



İSTANBUL
ÜNİVERSİTESİ
YAYINEVİ

jmed.istanbul.edu.tr

İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi



Journal of Istanbul
Faculty of Medicine



İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi

SAHİBİ VE SORUMLU MÜDÜR/OWNER AND RESPONSIBLE MANAGER

Tufan TÜKEK

İstanbul Tıp Fakültesi Dekanı
Dean of Istanbul Faculty of Medicine

EDİTÖR/EDITOR

Birsen KARAMAN

İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

EDİTÖR YARDIMCILARI/ASSOCIATE EDITORS

Funda GÜNGÖR UĞURLUCAN

İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Çiğdem KEKİK ÇINAR

İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Ayşe KUBAT ÜZÜM

İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

İsmail Cem SORMAZ

İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Nermin Görkem ŞİRİN İNAN

İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Deniz TUĞCU

İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Halil YAZICI

İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

LANGUAGE EDITORS / DİL EDİTÖRLERİ

Alan James NEWSON

İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Elizabeth Mary EARL

İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

YAYIN KURULU/EDITORIAL BOARD

Atilla ARINCI

İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Nilgün BOZBUĞA

İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Şükrü H. EMRE

Yale Üniversitesi, ABD
Yale University, USA

Haluk ERAKSOY

İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Hakan ERTİN

İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Simin GÖRAL

Pennsylvania Üniversitesi, ABD
University of Pennsylvania, USA

Nilüfer GÖZÜM

İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Hülya GÜL

İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Fahrettin KELEŞTEMUR

Yeditepe Üniversitesi, TÜRKİYE
Yeditepe University, TURKEY

Abdullah KUTLAR

Augusta Üniversitesi, ABD
Augusta University, USA

Sacit Bülent OMAV

Yale Üniversitesi, ABD
Yale University, USA

Betigül ÖNGEN

İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Beyza ÖZÇINAR

İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Altay SENCER

İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

Yasemin ŞANLI

İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

M. Öner ŞANLI

İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

E. Murat TUZCU

Cleveland Clinic, BAE
Cleveland Clinic, UAE

Pinar YAMANTÜRK ÇELİK

İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY

İSTATİSTİK DANIŞMANI/STATISTICS ADVISOR

Halim İŞSEVER

İstanbul Üniversitesi, TÜRKİYE
Istanbul University, TURKEY



İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi

AMAÇ KAPSAM VE YAYIN STANDARTLARI

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

İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi (İst Tıp Fak Derg), tıbbın tüm alanlarında klinik ve deneysel özgün araştırmalar, ender görülebilecek olgu sunumları, özel ve aktüel konularda literatür derlemeleri ve editöre mektuplar yayınlamaktadır. Orijinal metot geliştirme, yeni bir girişim tekniği ve orijinal çalışmaların ön sonuçlarını içeren kısa raporlara da dergide yer verilmektedir.

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

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

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

Makale değerlendirme ve yayın işlemleri için yazarlardan ücret talep edilmemektedir.

Derginin tüm masrafları İstanbul Üniversitesi tarafından karşılanmaktadır.

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

Yayınlanan tüm içeriğe ücretsiz olarak erişilebilir.

Editör: Birsen Karaman

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

Tel.: +90 212 414 21 61

E-posta: itfdergisi@istanbul.edu.tr

Yayıncı: İstanbul Üniversitesi Yayınevi

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

Tel.: +90 212 440 00 00

Faks: +90 212 217 22 92



Istanbul Tıp Fakültesi Dergisi

AIMS SCOPE AND PUBLICATION STANDARDS

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

Journal of Istanbul Faculty of Medicine (J Ist Faculty Med) aims to contribute to the literature by publishing manuscripts at the highest scientific level on all fields of medicine. The journal publishes original experimental and clinical research articles, reports of rare cases, reviews that contain sufficient amount of source data conveying the experiences of experts in a particular field, and letters to the editors as well as brief reports on a recently established method or technique or preliminary results of original studies related to all disciplines of medicine from all countries.

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

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

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

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

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

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

All published content is available online, free of charge.

Editor: Birsen Karaman

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

Phone: +90 212 414 21 61

E-mail: itfdergisi@istanbul.edu.tr

Publisher: Istanbul University Press

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

Phone: +90 212 440 00 00

YAZARLARA BİLGİ

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

İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi (İst Tıp Fak Derg), tıbbın tüm alanlarında klinik ve deneysel özgün araştırmalar, ender görülebilecek olgu sunumları, özel ve aktüel konularda literatür derlemeleri ve editöre mektuplar yayınlamaktadır. Orijinal metot geliştirme, yeni bir girişim tekniği ve orijinal çalışmaların ön sonuçlarını içeren kısa raporlara da dergide yer verilmektedir.

EDİTÖRYAL POLİTİKALAR VE HAKEM SÜRECİ

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

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

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

Klinik ve deneysel çalışmalar, ilaç araştırmaları ve bazı olgu sunumları için World Medical Association

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

Bütün makalelerin benzerlik tespiti denetimi, iThenticate yazılımı aracılığıyla yapılmaktadır.

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

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

ICMJE, yazarların aşağıdaki 4 koşulu karşılamasını önermektedir:

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

YAZARLARA BİLGİ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MAKALE HAZIRLAMA

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

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

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

YAZARLARA BİLGİ

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

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

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

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

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

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

Makale Türleri

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

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

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

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

Derleme: Yazının konusunda birikimi olan ve bu birikimleri uluslararası literatüre yayın ve atıf sayısı olarak yansımış uzmanlar tarafından hazırlanmış yazılar değerlendirmeye alınır. Yazarları dergi tarafından da davet edilebilir. Bir bilgi ya da konunun klinikte kullanılması için vardığı son düzeyi anlatan, tartışan,

Tablo 1. Makale türleri için kısıtlamalar

Makale türü	Sözcük limiti	Özet sözcük limiti	Kaynak limiti	Tablo limiti	Resim limiti
Özgün Araştırma	3500	250 (Alt başlıklı)	30	6	7 ya da toplamda 15 görsel
Derleme	5000	250	50	6	10 ya da toplamda 20 görsel
Olgu Sunumu	1000	200	15	Tablo yok	10 ya da toplamda 20 görsel
Editöre Mektup	500	Uygulanamaz	5	Tablo yok	Görsel yok

YAZARLARA BİLGİ

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

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

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

Tablolar

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

Resim ve Resim Altyazıları

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

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

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

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

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

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

REVİZYONLAR

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

YAZARLARA BİLGİ

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

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

KAYNAKLAR

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SON KONTROL LİSTESİ

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



YAZARLARA BİLGİ

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

Editör: Birsen Karaman

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

Telefon: +90 212 414 21 61

E-mail: itfdergisi@istanbul.edu.tr

Yayıncı: İstanbul Üniversitesi Yayınevi

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

Tel.: +90 212 440 00 00

Faks: +90 212 217 22 92



INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

Journal of Istanbul Faculty of Medicine (J Ist Faculty Med) aims to contribute to the literature by publishing manuscripts at the highest scientific level on all fields of medicine. The journal publishes original experimental and clinical research articles, reports of rare cases, reviews that contain sufficient amount of source data conveying the experiences of experts in a particular field, and letters to the editors as well as brief reports on a recently established method or technique or preliminary results of original studies related to all disciplines of medicine from all countries.

EDITORIAL POLICIES AND PEER REVIEW PROCESS

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

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

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

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

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

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

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



INTRUCTIONS TO AUTHORS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

MANUSCRIPT PREPARATION

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

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

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

Authors are required to submit the following:

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

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

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

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

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

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

Manuscript Types

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

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

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

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

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

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

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

Tables

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

Figures and Figure Legends

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

Table 1. Limitations for each manuscript type

Type of manuscript	Word limit	Abstract word limit	Reference limit	Table limit	Figure limit
Original Article	3500	250 (Structured)	30	6	7 or total of 15 images
Review Article	5000	250	50	6	10 or total of 20 images
Case Report	1000	200	15	No tables	10 or total of 20 images
Technical Note	1500	No abstract	15	No tables	10 or total of 20 images
Letter to the Editor	500	No abstract	5	No tables	No media

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

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

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

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

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

REVISIONS

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

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

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

REFERENCES

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

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

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

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

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

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

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

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

Thesis: Yılmaz B. Ankara Üniversitesindeki Öğrencilerin Beslenme Durumları, Fiziksel Aktivitelerine Beden Kitle İndeksleri Kan Lipidleri Arasındaki İlişkiler. H.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi. 2007.

Manuscripts Accepted for Publication, Not Published Yet: Slots J. The microflora of black stain on human primary teeth. Scand J Dent Res. 1974.

Epub Ahead of Print Articles: Cai L, Yeh BM, Westphalen AC, Roberts JP, Wang ZJ. Adult living donor liver imaging. Diagn Interv Radiol. 2016 Feb 24. doi: 10.5152/dir.2016.15323. [Epub ahead of print].

