%95.8) çocuk sahibi olan yaşlı bireylerin %85.6'sının sosyal güvencesi bulunmaktadır. Yaşlı bireylerin %29.1'ine göre gelir algısı düşük, %54.5'ine göre ve %16.4'üne göre yüksektir. Yalnız yaşadığını ifade eden yaşlı bireyler %19.2 oranında olup, %55.1'i eşi ve çocukları ile birlikte yaşamaktadır. Yaşlı bireylerin %34.8'i çocuklarını her gün gördüğünü ve %28.3'ü iki üç günde bir gördüğünü, %30.2'si akrabalarını iki üç günde bir gördüğünü ve %32.8'i arkadaşlarını yedi gün ve daha uzun uzun sürede bir gördüğünü ifade etmiştir. Sosyal medya kullandığını ifade eden yaşlı bireyler %18.1 oranındadır (Tablo 1).

Tablo 1:Yaşlı Bireylerin Tanıtıcı Özellikleri (n=354)

Değişken	Sayı	%
Yaş	≤ 67	35.3
	68 – 74	35.3
	75 ≤	29.4
Cinsiyet	Kadın	57.6
	Erkek	42.4
Eğitim	Okuryazar değil	27.7
	İlkokul mezunu	48.3
	Ortaokul mezunu	15.8
	Üniversite mezunu	8.2
Medeni durumu	Evli	59.3
	Evli değil	40.7

			22.9
Evlilik süresi (yıl) (n=210)	≤ 40	48	47.6
	41 – 50	100	29.5
	51 ≤	62	
Çocuk sahibi olma	Var	339	95.8
	Yok	15	4.2
Sosyal güvence	Var	303	85.6
	Yok	51	14.4
Gelir algısı	Düşük	103	29.1
	Orta	193	54.5
	Yüksek	58	16.4
Birlikte yaşadığı kişi			19.2
	Yalnız	68	55.1
	Eşi ile birlikte	195	22.0
	Eşi ve çocukları ile birlikte	78	3.7
	Yakın akrabaları ile birlikte	13	
Çocukların görülme sıklığı (n=339)	Hiç	5	1.5
	Her gün	118	34.8
	İki üç günde bir	96	28.3
	Yedi gün ve daha uzun sürede bir	120	35.4
Akrabaların görülme sıklığı	Hiç	13	3.7
	Her gün	35	9.9
	İki üç günde bir	107	30.2
	Yedi gün ve daha uzun sürede bir	99	56.2
Arkadaşların görülme sıklığı	Hiç	28	7.9
	Her gün	98	27.7
	İki üç günde bir	112	31.6
	Yedi gün ve daha uzun sürede bir	116	32.8
Sosyal medya kullanma durumu	Kullanıyor	64	18.1
	Kullanmıyor	290	81.9

Yaşlı bireylerin Yaşam Doymu ve Yalnızlık Ölçeği Puan Ortalamaları

Kadınların güçlendirilmesi ve yaşam doymu düzeylerini belirlemek için iki farklı ölçek kullanılmıştır. Yaşlıların Yalnızlık Ölçeği (YİYÖ) toplam puan ortalaması 9.477±2.955 ve duygusal alt boyutu için puan ortalaması 6.785±3.377, sosyal yalnızlık için 2.692±2.697 olarak belirlenmiştir. Yaşam doymu ölçeği puan ortalaması ise 21.163±6.957'dir (Tablo 2).

Tablo 2: Yalnızlık ve Yaşam Doymu Alt Ölçeklerinin Puan Ortalaması (n=354)

Bağımsız değişken	Puan aralığı (Min-max)	Ortalama	St.sapma
Yalnızlık	1-17	9.477	2.955
Duygusal yalnızlık	0-12	6.785	3.377
Sosyal yalnızlık	0-10	2.692	2.697
Yaşam doymu	5-35	21.163	6.957

Çalışmamızda yaşlı bireyin tanıtıcı özelliklerine göre yalnızlık ölçeği toplam ve alt boyut puan ortalamaları incelendiğinde erkeklerin yalnızlık ve yaşam doymu puan ortalamalarının kadınlardan istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu belirlenmiştir. Medeni duruma göre ise evli olanların toplam yalnızlık puan ortalamasının daha yüksek bulunmuştur Eğitim durumuna göre ise üniversite mezunu olan yaşlıların okuryazar olmayanlara, okuryazar ya da ilkokul mezunu olanlara ve ortaokul ya da lise mezunu olanlara göre yalnızlık puan ortalamalarının istatistiksel olarak anlamlı düşük olduğu saptanmıştır. Okuryazar olmayan yaşlıların yaşam doymu puan ortalaması okuryazar ya da ilkokul mezunu olanlara, ortaokul yada lise mezunu olanlara ve üniversite mezunu olanlara göre istatistiksel olarak anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Sosyal güvencesi olan ve sosyal medya kullanan yaşlıların yaşam doymu puan ortalamasının istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek olduğu belirlenmiştir. Gelir algısı düşük olan yaşlıların ise orta ve yüksek olanlara göre yama doymu puan ortalaması istatistiksel olarak anlamlı olarak düşük bulunmuştur (Tablo 3).

Tablo 3: Yaşlı Bireylerin Tanıtıcı Özelliklerine Göre Yalnızlık ve Yaşam Doymu Ölçeği Puan Ortalaması Karşılaştırmaları

Değişkenler	Yalnız Ölçeği Puan Ortalaması (ortalama±ss)	Yaşam doymu Ölçeği Puan Ortalaması
Yaş	≤ 67	9.66 ±3.056
	68 – 74	9.42 ±3.025
	75 ≤	9.32± 2.760
		KW: 1.090,p: 0.580
Cinsiyet durumu	Kadın	21.68 ±6.928
	Erkek	20.98 ±6.669
		U:13265.000, p:0.031*
Medeni durumu	Evli	20.62±6.957
	Evli değil	21.90± 6.914
		U:13895.000, p:0.140
		9.74 ±2.840
	9.09± 3.086	
	U:13061,500, p:0.029*	
	21.37± 7.207	
	20.87± 6.590	
	U:14507.500, p:0.517	

Çocuk sahibi olma durumu	Var	9.51± 2.920	21.19± 7.47
	Yok	8.73 ±3.712	20.67± 4.639
		U:2232.500,p:0.421	U:2386.000,p: 0.686
Sosyal güvence durumu	Var	9.48 ±2.982	21.58± 6.865
	Yok	9.49± 2.824	18.69 ±7.055
		U:7687.500, p: 0.954	U:5702.000, p:0.003*
Sosyal medya kullanma durumu	Kullanıyor	9.66± 3.233	23.73± 6.142
	Kullanmıyor	9.44 ±2.896	20.60± 7.009
		U: 8650.500, p: 0.393	U:6861.500, p:0.001*
Eğitim durumu	Okuryazar değil	9.65± 2.926	18.62 ±6.751
	Okuryazar/İlkokul mezunu	9.45 ±2.925	21.60 ±7.110
	Ortaokul/Lise mezunu	9.91± 2.849	22.86±5.348
	Üniversite mezunu	8.21± 3.234	23.90 ± 7.213
		KW:8.358, p:0.039**	KW:20.963, p:0.000**
Evlilik süresi	≤ 40	9.31 ±2.969	21.60± 7.094
	41 – 50	9.84 ±2.888	22.10 ±6.957
	51 ≤	9.97± 2.770	20.26± 7.708
		KW:2.545,p:0.280	F:1.262, p:0.285
Gelir algısı	Düşük	8.96± 3.061	17.87 ±6.527
	Orta	9.69± 3.013	22.28± 6.543
	Yüksek	9.69 ±2.465	23.28± 7.142
		KW.4.087,p:0.130	F:18.333, p:0.000***
Birlikte yaşadığı kişi	Yalnız	8.97 ±3.223	21.09± 6.457
	Eşi ile birlikte	9.79 ±2.804	21.59± 7.173
	Eşi ve çocukları ile birlikte	9.27± 3.144	20.35±6.984
	Yakın akrabaları ile birlikte	8.62± 2.063	20.00 ±6.137
		KW:7.105,p:0.069	KW:2.169,p:0.538

* Mann Whitney U Testi,p<0.05

**Kruskal Wallis Testi,p<0.05

***Tek yönlü ANOVA Testi

Çalışmamızda yalnızlık ölçeği duygusal yalnızlık alt boyutu puan ortalamaları ile yaşam doyumu ölçeği puan ortalamaları arasında zayıf derecede, pozitif yönde ($r:0.384, p:0.000 < 0.05$) ve sosyal yalnızlık alt boyut puan ortalaması ile ise orta derecede negatif yönde anlamlı bir ilişki olduğu bulunmuştur ($r:-0.437, p:0.000$). Buna göre yaşam doyumu arttıkça duygusal yalnızlığın ve sosyal yalnızlığın azaldığı söylenebilir (Tablo 4).

Tablo 4: Yaşlı Bireylerin Yaşam Doyumu Ölçeği ve Yalnızlık Ölçeği Puan Ortalamaları Arasındaki İlişki

	Yalnızlık Ölçeği Toplam Puan Ortalaması	Duygusal Yalnızlık Puan Ortalaması	Sosyal Yalnızlık Puan Ortalaması
Yaşam doyumu Ölçeği Puan Ortalaması			
r	0.040	0.384	-0.437
P:	0.455	0.000*	0.000*

4. Tartışma ve Sonuç

Yaşlanma döneminde fiziksel, biyolojik, duygusal, sosyal, ekonomik değişimlerin yalnızlık ve sosyal izolasyon sorunun ortaya çıkmasını neden olabilmektedir. Bu çalışmada evde yaşlı bireyin yalnızlık puan ortalaması 9.477 ± 2.955 olduğu için kabul edilebilir bir yalnız düzeyinin olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızla tutarlı olarak evde yaşayan yaşlıların yalnızlık ölçeği puan ortalaması Tel ve arkadaşlarının (2020) çalışmasında [22] 8.01 ± 3.77 , Ilgaz ve Gözümün (2020) çalışmasında (23) 9.97 ± 6.51 , Işık ve arkadaşlarının çalışmasında [24] 11.85 ± 6.17 olduğu için kabul edilebilir yalnızlık düzeyinin olduğu saptanmıştır. Bu çalışma sonuçları evde yaşayan yaşlarda yalnızlığın görüldüğünü göstermektedir. Bunun gümümüzde aile yapısının değişmesi çekirdek aile tipinin artması ile yaşlıların emosyonel ve sosyal desteklerinin azalması ile ilgili olabilir. Bu çalışmada yaşlı bireylerin emosyonel (duygusal) yalnızlığı sosyal yalnızlıktan daha fazla yaşadıkları belirlenmiştir [25,26]. Bu çalışmada da benzer şekilde emosyonel yalnızlığın yaşlılarda sosyal yalnızlıktan daha fazla görüldüğü gösterilmiştir.

Weiss (1973) yalnızlığın duygusal ve sosyal yalnızlık olarak iki türü olduğunu belirtmiştir [27]. Duygusal yalnızlık; bireyin çevresindeki insanlarla bir yakınlık ya da bir bağlanma ilişkisi hissetmemesi, reddedilme hissi sosyal yalnızlığı ise bir bireyin sosyal ilişki açısından yoksun olması, ortak ilgiye dayalı etkinlikleri paylaşmada kendilerini grubun parçası olarak hissetmeme olarak tanımlamıştır [27]. Yaşlılık döneminde yakınlarını kaybetme, sosyal sttaü ve rollerde değişim ya da kayıplar, bilişsel bozukluk, yakınlarının kaybı gibi sorunların yalnızlığın görülesini etkileyen önemli faktörlerdir Bu faktörlerin görülmesinin bireysel farklılık göstermesi hissedilen yalnızlığın duygusal ya da sosyal tipte olmasını da etkileyebilir [28]. Çalışmamızda yaşlı bireylerin sosyal yalnızlık düzeyi arttıkça yaşam doyumlarının azaldığı ve emosyonel yalnızlık düzeyi arttıkça ise yaşam doyumlarının arttığı bulunmuştur. Bu sonuç yaşlı bireylerin sosyal çevreye karşı yaşam doyumlarının yüksek ancak iç dünyalarında kendilerini yalnız hissettikleri, duygusal boşluklarının olduğunu düşündürmektedir ve sosyal desteğin ve etkileşimin yaşam doyumunda önemli olduğunu doğrulamaktadır.

Yalnızlığı etkileyen birçok farklı sosyodemografik özellikler bulunmaktadır. Bu çalışmada kadınların erkeklerden, evli olmayanların evlilerden ve üniversite mezunu olanların diğer eğitim düzeyindeki yaşlılara göre yalnızlık düzeyinin düşük olduğu bulunmuştur. Çalışmamızla tutarlı olarak bazı çalışmalarda yaşlı erkeklerde kadınlara göre yalnızlık düzeyinin daha fazla [29,30], bazı çalışmalarda kadınlarda erkeklerden [31,32], bazı çalışmalarda ise cinsiyete göre herhangi bir farklılık olmadığı belirtilmektedir [33-35]. Yalnızlık durumu bireylere göre değişiklik gösterse de kadınların; iletişim kurma, sosyalleşme rollerini erkeklere göre daha kısa sürede ortaya koymalarının kadınların yalnızlık puanını etkilediği düşünülebilir.

Çalışmamızda eğitim düzeyine göre yalnızlık düzeyinin değiştiğini yüksek eğitim düzeyinde daha az yalnızlık görüldüğünü göstermiştir. Çalışmamızla tutarlı olarak Bai ve arkadaşlarının (2021) [36] ve Fierlos ve arkadaşlarının (2021) [37] çalışmasında düşük eğitim düzeyinin yalnızlıkla ilişkili olduğu belirtilmektedir. Düşük eğitim düzeyi yaşlı bireylerin sosyoekonomik durumunu etkileyebildiği gibi

sosyal ilişkilerinin kalitesinde ve sosyal aktivitelere katılımında azalmaya neden olabilir. Bu durumda yaşlılarda emosyonel ve sosyal yalnızlığa neden olabilir[38]. Özvurmaz ve arkadaşlarının (2018) çalışması ile tutarlı olarak bu çalışmada evli olan yaşlılarda yalnızlık düzeyinin daha yüksek olduğu saptanmıştır[39]. Rahman ve arkadaşlarının (2019) [40] ve Kislev'in (2022) [41] çalışmasında ise boşanmış ya da dul yaşlı bireylerin evli olanlara göre yalnızlık düzeyinin daha fazla görüldüğü bazı çakılmalarda ise medeni durum ile yalnızlık düzeyi arasında hiçbir ilişki olmadığı belirtilmektedir. Bu çalışmadaki sonucun farklılığı yaşlı bireylerin çevresindeki bireyler olmasına rağmen yakın ilişki hissetmemesi ve duygusal yalnızlık hissini daha çok yaşamasına bağlı olabilir. Yaşlı bireyin yaşla beraber ortaya çıkan sorunlarının sosyal destek algısını değiştirmesi de bu sonucu etkilemiş olabilir.

Bu çalışmada gelir algısı yüksek olan, sosyal güvencesi olan ve sosyal medyayı kullanan yaşlı bireylerin yaşam doyumunun yüksek olduğu bulunmuştur. Kankaya ve Karadakovan (2017) ile Şahin ve Yıldırım'ın (2019) çalışmaları da çalışmamamız sonucunu desteklemektedir [42,43]. Gelir durumunun bireyin beslenme, barınma, günlük yaşam aktivitelerini yerine getirmesini, yaşamını kolaylaştırıcı yardımcı araç gereç kullanımını etkileyebilmektedir. Bu bağlamda bireyin daha güçlü ve bağımsız hissetmesini yüksek gelir düzeyi artırarak yaşam doyumunu arttırabileceği söylenebilir. Sosyal medya kullanımının yaşlı insanların subjektif iyilik durumunu[44], mutluluğunu [45], yaşam memnuniyetini arttırabileceği, sosyal katılım ve algılanan yalnızlık düzeyini azaltabileceği [46], mental ve bilişsel sağlığı iyileştirebileceği [47] belirtilmektedir. Racham ve ark.'nın çalışmasında bireyin yaşamında yer alan aile, toplum, sağlık, tüketim ve boş zaman alanları ile ilgili yaşam doyumunu sosyal medya kullanımının pozitif yönde etkilediğini belirlemiştir [48]. Gaia da çalışmasında (2021) benzer şekilde sosyal medya kullanımı ve yaşam doyumunu arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermiştir[49]. Bu çalışma sonuçları sosyal etkileşim ve iletişimin yaşlılar için önemli olduğu ve bununla sosyal iletişim ağlarının kullanımının önemli bir aracı olduğunu göstermektedir.

Bu çalışma sonuçları erkek, evli ve eğitim düzeyi düşük olan yaşlı bireylerde daha çok yalnızlık görüldüğünü ve gelir düzeyi düşük, sosyal güvencesi olmayan ve sosyal medya kullanmayan yaşlıların ise yaşam doyumunun daha düşük olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda Sağlık profesyonelleri tarafından evde yaşayan yaşlı bireylerin

-yalnızlık ve yaşam doyumunu etkileyebilecek sosyodemografik faktörleri değerlendirmeleri

-yalnızlık düzeyini azaltmak ve yaşam doyumunu arttırmak için sosyal destek kaynaklarını tanıması ve etkin kullanmasının desteklenmesi,

-Sosyal iletişim ve etkileşimi artırıcı yönde sosyal medyanın bilinçli ve güvenli kullanımına teşvik edilmesi önerilebilir. Ayrıca konuyla ilgili çözüm önerilerinin sağlanmasına yönelik nitel çalışmaların yapılmasının yararlı olacağı düşünülmektedir.

Teşekkür

Bu çalışmaya katkı sağlayan tüm yaşlı bireylere teşekkür ederiz.

Etik Beyanı

Bu çalışmada, "Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi" kapsamında uyulması gerekli tüm kurallara uyulduğunu, bahsi geçen yönergenin "Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiğine Aykırı Eylemler" başlığı altında belirtilen eylemlerden hiçbirinin gerçekleştirilmediğini taahhüt ederiz.

Kaynakça

[1] Başol, R.Ö. 2019.Türkiye ve AB Ülkelerinde Yaşlı Nüfusun Görünümü. *Kocaeli Üniversitesi Sosyal Bilimler Dergisi*, 37, 35 – 46.doi: <http://www.10.35343/kosbed.525236>.

[2] Ageing and health.WHO. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health> (Erişim Tarihi:17.10.2022).

- [3] İstatistiklerle Yaşlılar. 2021. [https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p= Istatistiklerle-Yasli-lar-2021-45636](https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Istatistiklerle-Yasli-lar-2021-45636)(Erişim Tarihi: 17.10.2022).
- [4] Özdemirkan, T., Şenlik, Z., Şimşek, A.Ç.2020. Sağlıklı Aktif Başarılı Yaşlanma. Türkiye Sağlık Okuryazarlığı Dergisi, 1(1), 51-7. doi:[http://www.saglikokur.yazarligidergisi.com /index.php/soyd/index](http://www.saglikokur.yazarligidergisi.com/index.php/soyd/index).
- [5] Kalyoncuo, S., Kartın, P.T.2021. Aktif Yaşlanma ve Hemşirelik Bakımı. ERÜ Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi, 8(1), 26-32.
- [6] Aslan, M.,Hocaoğlu, Ç.2017. Yaşlanma ve Yaşlanma Dönemiyle İlişkili Psikiyatrik Sorunlar. Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi,7(1), 53-62.
- [7] Nazlı, A. 2016.Yaşlanma, birey ve toplum: Yaşlanmaya sosyolojik bakış. Ege Tıp Dergisi, 55 (Ek Sayı / Supplement), 1-5
- [8] Bakalım, O., Yılık, M.M. 2020. Yalnızlık ve Yaşam Doyumu İlişkisinde Pozitif ve Negatif Duyguların Aracı Rolü. Buca Eğitim Fakültesi Dergisi, 50, 125-40.
- [9] Andrew, N., Meeks, S.2018. Fulfilled preferences, perceived control, life satisfaction, and loneliness in elderly long-term care residents. *Aging Ment Health*, 22(2),183-189.doi: <http://www.10.1080/13607863.2016.1244804>.
- [10]deGuzman, A.B, Maravilla, K.N., Maravilla. V.A.M., Marfil, J.D.V., Marinas, J.A.R., Marquez, J.M.B.2012. Correlates of Geriatric Loneliness in Philippine Nursing Homes: A Multiple Regression Model.*Educational Gerontology*,38(8),563 575. <https://doi.org/10.1080/03601277.2011.645443>.
- [11] Aydiner, B.A., Gunay, G. 2018. The effect of the perceived social support on the elderly life satisfaction. *Journal of the Human and Social Science Researches*, 7(2), 1351–63.
- [12]Sahin, D.S., Ozer, O., Zubaroglu, Y.M. 2019.Perceived social support, quality of life and satisfaction with life in elderly people. *Educational Gerontology*, 45(1), 69–77. <https://doi.org/10.1080/03601277.2019.1585065>.
- [13] Li, W., Sun, H., Xu,W., Ma, W.,Yuan, X., Niu, Y., Kou, C.2021. Individual Social Capital and Life Satisfaction among Mainland Chinese Adults: Based on the 2016 China Family Panel Studies. *Int J Environ Res Public Health*, 18(2):441.<https://doi.org/10.3390/ijerph18020441>.
- [14] Ng, S.T., Tey, N.P., Asadullah, M.N. 2017. What matters for life satisfaction among the oldest-old? Evidence from China. *PLoS One*, 12(2), e0171799. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171799>.
- [15]Nyqvist, F., Forsman, A.K., Giuntoli, G., Cattan, M.2012. Social capital as a resource for mental well-being in older people: A systematic review. *Aging & Mental Health*, 17(4), 394–410. <https://doi.org/10.1080/13607863.2012.742490>.
- [16] Lu, N., Spencer, M., Sun, Q., Lou, V.W.Q.2021. Family social capital and life satisfaction among older adults living alone in urban China: the moderating role of functional health. *Aging Ment Health*, 25(4),695-702. <https://doi.org/10.1080/13607863.2019.1709155>.
- [17]Yılmaz, C.K. 2020.Yaşlı Bireylerde Yerinde Yaşlanma ile Başarılı Yaşlanma ve Yaşam Doyumu Arasındaki İlişkinin Belirlenmesi. *Sağlık ve Toplum*, 20(3),38-48.
- [18] de Jong Gierveld, J., Kamphuis, F.H.1985. The development of a Rasch-type loneliness-scale. *Applied Psychological Measurement*, 9, 289-99.
- [19] Akgül, H., Yeşilyaprak, B.2015. Yaşlılar İçin Yalnızlık Ölçeği” nin Türk Kültürüne Uyarlaması: Geçerlilik ve Güvenirlilik Çalışması. *Yaşlı Sorunları Araştırma Dergisi*, 8(1), 34-45.
- [20] Diener, E.D, Emmons, R.A., Larsen, R.J., Griffin, S.1985. The satisfaction with life scale. *Journal of Personality Assessment*, 49(1), 71-5.
- [21]Yetim, Ü.1993. Life satisfaction: A study based on the organization of personal projects. *Social Indicators Research*, 29 (3), 277-289.

- [22] Tel, .H, Koç,M., Aydın, H.T. 2020. Evde Yaşayan Yaşlılarda Yalnızlık, Yaşam Doyumu ve Ölüm Kaygısının Belirlenmesi. *IBAD Sosyal Bilimler Dergisi*, (Özel Sayı): 1-10. <https://doi.org/10.21733/ibad.760027>.
- [23] Ilgaz,A., Gözüm,S.2020. Kentsel Alanda Yaşayan Yaşlı Kadınlarda Yalnızlık Sıklığı ve Etkileyen Faktörler. *Dokuz Eylül Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Elektronik Dergisi*,13(2),67-73.
- [24] Işık, K., Başoğul, C., Yıldırım, H.2021. The relationship between perceived loneliness and depression in the elderly and influencing factors. *Perspect Psychiatr Care*, 5,351–57.
- [25] Wolfers, M.E.G., Stam, B.E., Machielse, A.2022. Correlates of emotional and social loneliness among community dwelling older adults in Rotterdam, the Netherlands. *Aging Ment Health*, 26(2),355-67. <http://doi.org/10.1080/13607863.2021.1875191>.
- [26] Polat, F., Geçici, F. 2020. Yaşlı Bireylerin Algıladığı Yalnızlık Düzeyi İle Depresyon Arasındaki İlişki. *İnönü Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Dergisi*, 1,72-82. <https://doi.org/10.33715/inonusaglik.704241>.
- [27] Weiss, R.S.1973. *Loneliness: The experience of emotional and social isolation*, Cambridge, MA: MIT Press.
- [28] Hoşoğlu, T.K, Ümmet, D. 2021. Huzurevinde Bulunan Yaşlıların Yalnızlık Algısı ve Yaşam Kaliteleri Arasındaki İlişkinin İncelenmesi. *MANAS Sosyal Araştırmalar Dergisi*,10(1),463-75.
- [29] Kahraman, S., Zincir, H., Kaya, Z., Esen, F. 2011. Bir Huzurevinde Yaşlı Kadın ve Erkeğin Ayrı Yaşamalarının Onların Yalnızlık ve Yaşam Doyumuna Etkisi. *Sosyoloji Araştırmaları Dergisi*,2(14), 1-16.
- [30] Çam, C., Atay, E., Aygar, H.,Öcal, E.E.,Önsüz, M.F., Işıklı, B., Metintaş,S. 2021. Elderly people's quality of life in rural areas of Turkey and its relationship with loneliness and sociodemographic characteristics. *Psychogeriatrics*,21(5), 795-804. <http://doi.org/10.1111/psyg.12741>.
- [31] Dereli, F., Koca, B. 2010. Bir Huzurevinde Kalan Yaşlıların Yalnızlık Düzeylerinin İncelenmesi. *Yeni Tıp Dergisi*,27, 93-7.
- [32] Lim, K.K., Chan, A. 2017. Association of loneliness and healthcare utilization among older adults in Singapore. *Geriatrics and Gerontology International*, 17(11), 1789–98. <http://doi.org/10.1111/ggi.12962>.
- [33]Lasgaard, M., Friis, K., Shevlin, M.2016. "Where are all the lonely people?" A population-based study of high-risk groups across the life span. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol*, 51(10):1373–84.<http://doi.org/10.1007/s00127-016-1279-3>.
- [34]Brittain, K., Kingston, A., Davies, K. et al. 2017. An investigation into the patterns of loneliness and loss in the oldest old–Newcastle 85+ Study. *Ageing & Society*,37(1),39–62.
- [35]Tümer, A., Dönmez, S., Gümüşsoy, S., Balkaya, N.A. 2022. The relationship among aging in place, loneliness, and life satisfaction in the elderly in Turkey. *Perspect Psychiatr Care*, 58(2), 822-29.<http://doi.org/10.1111/ppc.12855>.
- [36] Bai, Z.,Wang, Z.,Shao, T.,Qin, X., Hu, Z. 2021. Association between social capital and loneliness among older adults: a cross-sectional study in Anhui Province, China. *BMC Geriatr*, 21:26. <http://doi.org/10.1186/s12877-020-01973-2>.
- [37] Fierloos, I.N., Tan, S.S., Williams, G., et al. 2021. Socio-demographic characteristics associated with emotional and social loneliness among older adults. *BMC Geriatr*, 9,21(1),114.<http://doi.org/10.1186/s12877-021-02058-4>.
- [38] Mansfield, J.C., Hazan, H., Lerman,Y.,Shalöö, V. 2016. Correlates and predictors of loneliness in older-adults: a review of quantitative results informed by qualitative insights. *Int Psychogeriatr*, 28(4), 557-76.<http://doi.org/doi:10.1017/S1041610215001532>.
- [39]Özurmaz, S. 2018. Yaşlı Bireylerin Yalnızlık Düzeyleri ve Sosyal Destek Algıları Arasındaki İlişki. *Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*, 2(3),118-25.

- [40]Rahman, M. S., Rahman, M. A., & Rahman, M. S. 2019. Prevalence and Determinants of Loneliness among Older Adults in Bangladesh. *International Journal of Emerging Trends in Social Sciences*, 5(2), 57–64. <https://doi.org/10.20448/2001.52.57.64>.
- [41]Kislev, E. 2022. Aging, Marital Status, and Loneliness: Multilevel Analyses of 30 Countries. *Research on Ageing and Social Policy*, 10(1), 77-103. <http://dx.doi.org/10.17583/rasp>.
- [42]Kankaya, H., Karadokovan, A. 2017. Yaşlı Bireylerde Günlük Yaşam Aktivite Düzeylerinin Yaşam Kalitesi ve Yaşam Doyumuna Etkisi. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 6(4), 21-29.
- [43]Şahin, B., Yıldırım, A. 2019. Yaşlı bireylerde internet kullanımı ile yaşam doyumu, algılanan sosyal destek ve umutsuzluk düzeyleri arasındaki ilişkinin incelenmesi. *Yaşlı Sorunları Araştırma Dergisi (YSAD)*, 12(2), 97-106.
- [44]Tobiasz-Adamczyk, B., Zawisza, K. 2017. Urban-rural differences in social capital in relation to self-rated health and subjective well-being in older residents of six regions in Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 24(2), 162–70
- [45] Lelkes, O. 2013. Happier and less isolated: Internet use in old age. *Journal of Poverty and Social Justice*, 21(1), 33–46.
- [46] Cotten, S.R., Anderson, W.A., McCullough, B.M. 2013. Impact of internet use on loneliness and contact with others among older adults: cross-sectional analysis, *Journal of Medical Internet Research*, 15 (2), e39.
- [47]Litwin, H., Stoeckel, K.J., Schwartz, E. 2015. Social networks and mental health among older Europeans: are there age effects?, *European Journal of Ageing*, 12(4), 299–309.
- [48] Ractham, P., Techatassanasoontorn, A.A., Kaewkitipong, L. 2022. Old But Not Out: Social Media Use and Older Adults' Life Satisfaction. *Australasian Journal of Information Systems*, 26. <https://doi.org/10.3127/ajis.v26i0.3269>.
- [49] Gaia, A., Sla, E., Cerati, G. 2021. Social networking sites use and life satisfaction. A quantitative study on older people living in Europe. *European Societies*, 23, 98-118.

Determination of Phytochemical Profile, Antiquorum Sensing and Antioxidant Activities of *Tragopogon oligolepis*

Tragopogon oligolepis'in Fitokimyasal İçeriği, Antioksidan ve Antiquorum Sensing Özelliğinin Belirlenmesi

Ahu REİS¹ , Tuğba MAZLUM ŞEN² , Ebru ÖNEM^{3*} , Özlem SARAL⁴ , Mutlu GÜLTEPE⁵ 

¹ Karadeniz Technical University, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Trabzon, Türkiye

² Karadeniz Technical University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biochemistry, Trabzon, Türkiye

³ Süleyman Demirel University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, Isparta, Türkiye

⁴ Recep Tayyip Erdogan University, Faculty of Health Sciences, Department of Nutrition and Dietetics, Rize, Türkiye

⁵ Giresun University, Dereli Vocational School, Department of Forestry, Giresun, Türkiye

ABSTRACT

Objective: In this study it was aimed to examine antiquorum sensing, antioxidant activities by using root and aerial parts extracts of *Tragopogon oligolepis*. Also phenolic content was detected using HPLC analysis.

Material-Method: Antioxidant activity was detected by DPPH, FRAP methods and phenolic content HPLC. Antiquorum sensing activity was investigated by using pyocyanin and swarming motility assay on *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

Results: Phytochemical profile findings showed that 12 components were detected in the root and 10 components in the aerial parts. The main components were found chlorogenic acid and o-coumaric acid. According to the obtained of antioxidant levels the aerial parts extracts of *T. oligolepis* had the best antioxidant property in our results. The amount of DPPH (0.60 ± 0.01 mg/ml) and phenolic content (6.55 ± 0.18 mg GAE/g sample) was determined to be high in the aerial parts. In the FRAP analysis, high reducing power was found in the roots (12.62 ± 0.36 μ mol FeSO₄/g sample). According to these results, although *T. oligolepis* extracts do not reach very high amounts in terms of antioxidant results, it is thought to be a plant that can be evaluated in terms of removing oxidant effects. The results of antiquorum sensing activity showed that both root and aerial parts extract showed strong inhibitory effect on swarming motility 62%, %65 rate respectively.

Conclusions: *Tragopogon oligolepis*, an endemic species, can be evaluated as an antiquorum sensing inhibitor candidate with its phytochemical contents.

Keywords: DPPH, FRAP, *Pseudomonas*, *T. oligolepis*

Alınış / Received: 23.10.2022 Kabul / Accepted: 14.12.2022 Online Yayınlanma / Published Online: 20.12.2022



Ö Z E T

Amaç: Bu çalışmada, *Tragopogon oligolepis*'in kök ve toprak üstü kısım ekstraktları kullanılarak antiokorum sensing ve antioksidan aktivitelerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca HPLC analizi kullanılarak fenolik içerik tespit edilmiştir.

Gereç Yöntem: Antioksidan aktivite DPPH, FRAP yöntemleri ve fenolik içerik HPLC ile tespit edildi. Çevreyi algılama aktivitesi, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 üzerinde piyosiyinin ve kayma hareketi testi kullanılarak araştırıldı.

Bulgular: Fitokimyasal profil bulguları, kökte 12 bileşen ve toprak üstü kısımlarda 10 bileşen tespit edildiğini göstermiştir. Ana bileşenler klorojenik asit ve o-kumarik asit olarak bulunmuştur. Elde edilen antioksidan seviyelerine göre, sonuçlarımızda en iyi antioksidan özelliği *T. oligolepis*'in toprak üstü kısımları ekstraktları göstermiştir. Toprak üstü kısımlarda DPPH (0.60 ± 0.01 mg/mL) ve fenolik içerik (6.55 ± 0.18 mg GAE/g numune) miktarının yüksek olduğu belirlendi. FRAP analizinde köklerde yüksek indirgeme tespit edildi (12.62 ± 0.36 μ mol FeSO₄/g numune). Antiokorum sensing sonuçlarına göre ise kök ve toprak üstü ekstraktları kayma hareketi üzerine %62 ve %65 oranında güçlü inhibisyon etki göstermiştir.

Sonuç: Elde edilen sonuçlar neticesinde endemik bir tür olan *T. oligolepis*, fitokimyasal içeriği ile antiokorum sensing inhibitör adayları olarak değerlendirilebilir.

Anahtar Kelimeler: DPPH, FRAP, *Pseudomonas*, *T. oligolepis*



1. Introduction

The genus *Tragopogon* L. (*Asteraceae*) contains about 150 species worldwide and widespread in semiarid and mountainous regions of Europe and Asia [1]. 26 taxa belonging to 22 species are distributed throughout Turkey [2]. It is morphologically similar to *T. oligolepis* Hartvig & Strid is local endemic to the Southwest of Anatolia [3]. It is a perennial herb with glabrous (4-5 mm diameter) stem and vertical woody stock [4]. Plants are important as they are sources of bioactive compounds. Phenols include a large group of compounds that contribute majorly to the human diet. Long-term consumption of polyphenol-based diets has positive antioxidant effects on the human body, reducing the risk of cancer, cardiovascular diseases and diabetes. The most important polyphenol compounds are classified in phenolic acids, flavonoids, stilbenes and lignans [5].

In all parts of the world, especially in developing countries, diseases caused by fungi, viruses, bacteria, and parasites are a major cause of mortality and morbidity [6]. Undoubtedly, one of the most important discoveries for humanity in the last century is antibiotics but misuse is one of the biggest problems of recent years also [7]. The considerable time it takes to produce new antibiotics has necessitated the development of multiple strategies in the fight against infectious diseases [8]. One of the two strategies that has attracted the most interest of researchers is plants and the other is inhibition of the QS mechanism. In recent years, researches on the antimicrobial properties of phytochemicals studies on the mechanisms of action are progressing rapidly [9]. Quorum sensing system is the communication mechanism between bacteria, which occurs as a result of the expression of some genes, depending on the cell population density, through a some small molecules called AHL and expression of many virulence factors in *P. aeruginosa* occurs through this system [10]. For this reason, inhibition of virulence factors produced by bacteria in order to cause infectious disease in the host is considered as one of the important target points that can be used in the fight against bacteria.

Since there is limited study about the properties of the *T. oligolepis*, the aim of the current study was to determine the antimicrobial and anti-quorum sensing activity, chemical compounds of its fraction (using HPLC method) antioxidant properties (total phenols, radical scavenging activity by IC₅₀ of DPPH test and total antioxidant capacity) of its extract.

The *T. oligolepis* extract was not previously studied in terms of polyphenol content and antioxidant activity, therefore the purpose of our study was to evaluate the antioxidant effect for future studies.

2. Material and Method

Plant Material and Preparation of the Extract for Assays

The *T. oligolepis* plant used in this study was collected in Muğla, Turkey, in August 2017 and identified by Prof. Dr. Kamil Coşkun Çelebi. The plant has been stored in the Herbarium of the Department of Biology of Karadeniz Technical University (KTUB) with the herbarium number Coşkunçelebi & Gültepe 584a. The assembled and exsiccated plant samples were separated from the aerial parts and roots and ground with the help of a steel blender (Waring 8011 EB, USA). The solvent (1/10 ethanol) was added and then the solvent-sample mixture was kept in an ultrasonic bath for 30 minutes, it was filtered with coarse filter paper and the solvent was removed in a rotary evaporator (Heidolph Hei-Vap Rotary Evaporator) at 40-45°C under vacuum. The plant extracts remaining in the balloon were weighed and recorded and taken with DMSO. The final concentration of the extract to be used in anti-quorum sensing activity experiments was set as 100 mg/mL for aerial parts and root. For antioxidant analyzes spectrophotometric techniques were used and also total flavonoids, polyphenols. These techniques are constantly utilization for the native substances. Determination of antioxidant assay; powdered aerial parts (5g) and roots (5g) were separately extracted with 90-96% methanol. These extracts mixed-incubated for 24 h at low rpm and room temperature. The methanolic extracts were filtered with filter papers and used. Analyses were done three times.

Total Phenolic Assay

According to the Folin-Ciocalteu method the amount in the samples was determined [9]. Gallic acid was used as standard. The solutions absorbances of were determined for 760 nm. Concentrations of total phenolic compounds were determined for dry weight of sample as mg of gallic acid.

The Determination of Antioxidant Activity

Utilizing by FRAP technique were calculated for plants antioxidant contents. FRAP test was utilized calculated antioxidant activity. This technique is based on the reduction of Fe³⁺-TPTZ compound to Fe²⁺ -TPTZ compound with electron donating material [10]. The result as µmol FeSO₄.7H₂O was explained for dry sample.

Opposite DPPH radical the radical cleaning capacity of samples in spectrophotometer was defined on 517 nm. The color change of the DPPH mixture is examined during the analysis. DPPH radical is deactivated in the presence of antioxidants [11]. The radical deactivation property was determined using Trolox and the results were expressed as IC₅₀.

Anti-quorum Sensing Assay

The inhibition effect of the plant extract on the swarming motility of PAO1 was carried out by preparing a medium containing nutrient broth, noble agar and 0.5% glucose. A two hundred µL of the plant extract were added to 20 mL of the swarming medium. An overnight culture of PAO1 was centrifuged into the center of the solidified medium, and 5 µL of the supernatant was inoculated and incubated overnight at 37°C. The sliding motion at the end of incubation was evaluated by measuring the diameter of the motility from the center of inoculation to the edge. The results were evaluated by comparing it with the positive control PAO1 [14].

For pyocyanin assay; an overnight bacterial culture calculated at a density of 0.02 at OD 600 was added to 10 mL of LBB medium added with 400 µL of plant extract and incubated for 16-18 hours at 37°C in a shaking incubator. After the incubation period, 5 mL of chloroform was added to the culture and vortexed for 30 seconds. The sub-phase formed in the medium and separated from the

chloroform was transferred to 2 mL tubes. One mL of HCl-water mixture (0.2 mol/L HCl) was added and vortexed again for 30 seconds. The absorbance of the pink phase formed at the top of the tubes was measured at 520 nm. PAO1, without added extract, was used as a positive control [15].

Statistical Analysis

Data analysis was carried out using Microsoft Office Excel 2016. For each sample, experiments were repeated three times and the mean of the results was calculated. Antiquorum sensing experiments were carried out in triplicate according to the randomized plot design and the data obtained were subjected to variance analysis using the JMP 8 packet statistics program. Statistical differences were marked by the LSD multiple comparison test.

3. Results

The antioxidants in plants are very different from each other and it is very difficult to measure each antioxidant component respectively. FRAP and DPPH methods were used in this study for radical scavenging activity. Total phenolic and flavonoid concentrations were also calculated.

Using The Folin-Ciocalteu assay the phenolic contents of the extracts measured by ranged from 5.166 ± 0.18 to 6.55 ± 0.18 mg GAE/g dry extract. It was found that the highest phenolic content was obtained in the aerial parts (Table 1).

FRAP and the total phenolic content values of the aerial and root parts are shown in Table (1). Analysis of DPPH values determined as the IC_{50} are shown in Figure (1).

Table 1: Total Phenolic Contents and FRAP for plant extracts

Analyses	Aerial parts	Roots
Total Phenolic Contents (mg GAE/g sample)	6.55 ± 0.18	5.166 ± 0.18
FRAP ($\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g sample}$)	4.98 ± 0.17	12.62 ± 0.36

The IC_{50} of DPPH assay in the examined extracts ranged from 0.60 to 1.83 mg/mL. The stable free radical DPPH has been widely used in the assessment of radical scavenging activity of plant extracts, natural compounds and foods [16].

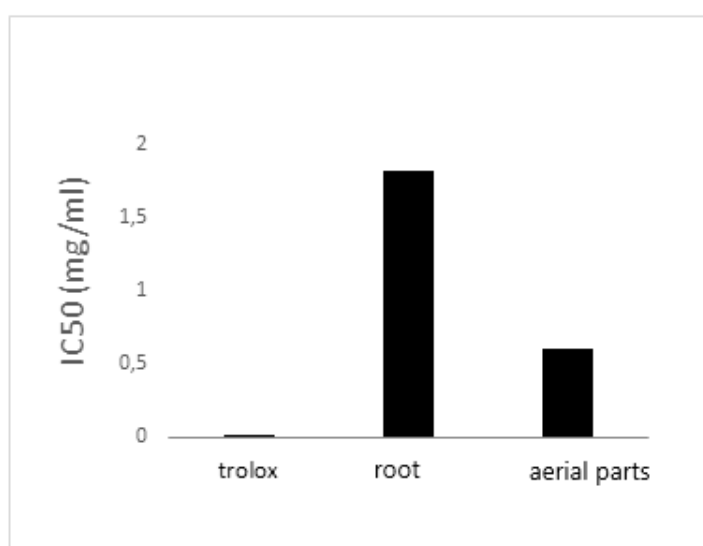


Figure 1: The results of DPPH for plant extracts

Bioactive Compounds

The bioactive contents of the extracts prepared with the root and aerial parts of *T. oligolepis* were studied in HPLC and a total of 23 standards were scanned. According to the results obtained, it was seen that the aerial part had more content in total in the investigated standards. Chlorogenic acid the major component in both extracts was determined, while the value found at 814.86 µg/g in the aerial parts was determined as 323.1 µg/g in the root (Table 2, 3).

Table 2: Phenolic composition of *T. oligolepis* aerial parts extract

Compounds	µg/g	Compounds	µg/g
Phenolics acids		Flavonoids	
chlorogenic acid	814,86	rutin	*
o-coumaric acid	157,86	catechin	*
caffeic acid	32,43	hesperidin	7,79
gallic acid	8,96	epicatechin	*
syringic acid	12,89	quercetin	*
p-coumaric acid	7,21	luteolin	32,46
protocatechic acid	*	kamferol	27,79
p-hydroxy benzoic acid	*	apigenin	92
vanillin	*		
ferulic acid	*		
sinapinic acid	*		
benzoic acid	*		
rosmarinic acid	*		
cinnamic acid	*		

* Not detected

Table 3: Phenolic composition of *T. oligolepis* root extract

Compounds	µg/g	Compounds	µg/g
Phenolics acids		Flavonoids	
chlorogenic acid	323,1	rutin	*
o-coumaric acid	52,7		
caffeic acid	19,4		
gallic acid	*		
syringic acid	3,8	catechin	5,3
p-coumaric acid	0,4		
protocatechic acid	1,0		
p-hydroxy benzoic acid	2,1	hesperidin	
Vanillin	0,9		
ferulic acid	*	epicatechin	*
sinapinic acid	1,6	eriodictiol	*
benzoic acid	3,8	quercetin	*
rosmarinic acid	*	luteolin	*
cinnamic acid	0,7	kamferol	*
		apigenin	*

* Not detected

Antiquorum Sensing Activity Results

T. oligolepis methanol extract showed similar results to the swarming motility and pyocyanin pigment production, which play an important role in the virulence of *Pseudomonas*. While the inhibition rates of the root extract were 61% on the swarming, it was determined as 33% on the pyocyanin pigment production. On the other hand the aerial parts extract showed a strong inhibition effect of 65% on the swarming motility, while a low inhibition effect of 15% on pyocyanin production.