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

SUBMISSION CHECKLIST

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



INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

Editor: Birsen Karaman

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

Phone: +90 212 414 21 61

E-mail: itfdergisi@istanbul.edu.tr

Publisher: Istanbul University Press

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

Phone: +90 212 440 00 00

İÇİNDEKİLER / CONTENTS

ARAŞTIRMA / RESEARCH

- 177** **SCREENING SLC2A1 GENE FOR SEQUENCE AND COPY NUMBER VARIATIONS ASSOCIATED WITH GLUT-1 DEFICIENCY SYNDROME**
GLUT-1 EKSİKLİĞİ SENDROMU İLE İLİŞKİLİ SLC2A1 GENİNDE YER ALAN DİZİ VE KOPYA SAYISI VARYASYONLARININ İNCELENMESİ
Cemre ÖRNEK ERGÜZELOĞLU, Bülent KARA, İlker KARACAN, Özkan ÖZDEMİR, Yeşim KESİM, Nerses BEBEK, Uğur ÖZBEK, Sibel Aylin UĞUR İŞERİ
- 184** **THE MEASUREMENT OF THE CHOROIDAL THICKNESS DURING ORAL GLUCOSE TOLERANCE TESTS IN PREDIABETIC SUBJECTS: A SPECTRAL DOMAIN OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY STUDY**
PREDİYABETİK HASTALARDA YAPILAN ORAL GLİKOZ TOLERANS TESTİ ESNASINDA KOROİD KALINLIĞININ ÖLÇÜLMESİ: SPEKTRAL DOMAİN OPTİK KOHERENS TOMOGRAFİ ÇALIŞMASI
Eylem ÇAĞILTAY, Muhammed ALTINIŞIK, Sjaak POWWELS, Nur DEMİR, Fahrettin AKAY
- 193** **SURGICALLY INDUCED ASTIGMATISM AFTER UPPER EYELID SURGERY IN ADULT PATIENTS**
YETİŞKİN HASTALARDAKİ ÜST KAPAK CERRAHİSİ SONRASI CERRAHİYE BAĞLI ASTİGMATİZMA
Emre ALTINKURT, Nihan AKSU CEYLAN
- 197** **EVALUATION OF REPETITIVE NERVE STIMULATION WITH DIFFERENT STIMULATION FREQUENCIES IN PATIENTS WITH MYASTHENIA GRAVIS**
MYASTHENİA GRAVİS HASTALARINDA FARKLI UYARI FREKANSLARI İLE ARDIŞIK SİNİR UYARIM TESTİNİN İNCELENMESİ
Nermin Görkem ŞİRİN, Elif KOCASOY ORHAN, Emel OĞUZ AKARSU, Hacer DURMUŞ, Feza DEYMEER, Mehmet Barış BASLO
- 204** **ANTERIOR TRANSPOSITION VERSUS IN SITU NEUROLYSIS IN CUBITAL TUNNEL SYNDROME: A COMPARISON BASED ON FUNCTIONAL AND ELECTRO-DIAGNOSTIC EVALUATION**
KÜBİTAL TÜNEL SENDROMUNDA ANTERİOR TRANSPOZİSYON İLE İN SİTU GEVŞETMENİN FONKSİYONEL VE ELEKTRODİAGNOSTİK SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI
Ömer Naci ERGİN, Necmettin TURGUT, Serkan BAYRAM, Mehmet DEMİREL, Murat ALTAN, Ahmet SALDUZ, Hayati DURMAZ
- 209** **THE CONNECTION BETWEEN POLYSOMNOGRAPHY RESULTS, EPWORTH SCORES AND DRUG-INDUCED SLEEP ENDOSCOPY FINDINGS IN PATIENTS WITH OSAS**
OUAS HASTALARINDA İLAÇLA İNDÜKLENMİŞ UYKU ENDOSKOPİSİ BULGULARININ POLİSOMNOGRAFİ VE EPWORTH SKALASI SONUÇLARI İLE İLİŞKİSİ
Mustafa Sıtkı GÖZELER, Yusufhan SUOĞLU
- 215** **KARACİĞER KİST HİDATİĞİNDE PERİKİSTEKTOMİ: TEK MERKEZ DENEYİMİMİZ**
PERICYSTECTOMY FOR LIVER HYDATID CYST: SINGLE CENTER EXPERIENCE
Kürşat Rahmi SERİN, Cem İBİŞ, Yaman TEKANT, İlgin ÖZDEN
- 221** **THE ROLE OF GASTRIC LOCALIZATION AND THE GASTRITIS SCORE OF HELICOBACTER PYLORI IN THE DEVELOPMENT OF EROSIVE ESOPHAGITIS**
EROZİV ÖZOFAJİT GELİŞİMİNDE HELICOBACTER PYLORİ'NİN GASTRİK LOKALİZASYONUN VE GASTRİT SKORUNUN ROLÜ
Serkan YALAKI, Hüseyin PULAT
- 227** **TORAKOLOMBER BİLEŞKE DİSK HERNİASYONLARININ CERRAHİ TEDAVİSİNDE POSTEROLATERAL TRANSKAMBİN YAKLAŞIM**
POSTEROLATERAL TRANSCAMBİN APPROACH FOR SURGICAL TREATMENT OF THORACOLOMBER DISC HERNIATIONS
Halil CAN, Furkan DİREN
- 234** **1,2 DİMETİLHİDRAZİN İLE OLUŞTURULAN KOLON KANSERİ MODELİNDE ZEOLİT DESTEKLİ BESLENMENİN KANSER GELİŞİMİNE ETKİLERİ**
THE EFFECTS OF ZEOLITE SUPPORTED NUTRITION ON CANCER DEVELOPMENT IN THE 1,2 DIMETHYLHYDRASIN INDUCED -COLON CANCER MODEL
Serap KURUCA, Kadriye AKGÜN DAR, Ayşegül KAPUCU, Dilşad ÖZERKAN

İÇİNDEKİLER / CONTENTS

ARAŞTIRMA / RESEARCH

- 241** MEKANİK VE ENZİMATİK YÖNTEM İLE İZOLE EDİLEN STROMAL VASKÜLER FRAKSİYONUN YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN *İN VİTRO* İNCELENMESİ
IN VITRO INVESTIGATION OF THE EFFECT OF STROMAL VASCULAR FRACTION ISOLATED BY MECHANICAL AND ENZYMATIC METHODS ON WOUND HEALING
Kemal Tunç TIRYAKI
- 247** KURKUMİN UYGULAMASININ YÜKSEK YAĞLI DİYETLE BESLENEN SIÇANLARIN TESTİS DOKUSUNDA OKSİDAN-ANTIOKSİDAN SİSTEM ÜZERİNE ETKİSİ
EFFECT OF DIETARY CURCUMIN ON OXIDANT-ANTIOXIDANT STATUS IN TESTIS TISSUES OF RATS FED A HIGH-FAT DIET
Muhammed SEYİTHANOĞLU, Sevda TANRIKULU KÜÇÜK, Yıldız ÖNER İYİDOĞAN, Hikmet KOÇAK, Parvana MİKAİLOVA, Abdurrahman Fatih AYDIN
- 254** RESULTS OF URINE DIPSTICK SCREENING TEST IN ELEMENTARY SCHOOL CHILDREN
İLKÖĞRETİM ÇAĞINDAKİ ÇOCUKLARDA İDRAR DİPSTİCK TARAMA TESTİ SONUÇLARI
Günay MURADOVA, Zeynep YÜRÜK YILDIRIM, Özde Nisa TÜRKKAN, Ahmet NAYIR
- 259** DELAYS IN INITIAL REFERRAL, DIAGNOSIS AND TREATMENT IN CHILDREN WITH CANCER
KANSERLİ ÇOCUKLARDA İLK YÖNLENDİRME, TANI VE TEDAVİDE GECİKMELER
Abbasali Hosein POURFEIZI, Rana HOSSEINI, Roghayeh SHEERVALILOU, Sahar MEHRANFAR
- 267** MULTIDRUG-RESISTANT BACTERIAL INFECTIONS OF THE LIBYAN CIVIL WAR VICTIMS: WHAT DID WE LEARN?
LİBYA İÇ SAVAŞ YARALANMALARININ ÇOKLU DİRENÇLİ BAKTERİLERLE OLAN İNFEKSİYONLARI: NE ÖĞRENDİK?
Zehra Çağla KARAKOÇ, Taner BEKMEZCİ, Ahmet BAŞEL, Binnur PINARBAŞI ŞİMŞEK
- 275** ROMATOLOJİK HASTALIKLARDA HİDRADENİTİS SÜPÜRATİVA'NIN ÖNEMİ
THE IMPORTANCE OF HYDRADENITIS SUPURATIVA IN RHEUMATOLOGIC DISEASES
Dilek TEZCAN, Muhammet LİMON, Semral GÜLCEMAL, Sema YILMAZ
- 280** THE CLINICAL TRIALS LANDSCAPE IN TURKEY: AN EVALUATION OF THE [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) DATABASE
TÜRKİYE'DEKİ KLİNİK ARAŞTIRMA MANZARASI: BİR [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) VERİTABANI DEĞERLENDİRMESİ
Selçuk ŞEN

REVIEW / DERLEME

- 286** BREASTMILK AND COVID-19
ANNE SÜTÜ VE COVID-19
Gülbin GÖKÇAY, Gonca KESKİNDEMİRCİ
- 291** SİNYAL AMPLİFİKASYON TEKNİKLERİ VE TANISAL VİROLOJİDEKİ UYGULAMALARI
SIGNAL AMPLIFICATION TECHNIQUES AND APPLICATIONS IN DIAGNOSTIC VIROLOGY
Fatih ŞAHİNER, Ramazan GÜMRAL

OLGU SUNUMU / CASE REPORT

- 302** TEK TARAFLI İZOLE KONJENİTAL ALT LATERAL KIKIRDAK TOTAL YOKLUĞU OLGUSU
CONGENITAL UNILATERAL ISOLATED TOTAL ABSENCE OF LEFT LOWER LATERAL CARTILAGE
Melihcan SEZGİÇ, Perçin KARAKOL

SCREENING *SLC2A1* GENE FOR SEQUENCE AND COPY NUMBER VARIATIONS ASSOCIATED WITH GLUT-1 DEFICIENCY SYNDROME

GLUT-1 EKSİKLİĞİ SENDROMU İLE İLİŞKİLİ *SLC2A1* GENİNDE YER ALAN DİZİ VE KOPYA SAYISI VARYASYONLARININ İNCELENMESİ

Cemre ÖRNEK ERGÜZELOĞLU^{1,8} , Bülent KARA² , İlker KARACAN^{1,3} , Özkan ÖZDEMİR^{1,4} , Yeşim KESİM^{1,5} , Nerses BEBEK⁶ , Uğur ÖZBEK^{1,7} , Sibel Aylin UĞUR İŞERİ¹ 

¹Istanbul University, Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine, Department of Genetics, Istanbul, Turkey

²Kocaeli University, Faculty of Medicine, Department of Pediatric Neurology, Kocaeli, Turkey

³Istanbul Medeniyet University, Faculty of Engineering and Natural Sciences, Department of Molecular Biology and Genetics, Istanbul, Turkey

⁴University of Cologne, University Hospital Cologne, Center for Molecular Medicine Cologne CMMC, Cologne, Germany

⁵Oxford Brookes University, Faculty of Health and Life Sciences, Oxford, UK.

⁶Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Department of Neurology, Istanbul, Turkey

⁷Mehmet Ali Aydınlar Acibadem University, School of Medicine, Department of Medical Genetics, Istanbul, Turkey

⁸Uludag University, Faculty of Medicine, Department of Medical Genetic Bursa, Turkey

ORCID IDs of the authors: C.Ö.E. 0000-0002-5932-4259; B.K. 0000-0003-3780-6596; İ.K. 0000-0003-3100-0866; Ö.Ö. 0000-0002-2647-6416; Y.K. 0000-0003-4423-2367; N.B. 0000-0002-4749-1471; U.Ö. 0000-0001-7031-3932; S.A.U.i. 0000-0002-5790-6853

Cite this article as: Ornek Erguzeloglu C, Ozdemir O, Kesim Y, Karacan I, Kara B, Bebek N et al. Screening *SLC2A1* gene for sequence and copy number variations associated with GLUT-1 deficiency syndrome. J Ist Faculty Med 2020;83(3):177-83.

doi: 10.26650/IUITFD.2019.0064

ABSTRACT

Objective: Glucose transporter-1 deficiency syndrome (GLUT1-DS) is defined as a metabolic encephalopathy that is associated with heterozygous and usually *de novo* pathogenic variations in the *SLC2A1* (solute carrier family2 member1) gene.

Materials and Methods: In this study, all coding exons and neighboring intronic regions of *SLC2A1* were Sanger sequenced in 12 patients with clinically suspected GLUT1-DS. For *de novo* variations revealed after sequencing and segregation analysis, we also performed genome wide Single Nucleotide Polymorphism (SNP) genotyping to confirm parental relatedness with the proband. In patients without any sequence variations, real-time quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) was applied to determine the presence of any copy number variations (CNV).

Results: Sanger sequencing followed by bioinformatics analysis, segregation in the family and SNP array genotyping revealed two novel and *de novo* pathogenic variations associated with the GLUT1-DS phenotype in 2 patients. qPCR results were com-

ÖZET

Amaç: GLUT1 eksikliği sendromu (GLUT-1ES) bebeklik çağında başlayan metabolik bir ensefalopati olarak tanımlanmıştır. Kolaylaştırılmış glikoz taşıyıcısı olan GLUT1'i kodlayan *SLC2A1* genindeki *de novo* patojenik varyasyonlardan kaynaklanır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışma kapsamında, GLUT1-ES klinik şüphesi olan 12 hastada *SLC2A1* geninin tüm ekzonları Sanger dizileme metodu ile taranmıştır. *De novo* varyantların anne baba çocuk üçlüsü açısından uyumluluğu Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP) genotipleme ile yapılmıştır. Sanger analizinde herhangi bir değişikliği olmayan hastalarda, gerçek zamanlı kantitatif PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) analizi ile kopya sayısı değişimleri incelenmiştir.

Bulgular: Sanger dizileme, biyoinformatik analiz, aile segregasyonu ve SNP genotipleme yaklaşımlarının ardarda uygulanması ile 2 hastada GLUT1-ES fenotipiyle ilişkili iki yeni ve *de novo* patojenik varyasyon tespit edilmiştir. Gerçek zamanlı qPCR sonuçları ise bir başka hastada *SLC2A1* geninin bir kopya kaybıyla

Corresponding author/İletişim kurulacak yazar: sibel.ugur@istanbul.edu.tr

Submitted/Başvuru: 19.08.2019 • **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 18.09.2019 •

Last Revision Received/Son Revizyon: 04.10.2019 • **Accepted/Kabul:** 10.10.2019 • **Published Online/Online Yayın:** 21.10.2019

©Telif Hakkı 2020 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2020 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

patible with one copy loss of *SLC2A1* gene in another patient. All variations identified herein are likely to have caused null alleles and resulted in GLUT1-DS through haplo insufficiency.

Discussion: In this study we used a series of molecular genetic approaches in order to identify all possible variations in *SLC2A1* that may be associated with GLUT1-DS. This collective effort facilitated diagnosis in 3 patients.

Keywords: Glucose transporter-1 deficiency syndrome (GLUT1-DS), *SLC2A1*, *de novo* variations, CNV analysis, SNP array

uyumlu bulunmuştur. Tespit edilen 3 varyasyonun da *SLC2A1* geninin bir allelinin fonksiyonunu tamamen ortadan kaldırarak haplo yetersizlik mekanizması ile hastalığa yol açtığı öngörülmüştür.

Tartışma: Bu çalışma ile pek çok farklı moleküler genetik teknik ve analizler kullanılarak GLUT1-ES hastalığında gen seviyesindeki olası tüm değişikliklerin belirlenmesi hedeflenmiş; klinik tanıya katkı sağlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: GLUT1 Eksikliği Sendromu, *SLC2A1*, *de novo* varyasyon, CNV analizi, SNP dizileme

INTRODUCTION

GLUT1 deficiency syndrome (GLUT1-DS) is caused by heterozygous pathogenic variations of the *SLC2A1* gene. *SLC2A1* encodes GLUT1 protein, which acts as the primary glucose transporter along the blood-brain barrier. *SLC2A1* gene is located on chromosome 1p34.2 and its largest transcript consists of 10 coding exons (1).

Lack or absence of GLUT1 protein leads to insufficient glucose levels for cerebral metabolism (1). Classical GLUT1 encephalopathy is characterized by infantile-onset seizures, developmental disability, complex motor disorders, and variable microcephaly. Although *SLC2A1* variations are known to cause GLUT1-DS, there is still need for determination of proper phenotype-genotype correlations. Most patients carry heterozygous *de novo* mutations in the *SLC2A1* gene. In familial cases, autosomal dominant inheritance is observed with full penetrance and autosomal recessive transition has rarely been reported (2). In clinical practice, the clinically available

distinctive biomarker for GLUT1-DS is a low concentration of glucose in cerebrospinal fluid (CSF) (<50 mg/dl or CSF-to-blood glucose ratio <0.45). Early diagnosis is critical for an effective etiological therapy (3,4).

In this study we set out to identify possible pathogenic variations associated with GLUT1-DS in the *SLC2A1* gene in 12 patients. Various molecular techniques including Sanger sequencing, SNP array analysis and real-time quantitative PCR (qPCR) were used throughout this process. The scientific importance of this study is to contribute to the discussion of diagnosis genetic causes of rare neurological diseases like GLUT1 deficiency syndrome and to determine the possible phenotype-genotype correlations.

MATERIALS AND METHODS

A cohort of 12 individuals with clinically suspected GLUT1-DS were recruited to the study by the Pediatric Neurology department at Kocaeli University's Medical Faculty (Table 1). DNA was isolated from peripheral

Table 1: Review of clinical findings in the study cohort.

Patient Number	Sex	Age at diagnosis	CSF glucose concentration	Parental Cons.	Clinical phenotype
E11-169	F	9 y	31mg/ml	Yes	Microcephaly, dyskinetic movement disorder, ataxia, mental retardation, epilepsy
E13-83	F	17 y	35 mg/ml	No	Dyskinetic movement disorder, mental retardation
E15-16	F	1 y	48 mg/ml	No	Mental retardation and early onset childhood absence epilepsy
E15-19	F	1 y	28 mg/ml	No	Acquired microcephaly, dystonia, epilepsy, psycho-motor retardation
E15-30	F	5 y	55mg/ml	No	Early onset childhood absence epilepsy
E15-34	F	10 y	35 mg/ml	No	Early onset childhood absence epilepsy
E15-40	F	5 y	32 mg/ml	No	Early onset childhood absence epilepsy
E15-47	F	7 y	53 mg/ml	No	Early onset childhood absence epilepsy
E16-16	M	6 y	< 20mg/ml	No	Early onset childhood absence epilepsy
E16-24	F	10 y	< 20mg/ml	No	Early onset childhood absence epilepsy
E17-20	F	13 y	< 20mg/ml	No	Early onset childhood absence epilepsy
E17-79	F	8.5 y	52 mg/ml	No	Early onset childhood absence epilepsy

CSF: cerebrospinal fluid; Cons.: Consanguinity; F: Female; M:Male; Y: year

blood of all patients and their family members whenever required. The DNA was first analyzed for sequence variations via Sanger sequencing and then subjected to trio SNP array genotyping only for trios with *de novo* variants. Real time qPCR method was additionally used for detecting any possible copy number changes that would be missed by Sanger sequencing. The study protocol was approved by İstanbul University, İstanbul Faculty of Medicine, Clinical Ethics Committee (2017/493; 12/05/2017).

Genomic DNA isolation

Peripheral blood samples were obtained in EDTA tubes and DNA was isolated using Qiagene maxi and/or mini kits as suggested. Also, 2.5 ml of peripheral blood samples of patient E11-169 and her parents were collected in PAXgene Blood RNA Tubes and RNA was isolated using PAXgene Blood RNA Kit according to the manufacturer's instructions.

Screening *SLC2A1* for sequence variations

All coding exons and neighbouring intronic regions in *SLC2A1* gene had been amplified using 10 primer pairs designed for this study (Table 2). A touch down PCR (TD-PCR) protocol was utilized for this purpose, which can increase specificity, sensitivity and yield, without the need

for struggle optimizations and/or the redesigning of primers (5,6). Each amplicon was Sanger sequenced and analyzed for sequence variations using CLC Workbench (8). Variants identified were then annotated with ENSEMBL Variant Effector Predictor Tool (VEP) for detecting the consequence of these variants on current transcript versions, retrieving up-to-date population frequency data and predicting the possible impact of amino acid substitutions on the structure and function of GLUT1 protein via PolyPhen and SIFT (<https://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/index.html>). Splicing consequence of splice region variants were analyzed through 'Human Splicing Finder (HSF)' (<http://www.umd.be/HSF/>). For variations with potential pathogenic effect, familial segregation analysis was performed. All variations were annotated using the only consensus codes database transcript of *SLC2A1*, namely ENST00000426263.8 (NM_006516.3) as a reference.

Parental confirmation by SNP array

According to the American College of Medical Genetics (ACMG) Standards Guidelines published in 2015 (8), it is necessary to show parental relatedness with the proband for the confirmation of *de novo* variants. We performed SNP array genotyping using Illumina Human Cyto SNP-12

Table 2: Primer sequences to amplify 10 *SLC2A1* fragments and exons covered by these fragments. Some amplicons were designed as overlapping fragments.

Fragment	Exons involved	Fragment length	Fragment GC content	Primer sequences
Fr1	ex 1	484bp	74%	GCCGGGGTCCTATAAACGCTAC CGTAGATCCGAAGCCCATC
Fr2	ex 2	535bp	54%	AATGAGACCCCAAGAATCC CCAGAAAACCTGGCTGGAGAG
Fr3	ex 3-4	558bp	60%	GGAAAAGGAAGACTGGGTCC ACATACATGGGCACGAAGC
Fr4	ex 4b	535bp	65%	ACTGGGCAAGTCCTTTGAG GTGTCCAGCACAGAGAATGG
Fr5	ex 5-6	466bp	71%	CTGAAGCAGCAGCTGACACAAAG GGAACAGCTCCAGGATGGTGAC
Fr6	ex 6-7	561bp	58%	TGAGCCACCTCACCTTCC TGGCATACACAGGCTGCTGC
Fr7	ex 7-8	609bp	68%	TTTCCCTTTAGACCCCAAGC TATGAAGCCCAGGCAAACCTC
Fr8	ex 8	442bp	70%	CTCTGCCCACAGCTGTTTGTG GGGGTTGCTGTGAAGATGAATTG
Fr9	ex 9	359bp	54%	GGATCCATCACAAACCAGTC TTCTCCTCAGCATGATTCC
Fr10	ex 10	415bp	56%	TCCAAAGTCCTACAGCCAGG CTTCTGGACATCATTGCTGG

Bead Chip kit in two parent offspring trios. The data was exported from Genome Studio platform and analyzed using an in-house approach, in which only 'informative SNPs (iSNP)' were selected for each trio. For autosomal SNPs, iSNPs are described as SNPs that are alternatively homozygous in each parent. For iSNPs the child is an obligate heterozygous. As an example if we choose all SNPs with 'AA' genotype in the father and 'BB' genotype in the mother, the offspring should essentially be 'AB'. A significant degree of heterozygosity for the offspring in the trio for iSNPs will assess biological relatedness (9).

Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) approach

In order to detect heterozygous copy number variations that may be missed by Sanger sequencing approach, we utilized real time qPCR approach using Roche Light Cycler 480 with SYBR Green I Master mix in 7 patients for over 9 *SLC2A1* fragments. Herein, we aimed to map CNVs at the level of exonic resolution. Delta-delta Ct approach was used for data analysis using *PCBP3* (Poly RC Binding Protein 3) gene as a reference. For this approach, primer pairs presented on Table 2 were used except for fragments 1, 6 and 7. For these regions new primer pairs were designed. Nevertheless, fragment 1 could not be optimized for qPCR probably due to a relatively high GC content. Therefore, qPCR was performed for 9 fragments. New primer pairs for fragments 6 and 7 are as follows: Fr6F:ATCAACCGCAACGAGGAG, Fr6R:ACCATGCA-CACTTGACCAGA, Fr7F:CCCACATCCACTGCTACAGA and Fr7R:TAGTGCCCTTCTGAACCCAC.

Gene expression level analysis

Patient E11-169 and her parents were tested using mRNA expression analysis of the *SLC2A1* gene to investigate any effects on the mRNA levels. For each subject, 1 µg total RNA was reverse transcribed using First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) assay was performed triplicate using Roche Light Cycler 480 with SYBR Green I Master mix and primers located on different exons (forward primer for Fr4 and reverse primer for Fr6 as indicated in Table 2). Delta-delta Ct approach was used for data analysis using *ABL* gene as a reference. Statistical significance was tested using one-way ANOVA.

***Reasons for choosing *ABL* and *PCBP3* as reference genes; stability, no change in the tissues or cells under investigation, these genes have the closest base length to the target gene. The reason for including the *ABL* gene as a second reference was that it is more compatible and optimized for the mRNA sequence step than *PCBP3* gene.