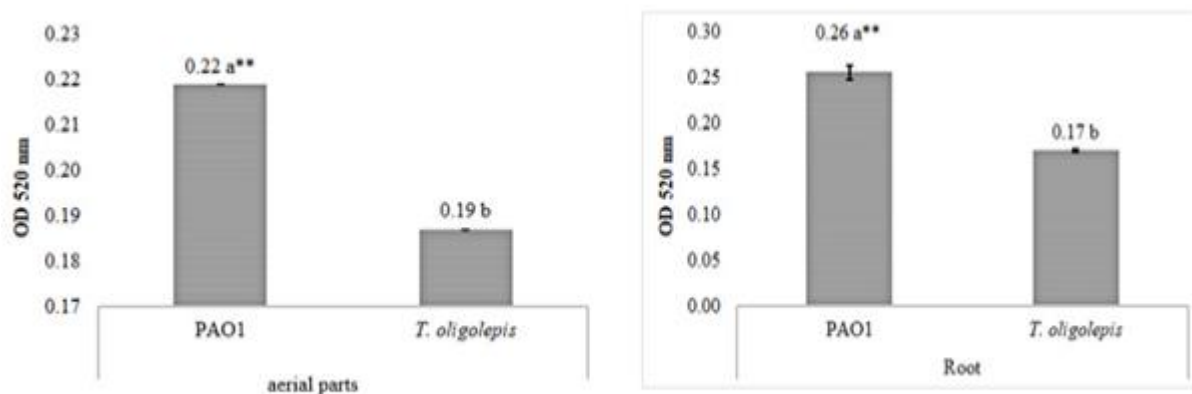


Figure 2. Inhibition effect of extracts on pyocyanin production. **Differences between mean values followed by different letters of compounds are statistically significant at $p < 0.01$

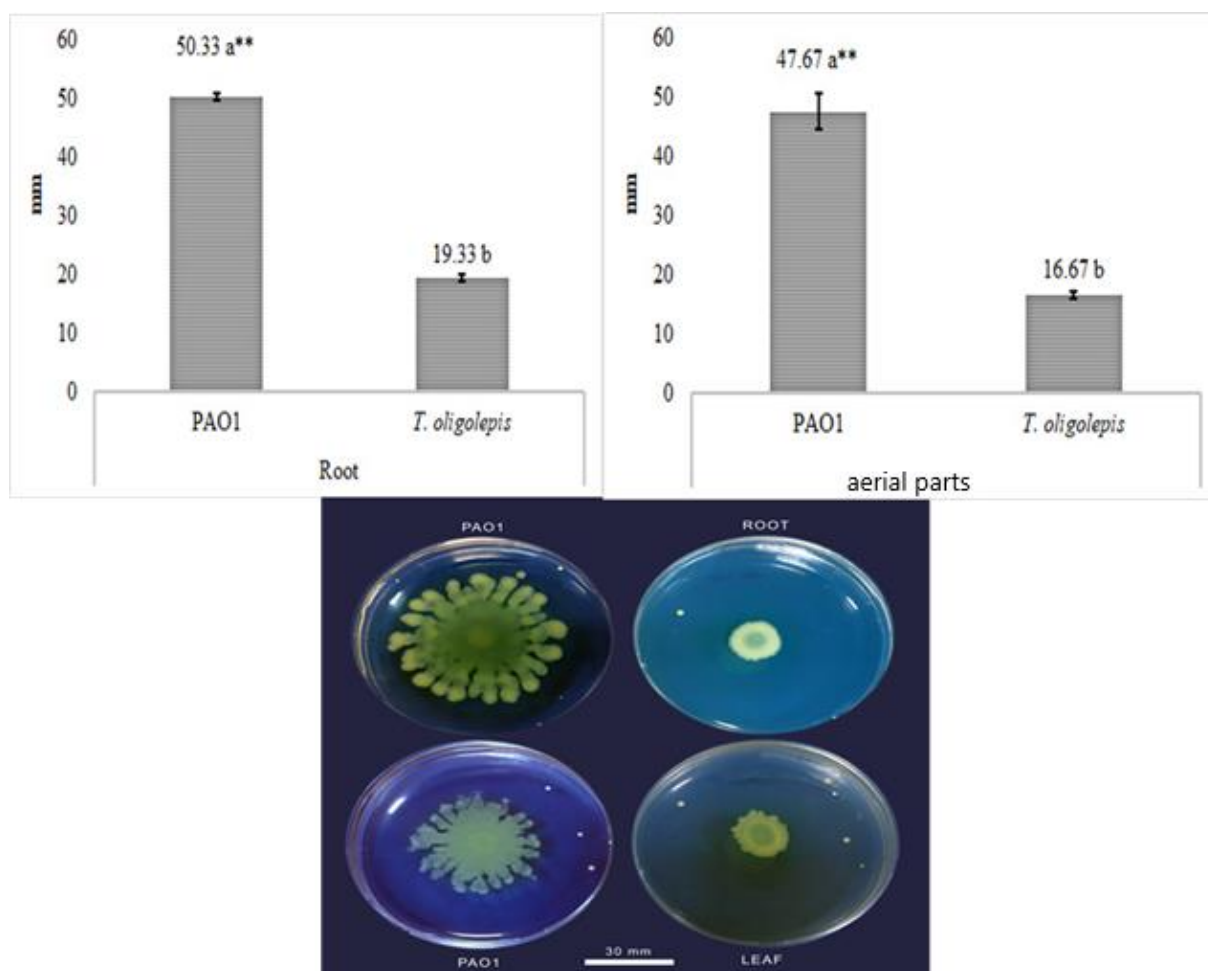


Figure 3. Inhibition effect of extracts on swarming motility, (scala bar 30mm). **Differences between mean values followed by different letters of compounds are statistically significant at $p < 0.01$

4. Discussion and Conclusion

Plants with medicinal properties and their secondary metabolites have been discovered since the dawn of time. Depending on the type of plant, the use of flowers, leaves, branches or roots is common in the treatment of acute and chronic diseases. Especially important to limit oxidative reactions in cells antioxidant nutrients are predispose humans to the development of major clinical conditions. Today, such as flavonoids, the antioxidant potential of plant-derived phenolic compounds are great interest in the possibility that may reduce the risk of developing these conditions [17]. Phenolic compounds may have a direct contribution to have an antioxidant effect [18]. Flavonoids are well known antioxidants. In different studies, antioxidant activities of flavonoid-rich plant extracts were found to be quite high [16,19]. Farzaei M.H. et al. identified the chemical constituents of the essential oil from the aerial parts of *Tragopogon graminifolius* by GLC and GLC-MS [20]. In our study, chlorogenic acid, caffeic acid, syringic acid, p-coumaric acid, and o-coumaric acid were found as common components in both samples. Chemical components of Hexane extract of *T. oligolepis* obtained from Muğla region (Turkey) were investigated by Uğur A. et al. who studied the same *Tragopogon* species as us, with GLC-GLC-MS the main components of the hexane extract were characterized as caryophyllene oxide (18.5%) [21]. Chlorogenic acid was found to be 323.1 µg for root extract and 814.8 µg for aerial parts extract in our study. Uysal S. et al. [22] indicated the presence of chlorogenic acid in water and methanolic extracts of *Tragopogon dubius* obtained from Kastamonu, Turkey. The authors reported that the highest content of phenolics was detected in the methanolic extracts. In addition, the authors stated that chlorogenic acid was the dominant natural product and benzoic acid observed in the methanolic extract, as we determined in our study. According to Sareedenchai V. et al. and Granica S. et al. also found that the amount of chlorogenic acid was high in *Tragopogon porrifolius* L. and *Tragopogon tommasini* extracts, similar to our study [23, 24]. Moreover, the *Tragopogon dubius* methanolic extract exhibited a promising antioxidant effect [22]. Similarly we predict that it may show a promising antioxidant effect with values for FRAP at root and aerial parts extract in our study. In addition, we determined 157.8 µg of o-coumaric acid for aerial parts in our study. As Abdalla and Zidorn stated in their review on the use of *Tragopogon* species, their phytochemical and pharmacological properties [25], similar to our study, Smolarz and Krzaczek's studies found high apigenin, luteolin, syringic acid and caffeic acid levels in methanolic extracts of *Tragopogon orientalis* L. [26]. In this study, when evaluated in terms of DPPH radical scavenging activity, more activity was found in the aerial parts than in the root (0.60±0.01 mg/ml) (Figure 1). Similarly to our study, Farzei M. H. et al. found high DPPH activity and high phenolic content in the aerial parts of *Tragopogon graminifolius*. However, contrary to our study, they found high reducing power in the root and low reducing power in the above-ground parts in the FRAP analysis. (Table 1) [20]. Falahi E. et al. investigated the phenol and flavonoid content and DPPH IC₅₀ of leaves *Tragopogon graminifolium*. Based on their findings, the phenolic contents of extract of *T. graminifolium* were 513.71±60.77 mg GAE/ g dry extract and 7133.66±5368.17 µg/mL. [27]. Besides antioxidant capacity phytochemical composition of plants showed antimicrobial and anti-quorum sensing activity. The problem of antibiotic resistance, which complicates the treatment of infectious diseases, has accelerated the studies on the use of plants and antimicrobial effective substances obtained from them. In addition, the inhibition of the bacterial communication system, which is effective in the management of virulence by many microorganisms, has been another focus in this struggle in recent years [28, 29]. Many synthetic and natural compounds have been studied and studied for the inhibition of the system that plays a role in the synthesis of many virulence factors such as elastase B production, biofilm formation, protease production, and swarming motility [30, 31]. In the literature review, no study was found in which the inhibition effect of on anti-quorum sensing, especially the swarming motility of *Pseudomonas* and pyocyanin pigment production. However, in a study with antibacterial properties of *T. oligolepis* were investigated and it was observed that the ethyl alcohol extracts was most effective on some MDR *Staphylococcus* species [27].

In conclusion, in this study, phenolic content of *T. oligolepis*, which is an endemic species, were investigated and its antioxidant ability and some virulence factors in *P. aeruginosa*, were investigated. It was found that the bacterial test results showed an inhibition effect against pyocyanin production and swarming motility, which have an important role in virulence. In recent years, when antibiotic resistance is a serious problem, the tendency to herbal drugs in the fight against bacteria and the prevention of the formation of infectious diseases by preventing the communication between bacteria without killing them are seen among the promising strategies.

Declaration of Ethical Code

In this study, we undertake that all the rules required to be followed within the scope of the "Higher Education Institutions Scientific Research and Publication Ethics Directive" are complied with, and that none of the actions stated under the heading "Actions Against Scientific Research and Publication Ethics" are not carried out.

References

- [1] Bell, C.D., Mavrodiev, E.V., Soltis, P.S., Calaminus, A.K., Albach, D.C., Cellinese, N., Garcia-Jacas, N. and Soltis, D.E. 2012. Rapid diversification of *Tragopogon* and ecological associates in Eurasia, *Journal of Evolutionary Biology*. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2012.02616.x>.
- [2] Gültepe, M., Coşkunçelebi, K., Makbul, S., Güzel, M.E. 2021 Contribution to the taxonomy of little known *Tragopogon* species endemic to Turkey. *Nordic Journal of Botany*. 39:1-7.
- [3] Davis, P., H., Mill, R., R. ve Tan, K., 1988. *Tragopogon* L. –In: Davis, P. H., Mill, R. R. & Tan, K. (eds.), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands (Suppl. 1)*. Vol. 10, Edinburgh Univ. Press, Edinburgh, 169-170.
- [4] Hartvig, P. ve Strid, A., 1987. Nev Taxa and New Record from the Mountains of SW and SC Turkey, *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie*, 108, 2,3, 301-341.
- [5] Varut, R.M., Rotaru, L.T. and Varut, M.C. 2017. QSPR Correlation of Physico-chemical Descriptors with the Molecular Surface Area and Rf of Ten Polyphenolic Compounds, Separated from Vegetal Extracts by TLC, *Rev. Chim (Bucharest)*. 68(8), 1776-177.
- [6] Asfour, H.Z. 2018. Anti-Quorum Sensing Natural Compounds. *J Microsc Ultrastruct*, 6(1), 1-10. doi: 10.4103/JMAU.JMAU_10_18. PMID: 30023261.
- [7] Zaman, S. B., Hussain, M.A., Nye, R., Mehta, V., Mamun, K.T. and Hossain, N.2017. A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing, *Cureus*. 9(6). <https://doi.org/10.7759/cureus.1403>.
- [8] Gonelimali, F.D., Lin, J., Miao, W., Xuan, J., Charles, F., Chen, M. and Hatab, S.R. 2018. Antimicrobial properties and mechanism of action of some plant extracts against food pathogens and spoilage microorganisms. *Front. Microbiol*, 9, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01639>.
- [9] Martínez, F.J. Á., Catalán, E. B., López, M. H., Micol, V. 2021. Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action, *Phytomedicine*, 90. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153626>.
- [10] Adonizio, A., Kong, K.F., Mathee, K. 2008. Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* by south Florida plant extracts, *Antimicrob. Agents Chemother*, 52, 198–203. <https://doi.org/10.1128/AAC.00612-07>.
- [11] Slinkard, K. and Singleton, V.L. . 1977. Total phenol analysis: Automation and comparison with manual methods. *Am J Enol Viticult*, 28, 49-55.
- [12] Benzie, I.F.F. and Szeto, Y.T. 1999. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agr Food Chem* 47, 633- 636. <https://doi.org/10.1021/jf9807768>.
- [13] Pokorny, J., Yanishlieva, N. and Gordon, M. 2001. *Antioxidants in Food*, CRC Pres, USA.
- [14] Köhler, T., Curty, L.K., Barja, F., van Delden, C. and Pechère, J.C. 2000. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol*, 182(21), 5990-6. doi: 10.1128/JB.182.21.5990-5996.2000.
- [15] Essar, D.W., Eberly, L., Hadero, A. and Crawford, I.P. 1990. Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: Interchangeability of the two anthranilate synthase and evolutionary implications, *J. Bacteriol.* 172, 884–900. <https://doi.org/10.1128/jb.172.2.884-900.1990>.
- [16] Ceylan, S., Cetin, S., Camadan, Y., Saral, O., Ozsen, O. and Tutus, A. 2019. Antibacterial and antioxidant activities of traditional medicinal plants from the Erzurum region of Turkey. *Irish Journal of Medical Science*. <https://doi.org/10.1007/s11845-019-01993-x>.

- [17] Duthie, G. and Crozier, A. 2000. Plant-derived phenolic antioxidants. *Curr Opin Lipidol* 11, 43–7.
- [18] Duh, P.D., Tu, Y.Y. and Yen, G.C. . 1999. Antioxidant activity of water extract of harn jzur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Leb Wissenschaft Technol Food Sci Technol* 32(5), 269–277. <https://doi.org/10.1006/fstl.1999.0548>.
- [19] Cakir, A., Mavi, A., Yıldırım, A., Duru, M.E., Harmandar, M. and Kazaz, C. 2003. Isolation and characterization of antioxidant phenolic compounds from the aerial parts of *Hypericum hyssopifolium* L. By activity-guided fractionation. *J Ethnopharmacol*, 87,73–83. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00112-0](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00112-0).
- [20] Farzaei, M.H., Rahimi, R., Attar, F. and et al. 2014. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of essential oil and extracts of *Tragopogon graminifolius*, a medicinal herb from Iran. *Nat Prod Commun* PMID: 24660479.
- [21] Ugur, A., Sarac, N., Ceylan, O., Emin Duru, M., Okmen, G. and Varol, O. 2010. Chemical composition of endemic *tragopogon oligolepis* and studies on the antimicrobial activity against multi-antibiotic resistant bacteria. *acta hortic.* 853, 299-306,DOI: 10.17660.
- [22] Uysal, S., Senkardes, İ., Mollica, A., Zengin, G., Emre, G. and et al. 2018. Biologically-active compounds from two members of the Asteraceae family: *Tragopogon dubius* Scop. and *Tussilago farfara* L. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* 37(12). DOI: [10.1080/07391102.2018.1506361](https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1506361).
- [23] Sareedenchai, V., Ganzera, M., Ellmerer, E.P., Lohwasser, V. and Zidorn, C. 2009. Phenolic compounds from *Tragopogon porrifolius* L. *Biochemical Systematics and Ecology*, 3(3), 234-236. DOI : 10.1016/j.bse.2009.03.004.
- [24] Granica, S., Piwowski, J.P., Randozzo, A., Schneider, P., Granica, B.Z. and Zidorn, C. 2015. Novel stilbenoids, including cannabispiradienone glycosides, from *Tragopogon tommasinii* (Asteraceae, Cichorieae) and their potential anti-inflammatory activity. *Phytochemistry*, 117, 254-266. DOI: [10.1016/j.phytochem.2015.06.018](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.06.018).
- [25] Abdalla, M.A and Zidorn, C. 2020. The genus *Tragopogon* (Asteraceae) : A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties, *Journal of Ethnopharmacology*, 250: 112466. DOI: [10.1016/j.jep.2019.112466](https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112466).
- [26] Smolarz, H.D and Krzaczek, T. 1988. Phytochemical studies of the herb, *Tragopogon orientalis* L. (Asteraceae) 2. Components of a methanol extract. *Acta Societatis Botanicorum Poloniase*, 57, 93-105. ISSN: 0001-6977.
- [27] Falahi, E., Delshadian, Z., Ahmadian, H. and Jokar, S.S. 2019. Head space volatile constituents and antioxidant properties of five traditional Iranian wild edible plants grown in West of Iran. *Agriculture and Food* 4(4), 1034-1053. DOI: [10.3934/agrfood.2019.4.1034](https://doi.org/10.3934/agrfood.2019.4.1034).
- [28] Önem, E. 2022. New green solutions against bacterial resistance: palmarosa (*Cymbopogon martini*) essential oil and quorum sensing. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 25,100587.
- [29] Martínez, O. F., Rigueiras P.O., Pires Á.S., Porto W.F., Silva O.N., Nunez C.F. and Franco, O.L. 2018. Interference with quorum-sensing signal biosynthesis as a promising therapeutic strategy against multidrug-resistant pathogens, *Front. Cell Infect. Microbiol*, 8, 444.
- [30] Fuentes, G.A., Curiel, Q.E., Correa, B. J. and et al. (2020). N-Heterocycles Scaffolds as Quorum Sensing Inhibitors. *Design, Synthesis, Biological and Docking Studies. Int J Mol Sci*, 21(24), 9512.
- [31] Önem, E., Tüzün, B. and Akkoç, S. 2021. Anti-quorum sensing activity in *Pseudomonas aeruginosa* PA01 of benzimidazolium salts: electronic, spectral and structural investigations as theoretical approach, *J Biomol Struct Dyn*, doi: 10.1080/07391102.2021.1890222.

Comparison of Local Anesthetic Injection and Exercise Therapy Results in Patients with Chronic Cervical Myofascial Pain Syndrome

Kronik Servikal Miyofasyal Ağrı Sendromlu Hastalarda Lokal Anestezik Enjeksiyonu ve Egzersiz Tedavisi Sonuçlarının Karşılaştırılması

Handan ÇAĞLAR ÇAVDAR ^{1*}, Nihal BÜKER ², Gülbüz SAMUT ³

¹ Suleyman Demirel University Atayalvaç Vocational School of Health Services Department of Physiotherapy and Rehabilitation, Isparta, Türkiye

² Pamukkale University Vocational School of Physical Therapy and Rehabilitation, Denizli, Türkiye

³ Kazan Hamdi Eriş State Hospital, Ankara, Türkiye

ABSTRACT

Objective: The study was planned to evaluate patients with chronic cervical myofascial pain syndrome treated with lidocaine injection and exercise and to compare the efficacy of treatments.

Material and Method: The study included 73 patients (40 females, 33 males) aged between 25 and 65 years, who had been treated with exercise and lidocaine injection due to the diagnosis of myofascial pain syndrome in our clinic 6 months ago, and volunteered to participate in the study. The mean age of the participants in the exercise group (n=38) was 44.16±10.63 years. The age of the participants in the lidokayn injection group (n=35) was 42.20±11.63 years. The exercise group was given stretching exercises for the neck and upper back muscles, and strengthening exercises for the neck muscles, 3 sets of 10 times a day. On the other hand, to the Lidokayn injection group participating in the study, 2 ml of 1% lidocaine was applied locally to the trigger points according to the injection technique defined by Travell and Simons. Patients' pain Visual Analogue Scale, pressure pain threshold Algometer, muscle spasm Palpable Muscle Spasm Scoring, cervical normal joint movement (CROM), disability level Neck Disability Scale, depression status Beck Depression Scale, anxiety status Beck Anxiety Inventory and quality of life SF-36 Short Form-36 scales. . Statistical significance level is (p<0.05).

Results: The results of lidocaine ejection and exercise are similar in the treatment of MAS. We think that exercise therapy is more feasible in the treatment of MAS because it is non-invasive, easily applicable and more economical.

Keywords: Exercise, Lidocain, Myofascial pain syndromes

Alınış / Received: 10.10.2022 Kabul / Accepted: 16.12.2022 Online Yayınlanma / Published Online: 20.12.2022



Ö Z E T

Amaç: Çalışma lidokayn enjeksiyonu ve egzersizle tedavi edilmiş kronik servikal miyofasyal ağrı sendromlu hastaları değerlendirmek ve tedavilerin etkinliğini karşılaştırmak amacıyla planlandı.

Materyal ve Metot: Çalışmaya ortalama 6 ay öncesinde kliniğimizde miyofasyal ağrı sendrom tanısı nedeniyle egzersiz ve lidokayn enjeksiyonu tedavisi almış, çalışmaya katılmaya gönüllü olan, 25 ve 65 yaş aralığında 73 hasta (40 kadın, 33 erkek) dahil edildi. Egzersiz grubundaki (n=38) katılımcıların yaşları ortalaması 44,16±10,63 yıldır. Lidokayn enjeksiyon grubundaki (n=35) katılımcıların yaşları ise 42,20±11,63 yıldır. Egzersiz grubuna daha önce günde 3 set 10'ar kez olmak üzere boyun ve üst sırt kaslarına germe, boyun kaslarına kuvvetlendirme egzersizleri verildi. Çalışmaya katılan Lidokayn enjeksiyonu grubuna ise daha önce tetik nokta üzerine lokal olarak %1'lik 2 ml lidokain, Travell ve Simons'un tanımladığı enjeksiyon tekniğine göre tetik noktalara uygulandı. Hastaların ağrısı Görsel Analog Skalas. basınç ağrı eşiği Algometre, kas spazmı Palpabl Kas Spazmı Skorlaması, servikal normal eklem hareketi (CROM), özür düzeyi Boyun Özür Ölçeği, depresyon durumu Beck Depresyon Ölçeği, kaygı durumu Beck Kaygı Ölçeği ve yaşam kalitesi SF-36 Short Form-36 ölçekleri ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi (p<0.05) tir.

Bulgular: Katılımcıların sonuçları karşılaştırıldığında ağrı algısı, kas spazmı, hareket açıklığı, depresyon, kaygı ve özür durumu genel yaşam kalitesi açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p>0,05).

Sonuç: MAS tedavisinde Lidokayn enjeksiyonu ve egzersiz uygulamasının sonuçları benzerdir. Egzersiz tedavisinin non-invaziv, kolayca uygulanabilir ve daha ekonomik olması nedeniyle MAS tedavisinde daha edilebilir olduğunu düşünüyoruz.

Anahtar Kelimeler: Egzersiz, Lidokayn, Miyofasyal Ağrı Sendromu



1. Introduction

Sedentary life routine and musculoskeletal disorders as a result of rapidly developing technology increase the myofascial pain syndrome (MPS) of the society nowadays [1]. There are different prevalence and incidence values of MPS in the studies and it is more prevalent in female gender between 27.5-50 years of age [2]. Although the etiology of MPS is not clear, the causes of this syndrome are chronic muscle injuries caused by cumulative trauma, acute traumas, muscle fatigue, environmental and psychological stress, and the presence of genetic factors [3]. There is no clear pathology a result of investigations on trigger points characterized by MPS [4]. The symptoms of myofascial pain syndrome originating from a trigger point resulted from a sudden overload or repeated micro-trauma are muscle spasm, limitation of movement, loss of muscle strength, depression, sleep disturbance and autonomic dysfunctions [5].

Trigger points, the most important among the clinical symptoms of MPS, are the 2-5 mm diameter sensitive points which are in the skeletal muscle or multiple muscle at the same time and in which pressure and pain occurs. Taut bands, which are referring to the shortened, hardened and increased tonus of muscle fiber, are the definite objective finding in the examination of MPS [6].

The treatment of painful trigger points may vary; however, the primary aim of treatment is to relieve pain and increase muscle strength at the same time, to regain joint range of motion and to provide suitable posture [7]. Pharmacological treatment such as muscle relaxants, pain relievers and non-steroidal anti-inflammatory drugs as well as interventional applications such as therapeutic local anesthetic, botulinum toxin, steroid injections and dry needling, can be recommended. In addition, noninvasive methods such as hot-cold applications, electrotherapy methods, physical therapy modalities and / or massage and stretching, range of motion are also important in the treatment and treatment is usually administered as a combination of these methods. This study, it is aimed to evaluate the clinical results of patients with chronic cervical MPS who were treated with local anesthetic injection or exercise, and to determine the effectiveness of the treatments and the most appropriate treatment for MPS.

2. Material and Method

Patients diagnosed with MPS according to Simons et al diagnostic criteria were included to this retrospective study. 392 patients aged 25-65 years who were diagnosed with chronic cervical myofascial pain syndrome and received local anesthetic injection and exercise therapy at Yalvac District State Hospital Physical Therapy and Rehabilitation Unit between March 2015 and March 2016 were invited to participate in the study. Since the most common treatment modalities for MPS patients in the clinic were exercise and local anesthetic injections, patients with MPS who were treated with these methods were preferred in the study. In the literature, exercise was frequently preferred as secondary therapy in MPS treatments. In our study, exercise group was preferred to determine the effectiveness of exercise alone in acute conditions. Patients diagnosed with MPS in our clinic may reject injection therapy. In this case, the exercise therapy is given and they are asked to keep an exercise log. In this way, it is seen whether they do their exercises regularly and the process is archived in the diaries of the patients.

The patients diagnosed with MPS were included in the study. The patients included in the treatment were those who were treated with a local anesthetic injection or home program, did not use any corticosteroids, and had not undergone any previous medical operation or treatment. However, he also had Turkish reading and comprehension skills. Patients who did not accept to participate in the study, did not exercise regularly for any reason, did not complete the evaluations, and received additional treatments were determined as exclusion criteria in the study (Figure 1).

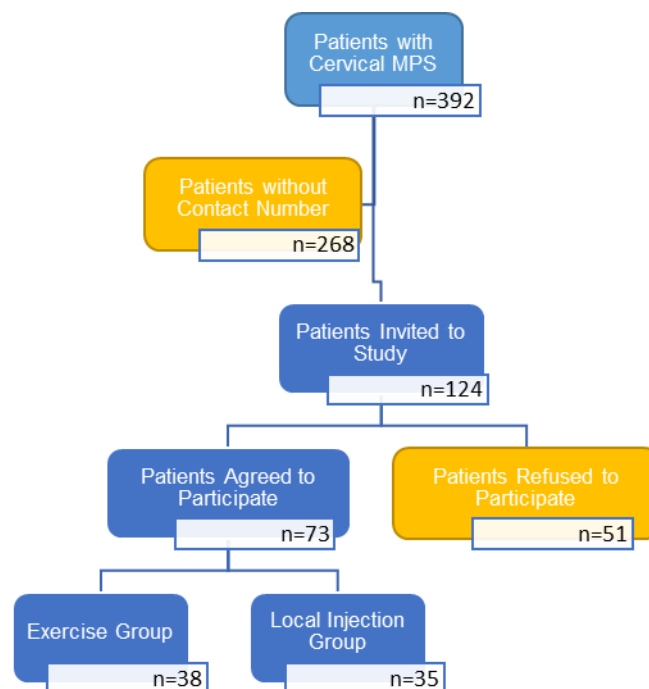


Figure 1: Working flow chart

The demographic data of the participants who signed the consent form after being informed and agreed to participate in the study were recorded with a form.