RESULTS

Interpretation of sequence variants in *SLC2A1*

Eight different single nucleotide variations were identified in 7 patients with a suspected phenotype of GLUT1-DS. Two of them (NM_006516.3: c.680-1G>C and NM_006516.3: c.542delG) were assessed to be associated with the GLUT-1 deficiency syndrome as they were found to be novel and *de novo* (Figure 1; Table 3). Trio SNP analysis was performed for families of E11-169 and

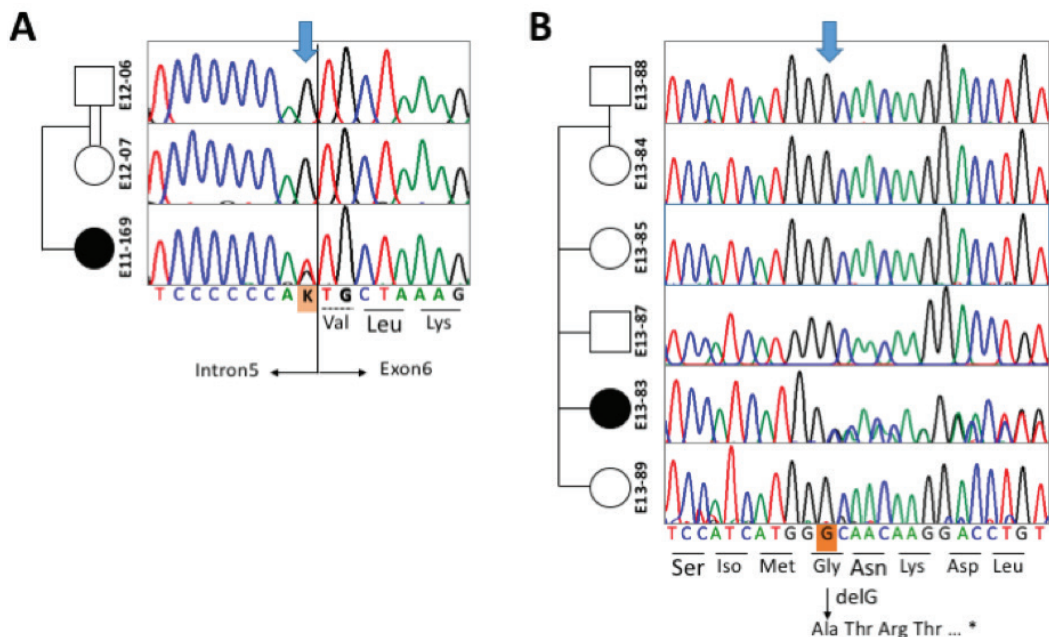


Figure 1: Segregation analysis of (a) NM_006516.3: c.680-1G>T and (b) NM_006516.3:c.542delG in the relevant families indicate a *de novo* pattern for the variations. K: ambiguity code for G or T.

Table 3: SLC2A1 variants identified through Sanger sequencing

Patient ID	Variant ID	Seg.	c.DNA	Protein	MAF	Variant type	Exon	Intron
E11-169	Novel	<i>de novo</i>	c.680-1G>T	-	-	splice_acceptor	-	5/9
E13-83	Novel	<i>de novo</i>	c.542delG	p.(Gly181Alafs*10)	-	frameshift	5/10	
E17-79	rs11537640	NP	c.-197A>C	-	0.23 (G)	5_prime_UTR	1/10	
E15-40, E17-20, E17-79	rs1385129	NP	c.45C>T	p.Ala15=	0.24 (A)	synonymous	2/10	
E17-79	rs76672402	NP	c.312C>T	p.Phe104=	<0.01 (A)	synonymous	4/10	
E17-79	rs755559487	NP	c.384C>T	p.Ile128=	<0.01 (A)	synonymous	4/10	
E15-30, E15-47, E17-20, E17-79	rs11537641	NP	c.399C>T	p.Cys133=	0.14 (A)	synonymous	4/10	
E15-30, E15-47, E17-20, E17-79	rs2229682	NP	c.588G>A	p.Pro196=	0.12 (T)	synonymous	5/10	

NP: not performed; Seg: Segregation

E13-83 as the *de novo* status of the variants gives strong support for the pathogenic status if both maternity and paternity can be confirmed (8). Accordingly, iSNP analysis in both the trios of E11-169 and E13-83 resulted in 99.9% correlation for 11,385 and 16,015 iSNPs, respectively.

The *de novo* variant identified in E11-169 (NM_006516.3: c.680-1G>T; hg38: chr1:42,929,781C>A) is a novel splice region variant. At the same locus, another splice variant (CS057229; NM_006516.3: c.680-1G>C; hg38: chr1:42,929,781C>G) previously associated with GLUT1-DS, can be interpreted as new evidence in favor of the

novel variant identified herein (10). HSF analysis for both alterations (NM_006516.3: c.680-1G>T;C) revealed alteration of the wild type acceptor site, so it is possible that both variants are affecting splicing. The other novel and *de novo* variant in E13-83 is a single base deletion resulting in a frameshifting effect on translation (NM_006516.3:c.542delG; p.(Gly181Alafs*10); hg38:chr1:42,930,010delC). For both variations, protein truncation can be speculated, but it is likely that both alleles have a null effect possibly due to translation dependent nonsense-mediated decay. This effect well cor-

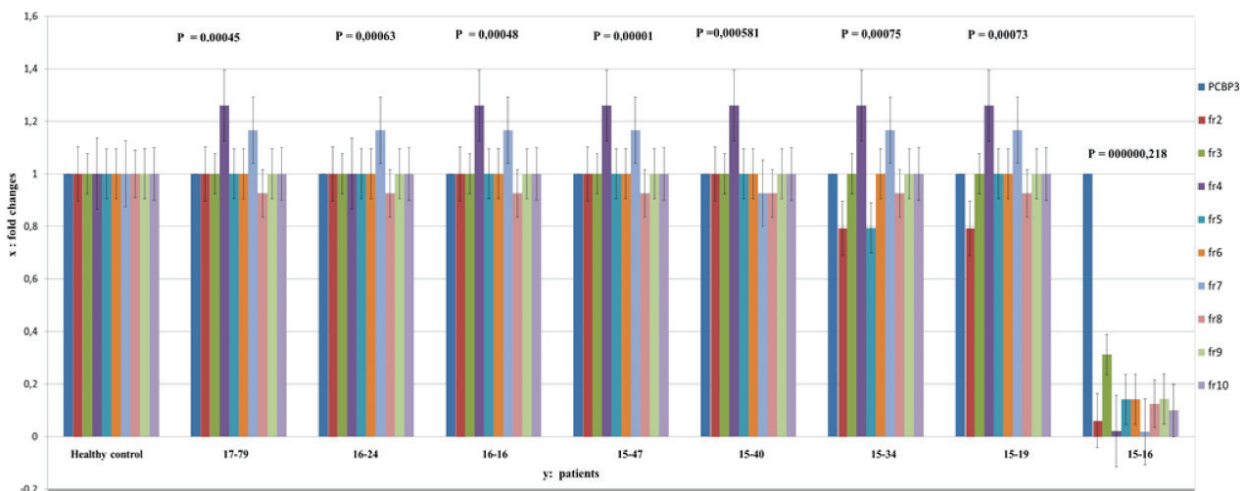


Figure 2: Graphical representation showing the comparison of the fold changes of each fragment for each patient. P values and fold changes were controlled three times. (x: fold changes y: patients SLC2A1: target gene, PCBP3: reference gene, control: a pool of six (three women-three men) unaffected individuals, fr: fragment).

relates with the haplo insufficiency of pathogenic variations in development of GLUT1-DS.

Interpretation of CNVs in *SLC2A1*

After identifying two novel pathogenic variations, 7 available patients out of 10 were analyzed for CNV events throughout the *SLC2A1* gene, using a real time qPCR approach. The result showed that only one patient (E15-16) was found to have a decreased CNV value in all *SLC2A1* fragments analyzed (Figure 2). The possible loss of the allele carrying the *SLC2A1* gene is again compatible with a null effect, which may result in GLUT1-DS phenotype through haplo insufficiency.

Interpretation of *SLC2A1* gene expression

SLC2A1 mRNA level analysis for E11-169 and her family showed reduced expression for the index patient compared to her parents. RT-qPCR measurements indicated statistically significant decrease in the *SLC2A1* gene expression compared to non-carrier healthy parents ($p=0,0002$). Triplicate mRNA measurements revealed a mean of 49% decrease in the transcript level for the affected patient (Figure 3). Possible mechanism for complete degradation of the mutated allele can be explained by non-sense mediated decay mechanism.

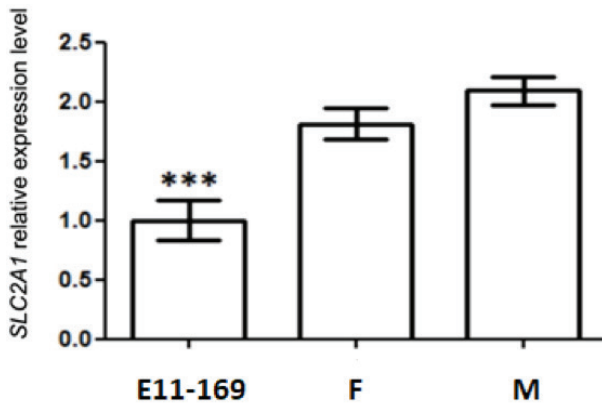


Figure 3: Triplicate mRNA measurements revealed a mean of 49% decrease in the transcript level for affected patient (E11-169) and her family (F: father, M: mother) ($p:0,0003657$).

DISCUSSION

In this study, we carried out screening of *SLC2A1* gene by means of Sanger sequencing and CNV analysis in order to detect novel variations associated with GLUT1-DS. This approach from clinics to genetics acts as a model facilitating the correct diagnosis of this disorder. Clinical diagnosis assisted with correct genetic diagnosis is the first step for the development of possible treatment options. In this case, patients diagnosed with GLUT1-DS can be good candidates for a ketogenic diet, optimal antiepileptic treatment and other supportive therapies (11).

In this study, we have identified 3 potentially pathogenic variants using Sanger sequencing and quantitative analysis of *SLC2A1* coding region. All these 3 variations (frameshift, splice region and gene copy loss) are loss of function alleles and accordingly they lead to null alleles and exert their effect on the GLUT1-DS phenotype through haploinsufficiency.

On the other hand, negative cases of *SLC2A1* may be due to another unknown genetic defect, reversible transient glucose transport disorder or even other unidentified causes such as infectious, traumatic, certain antiepileptic drugs (phenobarbital, valproate sodium) (12).

Increased blood glucose levels due to a variety of causes may also reduce CSF / blood glucose ratio and cause misdiagnosis. For example, as a result of the study conducted by Leen et al., only 41% of 132 people had a variation (13). By way of another example, in the study by Vuillaumier-Barrot et al., the atypical AHC case was associated with a false mutation in *SLC2A1*, indicating clinical overlap between the two pathologies (14).

Screening of other GLUT members (GLUT 2/3/4/5) associated with GLUT1 and / or functional regions of *SLC16A1*, *SLC16A3*, *SLC16A7* and *SLC16A8* genes in which MCT1, MCT2, MCT3 and MCT4 proteins are encoded may be suggested for further molecular testing for *SLC2A1* negative GLUT1DS cases.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine Ethics Committee.

Informed Consent: Written consent was obtained from the participants.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

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

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: This work was supported by the grant of Scientific Research Projects Coordination Unit of Istanbul University (Project No: TYL-2017-26212).

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulundan alınmıştır.

Bilgilendirilmiş Onam: Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

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

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.



Finansal Destek: Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi hibesi ile desteklenmiştir (Proje No: TYL-2017-26212).

REFERENCES

1. Feuk L, Carson AR, Schere SW. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet* 2006;7(2):85-97. [CrossRef]
2. Klepper J, Scheffer H, Elsaid MF, Kamsteeg EJ, Leferink M, Ben-Omran T. Autosomal Recessive Inheritance of GLUT1 Deficiency. *Neuropediatrics* 2009;40(5):207-10. [CrossRef]
3. Cappuccio G, Pinelli M, Alagia M, Donti T, Day-Salvatore DL, Veggioti P, De Giorgis V, et.al. Biochemical phenotyping unravels novel metabolic abnormalities and potential biomarkers associated with treatment of GLUT1 deficiency with ketogenic diet. *PLoS ONE* 2017;12(9):e0184022. [CrossRef]
4. Verrotti A, D'Egidio C, Agostinelli S, Gobbi G. Glut deficiency: when to suspect and how to diagnose? *Eur J Paediatr Neurol* 2012;16(1):3-9. [CrossRef]
5. Korbie DJ, Mattick JS. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Protoc* 2008;3(9):1452-6. [CrossRef]
6. Bustina S., Huggett J. qPCR primer design revisited. *Biomol Detect Quantif* 2017;(14):19-28. [CrossRef]
7. Sun K, Yuen YP, Wang H, Sun H. Online Diagnosis System: A webserver for analysis of Sanger sequencing-based genetic testing data. *Methods* 2014;(69):230-6. [CrossRef]
8. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Foster JG, et. al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17(5):405-24. [CrossRef]
9. Aylin Uğur S. Kopya Sayısı Değişikliklerinin SNP Array ile Tespiti. *Türkiye Klinikleri J Pediatr Sci* 2016;12(4):54-9.
10. Klepper J, Scheffer H, Leiendecker B, Gertsen E, Binder S, Leferink M, et. al. Seizure control and acceptance of the ketogenic diet in GLUT1 deficiency syndrome: a 2- to 5-year follow-up of 15 children enrolled prospectively. *Neuropediatrics* 2005;36:302-8. [CrossRef]
11. Klepper J, Leiendecker B. GLUT1 deficiency syndrome-2007 update. *Dev Med Child Neuro* 2007;49:707-16. [CrossRef]
12. Klepper J, De Vivo DC, Webb DW, Klinge L, Voit T. Reversible infantile hypoglycorrhachia: possible transient disturbance in glucose transport? *Pediatr Neurol* 2003;29(4):321-5. [CrossRef]
13. Leen WG, Klepper J, Verbeek MM, Leferink M, Hofste T, van Engelen BG, et al. Glucose transporter-1 deficiency syndrome: the expanding clinical and genetic spectrum of a treatable disorder. *Brain* 2010;133(Pt 3):655-70. [CrossRef]
14. Barrot VS, Panagiotakaki E, Bizec LC, El baba C, The ENRAhs for SME Consortium, Fontaine B, et. al. Absence of mutation in SLC2A1 Gene in a Cohort of Patients with Alternating Hemiplegia of Childhood (AHC). *Neuropediatrics* 2010;41:267-69. [CrossRef]

THE MEASUREMENT OF THE CHOROIDAL THICKNESS DURING ORAL GLUCOSE TOLERANCE TESTS IN PREDIABETIC SUBJECTS: A SPECTRAL DOMAIN OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY STUDY

PREDİYABETİK HASTALARDA YAPILAN ORAL GLİKOZ TOLERANS TESTİ ESNASINDA KOROİD KALINLIĞININ ÖLÇÜLMESİ: SPEKTRAL DOMAİN OPTİK KOHERENS TOMOGRAFİ ÇALIŞMASI

Eylem ÇAĞILTAY¹ , Muhammed ALTINIŞIK² , Sjaak POWWELS³ , Nur DEMİR⁴ , Fahrettin AKAY⁵ 

University of Medical Sciences, Sultan Abdulhamid Han Training and Research Hospital, ¹Department of Internal Medicine, Division Endocrinology and Metabolic Diseases, ⁴Department of Ophthalmology, Istanbul, Turkey

²Celal Bayar University, Faculty of Medicine, Department of Ophthalmology, Manisa, Turkey

³Haaglanden Medical Center, Department of Surgery, the Hague, Netherlands

⁵Katip Celebi University, Atatürk Training and Research Hospital, Department of Ophthalmology, Izmir, Turkey

ORCID IDs of the authors: E.Ç. 0000-0003-3901-4015; M.A. 0000-0003-0239-0180; S.P. 0000-0002-6390-7692; N.D. 0000-0003-4764-1131; F.A. 0000-0001-9679-9379

Cite this article as: Çağiltay E, Altinisik M, Pouwels S, Demir N, Akay F. The measurement of the choroidal thickness during oral glucose tolerance tests in prediabetic subjects: a spectral domain optical coherence tomography study. J Ist Faculty Med 2020;83(3):184-92. doi: 10.26650/IUITFD.2019.0095

ABSTRACT

Objective: The aim of this study is to investigate how acute hyperglycaemic changes affect the choroid in patients with prediabetes.

Material and Method: Each subject underwent a 75 g oral glucose tolerance test (OGTT) after overnight fasting. The measurement of choroidal thickness (ChT) was done with new generation spectral domain optical coherence tomography (SD-OCT).

Results: Fasting Plasma Glucose (FPG) levels of the patients with only isolated Impaired Fasting Glucose (IGT) patients are higher (all $p < 0.0001$). Mean insulin levels were also higher in patients with prediabetes than in healthy volunteers during the entire experiment (all $p < 0.0001$). Changes in ChT differed between the groups, a transient increase was observed in the mean ChT as well as subfoveal, nasal and temporal locations at the 500 μm distance to fovea in prediabetes individuals. While the subfoveal ChT difference was $1.52 \pm 4.11 \mu\text{m}$ (range, $-11.00/24.00 \mu\text{m}$) in prediabetes, $-0.22 \pm 1.74 \mu\text{m}$ (range $-2.00/8.00 \mu\text{m}$) in the control group at the first hour of the OGTT. A transient choroidal thickening occurred in the prediabetes group, while there was

ÖZET

Amaç: Akut hiperglisemik değişikliklerin prediyabetli hastalarda koroïdi nasıl etkilediğini araştırmak.

Gereç ve Yöntem: Hastalara en az 8 saat kalori alınmaması sonrası 75 g oral glukoz tolerans testi (OGTT) uygulandı. Koroïd kalınlığı (ChT), yeni nesil spektral domain optik koherens tomografi (SD-OCT) ile ölçüldü.

Bulgular: Koroïd kalınlığındaki değişiklikler gruplar arasında farklılık göstermiştir. Prediyabetli bireylerde, foveaya 500 μm mesafedeki subfoveal, nazal ve temporal lokasyonların yanı sıra ortalama ChT'de geçici bir artış gözlenmiştir. OGTT'nin ilk saatinde; prediyabetik grupta subfoveal koroïd kalınlığı farkı $1,52 \pm 4,11 \mu\text{m}$ (aralık, $-11,00/24,00 \mu\text{m}$) iken, kontrol grubunda subfoveal ChT farkı $-0,22 \pm 1,74 \mu\text{m}$ (aralık $-2,00/8,00 \mu\text{m}$) olarak ölçüldü.

Sonuç: Akut hiperglisemik değişikliklerin anlık ölçümlerle saptanması, hastalığın oküler yapılar üzerindeki etkisini daha iyi anlamamıza yardımcı olabilir.

Anahtar Kelimeler: Koroïd kalınlığı, oral glukoz tolerans testi, spektral domain optik koherens tomografi

Corresponding author/İletişim kurulacak yazar: eylem723@yahoo.com

Submitted/Başvuru: 29.11.2019 • **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 20.01.2020 •

Last Revision Received/Son Revizyon: 20.01.2020 • **Accepted/Kabul:** 30.01.2020 • **Published Online/Online Yayın:** 10.03.2020

©Telif Hakkı 2020 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2020 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

no change in the healthy volunteers.

Conclusion: Detecting acute hyperglycemic changes with instant measurements may help us to better understand the effect of the disease on ocular structures.

Keywords: Choroidal thickness, oral glucose tolerance test, spectral domain optical coherence tomography

INTRODUCTION

Diabetes mellitus (DM) is characterized by chronic hyperglycaemia and fluctuations in blood glucose levels (1). The current methods to identify DM include the fasting plasma glucose (FPG) level test, the 2 hours plasma glucose value after 75-g oral glucose tolerance test (OGTT) and glycosylated hemoglobin (HbA1c) level test. The previous stage of DM is prediabetes known as impaired glucose tolerance (IGT) or impaired fasting glucose (IFG), which indicate an increased risk for the future development of DM (2). IFG has identified as an FPG level of between 110 to 125 mg/dL and IGT identified as a 2 hours plasma glucose level of 140-200 mg/dL after 75 g oral glucose load (3).

Investigating how acute hyperglycaemic changes affect the choroid in patients with prediabetes may allow us to interpret physiological responses to metabolic changes in the eye.

Measuring choroidal thickness (ChT) *in vivo* has been enabled with new generation spectral domain optical coherence tomography (SD-OCT) devices. Many researchers have used the SD-OCT to investigate the pathologic and normal processes in the choroidal layer. It enables *in vivo* measurement of ChT and cross-sectional choroidal imaging. There are many studies investigating the role of the choroid in the pathogenesis of many ocular diseases such as degenerative myopia, age-related macular degeneration, central serous chorioretinopathy, diabetic retinopathy (DR), macular hole and retinitis pigmentosa (4-8).

Our hypothesis was that the response of the choroidal layer for hyperglycemia could be more dynamic and would differ between healthy individuals and prediabetic subjects. In this study, we aimed to investigate the effect of OGTT on ChT changes using OCT in prediabetics with no signs and symptoms of the ocular disease.

MATERIAL AND METHOD

This observational and prospective study was performed between April 2015 and August 2016 at the Ophthalmology Department of the Izmir Katip Celebi University Atatürk Training and Research Hospital. It was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki and approved by the institutional ethics committee ((GATA Ethics Committee 5.5.2015/8 (218)), and informed

consent was obtained from each patient. The OGTT group included 50 eyes of 50 patients with prediabetes whose FPG was 110 to 125 mg/dL and/or 2 h OGTT plasma glucose was 140-200 mg/dL, followed by the Endocrinology and Metabolism department. These patients underwent OGTT and were referred to the ophthalmology clinic before and during the OGTT for ophthalmological examinations. The control group included 50 eyes of 50 healthy age and sex-matched volunteers who were recruited from the healthy individuals visiting the outpatient clinic of ophthalmology. The control group received the same amount of glucose-free water. The control subjects did not have a diagnosis of any ocular or other systemic diseases. Only the right eyes of the participants were included in the study.

The inclusion criteria for both groups were: best-corrected visual acuity of at least 20/20, nonsmoking, no drug and alcohol abuse, no medication, less than 2 diopters (D) of cylindrical and/or 3 D of spherical refractive error, and without any glaucomatous findings such as glaucomatous optic disk changes, such as excavation, notching, or focal thinning of the neuroretinal rim, peripapillary hemorrhage and glaucomatous retinal nerve fiber layer loss. Exclusion criteria included any history of retinal diseases, intraocular pressure (IOP) readings higher than 21 mmHg, any systemic abnormalities (e.g., vascular disease, hypertension, or chronic inflammatory disease), history of previous intraocular surgery or laser therapy, smoking and poor image quality because of unstable fixation or cataract.

All patients and controls underwent complete ophthalmologic examinations, including visual acuity and refraction, slit-lamp biomicroscopy, applanation tonometry, axial length (AL) by ultrasonography (OcuScan; Alcon, TX, USA) and dilated funduscopy with a 90-D lens. Systolic and diastolic blood pressures were measured using a digital automatic device (Omron Healthcare Co., Ltd. Kyoto, Japan) after participants rested for at least 10 min. Blood pressure values of both groups were within the normal range (systolic <120 mm Hg, diastolic <80 mm Hg).