Visual Analogue Scale (VAS) was used to evaluate the pain severity of the patients. The scale consists of a 10 cm straight line. A score of 0 indicates no pain, and a score of 10 indicates unbearable pain. Patients were asked to mark their pain in activity and resting states. Palpable Muscle Spasm Scoring was used with palpation of the tender point to evaluate the muscle spasm status of the patients [8]. A universal goniometer was used to evaluate the normal range of motion in the neck joint. Flexion, extension, lateral flexion and rotation movements of the neck were measured and the results were recorded. The Neck Disability Scale (DCS) was used for neck disability status. This scale is used to evaluate cervical region disability in patients and consists of 10 items with different parameters and 6 answer options [9]. Beck depression scale (BDS) was used to evaluate the depressive status of the patients. The scale consists of 21 questions that individuals need to answer considering their last week [10]. The Beck anxiety Scale (BAS) was used to evaluate the anxiety status of the patients. The scale consists of 21 questions that include specific symptoms of individuals' anxiety [11]. SF-36 (Short form 36) quality of life questionnaire was applied to evaluate the quality of life of the patients who accepted to participate in the study. The scale was grouped under 8 titles consisting of 36 items. The main titles of the scale are; general health, activities of daily living, physical health, mental health, social activities and pain status [12]. In order to determine muscle sensitivity, pressure pain threshold should be measured and this measurement gives more reliable results by device rather than manual measurement. In addition, a digital algometer was used to determine the pressure pain threshold of the participants.

Patients who were diagnosed with myofascial pain syndrome by applying to the physical therapy and rehabilitation clinic were called by the physiotherapist and invited to the study and formed the exercise group of the study. Neck and upper back muscles as a home exercise program for the patients included in the exercise group; stretching and strengthening exercises for m.trapezius, deep neck flexor muscles and neck extensor muscles were taught. The exercises were shown to the patients by the physiotherapist practically in front of the mirror and it was confirmed whether the patients did the exercises appropriately. The patients were told that they should do the exercises in the home program at least 3 days a week, 3 times with 10 repetitions a day. A brochure for the description of the exercises was also given to the patients. The average follow-up time of patients was $X = 5 \pm 1.2$ months.

The injection group of the study was formed by the patients who received treatment with injection of 2 ml of lidocaine locally on the trigger point from multiple points by experienced physician (same physician administrated the treatments to all patients) according to the method of injection determined by Travell and Simons (minimum 2, maximum 4) [13]. The average follow-up time of the patients was $X = 5 \pm 2.9$ months.

SPSS 16.0 version was used to analyze and compare the evaluation methods. As a result of the Shapiro Wilk test, the t test was applied to the groups with normal distribution in independent group. Comparison of depressive symptoms and neck disability levels of the groups were performed by Independent groups t-test analysis and comparison of the general life quality of the groups were performed by Independent groups t-test analysis. $p \leq 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

Descriptive data of the patients were given in table 1. While the age of participants in the exercise group ($n = 38$) was 44.16 ± 10.63 years, the age of the participants in the injection group ($n = 35$) was 42.20 ± 11.63 years.

In the local anesthetic injection group, 20 patients (57.1%) were female and 15 (42.9%) were male. In the exercise group, 18 (47.7%) were male and 20 (52.6%) were female (Table 1).

Table 1: Demographic characteristics of participants

Variables	Local injection group (n=35) X±SD	Exercise group (n=38) X±SD	t	p*
Age(year)	42.20±11.63	44.16±10.63	0.75	0.45
Size(cm)	164.49±7.95	164.79±9.6	0.14	0.88
Weight(kg)	73.31±12.77	79.26±13.35	1.94	0.05
BMI(kg/m ²)	27.23±5.26	29.29±5.30	1.67	0.09
Male	42.9%	52.6%		
Female	57.1%	47.4%		
Occupation				
Civil Cervant	28.6%	15.8%		
Self Employed	17.1%	28.9%		
Housewife	42.9%	42.1%		
Retired	11.4%	13.2%		
Educational Attainment				
Primary School	11.4%	5.3%		
Middle School	22.9%	34.2%		
High School	34.3%	42.1%		
University	31.4%	18.4%		

Independent groups t-test analysis *p<0.05

BMI: Body Mass Index

When palpable muscle spasm data of the participants in the local anesthetic injection and exercise group were examined, 4 (10.5%) of the exercise group received 1 point, 23 (60.5%) received 2 points and 11 (28.9%) received 3 points. In the local anesthetic injection group, 11 (32.4%) received 1 point, 20 (57.1%) received 2 and 4 (11.4%) received 3 points (Figure 2).

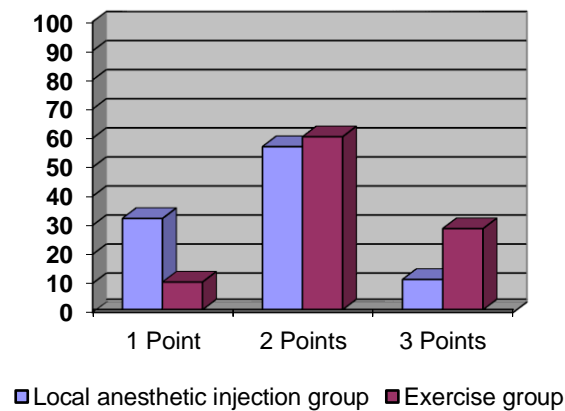


Figure 2: Distribution of palpable muscle spasm values of groups

There was no statistically significant difference in pain, cervical normal joint range of motion, pressure pain threshold, depressive and anxiety symptoms, disability levels and general life quality among the participants in the local anesthetic injection and exercise group ($p > 0.05$) (Table 2, 3, 4)

Table 2: Comparison of pain perception and active joint range of motion in groups

Variables	Local injection group (n=35) X±SD		Exercise group (n=38) X±SD		t	p*
	Min-max	X±SD	Min-max	X±SD		
Resting Pain (VAS) (cm)	1.2-6.5	3.18±1.23	1-6.1	2.65±1.21	-1.861	0.67
Activity pain (VAS) (cm)	3.9-9.6	6.64±1.33	3.2-9.4	6.60±1.49	-0.138	0.89
Pressure pain threshold	5.3-12.1	8.43±1.89	5.2-11	7.92±1.69	-1.206	0.23
ROM total	275-320	299.97±12.16	272-318	296.84±11.46	-1.131	0.26

p>0.05, Independent Groups t-test
 VAS: Visual Analogue Scale
 ROM: Range of Motion

Table 3: Comparison of depressive symptoms and neck disability levels of the groups

Variables	Local injection group (n=35) X±SD		Exercise group (n=38) X±SD		t	p*
	Min-max	X±SD	Min-max	X±SD		
BDS	7-40	22.11±8.48	10-45	21.92±8.30	-0.09	0.92
BAS	10-39	20.71±7.60	5-37	20.18±7.81	-0.29	0.77
NDS	7-29	16.85±4.27	9-34	18.47±4.81	2.18	0.65

p* < 0.05, Independent Groups t-test
 BDS: Beck Depression Scale
 BAS: Beck Anxiety Scale
 NDS: Neck Disability Scale

Table 4: Comparison of the general life quality of the groups

Variables	Local injection group (n=35) X±SD		Exercise group (n=38) X±SD		t	p*
	Min-max	X±SD	Min-max	X±SD		
General Scale of Life Quality (SF-36)						
Physical function (FF)	40-90	55.14±9.58	15-90	49.34±19.73	-3.68	0.12
Physical role limitation (FRL)	0-100	49.28±28.75	0-100	41.44±30.90	-1.11	0.26
Role emotion (RE)	0-100	41.90±27.22	0-100	36.83±30.79	-0.74	0.46
Energy level (EL)	30-75	48.85±10.85	20-75	48.42±13.20	-0.15	0.87
Mental well-being (MWB)	36-76	57.62±11.21	20-80	53.47±14.83	-1.34	0.18
Social function (SF)	25-100	53.71±17.29	12.5-75	48.02±14.09	-1.54	0.12
Pain (PH)	22.5-77.5	44.28±16.56	22.5-90	48.31±16.81	1.03	0.30
General health (GH)	30-70	48.57±10.88	25-75	47.36±13.98	-0.40	0.68

p* < 0.05, Independent Groups t-test
 SF-36: Short Form -36

4. Discussion and Conclusion

In the literature about the treatment of MPS, there are studies reporting that exercise should be given as an adjunctive therapy to treatments such as local injections, dry needles and electrotherapy methods. However, in this study, we administered only injection treatment for one group and only exercise therapy for the other group with the thought that the exercise therapy should be the primary treatment modality. We found that the clinical results of our patients who received injection and exercise therapy were similar. Thus, we found that exercise alone could be given as the main treatment method for MPS patients rather than as an adjunct to any treatment and there was no difference in approximately 8 months results of the patients.

Musculoskeletal system pain is one of the reasons of major morbidity [14]. MPS is also a major cause of musculoskeletal pain. The main aim of the treatment is to reduce pain and make the effect permanent as soon as possible. Invasive and non-invasive methods related to MPS treatment have been repeatedly compared with different parameters and evaluation methods, and there are some studies which is accepted in general that invasive methods provide early and long-term improvement in treatment, and exercise therapy should be given as a secondary therapy in addition to any treatment for MPS treatment [15]. However, in our study, contrary to these studies; when we compared local anesthetic injection therapy and noninvasive exercise therapy with a minimally invasive method, we found that our patients benefited from both treatment methods and the results of clinical recovery were similar.

Previously, resting and inactivity were recommended in the treatment of chronic pain for years, but over the years it was replaced by physical activity and exercise programs, considering the effectiveness of exercise in reducing pain severity, and the specific benefits of improving physical and mental health. In Cochrane examinations, there are studies stating that pain can be controlled by exercise to determine the effect of exercise programs and physical activity on pain severity, quality of life, function and use of healthcare service as well as the side effects and exercise-related damages in reducing chronic pain in adults, as far as studies stating that exercise programs and physical activity are not effective [16]. However, it was stated in this study that exercise has positive effects on physical function and it was reported that the studies were small and medium scale and larger sample and long term follow up results were required to be taken. In spite of this confusion in the literature about chronic pain treatment, our study supports studies showing the effectiveness of exercise.

When compared to lidocaine injection and physiotherapy modalities, dry needling, ultrasound and stretching exercises in the treatment of MPS in terms of efficacy of therapies, a statistically significant difference couldn't be found, but it was seen to be effective when compared to placebo [17, 18,19] In a recent study, it was reported that both lidocaine injection into trapezium muscles and correction of biomechanical factors had positive effects on pain relief for MPS patients who did not benefit from physiotherapy [20]. In our study, it was shown that local anesthetic injection could be used effectively in MPS treatment, but both treatment modalities in which clinical results were not different with exercise treatment, were found to provide pain relief, increase functionality and quality of life, and reduce disability. The mean follow-up period of our patients was consistent with the literature, and it was determined in the examination that our patients were not receiving any additional treatment during this period (including medical therapy as analgesic and muscle relaxants).

Exercise therapy was added to both treatment program under the control of both physiotherapist and home program as well as each treatment program in comparison with the studies. [21]. Stretching and posture exercises mostly preferred for MPS treatment as well as therapeutic and protective effects have an important role in the treatment due to having the same long-lasting effects of passive stretching which is the only exercise that can be tolerated by the trigger points which was increased in sensitivity [22]. According to Travell and Simons, the patient with MPS who has a trigger point to provide full joint range of motion and continuous relaxation should be given passive stretching exercises in the form of a home program especially by creating awareness. Whereas Hayden reported that it could be more effective with other conservative methods compared to the application of exercise alone in decreasing pain and increasing function [23]. Recent Cochrane review has shown that the use of strengthening and endurance exercises for cervical-scapulothoracic and shoulder may be of moderate benefit in reducing pain and improving function. However, it emphasized that new studies should be performed to determine the optimal dosage by stating that no beneficial effects can be expected only if stretching exercises are

used [24]. Based on the findings of our study, we think that exercise therapy can be used effectively in the treatment of MPS alone.

Both treatment modalities have similar effects. Therefore, we think that exercise therapy is a preferable method since it is both easy and cost-effective to use and it is a non-invasive method. In addition, exercises should be added to each treatment in order to increase the effectiveness of the treatments administered, to be sustainable, to decrease their tension, to regain muscle flexibility and to decrease the frequency of recurrences. The fact that the participants in the study consisted of patients with MPS diagnosis only in the neck and shoulders, being done the reliability of validity of all the scales used in the study and the use of objective evaluation method such as algometric measurement were among the strengths of our study.

Acknowledgment

Financial support: This research was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Coordinator ship with project number 2015SBE004.

Conflict of Interest: There is no conflict of interest between the authors.

Declaration of Ethical Code

In this study, we undertake that all the rules required to be followed within the scope of the "Higher Education Institutions Scientific Research and Publication Ethics Directive" are complied with, and that none of the actions stated under the heading "Actions Against Scientific Research and Publication Ethics" are not carried out.

References

- [1] Graff-Radford SB. Myofascial pain: diagnosis and management. *Curr Pain Headache Rep.* 2004;8(6):463–67.
- [2] Chiarotto, A., Clijisen, R., Fernandez-de-las-Penas, C., & Barbero, M. Prevalence of myofascial trigger points in spinal disorders: a systematic review and meta-analysis. *Archives of physical medicine and rehabilitation.* 2016; 97(2):316-37.
- [3] Delgado, E.V., Romero, J.C., Escoda, G.E. Myofascial pain syndrome associated with trigger points: A literature review. (I): Epidemiology, clinical treatment and etiopathogeny. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.* 2009;14(10): 494-8.
- [4] Kietrys DM, Palombaro KM, Azzaretto E, Hubler R, Schaller B, Schluskel JM, et al. Effectiveness of dry needling for upper-quarter myofascial pain: a systematic review and meta-analysis. *J Orthop Sports Phys Ther.* 2013;43(9):620–34.
- [5] Rodríguez-Mansilla, Juan, et al. Effectiveness of dry needling on reducing pain intensity in patients with myofascial pain syndrome: a Meta-analysis. *Journal of Traditional Chinese Medicine.* 2016; 36.1: 1-13.
- [6] Travell, J.G., Simons, D.G. Travell & Simons' Myofascial Pain and Dysfunction The Trigger Point Manual Volume 1. Upper Half of Body. Williams & Wilkins, USA. 1999. 1038s.
- [7] Liu, Lin, et al. Effectiveness of dry needling for myofascial trigger points associated with neck and shoulder pain: a systematic review and meta-analysis. *Archives of physical medicine and rehabilitation.* 2015;96.5: 944-955.
- [8] Cheshire, William P.; Abashian, Sandra W.; Mann, J. Douglas. Botulinum toxin in the treatment of myofascial pain syndrome. *Pain.* 1994; 59.1: 65-9.
- [9] Vernon, Howard; Mior, Silvano. The Neck Disability Index: a study of reliability and validity. *Journal of manipulative and physiological therapeutics.* 1991; 14.7: 409-15.

- [10] Hisli, Nesrin. Beck Depresyon Envanterinin üniversite öğrencileri için geçerliliği, güvenilirliği. Psikoloji dergisi. 1989;7.23: 3-13.
- [11] Beck, Aaron T., et al. An inventory for measuring clinical anxiety: psychometric properties. Journal of consulting and clinical psychology. 1988; 56.6: 893.
- [12] Koçyiğit, Hikmet, et al. Kısa Form-36 (KF-36)'nın Türkçe versiyonunun güvenilirliği ve geçerliliği. İlaç ve tedavi dergisi. 1999; 12.2: 102-6.
- [13] Travell, J.G., Simons, D.G. Travell & Simons' Myofascial Pain and Dysfunction The Trigger Point Manual Volume 1. Upper Half of Body. Williams & Wilkins, USA. 1999. 1038s.
- [14] World Health Organization: The burden of musculoskeletal conditions at the start of the new millennium: Report of a WHO scientific group. Geneva, Switzerland: WHO, 2003.
- [15] Ay S, Doğan SK, Evcik D, Baser O. Comparison the efficacy of phonophoresis and ultrasound therapy in myofascial pain syndrome. Rheumatol Int. 2011;31:1203–8.
- [16] Geneen, Louise J., et al. Physical activity and exercise for chronic pain in adults: an overview of Cochrane Reviews. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2017; 4.
- [17] Ong, J. , & Claydon, L. S. The effect of dry needling for myofascial trigger points in the neck and shoulders: a systematic review and meta-analysis. Journal of bodywork and movement therapies. 2014;18.3: 390-398.
- [18] Lugo, Luz Helena, et al. Treatment of myofascial pain syndrome with lidocaine injection and physical therapy, alone or in combination: a single blind, randomized, controlled clinical trial. BMC musculoskeletal disorders. 2016;17.1: 101.
- [19] Karadaş, Ömer; Gül, Hakan L.; İnan, Levent E. Lidocaine injection of pericranial myofascial trigger points in the treatment of frequent episodic tension-type headache. The journal of headache and pain. 2013; 14.1: 44.
- [20] Parthasarathy, S., Siyam Sundar, and Gayatri Mishra. "Assessment of predisposing factors in myofascial pain syndrome and the analgesic effect of trigger point injections-A primary therapeutic interventional clinical trial." Indian journal of anaesthesia . 2019: 300, 63.4.
- [21] Ofluoğlu Demet, et al. İnterferansiyel Akımların Kronik Miyofasyal Ağrı Sendromunda Kısa Dönem Etkinliği. Journal of Physical Medicine & Rehabilitation Sciences/Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Bilimleri Dergisi. 2013;16:3.
- [22] Garipoğlu, İ. Myofasyal ağrı sendromunda tetik noktalara uygulanan yüksek güçlü ultrason tedavi etkinliğinin geleneksel tedavi yöntemleriyle karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi. Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Kliniği 2002 ; 146.
- [23] Hayden, Jill, et al. Exercise therapy for treatment of non-specific low back pain. The Cochrane Library. 2005.
- [24] Gross, Anita, et al. Exercises for mechanical neck disorders. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2015;1.

Is a Vegetarian Diet Safe to Follow During Childhood? Çocukluk Döneminde Vejetaryen Beslenme Güvenli mi?

Aslı YİĞİT ^{1*}, Gülhan SAMUR ²

¹ Süleyman Demirel Üniversitesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Isparta, Türkiye
² Hacettepe Üniversitesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Ankara, Türkiye

ABSTRACT

Vegetarianism is characterized by the exclusion of all animal flesh foods from the diet, including meat and fish. The more restricted form is a vegan diet that excludes all animal-derived food, including milk, dairy products, and eggs. During past decades questions have been raised about whether vegetarian diets are suitable during all stages of life and during the fast growth period. Nutrition during pregnancy and lactation is a potentially modifiable risk factor as it is an important determinant of lifetime disease risk. Therefore, it is of great importance to encourage mothers to have adequate and balanced nutrition during pregnancy and lactation. Infancy, childhood, and adolescence are critical periods, and nutritional requirements become crucial to be met during this time. Children on vegetarian diets might be at risk of certain nutrient deficiencies such as n-3 fatty acids, vitamin B₁₂, iron, and zinc. Furthermore, the nutritional habits acquired during this period may influence dietary patterns and the risk of disease later in life. Most of the studies investigating the effect of vegetarian diets on children are outdated. There is a lot of controversy regarding the safety of vegetarian diets in childhood, and more longitudinal studies are needed. This review focuses on the effects of vegetarian diets in children and the health consequences of vegetarian diets.

Keywords: Children, nutritional status, vegetarian diet, vegan diet, health, safety

Alınış / Received: 27.04.2022 Kabul / Accepted: 04.11.2022 Online Yayınlanma / Published Online: 20.12.2022



Ö Z E T

Vejetaryenlik, et ve balık dahil olmak üzere tüm hayvan etlerinin diyetten dışlanması ile karakterize edilmektedir. Vegan diyet ise daha kısıtlı olup süt ürünleri ve yumurta dahil olmak üzere tüm hayvansal kaynaklı gıdalar dışlanmaktadır. Vejetaryen diyetlerin yaşamın tüm aşamalarında ve özellikle hızlı büyüme döneminde uygun olup/ olmadığı konusu sıklıkla sorgulanmaktadır. Gebelik ve emzilik döneminde beslenme, yaşam boyu hastalık riskinin önemli bir belirleyicisi olduğu için potansiyel olarak değiştirilebilir bir risk faktörüdür. Bu nedenle, gebelikte ve emzirme döneminde annelerin yeterli ve dengeli beslenmeye teşvik edilmesi büyük önem taşımaktadır. Bebeklik, çocukluk ve ergenlik kritik dönemler olup, bu dönemlerde beslenme gereksinimlerinin karşılanması çok önemli hale gelmektedir. Vejetaryen ve vegan çocuklar n-3 yağ asitleri, B12 vitamini, D vitamini, kalsiyum, demir ve çinko gibi bazı besin ögesi eksiklikleri ile karşı karşıya olabilir. Ayrıca, bu dönemde edinilen beslenme alışkanlıkları ve beslenme düzeni, yaşamın ilerleyen dönemlerinde hastalık riskini etkileyebilmektedir. Vejetaryen beslenmenin çocuklar üzerindeki etkisini araştıran çalışmaların çoğu güncelliğini kaybetmiştir. Çocuklukta vejetaryen diyetlerinin güvenliği konusunda pek çok tartışma söz konusu olup yeterli uzunlamasına çalışma bulunmamaktadır. Bu derleme, çocuklarda vejetaryen diyetlerin etkilerine ve sağlık üzerindeki sonuçlarına odaklanmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Çocuk, beslenme durumu, vejetaryen diyet, vegan diyet, sağlık, güvenlik



1. Introduction

Vegetarian diets are characterized by the exclusion of flesh foods such as meat and meat products, poultry, fish, and seafood. Vegetarian diets may include eggs, milk, and dairy products and are rich in plant-based foods such as vegetables, fruits, grains, legumes, nuts, and seeds. On the other hand, a vegan diet excludes all animal-derived food, including milk, dairy products, eggs, and even honey [1]. Different types of vegetarian diets [2-3] are described in table 1. A growing number of people are following vegetarian diets because of ethical, environmental, and health concerns [4]. The primary motivation behind following a vegetarian diet is animal protection, but it is also due to concerns about hormone and antibiotic use in animals or environmental concerns [5].

There are many longitudinal studies, the results of which suggest that vegetarians have a lower risk for certain diseases such as ischemic heart disease, hyperlipidemia, and hypertension [6,2,7]. But there are much less data available on the health consequences of vegetarian diets in infants and children. Therefore, the evidence may not be sufficient to conclude that a well-planned vegetarian diet is suitable for all stages of life [6]. If not appropriately planned, following a vegetarian diet may result in a reduced intake of specific nutrients such as n-3 fatty acids, vitamin D and B12, iron, zinc, and calcium. Academy of Nutrition and Dietetics (AND) states that well-planned vegetarian diets are appropriate for all stages of the life cycle and may provide some health benefits in the prevention of certain diseases [2,6]. On the other hand, the German Nutrition Society (DGE) is against all plant-based diets for infants, children, and adolescents [8]. The recent literature regarding the safety of vegetarian diets for children will be discussed further in this review.

Table 1: Different types of vegetarian diets

Lacto-ovo-vegetarian	Consumes eggs, milk and dairy products
Lacto-vegetarian	Consumes milk and dairy products but not eggs
Ovo-vegetarian	Consumes eggs and egg products, but not milk and dairy products
Semi-vegetarian	Consumes red meat, poultry and fish less than once per week and more than once per month
Pescatarian	Consumes seafood, fish, eggs, milk and dairy products but no red meat and poultry
Vegan	Excludes any kind of animal derived foods including eggs, milk, dairy products and honey
Raw vegan	Consumes mainly uncooked fruits, vegetables, nuts and seeds, grains and legumes.