Each subject underwent an OGTT (75 g glucose) after overnight fasting. Blood glucose levels were measured with a blood glucose analyzer (HemoCue Diagnostics BV, Oisterwijk, the Netherlands). Endogenous insulin levels were measured by means of immunometric assays (Lu-

minescence, Bayer Diagnostics, Mijdrecht, Netherlands) in the Endocrinology Laboratory at the Department of Clinical Chemistry.

Body mass index (BMI) was calculated as $BMI = \text{weight (kg)} / \text{height (m)}^2$.

Spectral-domain optical coherence tomography scans

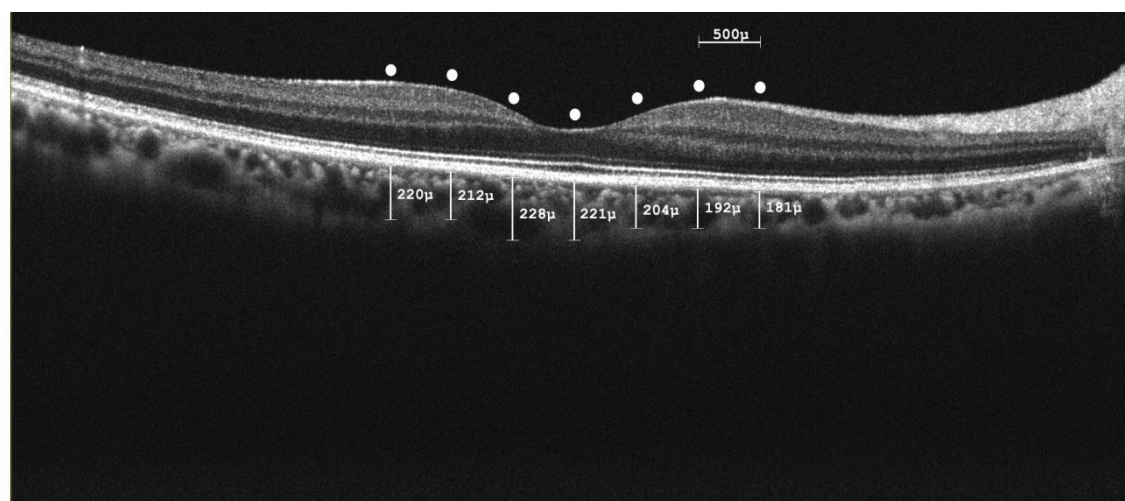
All participants were examined with SD-OCT (Nidek, RS-3000, Gamagori, Japan) after pupillary dilation with tropicamide 1% (Tropamid 1%; Bilim ilaç, İstanbul, Turkey). Three images were performed for each individual and the highest signal strength (at least 7) was enrolled. Macula Line Raster scan protocol was used to assess the ChT. The ChT was measured as the perpendicular distance between the hyperreflective outer border of the retinal pigment epithelium-Bruch's membrane and choroidal-scleral interface. Two experienced physicians (F.A and M.A) who were blinded to the diagnosis of the participants who underwent the OCT scans and ChT evaluations. The ChT was measured at 7 different points: at the subfovea; at 500 μm , 1000 μm , and 1500 μm temporal to the fovea; and at 500 μm , 1000 μm , and 1500 μm nasal to the fovea (Figure 1). The SD-OCT measurements were performed between 9:00 and 12:00 AM due to diurnal effect. The built-in follow-up feature was used to acquire scans at the same retinal position in subsequent imaging sessions.

Statistical analysis

All statistical data was analyzed using SPSS version 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Values were expressed as mean \pm standard deviation. The normality of the values was analyzed by using the Shapiro-Wilk test and baseline differences between groups were analysed using unpaired t-tests or Mann-Whitney U test according to distribution pattern. Categorical data was compared using the χ^2 -test or Fisher's exact test. The results of the OGTT were analysed by repeated measures analysis of variance test (rANOVA). Bonferroni adjustment for multiple testing was applied. Differences were accepted significant at $p < 0.05$. Correlations between the variables were analysed by Pearson or Spearman correlation coefficient.

RESULTS

A total of 50 prediabetic patients (31 male and 19 female) and 50 healthy subjects (26 male and 24 female) were enrolled in this study. The mean age of the prediabetic patients was 41.26 ± 6.49 years. There were no differences in sex, age, spherical equivalent (SE), IOP, BMI or AL between the two groups ($p > 0.05$). The mean HbA1c level was higher in prediabetic group as $5.98 \pm 0.33\%$ in the prediabetic group, $5.68 \pm 0.15\%$ in the healthy group ($p < 0.001$). The remaining demographic, along with clinical and ophthalmologic characteristics are summarized in Table 1.



Thickness Graph(RPE/BM - Manual)

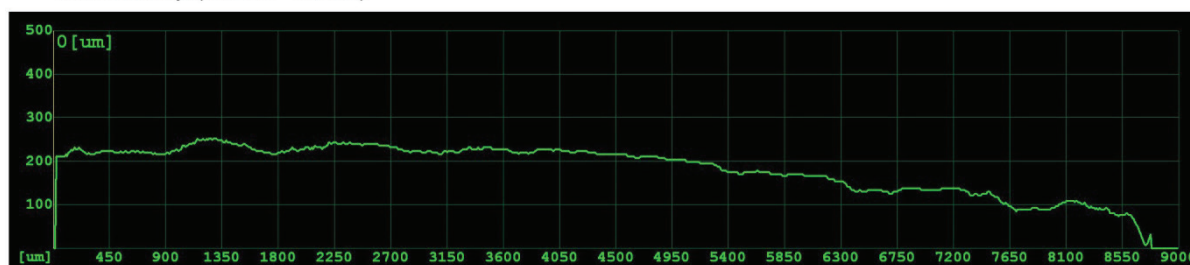


Figure 1: A sample of 7 different points measurement of ChT.

Fasting Plasma Glucose (FPG) levels of the patients with only isolated Impaired Fasting Glucose (IGT) patients are higher than non-diabetic patients (all $p < 0.0001$). In patients with prediabetes, mean PG increased from 114.38 ± 5.64 mg/dl to 187.94 ± 33.47 mg/dl at 60 min ($p < 0.001$) and to the 146.6 ± 44.53 mg/dl at 120 min (Table 2).

Mean insulin levels were also higher in patients with prediabetes than in healthy volunteers during the entire experiment (all $p < 0.0001$, Table 3).

Changes in ChT differed between the groups. There was a significant difference between repeated measures in prediabetes group, whereas no changes occurred in healthy volunteers. Post hoc tests showed that this significant difference was caused in the first hour of OGTT

measurement. So a transient increase was observed in the mean ChT as well as subfoveal, nasal and temporal locations at the 500 μm distance to fovea in prediabetes individuals. While subfoveal ChT difference was 1.52 ± 4.11 μm (range, $-11.00/24.00$ μm) in prediabetes, -0.22 ± 1.74 μm (range $-2.00/8.00$ μm) in the control group at the first hour of the OGTT.

The ChT at 1.500 μm nasal distance to fovea was significantly lower in prediabetic individuals at the beginning and after 2 hours from glucose loading. Table 4 summarizes ChT measurements during OGTT.

There was no correlation between basal ChT with both HbA1c and BMI in any groups.

Table 1: Demographic characteristics of the patients

	Prediabetic group (Mean \pm SD, min-max)	Healthy group (Mean \pm SD, min-max)	P
Age (years)	41.26 \pm 6.49 (30-50)	41.20 \pm 6.22	0.963
Sex (Male/female)	31/19 (62%/38%)	26/24 (52%/48%)	0.313
SE (D)	-0.41 \pm 0.79 (-2.00/1.00)	-0.25 \pm 1.14 (-2.50/2.25)	0.417
IOP (mmHg)	14.94 \pm 2.82 (10-25)	14.82 \pm 2.26 (11-19)	0.815
AL (mm)	23.30 \pm 0.56 (22.0-24.5)	23.10 \pm 0.52 (22.0-24.5)	0.06
HbA1c (%)	5.98 \pm 0.33 (5.50-6.90)	5.18 \pm 0.46 (4.10-5.70)	<0.001
BMI (kg/m ²)	26.32 \pm 1.34 (23.65-29.10)	25.94 \pm 1.31 (23.70-29.10)	0.149

SE: Spherical equivalent, IOP: Intraocular pressure, AL: Axial length, BMI: Body mass index, SD: Standard deviation, p: Statistical significance

Table 2: PG levels during OGTT

PG levels	Prediabetes (mg/dl)	p (within group)	Healthy volunteers (mg/dl)	p (within group)	p (between groups)
Basal	114.38 \pm 5.64		83.98 \pm 9.65		<0.001
1 hour after glucose loading	187.94 \pm 33.47	<0.001	147.46 \pm 28.54	<0.001	<0.001
2 hour after glucose loading	146.6 \pm 44.53		96.45 \pm 23.54		<0.001

OGTT: Oral glucose tolerance test, PG: Plasma glucose

Table 3: Insulin levels during OGTT

Insulin levels	Prediabetes patients ($\mu\text{U/mL}$)	P (within group)	Healthy volunteers ($\mu\text{U/mL}$)	p (within group)	p (between groups)
Basal	14.5 \pm 8.55		11.32 \pm 3.46		<0.001
1 hour after glucose loading	100.14 \pm 42.61	<0.001	73.56 \pm 26.45	<0.001	<0.001
2 hour after glucose loading	76 \pm 53.01		41.56 \pm 15.65		<0.001

OGTT: Oral glucose tolerance test

Table 4: ChT measurements during OGTT

ChT Measurements	Prediabetes patients (µm)	P (within group)	Healthy volunteers (µm)	p (within group)	p (between groups)
Average 0	260.81±29.71		264.18±27.01		0.555
Average 1	262.25±29.98	0.022	263.97±26.95	0.094	0.764
Average 2	261.14±29.22		264.58±26.45		0.538
Subfoveal 0	267.46±29.004		271.04±27.939		0.531
Subfoveal 1	268.98±30.15	0.021	270.82±28.31	0.685	0.754
Subfoveal 2	267.82±28.872		270.98±27.27		0.575
Nazal 500 µm 0	262.04±30.15		265.96±27.7		0.5
Nazal 500 µm 1	264.1±30.3	0.001	265.64±27.47	0.69	0.791
Nazal 500 µm 2	263.5±29.78		266±27.3		0.663
Nazal 1000 µm 0	250.8±29.73		257.7±26.63		0.225
Nazal 1000 µm 1	252.66±29.24	0.104	257.62±26.2	0.527	0.374
Nazal 1000 µm 2	251.68±28.26		258.12±26.65		0.244
Nazal 1500 µm 0	235.26±33.01		247.46±26.9		0.045
Nazal 1500 µm 1	236.36±32.53	0.242	247.38±26.87	0.251	0.068
Nazal 1500 µm 2	235.76±31.32		249.64±28.63		0.023
Temporal 500 µm 0	270.76±30.63		270.6±29.1		0.979
Temporal 500 µm 1	272.68±30.69	0.018	270.4±29.27	0.228	0.705
Temporal 500 µm 2	270.66±30.08		270.7±28.76		0.995
Temporal 1000 µm 0	271.24±32.24		270.54±29.32		0.91
Temporal 1000 µm 1	272.32±32.15	0.276	270.34±29.27	0.427	0.748
Temporal 1000 µm 2	271.34±31.64		270.6±28.83		0.903
Temporal 1500 µm 0	268.16±32.72		265.9±28.93		0.715
Temporal 1500 µm 1	268.62±33.06	0.205	265.64±28.77	0.26	0.632
Temporal 1500 µm 2	267.16±32.19		266±28.37		0.849

Results are expressed as mean±SD. 0: Before glucose loading 1: One hour after glucose loading 2: Two hour after glucose loading

DISCUSSION

Hyperglycemia is a condition that has various effects on the organism as well as on the eye. There have been some debates about hyperglycemia that need to be clarified. In this regard some questions such as the difference between acute or chronic effect of hyperglycemia, the levels at which begins to damage the eye, the earliest affected tissue in the eye, correlation between hyperglycemia exposure time and its effect, retinal neurodegeneration is a primary and independent change or, instead, a consequence of retinal vascular impairment, how retinal and choroidal blood flow were affected have been investigated (9).