Vegetarian Diets in Children

Even though there are various reasons why people adopt a vegetarian diet style, vegetarianism in children is primarily the parents' decision [9]. The prevalence of vegetarianism in children varies around the world. According to National Surveys, 0.7% of children aged 6-12 and 1.3% of children ages 12-19 years are vegetarians in the United States. Similarly, in the United Kingdom, approximately 2% of children reported being vegetarian [10]. Although vegetarian diets are perceived as healthy, there are some concerns about the nutritional requirements during infancy, childhood, and adolescence [11]. In growing children, height and weight and cognitive and psychomotor development are influenced by the quality of the diet they consume. Therefore, infants and children must get their nutritional requirements met. In the fast-growing period, vegetarian children might be at risk of certain nutrient deficiencies such as n-3 fatty acids, vitamin B12, iron, and zinc. Furthermore, the nutritional habits acquired in this period may influence dietary patterns later in life [12].

The period from birth to 1 year is a critical period to meet the nutrients needed to support extremely fast growth. Particular attention should be paid to normal growth and neurodevelopment targets at this stage. In the second half of the first year of life, breast milk alone is not enough to provide enough energy, protein, zinc, iron, and fat-soluble vitamins (vitamins A, D, K). Thus, complementary feeding is a crucial stage in an infant's growth, and it may play a significant role later in life [13]. Recently ESPGHAN [European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Committee on Nutrition] stated on its position paper that vegan diets should be discouraged during complementary feeding [8].

The nutritional status of vegetarian children depends on the parents' level of education and knowledge [9]. Several cases of infant hospitalization were reported due to various nutrient deficiencies which developed after these infants were weaned with vegan regimes. An 11-month-old infant weaned with a vegetarian diet was hospitalized because of a severe B12 deficiency. In 2016 a 2-years-old child was hospitalized with severe nutritional deficiencies because he was exclusively breastfed by a mother following a vegan diet [3].

Nutrients that are likely to require special attention for vegetarian children include iron, zinc, vitamin B12, and additionally for vegan children calcium and vitamin D. Daily protein intakes of young vegetarians' usually meet recommendations, while protein needs of vegan children vary because of differences in amino acid composition and protein digestibility. Vegetarian diets are associated with limited absorption of iron and zinc due to their high content of phytates. Still, deficiencies of these minerals in children are not very common in industrialized countries. Children on vegan diets should be strictly monitored for Vitamin B12, iron, and zinc status [2].

Macro And Micronutrient Status in Children on a Vegetarian Diet

Children need more energy, macro, and micronutrients per body weight unit compared to adults to maintain healthy growth and development [14]. Therefore, nutrient status in children following a vegetarian or a vegan diet is important for their growth and development. Studies on macro and micronutrient intake of vegetarian children are limited and outdated [15]. Thane and Bates [16] included 13521 children (1.5-4.5 years) from the National Diet and Nutrition Survey to analyze and compare dietary intakes and nutrient status of vegetarian and non-vegetarian Asian preschool children. They found that vegetarian children had a higher energy intake from carbohydrates than non-vegetarian children. Serum ferritin levels were lower in vegetarian children, while antioxidant vitamin status was higher compared to non-vegetarian children. Although the authors concluded that lower intakes of fat, sodium and higher intakes of antioxidant vitamins may be beneficial, low serum ferritin levels may be a potential risk for impairment in growth for these children [16]. Alexy et al. [17] compared the dietary intakes of vegetarian (n =149), vegan (n =115), and omnivore (n = 137) children and adolescents (6–18 years) in Germany. The total energy intake was not significantly different between groups. Intake of carbohydrates was significantly higher among vegans and vegetarians compared to omnivores. The median protein was lowest among vegetarians. The authors did not report any specific nutritional risks among vegetarian and vegan children and adolescents [17]. In the study Peddie et al. [18] conducted, adolescent girls between the ages of 15-18 were assessed via 24-h diet recalls. Vegetarian adolescents had similar carbohydrate and fat intakes compared to non-vegetarians; however, their protein intake was lower. Vegetarian adolescents also ate less saturated fat, more polyunsaturated fat, and 5 g/day more fiber than non-vegetarians [18].

Protein

It is stated by AND that when energy intakes are sufficient, vegetarian diets [including vegan] meet recommended protein intakes. AND also states that different sources of plant-based protein eaten during the day to be enough to supply all of the essential amino acids. The regular consumption of soy and legumes may provide adequate protein intake for vegetarians [2]. Plant-based proteins such as soy or gluten, due to antinutritional factors, may have a lower digestibility than animal proteins. Even though all the essential amino acids are present in plant-based foods, certain amino acids are relatively low in some foods, such as lysine in rice and methionine in legumes. Concerning these essential amino acids, a combination of cereals and legumes may help to provide the needed daily amino acid composition [5].

EPA/DHA

A vegan diet consists of no EPA (eicosapentaenoic acid) or DHA (docosahexaenoic acid), while vegetarian diets can provide some DHA from eggs [6]. A small percentage of ALA (a-linolenic acid) from plants is converted to EPA and DHA in the human body. These fatty acids are essential for maintaining the cell membranes, brain, and retina during fast growth [2]. It is known that DHA is crucial for brain development, especially during the first years of life. Deficiencies of EPA and DHA are associated with some neurocognitive consequences, including autism spectrum disorders, ADHD [attention-deficit hyperactivity disorder], and dyslexia [6].

While ALA [a-linolenic acid] intakes of vegetarians are similar to those not following a vegetarian diet, their intakes of EPA and DHA are much lower. Therefore, in vegetarians, levels of these long-chain n-3 fatty acids may get significantly lower compared with non-vegetarians [2]. The suboptimal levels of DHA and EPA may put infants and children at risk for impaired CNS (central nervous system) development [6]. The plant-based sources of long-chain n-3 fatty acids are flaxseed, chia, canola, walnuts, and their oils [2]. For complementary feeding, n-3 rich oils such as walnut, soybean, and rapeseed may be added to one meal a day. DHA supplementation of 100mg/day is recommended from 12 months and on. The intake of n-3 fatty acids should be ensured with foods rich in ALA, including flaxseed, walnuts, chia, and soybean oil in children and adolescents. To meet the recommendations of DHA and EPA, algae-based supplements should be considered [5].

Vitamin D

Vitamin D levels closely correlate with sun exposure and the consumption of fortified foods or simply taking supplements. The degree of vitamin D production after sun exposure depends on many factors

such as latitude, season, time of the day, clothing, sunscreen use, skin pigmentation, and age. Low vitamin levels are detected in vegetarian and non-vegetarian populations, especially during winter and in higher latitudes. Fortification of vitamin D is done via cow's milk, plant-based milk, margarine, fruit juice, and cereals [2]. In the lack of consumption of fortified foods or/and supplementation, vegan and vegetarian children can be at risk of vitamin D deficiency and vitamin D-related rickets [5]. In the study, Ambroszkiewicz et al. [19] conducted, no significant difference was found regarding vitamin D status between vegetarian prepubertal children and their non-vegetarian counterparts. Supplementation of vitamin D is crucial for vegan and vegetarian children. Monitorization of 25[OH]D3 levels and supplementation even outside winter periods are necessary elements for optimizing vitamin D levels [5]. In the study Hovinen et al. [14] conducted, children following a vegan diet showed much lower vitamin D levels even though they were reported to take daily supplements.

Vitamin B12

Vitamin B12 does not have a plant-based source. Thus, vegans must regularly consume vitamin B12 fortified foods or supplements. Especially infants in the fast growth period and children may be at risk for vitamin B12 deficiency. Vegetarian children might also be at risk of vitamin B12 deficiency since 200 ml of milk and one egg per day provides approximately 2/3 of the RDA (Recommended Dietary Allowance) value [2]. In the study, Osei-Boadi et al. [20] conducted, vitamin B12 intakes of vegetarian Ghanaian children were much lower compared to non-vegetarian children based on 24-hr food recall. Severe vitamin B12 deficiency symptoms include fatigue, poor cognition, numbing of the fingers and toes, anorexia, megaloblastic anemia, failure to thrive [2]. Signs of vitamin B12 deficiency can be detected around 4-10 months, even though they may be seen earlier or later in life. In young children and infants, irreversible cognitive damage can occur due to severe vitamin B12 deficiency, and cases of deaths have been reported regarding B12 deficiency. Most of the B12 deficient infants are known to be exclusively breastfed by vegan or vegetarian mothers [8].

Due to its stability, cyanocobalamin is commonly used in supplements and fortified foods [2]. Foods fortified with vitamin B12 such as cereals, non-dairy milk, and soy products may provide sufficient amounts for young growing children. Still, it can be more challenging for infants whose vitamin B12 sources are limited [8]. EFSA (European Food Safety Authority) set an adequate intake of vitamin B12 for children seven months- 6 years as 1.4 µg/day [21]. Therefore, parents of vegan infants and children need to optimize their children's vitamin B12 intake with the help of a pediatric dietitian [8]. Even though vegetarians can achieve sufficient B12 levels with supplementation, some can still be deficient, and maintaining adequate levels via supplementation is much more difficult for the children [6].

Iron

Iron is an essential element that plays a vital role in growth and development. Iron is required in energy metabolism for the citric acid cycle and is a cofactor for many enzymes [22]. Iron deficiency in children may lead to anemia, weakened immune system, lethargy, and impaired growth and cognitive performance [23]. The most readily digested form of iron is heme iron which is found in meat, poultry, and fish. In vegetarian and vegan diets, most of the iron comes from non-heme sources [22]. Even though vegetarians may have similar intakes as non-vegetarians, their iron status may be worse than those of non-vegetarians. The bioavailability of non-heme sources is influenced by some inhibitors such as phytates and some boosters such as vitamin C and some organic acids. Diet has an important impact on non-heme iron absorption; thus, iron absorption can substantially increase when serum ferritin levels are low [2].

In a study designed to assess the prevalence of anemia in Indian school children, it was shown that vegetarian children were more anemic at almost all ages than non-vegetarians [24]. In the study Bryne [23] conducted on vegan and vegetarian children (4-8 years old), no significant difference was found for iron intakes. Osei-Boadi et al. [20] conducted a cross-sectional study to investigate Ghanaian children's dietary intake and iron status (9 months-11 years old) following a vegetarian diet. Plasma ferritin levels were lower in vegetarian children compared to their non-vegetarian counterparts, but there was no difference in plasma transferrin receptor concentrations. They found the prevalence of anemia around 25% in both groups, which was attributed to their diets lacking iron-rich foods. A study in Poland investigated the effect of a vegetarian diet on iron metabolism and parameters, including serum hepcidin and soluble transferrin receptor (sTfR) concentrations in 43 vegetarian and 46 non-

vegetarian children [4.5-9.0 years old]. Vegetarian children had a similar iron and vitamin C intake compared to non-vegetarians. Serum transferrin levels were similar in both groups, whereas ferritin concentrations were significantly lower in vegetarians [25].

Calcium

Calcium has a structural function in bone health and integrity and has a vital role in regulating muscle contraction, vasodilation, and activation of enzymes [26]. While the primary calcium sources include milk and dairy products, some plant sources such as green vegetables, nuts, and legumes contain significant amounts of calcium. The bioavailability of plant-based calcium sources depends on the levels of phytate and oxalate present in these foods. Since bone mineralization makes a peak during the growth period, adequate calcium intake is vital in children and adolescence [5]. Studies investigating calcium status and bone health in children and adolescents are contradictory. Some studies suggest that calcium intake and bone mineral density (BMD) of vegetarian children were similar to non-vegetarians. Some suggest that although calcium intakes are within the reference range, the BMD was lower than non-vegetarians [27, 19]. There are no studies in vegan adolescents investigating fracture risk regarding decreased BMD, but a meta-analysis showed that vegan adults have an increased fracture risk [28].

Infants breastfed by a mother on a vegan diet are not exposed to deficiency since calcium in breastmilk is derived from maternal bone mineral reserves. In older children and adolescents, consuming plant foods rich in calcium and low in oxalate and phytate is required for those on a vegan diet. Supplementation is always needed for this population to meet the adequate calcium intake per day [5].

Zinc

Severe zinc deficiency consequences include growth retardation, stunting, developmental delays, and increased infectious diseases. Suboptimal zinc status is attributed to the dietary patterns in developing countries, which show similarities with vegetarian diets as they are predominantly plant-based with limited intakes of meat. Higher intakes of zinc are recommended for vegetarian infants to catch up on the differences in digestibility between plant-based and animal-based sources of zinc [10]. In an experimental study, three different complementary feeding approaches- meat, iron, and zinc fortified cereal or iron-fortified whole-grain cereal- were compared to meet infants' zinc requirements. At 9 months of age, only the meat and zinc fortified cereal group achieved the EAR (Estimated Average Requirement) for zinc [29].

Studies regarding zinc status in vegetarian populations show that compared with non-vegetarian counterparts, they have similar zinc intake but lower serum zinc concentrations. There is insufficient evidence that the zinc status in vegetarian at-risk groups such as infants and children are lower than non-vegetarians [10, 2]. In a study conducted on children, zinc intakes tend to be lower but not significantly different in vegetarian children compared to non-vegetarians. [30].

Vegetarian sources of zinc include legumes, grains, soy, cheese, nuts, and seeds. To increase zinc bioavailability by reducing the effects of phytic acid, food preparation techniques such as soaking legumes, grains, and seeds can be applied [2]. Choosing leavened whole-grain bread and fermented soy foods such as miso and tempeh can be considered since phytate is hydrolyzed during leavening and fermentation and no longer inhibits zinc absorption [31].

Iodine

Optimal iodine intake is crucial for normal physical and neurological development in children. Main sources of iodine for children include iodized salt and milk products. The risk of inadequate iodine intake increases with the exclusion of fish, meat, eggs, and milk, such as in vegan diets [26]. Low intakes of iodine due to the exclusion of the primary sources may result in thyroid dysfunctions [5]. Vegan children, in particular, may be at risk of insufficient iodine intake when they do not consume enough from the main sources of iodine, such as sea vegetables and iodized salt [2]. Vegans were found to have lower intakes of iodine (30 mg/day) compared to that of omnivore children (110 mg/day) and adolescents (130mg/day) [32]. For infants, the introduction of iodized salt is recommended with

complementary feeding. Even though the exclusion of animal source foods increases the risk of iodine deficiency, the use of iodized salts may provide the required intake [5].

Health Risks Associated with Vegetarian Diets for Children

Growth and Nutritional Status

Vegetarian children tend to overeat certain foods with low nutrient density. Therefore, an improperly planned vegetarian diet can negatively affect growth and nutritional status [33]. The systematic review of Schürmann et al. [11] showed that physical growth between vegetarian and non-vegetarian children was generally similar regarding height, weight, and BMI (body mass index). In another review, vegetarian children were reported to be thinner than non-vegetarian children with BMI becoming more discrepancy being more pronounced in adolescence [34]. Vegetarian children are more likely to eat plant-based foods than non-vegetarian children, and thus, they consume more low-energy-density meals. Therefore, when not planned appropriately, a vegetarian or a vegan diet may cause a risk for specific nutrient deficiencies. A diet that is too high in dietary fiber may lead to malabsorption of some minerals, and increased satiety may result in inadequate energy intake [35].

Choi et al. [36] investigated the effects of Lacto-ovo vegetarian and non-vegetarian diets on nutrient intake and health status of elementary school children. They found that non-vegetarian children consumed more milk, dairy products, fish, meat, eggs, and tofu than vegetarian children. Vegetarian children consumed more bread, potatoes, and fruits; meanwhile, non-vegetarian children consumed more ice cream and carbonated beverages. They found that vegetarian children were not getting sufficient calcium and experienced higher rates of fatigue [36]. In the study Segovia-Siapco et al. [37] conducted on 534 adolescents [12-18 years old], both vegetarian and non-vegetarian adolescents consumed an adequate diet. They observed that vegetarian adolescents had higher intakes of carbohydrates and total protein but lower intakes of fats, animal protein, and zinc than non-vegetarians [37]. In the Vegetarian and Vegan Children Study, energy, macronutrient intake, and anthropometrics of 430 vegans, vegetarian and non-vegetarian children (1-3 years old) were assessed. There was no significant difference in energy intakes or anthropometrics between the three groups. Non-vegetarian children had the highest intake of protein meanwhile vegetarian children had the highest intake of carbohydrates and fiber. The authors concluded that a vegetarian or a vegan diet could provide the same amount of energy and macronutrients for normal growth compared to non-vegetarian children [38]. On the other hand, there are some case reports of infants at risk of developmental delay and malnutrition caused by improper infant feeding and lack of supplementation [39, 40]. Lemale et al. [41] conducted a research that showed thirty-four children who were exposed to the health consequences of long-term consumption of dairy substitutes during infancy. Therefore, the tone of the European statements seems to reflect a growing concern about veganism among children due to the high risks involved and the need for continued supervision and supplementation [40].

Bone Health

Even though they are associated with factors that promote bone health, vegetarian diets may lead to impairment of bone homeostasis when intakes of calcium, vitamin D, and protein are low [2]. Movassagh et al. [42] conducted a longitudinal study on 125 adolescents (mean age=12.7 years) to investigate the effects of different dietary patterns on bone health. They found that a vegetarian diet rich in dark green vegetables, fruits, low-fat milk, eggs, legumes, nuts, and seeds during adolescence was associated positively with BMC (bone mineral content) and BMD (bone mineral density). They concluded that higher adherence to a vegetarian diet during adolescence results in higher BMC and BMD during young adulthood average 15 years later [42]. In the study conducted by Ambroszkiewicz et al. [43], 53 vegetarian and 53 non-vegetarian prepubertal children were analyzed for body composition, BMD, and bone turnover markers. They showed that vegetarian children had a significantly higher ratio of c-OC (osteocalcin)/ uc-OC. They also observed that mean values of total BMD-z score and spine BMD z-score were lower in vegetarians, possibly due to increased PTH concentrations. These results suggest that vegetarian children may be at risk of impaired bone health [43].

Psychological Status

The rate of depression among young people has been increased drastically in developed countries [6]. Some studies suggest vegetarianism as a risk factor while others as a protector for mental health problems [44,45]. Evidence shows that supplementation with EPA can improve depression [46, 6]. In the meta-analysis Li et al. [47] conducted, an association was observed between low fish intake and depression. This study suggests that children and adolescents on a vegetarian or vegan diet might have an increased risk for depression [6]. A survey conducted on Turkish adolescents (17-21) found that vegetarians were more prone to depression, suicidal ideas, and substance use compared to non-vegetarian counterparts [48]. Santivanez-Romani et al. [44] conducted a study on adolescents between the ages of 14-15 years and found no significant difference among emotional symptom scores between vegetarian and non-vegetarian adolescents.

Planning the Diet of Vegetarian Children

In 2019 Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics published vegetarian food guidelines - VegPlate Junior (VPJ) designed for dietary planning in infancy, childhood, and adolescence. VPJ includes all of the criteria for a well-planned vegetarian diet and is thus characterized by a wide variety of foods such as vegetables, fruits, grains, legumes, nuts, and seeds. Dairy and eggs are considered optional, and for n-3 fatty acid sources-flaxseeds, chia, and walnuts are recommended [4]. For infants, current guidelines recommend that solid foods should be provided by 6 months in all children, and an introduction of a variety of food is encouraged [49, 3]. For infants, VJP recommends similar practices as non-vegetarian infants regarding introduction to solid foods and continuing breastmilk until at least one year of age. VJP recommends soy-based or rice-based infant formulas for vegan babies if the mother is not breastfeeding [4]. The use of soy formula in infants is debated; some defend that these infants develop normally. Others suggest that exclusive soy-based products should not be introduced in the first year since their bioavailability is lower than cow's milk. However, soy-based formulas are recommended for vegan infants who cannot be breastfed [3]. The growth rate decreases slightly after the first year of life. However, it still continues quite rapidly until the 24th month. After that, weight and height increase steadily until adolescence. In the adolescence period, a sudden increase in growth rate occurs again. VPJ is an exemplary model for meeting the nutritional needs of children and adolescents from 12 months to 17 years of age. VPJ contains six food groups: grains, vegetables and fruits, healthy fats, protein-rich foods, and seeds. It also includes calcium and omega-3-rich food groups as extra two categories. In the VPJ model, the number of daily servings to be consumed from each food group is given for the different needs of various age groups [4]. Families who decide to feed their children vegan should be warned against multiple nutritional deficiencies such as vitamin D, vitamin B12, calcium, iron and iodine [3].

2.Conclusion

Vegetarian and vegan families may want their children to grow up according to their dietary patterns. However, the effects of vegetarian and vegan diets on the growth and development of their children as well as the risk of nutrient deficiencies, should be explained. They should also be informed about the consequences of failing to achieve their children's proper supplement and diet regimen, which may lead to irreversible cognitive damage. Special care is needed when communicating with parents and their children on a vegetarian or vegan diet. It is crucial to ensure adequate nutrition during breastfeeding and weaning periods. Vegan and vegetarian children can become deficient in several essential nutrients that may disrupt their normal growth and development. It is important to provide additional fortified foods and supplements in case of inadequate nutrient intake and deficiencies. The evidence on the long-term effects of vegetarian and vegan diets on children is insufficient and outdated. Therefore, well-planned longitudinal studies are required to investigate the impact of vegetarian diets on future health outcomes among children.

Professional experience and opinions of nutritionists and pediatricians agree that "well-planned" vegetarian diets are appropriate for all childhood and adolescence stages. Regardless of whether the child is vegetarian or omnivorous, nutritional status needs to be evaluated. This assessment should primarily include monitoring the child's physical, psychomotor, and pubertal development. Vegetarian children can show healthy development when fed an adequate and balanced diet. Any unbalanced diet can lead to nutrient deficiencies. Parents of vegetarian children may face difficulties in providing nutritious foods. In addition, some foods that play an essential role in a vegetarian diet are not liked or

popular by many children. This can create more difficulties for parents of vegetarian children to establish an appropriate diet. Vegetarian diets in children raise concerns about insufficient intake of calcium, zinc, iron, vitamin B12, vitamin D, energy, protein, and omega-3 fatty acids. Therefore, parents should be aware of the best sources of these nutrients in their child's diet. All children on a vegan diet should have access to reliable vitamin B12 and vitamin D sources through fortified foods or supplements. Indications for vitamin D supplementation for other types of vegetarian diets are not different from the guidelines for omnivorous children. However, regular monitoring of serum ferritin, 25-OH-vitamin D, and vitamin B12 levels is crucial for these children. Parents should seek help from nutritionists in planning appropriate vegetarian diets. In addition, children and their families should be trained explicitly on enriching vegetarian diets and improving dietary absorption by adjusting food preparation techniques and the right food choice and combinations.

References

- [1]. Sofi F, Dinu M, Pagliai G, Cesari F, Marcucci R, Casini A. Mediterranean versus vegetarian diet for cardiovascular disease prevention (the CARDIVEG study): study protocol for a randomized controlled trial (published correction appears in *Trials*. 2016;17(1):253). *Trials*. 2016;17(1):233. Published 2016 May 4.
- [2]. Melina V, Craig W, Levin S. Position of the academy of nutrition and dietetics: vegetarian diets. *J Acad Nutr Diet*. 2016;116(12): 1970-1980.
- [3]. Ferrara P, Corsello G, Quattrocchi E, Dell'Aquila L, Ehrich J, Giardino I, et al. Caring for infants and children following alternative dietary patterns. *J Pediatr*. 2017;187: 339-340.
- [4]. Baroni L, Goggi S, Battino M. Planning Well-Balanced Vegetarian Diets in Infants, Children, and Adolescents: The VegPlate Junior. *J Acad Nutr Diet*. 2019;119(7):1067-1073.
- [5]. Lemale J, Mas E, Jung C, Bellaiche M, Tounian P, Hepatology, F. S. P. Vegan diet in children and adolescents. Recommendations from the French-speaking Pediatric Hepatology, Gastroenterology and Nutrition Group (GFHGNP). *Arch Pediatr*. 2019; 26(7): 442-450.
- [6]. Cofnas N. Is vegetarianism healthy for children? *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2019; 59(13): 2052-2060.
- [7]. Mirshahia S, D Ding J, Gale M, Allman-Farinelli, E. Banks, and A. E. Bauman. Vegetarian diet and all-cause mortality: Evidence from a large population-based Australian cohort – the 45 and up study. *Prev Med*. 2017; 97:1–7.
- [8]. Pawlak R. To vegan or not to vegan when pregnant, lactating or feeding young children. *Eur J Clin Nutr*. 2017; 71(11):1259-1262.
- [9]. Gorczyca, D. Nutritional Status of Vegetarian Children. Mariotti F (Ed) In *Vegetarian and Plant-Based Diets in Health and Disease Prevention*, Academic Press. 2017. p. 529-547.
- [10]. Foster M, Samman S. Vegetarian diets 40. across the lifecycle: Impact on zinc intake and status. *Adv Food Nutr Res*. 2015; 74:93-131.
- [11]. Schürmann S, Kersting M, Alexy U. Vegetarian diets in children: a systematic review. *Eur J Nutr*. 2017;56(5):1797-1817.
- [12]. Müller P. Vegan Diet in Young Children. In *Global Landscape of Nutrition Challenges in Infants and Children*, Karger Publishers. Basel, 2020.p.103-110.
- [13]. Scaglioni S, De Cosmi V, Mazzocchi A, Bettocchi S, Agostoni, C. Vegetarian infants and complementary feeding. Mariotti F (Ed). In *Vegetarian and Plant-Based Diets in Health and Disease Academic Press. Prevention* 2017. p. 513-527.
- [14]. Hovinen T, Korkalo, L, Freese R, Skaffari E, Isohanni P, Niemi M. et al. Vegan diet in young children remodels metabolism and challenges the statuses of essential nutrients. *EMBO Mol Med*, 2021;13(2), e13492.
- [15]. Sutter, D. O., & Bender, N. Nutrient status and growth in vegan children. *Nut Res* 2021; 9:13-25
- [16]. Thane CW, Bates CJ. Dietary intakes and nutrient status of vegetarian preschool children from a British national survey. *J Hum Nutr Diet*. 2000; 13(3):149-162.

- [17]. Alexy U, Fischer M, Weder S, Längler A, Michalsen A, Sputtek A, & Keller M. Nutrient intake and status of German children and adolescents consuming vegetarian, vegan or omnivore diets: Results of the Vechi youth study. *Nutrients*. 2021;13(5): 1707.
- [18]. Peddie M, Scott T, Ranasinghe C, Fleming E, Webster K, Brown R, ... & Haszard J. A Sample of Female Adolescent Self-Identified Vegetarians in New Zealand Consume Less Protein and Saturated Fat, but More Fiber than Their Omnivorous Peers. *Nutrients*. 2022;14(3): 711.
- [19]. Ambroszkiewicz J, Klemarczyk W, Gajewska J, Chelchowska M, Franek E, Laskowska-Klita T. The influence of vegan diet on bone mineral density and biochemical bone turnover markers. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab*. 2010; 16(3): 201-4.
- [20]. Osei-Boadi K, Lartey A, Marquis GS, Colecraft EK. Dietary intakes and iron status of vegetarian and non-vegetarian children in selected communities in Accra and Cape Coast, Ghana. *Afr J Food Agric Nutr Dev*. 2012;12(1): 5822-5842.
- [21]. European Food Safety Authority. Scientific opinion on dietary reference values for cobalamin. <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4150> 2015;13(7):4150 (last accessed 07 October 2022).
- [22]. Pawlak R, Bell K. Iron status of vegetarian children: a review of literature. *Ann Nutr Metab*. 2017; 70(2): 88-99
- [23]. Byrne HM. Iron and Zinc Nutrition in Vegan and Lacto-Ovo Vegetarian Children. 2017. Doctoral dissertation, D'Youville College, ProQuest, 10282090, 11-24.
- [24]. Jain N, Jain VM. Prevalence of anemia in school children. *Med Pract Rev*. 2012; 3(1): 1-4.
- [25]. Ambroszkiewicz J, Klemarczyk W, Mazur J, Gajewska J, Rowicka G, Strucińska et al. Serum hepcidin and soluble transferrin receptor in the assessment of iron metabolism in children on a vegetarian diet. *Biol Trace Elem Res*. 2017;180(2): 182-190.
- [26]. Rudloff S, Bühner C, Jochum F, Kauth T, Kersting M, Körner A, et al. Vegetarian diets in childhood and adolescence. *Mol Cell Pediatr*. 2019; 6(1): 1-7.
- [27]. Leung SS, Lee RH, Sung RY, et al. Growth and nutrition of Chinese vegetarian children in Hong Kong. *J Paediatr Child Health*. 2001;37(3):247–53.
- [28]. Iguacel I, Miguel-Berges ML, Gómez-Bruton A, Moreno L. A, Julián C. Veganism, vegetarianism, bone mineral density, and fracture risk: a systematic review and meta-analysis. *Nutr Rev*. 2019; 77(1): 1-18.
- [29]. Krebs NF, Westcott JE, Culbertson DL, Sian L, Miller LV, Hambidge KM. Comparison of complementary feeding strategies to meet zinc requirements of older breastfed infants. *Am J Clin Nutr*. 2012; 96(1): 30–35.
- [30]. Gorczyca D, Prescha A, Szeremeta K. Impact of vegetarian diet on serum immunoglobulin levels in children. *Clin Pediatr*. 2013; 52(3): 241–246.
- [31]. Gibson RS, Heath ALM, Szymlek-Gay EA. Is iron and zinc nutrition a concern for vegetarian infants and young children in industrialized countries? *Am J Clin Nutr*. 2014; 100(1): 459-468.
- [32]. Baroni L, Goggi S, Battaglino R, Berveglieri M, Fasan I, Filippin D, et al. Vegan Nutrition for Mothers and Children: Practical Tools for Healthcare Providers. *Nutrients*. 2018;11(1):5.
- [33]. Redecillas-Ferreiro, S., Moráis-López, A., & Moreno-Villares, J. M. Position paper on vegetarian diets in infants and children. Committee on Nutrition and Breastfeeding of the Spanish Paediatric Association. *An Pediatr (Engl Ed)*. 2020; 92(5): 306-e1.
- [34]. Sabaté J, Wien M. Vegetarian diets and childhood obesity prevention. *Am J Clin Nutr*. 2010; 91(suppl):1525S–1529S.
- [35]. Segovia-Siapco G, Jung S, Sabaté J. Vegetarian Diets and Pediatric Obesity. *Pediatr Obes*. 2017; 287–303.
- [36]. Choi KS, Shin KO, Jung TH, Chung KHA. Study on the differences in the dietary habits, nutrient intake and health status of vegetarian (lacto-ovo vegetarian) and non-vegetarian Korean elementary school children. *J Food Science Nutr*. 2011;40(3): 416-425.
- [37]. Segovia-Siapco G, Burkholder-Cooley N, Haddad Tabrizi S, Sabaté J. Beyond Meat: A Comparison of the Dietary Intakes of Vegetarian and Non-vegetarian Adolescents. *Front Nutr* 2019; 6, 86.

- [38]. Weder, S., Hoffmann, M., Becker, K., Alexy, U., & Keller, M. (Energy, Macronutrient Intake, and Anthropometrics of Vegetarian, Vegan, and Omnivorous Children (1–3 Years) in Germany (VeChi Diet Study). *Nutrients*, 2019; 11(4), 832.
- [39]. Farella, I, Panza, R & Baldassarre, ME. The difficult alliance between vegan parents and pediatrician: a case report. *Int J Environ Res Public Health* 2020;17, 6380–6384.
- [40]. Kiely, M. Risks and benefits of vegan and vegetarian diets in children. *Proc Nutr Soc*, 2021; 80(2), 159-164.
- [41]. Lemale, J, Salaun, J-F, Assathiany, R et al. Replacing breastmilk or infant formula with a non-dairy drink in infants exposes them to severe nutritional complications. *Acta Paediatr* 2018;107, 1828–1829.
- [42]. Movassagh EZ, Baxter-Jones ADG, Kontulainen S, Whiting S, Szafron M, Vatanparast H. Vegetarian-style dietary pattern during adolescence has long-term positive impact on bone from adolescence to young adulthood: a longitudinal study. *Nutr J*. 2018;17(1):36.
- [43]. Ambroszkiewicz J, Chelchowska M, Szamotulska K, Rowicka G, Klemarczyk W, Strucińska, M, et al. Bone status and adipokine levels in children on vegetarian and omnivorous diets. *Clin Nutr*. 2019;38(2): 730-737.
- [44]. Santivañez-Romani A, Carbajal-Vega V, Pereyra-Elías R. Association between a vegetarian diet and emotional symptoms: a cross-sectional study among adolescents in four developing countries. *Int J Adolesc Med Health*. 2018; 33(2):1-9
- [45]. Ocklenburg S, & Borawski J. Vegetarian diet and depression scores: a meta-analysis. *J Affect Disord. Journal of Affective Disorders*. 2021; 294: 813-815.
- [46]. Sublette ME, Ellis SP, Geant AL, Mann JJ. Meta-analysis: effects of eicosapentaenoic acid in clinical trials in depression. *J Clin Psychiatry*. 2011;72(12):1577.
- [47]. Li F, Liu X, Zhang D. Fish consumption and risk of depression: A meta-analysis. *J Epidemiol Community Health*. 2016;70 (3):299–304.
- [48]. Baş M, Karabudak E, Kiziltan G. Vegetarianism and eating disorders: association between eating attitudes and other psychological factors among Turkish adolescents. *Appetite*. 2005;44(3):309–15.
- [49]. Vail B, Prentice P, Dunger B, Hughes IA, Acerini CL, Ong KK. Age at weaning and infant growth: primary analysis and systematic review. *J Pediatr*. 2015; 167(2): 317-324.

Hemşirelik Öğrencileri için Geliştirilen COVID-19 Oyunlaştırılmış E-Öğrenme Modülünün Geliştirilme Basamakları

Development Steps of a COVID-19 Gamification E-Learning Module for Nursing Students

Afra ÇALIK^{1*}, Rıdvan Bilal SAĞLAM^{1b}, Murat Gökhan KABAL^{1b}, Betül ÇAKMAK^{2b},
Bahar İNKAYA^{2b}, Sevgisun KAPUCU^{1b}

¹ Hacettepe Üniversitesi, Hemşirelik Fakültesi, Ankara, Türkiye

² Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Hemşirelik Bölümü, Ankara, Türkiye

ÖZET

Pandemi sürecinde çevrimiçi öğretim yöntemlerinden biri olan e-öğrenme modüllerine olan ilgi artmıştır. Bu makalenin amacı hemşirelik öğrencileri için geliştirilen oyunlaştırılmış e-öğrenme modülünün geliştirme basamaklarını açıklamaktır. Bir eğitim tasarımcısı, iki içerik uzmanı, iki danışman ve bir öğrenciden oluşan işbirlikçi, çok disiplinli bir proje ekibi düzenlenmiştir. Ekip, oyunlaştırmanın D6 modelini kullanarak bir e-öğrenme modülü geliştirmiştir. Bu modül, hemşirelik lisans öğrencilerinin COVID-19'a yönelik klinik beceri ve bilgilerini artırmak için çevrimiçi ve asenkron olarak tasarlanmıştır. Bir e-öğrenme modülünün hemşirelik eğitimine entegre edilerek kullanılan oyunlaştırılmış probleme dayalı öğrenmenin teori ve uygulama şeklinde öğretim materyali olarak kullanılması, öğrencilerin aktif katılım göstermesine, motivasyonunun artmasına ve öğrenmenin etkili olarak gerçekleşmesine katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Hemşirelik eğitimi, oyunlaştırma, eğitim teknolojileri

Alınış / Received: 10.11.2021 Kabul / Accepted: 09.09.2022 Online Yayınlanma / Published Online: 20.12.2022



ABSTRACT

The interest in e-learning modules, which is one of the online teaching methods, has increased during the pandemic process. This article explains the development steps of the gamified e-learning module developed for nursing students. A collaborative, multidisciplinary project team consisting of an educational designer, two content experts, two consultants and a student was organized. The team developed an e-learning module using the D6 model of gamification. This module was designed online and asynchronously to increase the clinical skills and knowledge of undergraduate nursing students regarding COVID-19. Using gamified problem-based learning, which is used by integrating an e-learning module into nursing education, as a teaching material as theory and practice will contribute to the active participation of students, increase their motivation and effective learning.

Keywords: Nursing education, gamification, educational technology



1. Giriş

Mart ayında ortaya çıkan COVID-19 sonrasında başlayan pandemi süreci, insan sağlığı başta olmak üzere birçok alanı olumsuz etkilemiştir. Bunlardan en önemlisi şüphesiz eğitim sektörü olup özellikle yükseköğretim alanıdır. Birleşmiş Milletler verilerine göre dünyada 770 milyon kişilik öğrenen kitle, okul ve üniversitelerin kapanmasından etkilenmiştir [1,2]. Türkiye’de de benzer şekilde birçok üniversitedeki son sınıf hemşirelik öğrencileri klinik eğitimleri dahil tüm derslerini uzaktan eğitim yoluyla sürdürmek durumunda kalmıştır. Olağanüstü koşul olarak görülen pandemi nedeniyle her ne kadar online eğitim kalitesine önem verilmiş olsa da koşulların iyileştirme süresi zaman ve emek gerektirmektedir.

Teknolojiyi eğitime dahil eden bu çağrıyla birlikte çevrimiçi öğretime yönelik talep artmıştır [3]. E-öğrenme; web tabanlı, bilgisayar, dijital veya çevrimiçi öğrenmeyi geliştirmek için bilgi ve iletişim teknolojisinin kullanımını tanımlar [4]. E-öğrenme ortamı, öğrencinin kendi hızında tamamlanabilen, kendi kendini yöneten bir öğrenme aracının oluşturulmasına izin verir [3]. E-öğrenme içeriği, güvenli bir öğrenme ortamı yaratmak için gerektiği kadar tekrar edilebilir [5]. Ek olarak, e-öğrenme modülleri, geliştirilmiş öğrenme sonuçlarını desteklemek için çoğu müfredata kolayca entegre edilebilir [3]. Amacı, öğrencilerin yaşam boyu öğrenme becerilerinin geliştirilmesini sağlayarak öğrenmelerini geliştirmelerini ve motive olmalarını sağlamaktır [6].

E-öğrenme, aynı zamanda, öğrenciler tarafından esnek ve kendi hızında bir çalışma imkânı sunduğu, öğrencinin yeni bilgilerini, daha önce edindiği bilgilerin üzerine inşa ettiği için faydalı olarak algılanmaktadır [7,8]. Bazı hemşirelik alanındaki eğitimciler e-öğrenmenin eğitime entegre edilerek, öğretim kalitesini artırabileceğini, mezun hemşireleri “uygulamaya hazır olma” konusunda destekleyeceğini ve nihayetinde daha güçlü hemşirelik bakımı sağlayabileceğini belirtmektedir [4].

Hemşirelik eğitiminde e-öğrenme, bilişsel becerileri geliştirir, muhakeme yeteneğini güçlendirir, uygulama süresini iyileştirir ve dikkat becerilerini geliştirir [9]. Ayrıca, simülasyon eğitimlerinde olduğu gibi öğrencilerin fiziksel olarak katılım sağlaması yerine tekrar tekrar uygulama yapmasına olanak sağlaması gibi önemli avantajlar sağlayabilir [9,10]. COVID-19 pandemisinin yönetimindeki belirsizlikler, hastalık bulaştırma riski, öğrenme sürecinin online ve yetersiz olması gibi nedenler özellikle son sınıf hemşirelik öğrencilerinin mezuniyete ilişkin kaygı ve mesleğe karşı motivasyon eksikliği yaşamalarına neden olmuştur [11,12]. Bu kapsamda e-öğrenme araçlarının geliştirilmesinin pandemi sürecinde ve sonrasında hemşirelik öğrencilerinin eğitimine destek sağlayacağı söylenebilir.

Literatürde de bu bilgiyi destekleyen çalışmalara rastlamak mümkündür. Suppan ve arkadaşlarının (yıl) hastane çalışanlarının kendi aralarında ve hastalarla COVID-19 bulaşmasını engellemek için enfeksiyon önleme ve kontrolü hakkında hazırladıkları oyunun, sağlık çalışanlarında COVID-19 sürecinde güvenli davranışları teşvik ettiği ve motivasyonu arttırdığı gösterilmiştir [13]. Ayrıca Hu ve arkadaşlarının (2021) yaptıkları çalışmada tıp öğrencileri için hazırlanan ciddi oyunların öğrencilerin COVID-19 hakkında bilgi birikimlerini arttırmada etkili bir araç olabileceği gösterilmiştir [14]. Klinik yeterlilikleri ve bilgiyi değerlendiren çalışmalar, öğrencilerin mezuniyet öncesinde e-öğrenme araçlarını kullanılmasını önermiştir [9-12]. E-öğrenme modülünün geliştirme aşamalarını paylaşmak, gelişmekte olan bu eğitim alanının daha iyi anlaşılmasını sağlayacak ve gelecekteki araştırmalar için yönergeler sunacaktır. Bu araştırma, son sınıf hemşirelik öğrencilerinin mezun olmadan önce COVID-19 hakkında bilgi edinmeleri için bir e-öğrenme modülünün nasıl geliştirildiğini açıklamaktadır.

2. Materyal ve Metot

E-öğrenme Modülünün Geliştirilmesi

Teorik Çerçeve

E-öğrenmenin temel amacı, öğrencilerin yüksek verimlilik, etkililik, katılım, memnuniyet ve motivasyonunu sağlamaktır. Bu hedeflere oyun mekaniği ve oyunlaştırma kullanılarak ulaşılabilir [15]. Oyunlaştırmanın e-öğrenme modüllerinden biri olarak kullanılması, öğrencilere materyallerin açıklanması ve anlaşılması, farklı öğrenme çıktılarının oluşturulması açısından fark yaratacaktır. Bununla birlikte oyunlaştırmaya dayalı modül, öğrencilerin bilişsel yetenekleri, eleştirel düşünme düzeyleri, öğrenme düzeylerine ve motivasyonuna olumlu katkı sağlaması nedeniyle e-öğrenme koşullarına elverişli bir yöntem olarak görülmektedir [16].

Oyunlaştırılmış bir sistemin tasarımı, mevcut kaynaklara ve grubun eğitim ihtiyaçlarına bağlı değişiklik göstermektedir. Werbach ve Hunter (2015) tarafından geliştirilen başarılı bir oyunlaştırma modeli için 6 adımlı bir çerçeve sunmaktadır. Oyunlaştırma modeline ilişkin modülün hedefleri Tablo 1'de verilmiştir.

Modelin adımları [17];

D1: Hedeflerinin tanımlanması

D2: Hedef davranışların tanımlanması

D3: Oyuncuları tanımla

D4: Aktivite döngülerini tasarla

D5: Eğlenceyi unutma

D6: Uygun araçları kullan

Tablo 1: D6 Tasarım Modülü ve E-öğrenme modülü hedefleri

D6 Tasarım Modeli	Modül hedefleri
D1	Öğrencinin öğrendiği bilgileri modüle aktarabilmesi ve uygulayabilmesi
D2	Öğrenciye verilen bilgilerin modül sonunda öğrenebilmesi
D3	Oyuncu tipi anketi kullanılarak modülün düzenlenmesi
D4	Modül içinde basitten karmaşığa doğru akış izlenmesi
D5	Akış teorisine uygun eğlenceli oyunların yerleştirilmesi
D6	Oyun mekaniğlerinin belirlenmesi

Oyunlaştırmanın özünde motivasyonu artırmayı ve öğrenme sürecinde daha yüksek katılım seviyelerine ulaşmayı amaçlayan çeşitli öğrenme ortamı, kararlar ve ödüller sistemi yatmaktadır. İyi tasarlanmış eğitici oyunlar, oyuncu gelişimi için sürekli fırsatlar, büyük miktarda geri bildirim, herhangi bir bireyin tek başına çözemeyeceği kadar karmaşık görevler ve öğrencilerin eylemlerine yanıt olarak değişen ortamlar sunar [18]. Csikszentmihalyi tarafından geliştirilen Akış teorisi de bu hedeflere yönelik oluşturulmuş bir teoridir. Bu teoride bir aktiviteyi gerçekleştirirken tam katılım, tam özümseme ve içsel keyif durumu olması beklenir. Akış durumu aşağıdaki koşulları gerektirir [19]:

- 1) Açık ve yakın hedefler
- 2) Performans ve ilerleme hakkında anında geri bildirim
- 3) Uygun zorluk seviyesi
- 4) Mevcut becerileri geliştirmede zorlukların algılanan faydası

Akış teorisine dayalı olarak geliştirilen e-öğrenme modülü öğrencinin içsel motivasyonunu sağlayarak tam katılım göstermesini hedeflemektedir. Bu bağlamda, bu araştırma kapsamında hazırlanan e-öğrenme modülünün hedeflerine uygun, daha basit ve anlaşılır olan D6 Tasarım modeli, oyunlaştırılmış modüle dayandırılmıştır.

Aşama I: Hazırlık

Hemşirelik son sınıf öğrencileri hedef kitleyi oluşturmaktadır. Son sınıfta COVID-19 pandemisine yönelik ders bulunmadığı için Sağlık Bakanlığının yayınladığı kılavuzlar [20] kapsamında araştırmacılar tarafından öğrencilere eğitim içeriği hazırlanmıştır. Eğitim içeriği başlıkları aşağıda belirtilmiştir [20]:

- COVID-19 Hakkında Temel Bilgiler
- Karantina/İzolasyon Süreleri
- Hastanede Alınacak Genel Önlemler (klinik, yoğun bakım servisleri)
- Sağlık Çalışanlarının Sağlık Kontrolü
- Kişisel Koruyucu Ekipman (KKE) Giyme-Çıkarma

Hemşirelik öğrencileri, sahada çalışan hemşirelerin artan iş yükleri, enfekte olma ve bulaştırma gibi durumlar mezuniyet sonrasında anksiyete gibi olumsuz duygular yaşamaktadır [21,22]. Bunun yanında ilk iş stresi, pandemi dönemine özgü yetersiz klinik uygulama gibi nedenler COVID-19'a yönelik eğitim ihtiyacını doğurmuştur. Bu konu hakkında e-öğrenme modülünün hemşirelik eğitimine eklenmesinin daha iyi öğrenme sonuçları için iyi bir yol sağlayabileceği öngörülmüştür.

Aşama II: Proje Ekibi

İşbirliğine dayalı, çok disiplinli bir proje ekibi düzenlendi. Tablo 2'de proje ekibinin rolleri listelenmektedir. Ekip, bir e-öğrenme tasarımcısı, iki hemşirelik fakültesi öğretim üyesi, iki araştırma görevlisi, iki son sınıf hemşirelik öğrencisinden oluşuyordu. Öğrenme çıktıları, Sağlık Bakanlığının kılavuzlarına dayalı olarak geliştirildi ve diğer ekip üyelerine sunuldu.

Tablo 2: Proje Ekibi ve Roller

Proje Ekibi	Roller
E-öğrenme Tasarımcısı	Articulate 360'ta e-öğrenme modülünü oluşturdu
	E-öğrenme modülünün ve aktivitelerinin genel tasarımı (ekranda nasıl görüldüğü ve sunulduğu) yapıldı
	Animasyonlar tasarlandı
	Animasyonlu videolar eklendi
	İçerik uygulaması periyodik olarak test edildi ve geri bildirim sağlandı
	Kullanıcıya sunulmadan önce e-öğrenme modülünün hedef-içerik uyumu değerlendirildi
Araştırma Görevlisi	Geliştirilmiş orijinal fikrin buldu
	Eğitim ihtiyacını ve bilgi birikimini analiz etti
	E-öğrenme modülünün ve etkinliklerinin tüm bölümlerinde hemşirelik içeriği ve uzmanlığı kapsamında tasarıma katkıda bulundu
	Belirlenen öğrenme yöntem ve teknikleri ile içeriği düzenledi
	Ölçme ve değerlendirme yöntemlerini belirledi
	Oluşturulan modülü deneyimledi ve geri bildirim sağladı
Öğretim Üyesi	Eğitim ihtiyacını ve bilgisini analiz etmeye yardımcı oldu
	Hazırlanan içeriği inceledi ve değerlendirdi
	İçeriğin öğrenme teorisi ve ilkelerine uyduğundan emin olmak için inceledi ve değerlendirdi
	Oluşturulan modülü deneyimledi ve geri bildirim sağladı
Öğrenci	Eğitim ihtiyacını ve bilgi birikimini analiz etti
	İçeriğin hedef kitleye uyduğundan emin olmak için inceledi ve değerlendirdi
	Oluşturulan modülü deneyimledi ve geri bildirim sağladı

Aşama 3: Modül geliştirme


Modül, HTML5 biçimlendirme dilinde yayınlamayı sağlayan Storyline 3 (Articulate Storyline) kullanılarak geliştirildi. Bu nedenle modül, tabletler ve akıllı telefonlar dahil olmak üzere çoğu cihazla uyumludur. Modül içerikleri: eğitim verme, e-öğrenme aracı oluşturma, eğlenceli oyun ve sınavın gerçekleştirilmesi şeklinde beş modülden oluşmaktadır. Modül içeriklerine ilişkin öğrenme hedefleri, öğrenme mekaniği ve örnek Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3: Öğrenme hedefi, öğrenme mekaniği ve örnek

Öğrenme hedefi	Oyun- Öğrenme mekaniği	Örnek
Aşı bilgisi	İçerik atlamasını önleme	Şekil 1-3: Aşılardan biri seçilmek için önce broşür okunmalıdır.
KKE giyme- çıkarma	Oyunlaştırma, içerik atlamasını önleme ve geri bildirim	Şekil 4-7: Ekipmanlar sürükleyip bırak seçeneği ile ilgili sayı butonlarına yerleştirilir. "Hazır" butonuna tıklandıktan sonra ayrı bir ekranda olumlu veya olumsuz geri bildirim verilir.
Hastalık belirtileri	İçerik atlamasını önleme, oyunlaştırma ve geri bildirim	Şekil 8-12: Semptomlardan birden fazlasını seçerek "Bitir" butonuna basılarak geri bildirim verilir.
Karantina süresi	Test ve geri bildirim	Şekil 13-15: Karantina süresine ilişkin soruya tek seçeneğe tıklanır ve geri bildirim verilir.