Some models have been used to study the various forms of hyperglycemia. To evaluate the acute hyperglycemic episodes, OGTT or a glucose clamp attachment; or to in-

vestigate the 3-months hyperglycemic condition, HbA1c levels have been widely used (10). While it was suggested that an OGTT may provide a more similar approach to daily metabolism we used this method in this study (11).

In the present study, in the cases of healthy individuals and prediabetes, the choroidal response was evaluated in an OGTT-induced acute hyperglycemic episode. A transient choroidal thickening occurred in the prediabetes group, while there was no change in the healthy volunteers.

Changes in ChT after an acute hyperglycemic episode has only been investigated in one study to the best of our knowledge (12). Klefter et al. reported reduced ChT of healthy subjects without significant changes in DM patients contrary to our results. They claimed that this finding was probably due to a transient reduction in chori-

dal blood flow in healthy individuals. However, they did not analyze insulin levels and the number of the participants enrolled in the study was relatively small. In addition diabetic patients were included in that study unlike prediabetes patients in our study. In the present study we suggest that the ChT may temporarily increase in prediabetes patients unlike in healthy individuals, probably due to the fact that both insulin and glucose levels increase more than the control group. In this regard we would like to discuss the acute, subacute and chronic effect of hyperglycaemia on the choroid in this study.

DM - in addition to chronic hyperglycaemia - is a chronic disease characterized by fluctuations in glucose levels (1). For that reason, detecting acute hyperglycemic changes with instant measurements may help us to better understand the effect of the disease on ocular structures.

As a matter of fact to understand the effects of acute hyperglycaemia on the eye, systemic metabolic changes should be analyzed. There is an increase in insulin levels and glucose levels and plasma osmolality after glucose uptake via OGTT.

Two opposite hemodynamic effects of insulin have been reported: sympathetic vasoconstriction and vasodilation with direct effect *via* adenosine and endothelial nitric oxide (13, 14). In a previous study, it was shown that mild hyperinsulinemia induces an effect on pulsatile choroidal blood flow partially mediated by nitric oxide (15). Polak et al. have found increased pulsatile choroidal blood flow whereas retinal blood flow was not significantly changed (16). The different effects of insulin on the choroidal and retinal circulation attributed to the differences in sympathetic innervation in the retina and choroid that the retinal vessels do not have sympathetic innervation (17). Compatible with these findings insulin levels were higher in prediabetes patients in our study and this may contribute to the choroidal thickening.

However it was reported that glucose has potent vasodilator properties (18). Studies have not found any changes in retinal structure during acute hyperglycaemia (19, 20) but there is an agreement about the issue that acute hyperglycaemia increased retinal oxygen extraction (12, 21) and retinal arterial oxygen saturation (12, 22-24). Concomitantly, studies in this area have shown that hyperglycemia either increases (25, 26) or at least does not alter (27-29) retinal blood flow. Considering all these factors, glucose may also increase the ChT in the present study. On the other hand, whether the changes depend only on the increase in insulin levels or are caused by hyperglycemia is not clear. Hence somatostatin was given before OGTT and the insulin levels were suppressed and normoinsulinemic hyperglycemia was provided in some studies (20).

Furthermore it was suggested that serum osmolality may be positively correlated with ChT (30, 31). Depending on the increase in osmolality; ocular hypotension, lens thickening, shallowing of the anterior chamber and a myopic shift in refractive index have been reported (32). There is no quantitative data associated with osmolality as a deficiency in our work, but this may be another factor that increases ChT.

Since the choroid receives 95% of all ocular blood flow and is the only blood supply of avascular fovea, choroid has been a possible target for vascular-related studies in diabetic patients and was identified an entity - diabetic choroidopathy which was associated with increased vascular tortuosity, microaneurysms, nonperfusion areas, either vascular dilations or narrowing in the choroid (33-35) But the relationship between the natural course of DR and diabetic choroidopathy is still unclear. There are current studies trying to find answers to the question of if there is any predictive value in choroidal changes before developing DR.

The studies reported conflicting results. The majority of the authors reported choroidal thinning in diabetic patients without DR (9, 36-39). They postulated that choroidal thinning may be the earliest sign in the diabetic patients with no clinical DR and suggested that microvascular changes might occur earlier than structural changes in DM. Some OCT angiography studies supported this finding that vessel density already decreased in patients with DM before the clinical signs of DR occur (40, 41). Authors attributed the choroidal thinning to choriocapillaris dropout caused by hyperglycemia and hypoinsulinemia (42, 43). Regarding this Nagaoka et al. demonstrated decreased choroidal blood flow in diabetic patients, even before visible DR was present (8).

In contrast to these findings choroidal thickening was also reported in DM patients with no DR (38, 44). It was attributed to choroidal vasodilation and increase of blood flow by increased vascular endothelial growth factor (45).

The studies performed after retinopathy had developed are also controversial. In a recent study of Horváth et al. with swept source OCT, ChT was thinner in cases with more advanced DR (46). Controversially ChT increased in eyes with severe NPDR and PDR in another study (47). It has also been reported that there is no relationship between the duration of DM and ChT (48).

The possible cause of these conflicting results may be the involvement of heterogeneous and relatively small samples in the studies. A recent study provided an idea of these contradictory outcomes, Ferreira et al. reported that mean ChT increased in the first 77 months of DM, then decreased until 150 months, after which, it tended to be stabilized (38). They postulated there may be three

phases of choroid during DM, early choroidal thickening, choroidal thinning -due to atrophy- and vascular stabilization phases where resistance and remodeling of vessels were seen.

One other reason for the conflicting results could be the number of the scoring physicians. At least two scorers must rate the results.

There was no correlation between HbA1c and ChT in our study, in agreement with other studies (38). No change in ChT values with different HbA1c levels may be related to an increase in resistance index in diabetic patients developed during the chronic period (49).

Our study had some limitations. ChT measurements were done manually. However, this manual technique already showed a high intraobserver and interobserver reproducibility (50). The values for *intraclass correlation* coefficient (ICC) between raters as well as the mean inter-observer difference should have been provided.

Also, the magnitude of the choroidal increase is relatively small. Variability in ChT measurements can arise from factors related to the observer, image quality or exact location of the measurement.

There is a much larger dispersion in the prediabetic group than in the control group as expressed by SD and min-max values. This finding could be due to clinicians diagnosing prediabetes which should be treated; emphasizing life style changes effect on the patient and the patients perception and motivation, adopting these changes which is a crucial point at the management of type two diabetes. The time between the start of the life style changes and OGTT could also be a determining factor.

This study may give an opinion that hyperglycemia and/or hyperinsulinemia can cause different effects in the acute or chronic process in the choroid and it may have a predictive value about DR progression. Future studies were needed to clarify the exact mechanism between hyperglycemia and ocular structures as well as choroid.

Ethics Committee Approval: This study was approved by the GATA Ethics Committee (5.5.2015/8 (218)).

Informed Consent: Written consent was obtained from the participants.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study- E.C., M.A., N.D., F.A.; Data Acquisition- E.C., F.A.; Data Analysis/Interpretation- E.C., M.A., S.P., N.D., F.A.; Drafting Manuscript- E.C., M.A., S.P., N.D., F.A.; Critical Revision of Manuscript- E.C., M.A., S.P.,

N.D., F.A.; Final Approval and Accountability- E.C., M.A., S.P., N.D., F.A.; Technical or Material Support- M.A., N.D., F.A.; Supervision- E.C., M.A., S.P., F.A.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: Authors declared no financial support.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı GATA Etik Kurulu'ndan alınmıştır (5.5.2015/8 (218)).

Bilgilendirilmiş Onam: Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- E.C., M.A., N.D., F.A.; Veri Toplama- E.C., F.A.; Veri Analizi/Yorumlama- E.C., M.A., S.P., N.D., F.A.; Yazı Taslağı- E.C., M.A., S.P., N.D., F.A.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- E.C., M.A., S.P., N.D., F.A.; Son Onay ve Sorumluluk- E.C., M.A., S.P., N.D., F.A.; Malzeme ve Teknik Destek- M.A., N.D., F.A.; Süpervizyon- E.C., M.A., S.P., F.A.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

REFERENCES

1. Smith-Palmer J, Brandle M, Trevisan R, Orsini FM, Liabat S, Valentine W. Assessment of the association between glycemic variability and diabetes related complications in type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2014;105:27384. [CrossRef]
2. Abdul-Ghani M, Defronzo RA, Jayyousi A. Prediabetes and risk of diabetes and associated complications: Impaired fasting glucose versus impaired glucose tolerance: does it matter? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2016;19:394-9. [CrossRef]
3. World Health Organization. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia: report of a WHO/IDF consultation. Geneva: World Health Organization, 2006:1-50.
4. Fujiwara T, Imamura Y, Margolis R, et al. Enhanced depth imaging optical coherence tomography of the choroid in highly myopic eyes. *Am J Ophthalmol* 2009;148:445-50. [CrossRef]
5. Zeng J, Li J, Liu R, et al. ChT in both eyes of patients with unilateral idiopathic macular hole. *Ophthalmology* 2012; 119:2328-33. [CrossRef]
6. Dhoot DS, Huo S, Yuan A, et al. Evaluation of ChT in retinitis pigmentosa using enhanced depth imaging optical coherence tomography. *Br J Ophthalmol* 2013; 97:66-9. [CrossRef]
7. Kim SW, Oh J, Kwon SS, et al. Comparison of ChT among patients with healthy eyes, early age-related maculopathy, neovascular age-related macular degeneration, central serous chorioretinopathy, and polypoidal choroidal vasculopathy. *Retina* 2011;31:1904-11. [CrossRef]
8. Nagaoka T, Kitaya N, Sugawara R, et al. Alteration of choroidal circulation in the foveal region in patients with type 2 diabetes. *Br J Ophthalmol* 2004;88:1060-3. [CrossRef]