Birinci modül, öğrencilerin mezun olmadan önce hastane prosedüründe yer alan pandemi koşullarını tanıma ve yönetimi amacına yönelik araştırmacılar tarafından tasarlanmıştır. Modül, çerçevenin planlama ve yansıtma aşamalarını ele almıştır. Öğrencilerin bilgi düzeylerini artırmaya odaklanmış ve hastanede işe başlamadan önce bilgilerini yansıtmak için rehberlik etmeyi hedeflemiştir.

İkinci modül, eğitim içeriklerine uygun öğrenme çıktıları oluşturarak öğrenmeyi kolaylaştırmaya, daha eğlenceli hale getirerek öğrencileri modülün akışında tutmaya odaklanmıştır. Bu kapsamda D6 Oyunlaştırma modeline dayalı olarak oyun ekran süresi, örnek ekran oluşturma, öğrenme çıktıları, oyun içi interaktif oyun mekaniklerinin yerleşimi ve animasyonlar tasarlanarak oyunun storyboardu hazırlanmıştır (Resim 1). Modül, çerçevenin yansıtma ve uygulama aşamalarını ele almıştır. Bir amaç doğrultusunda e-öğrenme aracını nasıl kullanacağını, bilgilerini nasıl aktaracağını ve hemşirelik uygulamalarının nasıl ilişkilendirileceği ile ilgili bilgiler işlenmiştir. Öğrencilere, hastanede işe başlamadan önceki deneyimlerini yansıtmalarına destek sağlamıştır.

SÜRE	ÖRNEK EKРАН	EKRAN	SESLENDİRME	NOTLAR
1.	20 sn		Hasta odasına girmeden önce öncelik sırasına göre koruyucu ekipman giymemde yardımcı olur musun? Resimler; • Gözlük • Eldiven • N95 maske • Önlük	Öğrenme çıktısı: Konuya ilişkin bilgisi ölçülür. Animasyon: Soru ve resimler aynı anda gelir. Dizayn: • Resimler (tek tablo) • Soru metni • Puan • Sıralama butonları İnteraktif: • Resimler sıralama butonlarına sürüklenir.

Şekil 1: Örnek storyboard

Üçüncü modülün amacı, D6 modelinin beşinci basamağını hedefleyen öğrencileri akışta tutabilmek ve odaklanmalarını sağlamak için eğlenceli oyunlar yerleştirmektir. Böylece kısa ve hızlı hareketlerle oyun içinde vakit geçirmeleri sağlanarak e-öğrenme aracını kullanmaya daha çok motive eder.

Dördüncü modülün amacı, öğrencilerin anlama ve hemşirelik uygulamasına aktarmak için çalışma stratejilerini birleştirmektir. Modül, çerçevenin yansıtma ve uygulama aşamasına dayanmaktadır.

Öğrencilerin COVID-19'a yönelik alınan önlemleri öğrenerek iş hayatına hazırlamaktır. İçerik, düşünmeyi kolaylaştıracak sorular içerir.

Oyunlaştırılmış Diziler

Oyun mekaniklerine yönelik oyunlaştırılmış içerikler D6 Modeline göre planlandı. Öncelikle KKE takma ve çıkarma dizileri öğrenme zorlukları açısından oyunlaştırıldı. Bloom taksonomisine göre [23], öğrenme hedefiyle eşleşen üç düşünme becerisine odaklanılmıştı: bilgi, anlama ve uygulama. Uygulama becerisinde öğrenme mekaniği olarak “sürükle bırak” ve “hareket” kullanılmıştır. Anlama becerisi için sorulara gerekli sıralama yapıldıktan sonra hem öğrenmenin hem de oyun mekaniğinin bir parçası olan geri bildirim verildi. Uygulama becerisinde “keşfet”, “sırala” ve “tekrar” öğrenme mekanikleri kullanıldı. Ekipman görselleri her seçenekte ayrı olarak gösterildi ve eldiven, gözlük, önlük ve maske ile temsil edildi. Seçim için sıralama yaptıktan sonra ekranda karakter geri bildirim verdi. Doğru cevap verdikten sonra bir sonraki bölüme geçildi. Ekipman giyme sorusundan sonra oyun başında verilen bilgiyi hatırlaması için “ara sahne” oyun mekaniği kullanıldı. D6 modelinde “eğlenceyi unutmama” basamağı için sorular arasına eğlenceli oyunlar yerleştirildi.

Aşama 4: Modülün Değerlendirmesi

Geliştirme döngüleri sırasında ve sürecinin sonunda, modülün kullanılabilirliği, bilimsel temeller aşamasında edinilen teorik temellere göre değerlendirildi. Tüm geri bildirimler alındıktan sonra modülden tamamen hatalar ayıklandı, son versiyonu, tüm yazarlar tarafından doğrulandı.

4. Tartışma ve Sonuç

Bu araştırma kapsamında Bloom taksonomisi ve oyunlaştırmanın D6 modeli kullanılarak tasarlanmış çok platformlu oyunlaştırılmış bir e-öğrenme modülü geliştirildi. Modülün içeriği öğrencilerin mezun olmadan önce COVID-19 pandemisinde hastanede karşılaşacakları KKE seçimi ve kullanımı, hastalık belirtisi, karantina süresi ve aşı hakkında bilgi edinmelerine destek olacak şekilde hazırlandı. Modülün temel amacı oyunlaştırılmış içeriklerle öğrencilere daha ilgi çekici materyaller oluşturmak ve belirli bir hedefe ulaşmak için kullanıcı deneyimini geliştirmektir. Bu kapsamda ana hedefler aşı bilgisi, KKE takma ve çıkarma işlemleri, hastalık belirtileri ve karantina süresi ile ilgili bilgi ve becerilerin kazanılmasını geliştirmektir.

E-öğrenme modülünün geliştirilmesi ile hemşire eğitimcileri sadece konuyu öğretmekle değil, aynı zamanda öğrencilerin yetkin, yaşam boyu öğrenmelerine katkı sağlamaktadırlar. Öğrencilerin pandemi döneminde yaşadığı zorluklarla yüzleşmek için birden fazla strateji gereklidir. Gelişen teknolojiye uyum sağlamanın artık her eğitimcinin önemli bir sorumluluğu olduğu düşünüldüğünde E-öğrenme ortamlarının gerekliliği oldukça açıktır. Güncellemeye açık e-öğrenme modülleri oluşturmak, öğrencinin bilgisinin kalıcılığını ve başarısını artırmak için uygulanabilecek proaktif bir müdahaledir [24]. Bunun yanında geleneksel öğrenme yöntemlerine bir e-öğrenme modülünün eklenmesi, öğrenciler için kendi öz yeterliklerini, öz yansımalarını, öğrenme motivasyonlarını ve yaşam boyu öğrenme stratejilerinin kazanımlarını arttırırken güvenli bir öğrenme ortamını teşvik edebilir [25,26].

Bu makalenin amacı, hemşirelik öğrencileri için geliştirilen oyunlaştırılmış e-öğrenme modülünün geliştirme basamaklarını açıklamaktır. Böylelikle, hemşirelik eğitime entegre edilerek kullanılan oyunlaştırılmış probleme dayalı öğrenmenin teori ve uygulama şeklinde öğretim materyali olarak kullanılması, öğrencilerin aktif katılım göstermesine, motivasyonunun artmasına ve öğrenmenin etkili olarak gerçekleşmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Sınırlılıklar

Bu çalışmanın ana sınırlaması, mevcut kanıt eksikliğidir. COVID-19 Pandemisi ile ilgili her gün değişen bilgiler ve güncellenen kılavuzlar kafa karışıklığına neden olmaktadır. Bunun yanında 3-4 ay içinde oyundaki bazı bilgilerde (karantina süresi) değişiklik olması ve güncellenmesini kaybetmesi doğaldır. Bu sınırlamaların yanında e-öğrenme modülünü geliştirmek için kullanılan platformların esnek olması içeriğin hızlı şekilde güncellenmesini sağlar. Ayrıca bir diğer sınırlılık nedeni de modülün sadece Türkçe olarak geliştirilmiş olmasıdır.

Teşekkür

Geliştirilen e-öğrenme modülünün geliştirilmesinde ve deneyimlenmesinde katkı sağlayan hemşirelik öğrencilerine ve lisansüstü öğrencilerine teşekkür ederiz.

Etik Beyan

Bu çalışma öğrenme yöntemi geliştirmek üzere hazırlanan derleme bir çalışma olduğu için etik kurul onayına gerek yoktur.

Kaynakça

- [1] Schneider S.L., Council M.L. 2020. Distance Learning in The Era of COVID-19. Arch Dermatol Res,1. doi: 10.1007/s00403-020-02088-9.
- [2] Zhong R. 2020. The Coronavirus Exposes Education's Digital Divide. The New York Times. <https://www.nytimes.com/2020/03/17/technology/china-schools-coronavirus.html> (Erişim tarihi 15.06.2021).
- [3] Kowitlawakul Y., Chan M.F., Tan S.S.L., Soong A.S.K., Chan S.W.C. 2017. Development of an E-Learning Research Module Using Multimedia Instruction Approach. Comput Inform Nurs,35(3):158-168. doi: 10.1097/CIN.0000000000000306.
- [4] McDonald E.W., Boulton J.L., Davis J.L. 2018. E-Learning and Nursing Assessment Skills and Knowledge— an İntegrative Review. Nurse Educ Today, 66:166-174. doi: 10.1016/j.nedt.2018.03.011.
- [5] Parquet F., Marchionni C. 2015. E-Learning And IV Therapy: Can Learning Be Fun. Vascular Access, 9(3):11-22.
- [6] Briscoe G.S., Brown L.G. 2019. Self-Regulated E-Learning Modules for Prenursing Success. Nursing Educ Perspec, 40(3):186-188. doi: 10.1097/01.NEP.0000000000000356.
- [7] Cook D.A., Levinson A.J., Garside S., Dupras D.M., Erwin P.J., Montori V.M. 2008. Internet-Based Learning in the Health Professions: A Meta-Analysis. JAMA, 300(10):1181-1196. doi: 10.1001/jama.300.10.1181.
- [8] Farrell G.A., Cubit K.A., Bobrowski C.L., Salmon P. 2007. Using The WWW to Teach Undergraduate Nurses Clinical Communication. Nurse Educ Today, 27(5):427-435. doi: 10.1016/j.nedt.2006.07.005.
- [9] Ahmed H., Allaf M., Elghazaly H. 2020. COVID-19 and Medical Education. Lancet Infect Dis, 20(7):777-778. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30226-7.
- [10] Wittich C.M., Agrawal A., Cook D.A., et al. 2017. E-Learning in Graduate Medical Education: Survey of Residency Program Directors. BMC Med Educ, 17(1):1-7. doi: 10.1186/s12909-017-0953-9.
- [11] Cervera-Gasch Á., González-Chordá V.M., Mena-Tudela D. 2020. COVID-19: Are Spanish Medicine and Nursing Students Prepared? Nurse Educ Today, 92:104473. doi: 10.1016/j.nedt.2020.104473.
- [12] Malicki A., Vergara F.H., Van de Castle B., et al. 2020. Gamification in Nursing Education: An Integrative Literature Review. Journal Contin Educ Nurs, 51(11):509-515. doi: 10.3928/00220124-20201014-07.
- [13] Suppan M., Catho G., Nunes T.R., et al. 2020. A Serious Game Designed to Promote Safe Behaviors Among Health Care Workers During the COVID-19 Pandemic: Development of "Escape COVID-19". JMIR Serious Games, 8(4):e24986. doi: 10.2196/24986.
- [14] Hu H., Xiao Y., Li H. 2021. The Effectiveness of a Serious Game Versus Online Lectures for Improving Medical Students' Coronavirus Disease 2019 Knowledge. Games Health J. doi: 10.1089/g4h.2020.0140.
- [15] Kapp K.M. 2012. The Gamification of Learning and Instruction: Game-Based Methods and Strategies for Training and Education. 1. Baskı. John Wiley & Sons; 2012.
- [16] Panis I., Setyosari P., Kuswandi D., Yuliati L. 2020. Design Gamification Models in Higher Education: A Study in Indonesia. İJET, 15(12):244-255. doi: 10.3991/ijet.v15i12.13965.
- [17] Hunter D., Werbach K. 2012. For the Win. Wharton Digital Press, 100s.

- [18] Urh M., Vukovic G., Jereb E. 2015. The Model for Introduction of Gamification into E-learning in Higher Education. *Procedia Soc Behav Sci*, 197:388-397. doi: 10.1016/j.sbspro.2015.07.154
- [19] Nakamura J., Csikszentmihalyi M. 2009. Flow Theory and Research. *The Oxford Handbook of Positive Psychology*. 2. baskı. Oxford University Press, 195-206s.
- [20] Sağlık Bakanlığı. 2020. COVID-19 Kişisel Koruyucu Ekipman Giyme ve Çıkarma Talimatı. <https://khgmstokyonetimdb.saglik.gov.tr/Eklenti/36977/0/covid-19-kisisel-koruyucu-ekipman-giyme-ve-cikarma-talimatipdf.pdf> (Erişim tarihi 12.09.2021).
- [21] Dewart G., Corcoran L., Thirsk L., Petrovic K. 2020. Nursing Education in a Pandemic: Academic Challenges in Response to COVID-19. *Nurse Educ Today*, 92:104471. doi: 10.1016/j.nedt.2020.104471.
- [22] Joshi K., Madhura L., Jamadar D. 2020. Knowledge and Awareness Among Nursing Students Regarding the COVID-19: A Cross Sectional Study. *Int J Community Med Public Health*, 7(6):1-4. doi: 10.18203/2394-6040.ijcmph20202536.
- [23] Anderson, L.W., & Krathwohl, D.R. 2001. *A Taxonomy For Learning, Teaching, And Assessing: A Revision Of Bloom's Taxonomy Of Educational Objectives*. New York, NY: Addison Wesley Longman.
- [24] Logan R.M., Johnson C.E., Worsham J.W. 2021. Development of an E-learning Module to Facilitate Student Learning and Outcomes. *Teach Learn Nurs*, 16(2):139-142. doi: 10.1016/j.teln.2020.10.007.
- [25] Chen J.H., Björkman A., Zou J.H., Engström M. 2019. Self-regulated Learning Ability, Metacognitive Ability, and General Self-Efficacy in a Sample of Nursing Students: A cross-sectional and Correlational Study. *Nurse Educ Pract*, 37:15-21. doi: 10.1016/j.nepr.2019.04.014.
- [26] Moon H., Hyun H.S. 2019. Nursing Students' Knowledge, Attitude, Self-Efficacy in Blended Learning of Cardiopulmonary Resuscitation: a Randomized Controlled Trial. *BMC Med Educ*, 19(1):1-8. doi: 10.1186/s12909-019-1848-8.

Birinci Mesajcılar ve Reseptörlerine Genel Bakış Overview of Primary Messengers and Their Receptors

Esmâ SELÇUK^{1*}, Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU¹

¹ Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye



Ö Z E T

Sinyal molekülleri, hücreler arasında biyolojik bilginin taşınmasında ve uygun yanıtın oluşmasında kilit rol oynamaktadır. Bir sinyal molekülü reseptörüne bağlandığında hücre çoğalması, farklılaşması, hareketi, metabolizması ve davranışı gibi hayati olayların düzenlenmesi için hücre içi yanıtlar başlatır. Hücre içi sinyal moleküllerinin etki mekanizması reseptörlerin lokalizasyonundan etkilenir. Reseptörler, hedef hücrenin zarında, sitoplazmasında veya nükleusunda yer alan, istenen etkinin oluşmasını sağlayan proteinlerdir. Sinyalizasyon için sentezlenen birinci mesajcılar yapılarına göre hücre içinde veya hücre membranında yer alan reseptörlerine bağlanır. Ligand reseptöre bağlandığında reseptörün özelliklerini değiştirerek hücrede gerekli uyarının oluşmasını sağlar.

Anahtar Kelimeler: Reseptör, ligand, hidrofilik

Alınış / Received: 22.11.2022 Kabul / Accepted: 16.12.2022 Online Yayınlanma / Published Online: 20.12.2022



ABSTRACT

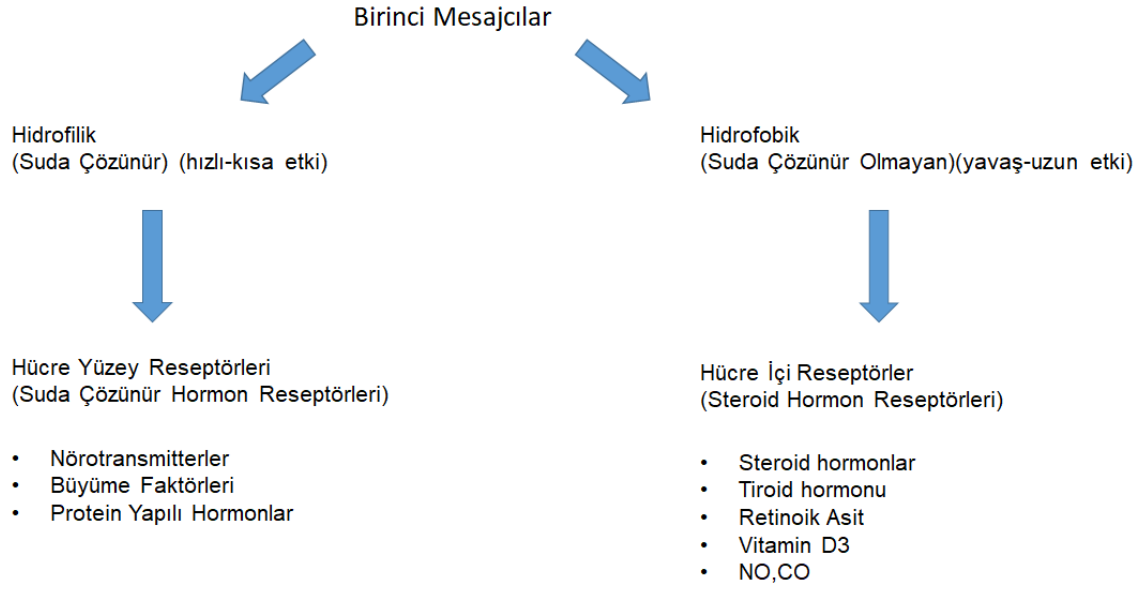
Signaling molecules play a key role in the transport of biological information between cells and in the formation of an appropriate response. When a signal molecule binds to its receptor, it initiates intracellular responses for the regulation of vital events such as cell proliferation, differentiation, movement, metabolism and behavior. The mechanism of action of intracellular signaling molecules is affected by the localization of the receptors. Receptors are proteins located in the membrane, cytoplasm or nucleus of the target cell, enabling the desired effect to occur. The first messengers synthesized for signaling bind to their receptors located in the cell or on the cell membrane, depending on their structure. When the ligand binds to the receptor, it changes the properties of the receptor and provides the necessary stimulation in the cell.

Keywords: Receptor, ligand, hydrophilic



1. Giriş

Hücrede gerçekleşen birçok mekanizma için hücre sinyalizasyonuna gereksinim duyulmaktadır. Hücreye ekstrinsik veya intrinsik faktörler olarak gelen uyarılar ile birinci mesajcılar (hormonlar, büyüme faktörleri, nörotransmitterler, sitokinler) sentezlenir. Sentezlenen moleküller hidrofilik ya da hidrofobik özelliktedir. Hidrofilik moleküller suda çözünür yapıda oldukları için hücre içerisine reseptör aracılığı ile alınır. Bu nedenle reseptörleri hücre membranında bulunur. Etkileri ise hızlı ve kısadır. Nörotransmitterler, büyüme faktörleri, protein yapılı hormonlar bu gruba örnek verilebilir. Hidrofobik moleküller suda çözünür olmayan apolar karakterdedir ve bu nedenle hücre membranını difüzyonla rahatlıkla geçebilirler. Reseptörleri sitoplazmada ya da nükleusta bulunur, etkileri yavaş ve uzundur. Başta steroid hormonlar olmakla birlikte tiroid hormonu, retinoik asit, vitamin D3, nitrikoksit (NO), karbonmonoksit (CO) bu gruba dahildir [1,2] (Şekil 1).



Şekil 1: Birinci mesajcılar ve reseptörleri

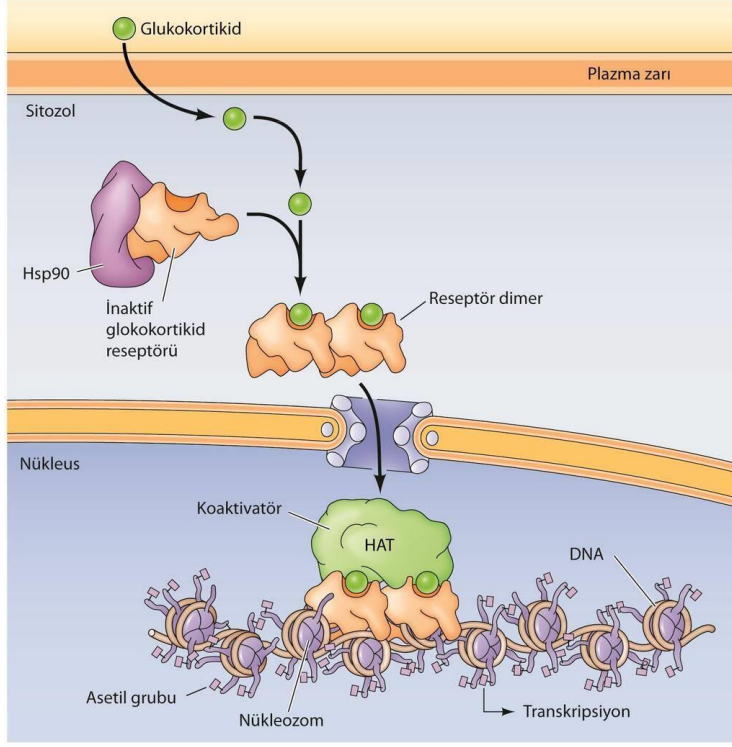
Hücre İçi Reseptörler

Bir steroid hormon reseptörü yaklaşık 800 amino asit uzunlukta olup karboksil uç, orta bölge ve amino uç olarak üç farklı bölgeden oluşur. Karboksil uç hormon bağlayan, orta bölge DNA bağlayan, amino uç ise gen transkripsiyonunu aktive eden bölgedir [3].

Reseptör inaktif durumda iken DNA bağlanma bölgesini bloke edecek şekilde bir inhibitör protein bağlanmıştır. Reseptöre hormon bağlanması durumunda inhibitör protein reseptörden ayrılır ve böylece hormon-reseptör kompleksi aktifleşmiş olur. Kompleks DNA 'da yer alan ilgili genin enhancer bölgesine yerleşir. Steroid-reseptör kompleksinin enhancer bölgesine bağlanması, bu bölgenin hemen yanındaki promotör bölgenin aktifleşmesine ve transkripsiyonun başlamasına neden olur [3].

Ligandın reseptöre bağlanması farklı etkiler oluşturabilir. Nükleer reseptör ailesinin bazı üyeleri, hormonları olmadığında DNA'ya bağlanamaz. Bunlardan biri de Glukokortikoid reseptürüdür [1,3].

Glukokortikoidler plazma zarından geçer ve nükleustaki reseptörüne bağlanır. Ligand olmadığında ise reseptör sitoplazmada Hsp90'a bağlı durumdadır. Glukokortikoid'in reseptöre bağlanmasıyla Hsp90 ayrılır ve reseptör dimerleri oluşur. Aktifleşmiş reseptör nükleusa geçer, DNA ya bağlanır ve histon asetiltransferaz (HAT) aktivitesi olan koaktivatörler ile etkileşime girerek hedef genlerin transkripsiyonunu uyarır (Şekil 2) [1].



Şekil 2: Glukokortikoid reseptörü [1]

Bazı durumlarda ise reseptör hormon olsa da olmasa da DNA'ya bağlanır, fakat hormona bağlanması reseptörün transkripsiyonu düzenleyen bir molekül olarak aktivitesini değiştirir. Tiroid hormon reseptörü ise bu duruma örnek verilebilir [1].

Tiroid hormonu reseptörü ve retinoik asit reseptörü DNA üzerinde birlikte yer almaktadır. Hormon yokluğunda tiroid hormon reseptörü hedef genlerinin transkripsiyonunu baskılayan histon deasetilaz (HDAC) aktivitesi olan bir korepresör olarak isimlendirilen retinoik asit reseptörü ile bağlıdır. Hormon varlığında ise korepresör ayrılır, reseptör histon asetiltransferaz (HAT) aktivitesi olan koaktivatör (T3 hormonu) ile bağlanır [1].

Steroid hormonlar gibi nitrik oksit (NO) de hedef hücrelerinin plazma zarından difüzyonla hücre içine girer. Ancak NO etkisinin moleküler temeli steroidlerin etkisinden farklıdır. NO transkripsiyonu düzenleyen bir reseptöre bağlanmak yerine, hücre içi hedef enzimlerin aktivitesini değiştirir. Hücreden dışarıya çıkar, komşu hücreleri bölgesel olarak etkiler. Çok kararsız olması ve yarılanma ömrünün birkaç saniye sürmesi nedeniyle lokal etkiler ile sınırlıdır [1].

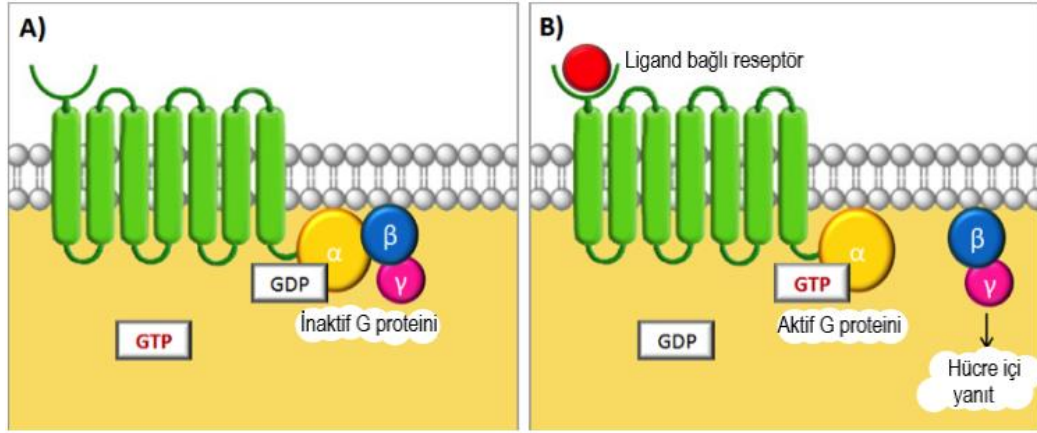
Hücre büyümesi üzerine inhibe edici etkisi olan vitamin D3'ün reseptörü (VDR) ise sitoplazma ve nükleusta bulunmaktadır. Hücre içine difüzyonla girmekte ve sitoplazmada VDR'ye bağlanmaktadır. Bu bağlanma ile retinoik asit reseptörü (RXR) de aktive olur. Aktive işlemi ile ligand-VDR-RXR kompleksi nükleusa geçer ve gen transkripsiyonunu regüle eder [4].

Hücre Yüzey Reseptörleri

Hücre yüzey reseptörleri, kullandıkları uyarı iletme mekanizmalarına göre 3 sınıfa ayrılırlar. İyon kanallarına bağlı reseptörler, G proteinine bağlı reseptörler ve enzime bağlı reseptörler [5].

G-protein-bağlı reseptörler (GPCR'ler), insan proteomunun ~%3'ünü kaplayan en büyük integral membran proteinleri üst ailesini oluşturur. Hücre dışı sinyallere yanıt olarak hücrel membran boyunca bilgi transferini allosterik olarak kolaylaştırarak ve bunları bir veya daha fazla hücre içi sinyalleşme kaskadlarına dönüştürür. G bağlı protein reseptörü α , β ve γ alt birimlerinden oluşmuş heterotrimerik bir yapıya sahiptir. Reseptör uyarımı yokken GDP α alt birimine ve tüm alt birimler birbirine bağlıdır. Reseptöre ligand bağlanmasıyla α alt birimi GDP'yi GTP'ye değiştirir. GTP bağlanmış olan α alt birim, β , γ alt birimlerinden ayrılır ve hedef proteinini düzenler. Hedef protein ikincil

mesajcı aracılığıyla sinyal gönderir. GTP'nin hidrolizi ile G proteininin etkisi sonlanır ve başlangıçtaki G α -GDP, β , γ heterotrimerik inaktif yapısına döner [2,6-8] (Şekil 3).



Şekil 3: G-protein-bağlı reseptörlerin yapısı [9].

İyon kanallarına bağli reseptörler ise homolog çok geçişli transmembran proteinlerdir. Ligandın reseptörüne bağlanmasıyla iyon kanalı geçici olarak açılır veya kapanır. Böylece hücre zarının iyon geçirgenliği değişir [1].

Asetilkolin, Dopamin, Adrenalin, Serotonin, Histamin, Glutamat, Glisin, Gama aminobütirik asit (GABA) gibi nörotransmitterler hedef hücre yüzeyindeki reseptöre bağlanırlar. Her bir nörotransmitter farklı reseptör yapısına sahip olsa da çoğunlukla G protein yapıli reseptörler ile aktivite gösterirler [8].

Asetil Koa ve kolinin asetilkolintransferaz enzimi aracılığı ile etkileşimi sonucu oluşan asetilkolin daha sonra bir vezikül içerisine alınır ve sinaptik aralığa bırakılır. Bu nörotransmitter muskarinik reseptör olarak isimlendirilen G protein bağli reseptör ve nikotinik reseptör olarak isimlendirilen iyon kanalına bağli reseptör olarak iki farklı reseptör tipine sahiptir [8].

Dopamin, tirozin amino asitinden elde edilen bir moleküldür ve birden fazla reseptöre sahiptir. D1-D2-D3-D4-D5 olarak bilinen reseptörler G proteinine bağli reseptörlerdir. D1 ve D5 eksitatörken, D2-D3 ve D4 ise inhibitör özelliktedir [10].

Adrenalin, hücre membranında bulunan GPCR'e bağlanarak hücre sinyalizasyonunu ikinci mesajcı cAMP üzerinden gerçekleştirmektedir [1].

Serotonin veya 5-hidroksitriptamin (5-HT) olarak isimlendirilen molekül anksiyeteden depresyona, öğrenmeden uykuya, migrenden iştaha kadar birden fazla fonksiyona sahip bir nörotransmitterdir. Vücuttaki serotoninin çoğu, daha çok gastrointestinal (GI) kanalda bulunur. Genellikle GPCR yapısında olan ve 5-HT1-7 olarak isimlendirilen yedi tip reseptörü vardır [11].

Histamin, L-histidinden türetilen doğal bir amindir. GPCR yapısındaki H1, H2, H3 ve H4 olarak bilinen reseptörleri ile aktivitesini gösterir. H1 tipi histaminik reseptör, tüm vücutta yaygın olarak bulunmasına karşın en önemli buldukları bölgeler damar endoteli ve damar duvarlarıdır. Bu reseptörler alerji, immun yanıt veya yangısal olaylarda mast hücrelerinden ve nötrofillerden salgılanan histaminlerin bağlandığı başlıca reseptörlerdir. H2 reseptörün başlıca bulunduğu yerler mide mukozasına ait paryetal hücrelerdir. Histaminin bu reseptörlere bağlanması sonucu hidroklorik asit ve intrinsik faktör salınımı artarak mide faaliyetleri artırılır. H3 ise sadece merkezi sinir sisteminde bulunur. H3 reseptöründeki fonksiyonel değişiklikler uyku bozuklukları, dikkat eksiklikleri, hiperaktivite bozukluğu ve bilişsel bozuklukta rol oynar [12].

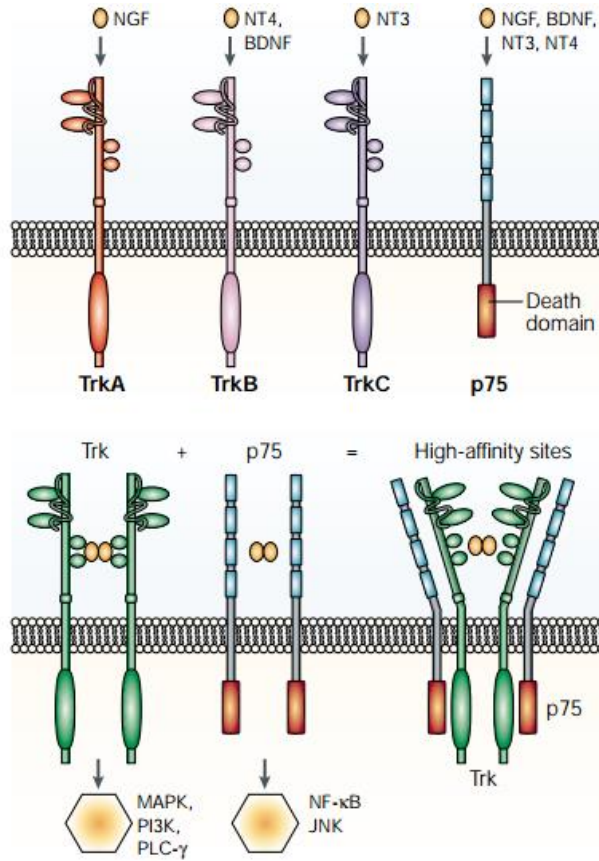
Glutamat reseptörleri ise merkezi sinir sistemi boyunca sinaptik iletme aracılık eden ligand kapılı iyon kanallarıdır. NMDA reseptörleri, AMPA reseptörleri, metabotropik reseptörleri ve kainat reseptörleri şeklinde 4 ana gruba ve bu grupların alt birimlerine sahiptir [13].

Glisin reseptörleri (GlyR'ler) pentamerik, klorür geçirgen kanallar oluşturan ve merkezi sinir sistemi boyunca hızlı inhibitör sinyalleme için aracılık eden iyon kanalı reseptörleridir. Omurilik ve beyin sapında, GlyR'ler hareketi düzenler [14].

Bir diğer nörotransmitter GABA ise farklı yapı gösteren birden fazla reseptöre sahiptir. GABA-A ve GABA-C iyon kanallarına bağlı reseptör yapısındadır. Reseptörüne bağlandığında hücre içine klor iyon geçişi gerçekleşir. GABA-B ise G protein bağlı reseptör olarak işlev göstermektedir [15].

Genel olarak nörotransmitterler hücre içerisinde oluşturulduktan sonra bir vezikül içerisine alınır ve daha sonra sinaptik aralığa bırakılır. Hedef hücre membranında bulunan, çoğunlukla G bağlı protein olarak karşımıza çıkan reseptörleri aracılığı ile de etkilerini gösterirler.

Nörotransmitterler gibi reseptörü hücre membranında bulunan diğer moleküller ise büyüme faktörleridir. Sinir büyüme faktörü (NGF), Epidermal büyüme faktörü (EGF), Fibroblast büyüme faktörü (FGF), Transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β), İnsülin benzeri büyüme faktörleri (IGF), Platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF) gibi birçok büyüme faktörleri bulunmaktadır. Büyüme faktör reseptörleri tirozin kinaz (Trk) aktivitesine sahip olan moleküllerdir. Yüksek affiniteli olarak Trk-A, Trk-B, Trk-C olmak üzere üç tipi bulunurken, düşük affiniteli olarak ise $p75^{NTR}$ reseptörü mevcuttur. Her biri farklı büyüme faktörü bağlama özelliğine sahiptir. Trk-A reseptörü NGF, Trk-B reseptörü beyin kaynaklı nörotrafik faktör (BDNF) ve nörotrofin-4/5 (NT-4/5), Trk-C reseptörü NT-3, $p75^{NTR}$ reseptörü ise NGF, BDNF, NT-3, NT-4 bağlamaktadır [2] (Şekil 4).



Şekil 4: Tirozin kinaz aktivitesine sahip reseptörler [16]

NGF, Rita Levi-Montalcini'ye 100 yaşında Nobel ödülünü kazandıran moleküldür. NGF etkisini yüksek affiniteli reseptörü Trk-A ve düşük affiniteli reseptörü $p75^{NTR}$ olmak üzere iki hücre yüzey reseptör aracılığıyla gösterir. NGF'nin Trk-A/ $p75^{NTR}$ kompleksi ile etkinleştirilen başlıca hücre içi sinyalizasyon yolları; mitojen-aktivi protein kinaz (MAPK), hücre dışı sinyal-ilişkili kinaz (ERK), fosfotidil inozitol 3-kinaz (PI3K-Akt) ve fosfolipaz C gamma (PLC- γ)'dir. Trk-A reseptörü, hücrelerin yaşaması ve

farklılaşmasının gerçekleşmesi için fosforilasyon kaskadını etkinleştirir. p75^{NTR}'nin, NGF'nin Trk-A'ya bağlanma becerisini artırdığı gibi çeşitli hücrelerin Trk-A fosforilasyonunu arttırdığı da bilinmektedir. p75^{NTR}, Trk-A aktivasyonunun azaldığı ya da olmadığı durumlarda sempatik nöronların, duyu nöronlarının, motor nöronların ve oligodendrositlerin apoptozunu tetikler. NGF'nin yalnızca p75^{NTR}'ye bağlanması, aynı zamanda nüklear faktör-κB (NF-κB) yolaklarını etkinleştirir [5,17-19].

BDNF'nin reseptörleri ise Trk-B ve p75^{NTR}'dir. Trk-B reseptörüne bağlandıktan sonra PI-3 K, ERK/MAPK ve PLCγ yolakları ile hücre sağ kalımı görülürken, p75^{NTR} reseptörü ile etkileşim sonucu NF-κB, JNK ve RhoA-GTP yolaklarını kullanarak hücre ölümünün gerçekleştiği görülür [20].

EGF, hücrelerin bölünmesini, farklılaşmasını, yaşamasını, çoğalmasını, büyümesini ve göçünü uyaran, organizmadaki pek çok fizyolojik ve patolojik süreçte görev alan protein yapıda bir büyüme faktörüdür. Biyolojik etkilerini bir transmembran protein olan EGF reseptörü (EGFR) aracılığı ile gösteren EGF, reseptörüne bağlandığı zaman dimerizasyon gerçekleşir ve bir kompleks oluşturduktan sonra MAPK, ERK, PI3K-Akt, PLC-γ, Janus kinaz/sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (JAK/STAT) sinyal yolaklarını aktive eder [21,22].

TGF-β ise çoğalma, farklılaşma ve apoptoz dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerde rol oynayan önemli bir faktördür. TGF-β1, TGF-β2 ve TGF-β3 olmak üzere üç izoformu mevcuttur. Sinyalizasyonu ise kanonik ve kanonik olmayan yol olarak iki farklı şekilde gerçekleşmektedir. Kanonik yol, TGF-β reseptörüne bağlanır ve reseptörün dimerizasyonu gerçekleşir. Daha sonra hücre içerisinde Smad2/3 fosforilasyonu olur ve Smad4 ile kompleks oluşturup gen transkripsiyonunu indükler. Kanonik olmayan yol da ise TGF-β reseptörüne bağlanır ve reseptör dimerizasyonu gerçekleşir. Reseptörler tirozin kinaz aktiviteleri sayesinde birbirlerinin fosforilasyonunu gerçekleştirerek aktif duruma geçerler. Üç farklı sinyal yolu yer almaktadır. İlk olarak adaptör moleküler aracılığı ile Ras-Raf-MEK-ERK yolağını aktive edebilir ya da PI3K/Akt yolağını kullanabilir [23,24].

IGF reseptörü ise yine tirozin kinaz fosforilasyonu ile aktive olur. Akabinde IRS (insülin reseptörü substratı) veya SHC (Src homoloji alanı içeren) proteinlerinin fosforilasyonu ile MAPK (Ras/Raf/ERK) veya PI3K (PI3K/PTEN/AKT) sinyal yollarının aktivasyonu gerçekleşir.

PDGF ise hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması, hücre iskeleti yeniden düzenlemeleri ve kemotaksi dahil hücre göçü gibi çoklu hücre fonksiyonları üzerine etkili bir faktördür. MAPK (Ras/Raf/ERK) veya PI3K (PI3K/PTEN/AKT) sinyal yolları ile sinyalizasyon işlemini gerçekleştirir.

Genel olarak büyüme faktörlerine baktığımızda reseptör yapılarının tirozin kinaz aktivitesine sahip olduğu görülmektedir. Trk-A, Trk-B, Trk-C ve p75^{NTR} reseptörlerinin yer aldığı, sıklıkla MAPK, ERK, PI3K-Akt, PLC-γ gibi yolların aktivitesi üzerinden hücresel yanıt oluştuğunu görmekteyiz.

2. Sonuç

Ekstrinsik ve intrinsik uyarı moleküllerinin etkili olması ile sentezlenen birinci mesajcılarının yapısına uygun olarak lokalize olmuş reseptörüne bağlanması ile hücresel yanıt için ilk adım atılmaktadır. Reseptör-ligand etkileşiminden sonra birçok sinyal yolunun aktive olması ve sinyalizasyonun giderek güçlenmesi ile hücresel yanıt elde edilmektedir. Bu oluşan hücresel yanıtlar hayati fonksiyonlarımız için kilit noktalarıdır. Bu derlemede birinci mesajcılar ve reseptörleri, hücre içi ve hücre membranında yer alan reseptör olarak gruplandırılarak ele alınmıştır. Genel bir bakış açısı olarak hücre içi sinyal yollarının değerlendirilmesinde katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Kaynakça

[1] Cooper G., & Hausman R. (2019). Hücre moleküler yaklaşım (7.Baskı). 601-647

[2] Kırdag, M., Sel, T. & Altıntaş, A., (2019), Hücre Sinyal Proteinleri ve Biyo-Haberleşme, *Eurasian Journal of Health Sciences* 2(2):48-55, Erişim Adresi: H__cre Sinyal Proteinleri ve Biyo-Haberle__me[#524817]-726328.pdf

[3] Skowron K., Booker K., Cheng C., Creed S., David BP., Lazzara BP., Lian A., Siddiqui Z., Speltz TE., Moore TW. (2019). Steroid Receptor/Coactivator Binding Inhibitors: An Update. *Mol Cell Endocrinol.* August 01; 493: 110471. doi:10.1016/j.mce.2019.110471.

- [4] Pepeler MS, Savaş B, Pamukçuoğlu M, et al. (2019). Expression of vitamin D receptor in colorectal cancer staging and its effects on prognosis. *The Turkish Journal of Academic Gastroenterology*;18:101-108. DOI: 10.17941/agd.601187.
- [5] Tuncer Z., Kozacı LD. (2022). Büyüme Faktörleri, Reseptörleri ve Sinyal İletim Yolları. *Karatay Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, Cilt 3, Sayı 2, 91-107.
- [6] Syrovatkin V, Alegre K, Dey R, Huang X. (2016). Regulation, signaling and physiological functions of G-proteins. *J Mol Biol*. September 25; 428(19): 3850–3868. doi:10.1016/j.jmb.2016.08.002.
- [7] Hilger D, Masureel M, Kobilka BK. (2018). Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nat Struct Mol Biol*. January ; 25(1): 4–12. doi:10.1038/s41594-017-0011-7
- [8] Santiago LJ., Abrol R. (2019) Understanding G Protein Selectivity of Muscarinic Acetylcholine Receptors Using Computational Methods. *Int. J. Mol. Sci.*, 20, 5290; doi:10.3390/ijms20215290.
- [9] Michael J. Capper & Daniel Wacker, 2018. "How the ubiquitous GPCR receptor family selectively activates signalling pathways," *Nature*, *Nature*, vol. 558(7711), pages 529-530, June.
- [10] Sayın A. (2008). Dopamin Reseptörleri ve Sinyal İletim Özellikleri. (*Klinik Psikiyatri* ;11:125-134).
- [11] D McCorvy J, L Roth B. (2015). Structure and Function of Serotonin G protein Coupled Receptors. *Pharmacol Ther*. June ; 150: 129–142. doi:10.1016/j.pharmthera.
- [12] Shulpekova, Y.O.; Nechaev, V.M.; Popova, I.R.; Deeva, T.A.; Kopylov, A.T.; Malsagova, K.A.; Kaysheva, A.L.; Ivashkin, V.T. (2021). Food Intolerance: The Role of Histamine. *Nutrients*, 13, 3207. <https://doi.org/10.3390/nu13093207>.
- [13] Huettner J. (2015). Glutamate receptor pores. *The Journal of Physiology*, 593.1 pp 49–59.
- [14] Zhu H, Gouaux E. (2021). Architecture and assembly mechanism of native glycine receptors. *Nature*. November ; 599(7885): 513–517. doi:10.1038/s41586-021-04022-z.
- [15] Gong P, Hong H, Perkins E. (2015). Ionotropic GABA receptor antagonism-induced adverse outcome pathways for potential neurotoxicity biomarkers. *Biomarkers in Medicine* Volume 9, Issue 11, November, Pages 1225-1239. <https://doi.org/10.2217/bmm.15.58>
- [16] M. V. Chao. (2003). Neurotrophins And Their Receptors: A Convergence Point For Many Signalling Pathways. *Nature Reviews Neuroscience* volume 4, pages299–309.
- [17] Yediel Aras Ş, Karadağ Sarı E. (2017). NGF (Sinir Büyüme Faktörü) ve Fonksiyonları. *MAE Vet Fak Derg*, 2 (1): 91-96, DOI: 10.24880/maeuvsd.296782.
- [18] Du, Z., & Lovly, C. M. (2018). Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Molecular Cancer*, 17(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0782-4>.
- [19] Rocco, M. L., Soligo, M., Manni, L., & Aloe, L. (2018). Nerve growth factor: early studies and recent clinical trials. *Current neuropharmacology*, 16(10), 1455–1465. <https://doi.org/10.2174/1570159X16666180412092859>.
- [20] Jin W. (2020). Regulation of BDNF-TrkB Signaling and Potential Therapeutic Strategies for Parkinson's Disease. *J. Clin. Med.*, 9, 257; doi:10.3390/jcm9010257.
- [21] Yarım GF, Yarım M, Kazak F, Torunoğlu Eİ. (2017). Epidermal Büyüme Faktörünün Nöroprotektif Etkileri. *F.Ü.Sağ.Bil.Tıp.Derg*. 31 (2): 99 - 103 <http://www.fusabil.org>.
- [22] Pottier, C., Fresnais, M., Gilon, M., Jérusalem, G., Longuespée, R., & Sounni, N. E. (2020). Tyrosine kinase inhibitors in cancer: Breakthrough and challenges of targeted therapy. *Cancers*, 12(3), 731. <https://doi.org/10.3390/cancers12030731>.
- [23] Chung, J.Y.-F.; Chan, M.K.-K.; Li, J.S.-F.; Chan, A.S.-W.; Tang, P.C.-T.; Leung, K.-T.; To, K.-F.; Lan, H.-Y.; Tang, P.M.-K. (2021). TGF-β Signaling: From Tissue Fibrosis to Tumor Microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.*, 22, 7575. <https://doi.org/10.3390/ijms22147575>.
- [24] Ma, N., Teng, X., Zheng, Q., & Chen, P. (2019). The regulatory mechanism of p38/MAPK in the chondrogenic differentiation from bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal Of Orthopaedic Surgery And Research*, 14(1), 434. <https://doi.org/10.1186/s13018-019-1505-2>.