9. Chen Q, Fan T, Wu Y, et al. Characteristics of Retinal Structural and Microvascular Alterations in Early Type 2 Diabetic Patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2018;59:2110-8. [\[CrossRef\]](#)
10. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol Metab* 1979;237(3):214-23. [\[CrossRef\]](#)
11. Cersosimo E, Solis-Herrera C, Trautmann ME, Malloy J, Triplitt CL. Assessment of pancreatic beta-cell function: review of methods and clinical applications. *Curr Diabetes Rev* 2014;10:2-42. [\[CrossRef\]](#)
12. Klefter ON, Vilsboll T, Knop FK, et al. Retinal vascular and structural dynamics during acute hyperglycaemia. *Acta Ophthalmol* 2015;93:697-705. [\[CrossRef\]](#)
13. Anderson EA, Hoffman RP, Balon TW, Sinkey CA, Mark AL. Hyperinsulinemia produces both sympathetic neural activation and vasodilation in normal humans. *J Clin Invest* 1991;87:2246-52. [\[CrossRef\]](#)
14. Su EN, Yu DY, Alder VA, Cringle SJ, Yu PK. Direct vasodilatory effect of insulin on isolated retinal arterioles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:2634-44.
15. Schmetterer L, Muller M, Fasching P, et al. Renal and ocular hemodynamic effects of insulin. *Diabetes* 1997;46:1868-74. [\[CrossRef\]](#)
16. Polak K, Dallinger S, Polska E, et al. Effects of insulin on retinal and pulsatile choroidal blood flow in humans. *Arch Ophthalmol* 2000;118:55-9. [\[CrossRef\]](#)
17. Laties AM. Central retinal artery innervation: absence of adrenergic innervation to the intraocular branches. *Arch Ophthalmol* 1967;77:405-409. [\[CrossRef\]](#)
18. Bursell SE, Clermont AC, Kinsley BT, Simonson DC, Aiello LM, Wolpert HA. Retinal blood flow changes in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and no diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:886-97.
19. Jeppesen P, Knudsen ST, Poulsen PL, Mogensen CE, Schmitz, Bek T. Response of retinal arteriole diameter to increased blood pressure during acute hyperglycaemia. *Acta Ophthalmol Scand* 2007;85:280-6. [\[CrossRef\]](#)
20. Wiemer NGM, Eekhoff EMW, Simsek S, et al. The effect of acute hyperglycemia on retinal thickness and ocular refraction in healthy subjects. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008;246(5):703-8. [\[CrossRef\]](#)
21. Tiedeman JS, Kirk SE, Srinivas S, Beach JM. Retinal oxygen consumption during hyperglycemia in patients with diabetes without retinopathy. *Ophthalmology* 1998;105:31-36. [\[CrossRef\]](#)
22. Hardarson SH, Stefansson E. Retinal oxygen saturation is altered in diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 2012;96:560-3. [\[CrossRef\]](#)
23. Khoobehi B, Firn K, Thompson H, Reinoso M, Beach J. Retinal arterial and venous oxygen saturation is altered in diabetic patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54:7103-6. [\[CrossRef\]](#)
24. Jorgensen CM, Hardarson SH, Bek T. The oxygen saturation in retinal vessels from diabetic patients depends on the severity and type of vision-threatening retinopathy. *Acta Ophthalmol* 2014;92:34-9. [\[CrossRef\]](#)
25. Garhofer G, Kopf A, Polska E et al. Influence of exercise induced hyperlactatemia on retinal blood flow during normo- and hyperglycemia. *Curr Eye Res* 2004;28:351-8. [\[CrossRef\]](#)
26. Kida T, Harino S, Sugiyama T, Kitanishi K, Iwahashi Y, Ikeda T. Change in retinal arterial blood flow in the contralateral eye of retinal vein occlusion during glucose tolerance test. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2002;240(5):342-7. [\[CrossRef\]](#)
27. Gilmore ED, Hudson C, Nrusimhadevara RK, et al. Retinal arteriolar hemodynamic response to an acute hyperglycemic provocation in early and sight-threatening diabetic retinopathy. *Microvasc Res* 2007;73(3):191-7. [\[CrossRef\]](#)
28. Fallon TJ, Maxwell DL, Kohner EM. Autoregulation of retinal blood flow in diabetic retinopathy measured by the blue-light entoptic technique. *Ophthalmology* 1987;94:1410-5. [\[CrossRef\]](#)
29. Sullivan PM, Parfitt VJ, Jagoe R, Newsom R, Kohner EM. Effect of meal on retinal blood flow in IDDM patients. *Diabetes Care* 1991;14:756-8. [\[CrossRef\]](#)
30. Elbay A, Altinisik M, Dinciyildiz A, et al. Are the effects of hemodialysis on ocular parameters similar during and after a hemodialysis session? *Arq Bras Oftalmol* 2017;80:290-5. [\[CrossRef\]](#)
31. Chang IB, Lee JH, Kim JS. Changes in ChT in and Outside the Macula After Hemodialysis in Patients With End-Stage Renal Disease. *Retina* 2017;37:896-5. [\[CrossRef\]](#)
32. Furushima M, Imaizumi M, Nakatsuka K. Changes in Refraction Caused by Induction of Acute Hyperglycemia in Healthy Volunteers. *Jpn J Ophthalmol* 1999;43(5):398-403. [\[CrossRef\]](#)
33. Shiragami C, Shiraga F, Matsuo T, et al. Risk factors for diabetic choroidopathy in patients with diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2002;240:436-42. [\[CrossRef\]](#)
34. Sezer T, Altinisik M, Koytak IA, Ozdemir MH. The Choroid and Optical Coherence Tomography. *Turk J Ophthalmol* 2016;46(1):30-7. [\[CrossRef\]](#)
35. Hidayat AA, Fine BS. Diabetic choroidopathy, light and electron microscopic observations of seven cases. *Ophthalmology* 1985;92:512-22. [\[CrossRef\]](#)
36. Esmaelpour M, Považay B, Hermann B, et al. Mapping choroidal and retinal thickness variation in type 2 diabetes using three-dimensional 1060-nm optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:5311-6. [\[CrossRef\]](#)
37. Vujosevic S, Martini F, Cavarzeran F, et al. Macular and peripapillary ChT in diabetic patients. *Retina* 2012;32:1781-90. [\[CrossRef\]](#)
38. Tavares Ferreira J, Alves M, Dias-Santos A, et al. Retinal neurodegeneration in diabetic patients without diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016;57:6455-60. [\[CrossRef\]](#)
39. Pierro L, Iuliano L, Cicinelli MV, Casalino G, Bandello F. Retinal neurovascular changes appear earlier in type 2 diabetic patients. *Eur J Ophthalmol* 2017;27:346-51. [\[CrossRef\]](#)
40. Di G, Weihong Y, Xiao Z, et al. A morphological study of the foveal avascular zone in patients with diabetes mellitus using optical coherence tomography angiography. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2016;254:873-9. [\[CrossRef\]](#)
41. Takase N, Nozaki M, Kato A, Ozeki H, Yoshida M, Ogura Y. Enlargement of foveal avascular zone in diabetic eyes evaluated by en face optical coherence tomography angiography. *Retina* 2015;35:2377-83. [\[CrossRef\]](#)

42. Regatieri CV, Branchini L, Carmody J, Fujimoto JG, Duker JS. ChT in patients with diabetic retinopathy analyzed by spectral-domain optical coherence tomography. *Retina* 2012;32:563-8. [\[CrossRef\]](#)
43. Querques G, Lattanzio R, Querques L, et al. Enhanced depth imaging optical coherence tomography in type 2 diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53:6017-24. [\[CrossRef\]](#)
44. Xu J, Xu L, Du KF, et al. Subfoveal ChT in diabetes and diabetic retinopathy. *Ophthalmology* 2013;120:2023-8. [\[CrossRef\]](#)
45. Savage HI, Hendrix JW, Peterson DC, Young H, Wilkinson CP. Differences in pulsatile ocular blood flow among three classifications of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:4504-9. [\[CrossRef\]](#)
46. Horváth H, Kovács I, Sándor GL, Czakó C, Mallár K, Récsán Z, et al. Choroidal thickness changes in non-treated eyes of patients with diabetes: swept-source optical coherence tomography study. *Acta Diabetologica* 2018;55:927-34. [\[CrossRef\]](#)
47. Kim JT, Lee DH, Joe SG, Kim JG, Yoon YH. Changes in ChT in relation to the severity of retinopathy and macular edema in type 2 diabetic patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54:3378-84. [\[CrossRef\]](#)
48. Yulek F, Ugurlu N, Onal ED, et al. Choroidal changes and duration of diabetes. *Semin Ophthalmol* 2014;29:80-4. [\[CrossRef\]](#)
49. Kawagishi T, Nishizawa Y, Emoto M, et al. Impaired retinal artery blood flow in IDDM patients before clinical manifestations of diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 1995;18:1544-9. [\[CrossRef\]](#)
50. Shao L, Xu L, Chen CX, et al. Reproducibility of subfoveal ChT measurements with enhanced depth imaging by spectral-domain optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54:230-3. [\[CrossRef\]](#)

SURGICALLY INDUCED ASTIGMATISM AFTER UPPER EYELID SURGERY IN ADULT PATIENTS

YETİŞKİN HASTALARDAKİ ÜST KAPAK CERRAHİSİ SONRASI CERRAHİYE BAĞLI ASTİGMATİZMA

Emre ALTINKURT¹ , Nihan AKSU CEYLAN¹ 

¹Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Department of Ophthalmology, Istanbul, Turkey

ORCID IDs of the authors: E.A. 0000-0001-7967-825X, N.A.C. 0000-0003-3724-7659

Cite this article as: Altinkurt E, Aksu Ceylan N. Surgically induced astigmatism after upper eyelid surgery in adult patients. J Ist Faculty Med 2020;83(3):193-6. doi: 10.26650/IUITFD.2019.0101

ABSTRACT

Objective: Surgical repositioning of the eyelids may change astigmatism. The change in astigmatism may affect the results of previous refractive procedures.

Material and Method: Twenty-eight eyes of 18 patients were included in the study. Interpalpebral fissure height (IPF), margin reflex distance 1 and 2 (MRD 1-2), and levator function (LF) were recorded in all patients preoperatively and at the postoperative third month. Keratometric values were measured by Scheimpflug corneal topography. Surgically induced astigmatism values due to upper eyelid surgery were calculated using a vectorial analysis program.

Results: The mean age of the patients was 45.46±18.8 years. Blepharoplasty was performed in 11 eyes with dermatochalasis. Levator resection was performed in nine of 11 eyes with ptosis, and frontalis suspension was performed in the remaining two eyes with ptosis. Blepharoplasty with levator resection was performed in six eyes where ptosis coexists with dermatochalasis. There was no significant difference between preoperative and postoperative keratometric and LF values. However, there was a significant increase in IPF and MRD 1 values. Mean surgically induced astigmatism was 0.54±0.22 D.

Conclusion: Upper eyelid surgery can induce astigmatism. Therefore, it might be better to perform upper eyelid surgery before refractive procedures.

Keywords: Astigmatism, eyelids, surgery

ÖZET

Amaç: Göz kapaklarının cerrahi olarak yeniden konumlandırılması astigmatizmayı değiştirebilir. Astigmatizmadaki değişim önceki refraktif prosedürlerinin sonuçlarını etkileyebilir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya 18 hastanın 28 gözü dahil edildi. Preoperatif ve postoperatif üçüncü ayda interpalpebral fissür yüksekliği (IPF), marjin refleksi mesafesi 1 ve 2 (MRD 1-2) ve levator fonksiyonu (LF) kaydedildi. Keratometrik değerler Scheimpflug kornea topografisi ile ölçüldü. Üst göz kapağı ameliyatı nedeniyle cerrahi olarak indüklenen astigmatizma değerleri vektörel analiz programı kullanılarak hesaplandı.

Bulgular: Hastaların yaş ortalaması 45,46±18,8 idi. Dermatoşalazisli 11 göze blefaroplasti yapıldı. Pitozu olan 11 gözün dokuzuna levator rezeksiyonu, ikisine frontal asma uygulandı. Pitoz ve dermatoşalazisli altı göze levator rezeksiyonu ile birlikte blefaroplasti yapıldı. Preoperatif ve postoperatif keratometri ve LF değerleri arasında anlamlı fark yoktu. Ancak, IPF ve MRD 1 değerlerinde anlamlı bir artış vardı. Cerrahi olarak indüklenen astigmatizma değeri ortalaması 0,54±0,22 D idi.

Sonuç: Üst göz kapağı ameliyatı astigmatizmayı indükleyebilir. Bu nedenle, üst göz kapağı ameliyatının refraktif işlemlerden önce yapılması daha iyi olabilir.

Anahtar Kelimeler: Astigmatizm, cerrahi, göz kapakları

Corresponding author/İletişim kurulacak yazar: altinkurtemre@gmail.com

Submitted/Başvuru: 16.12.2019 • **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 27.12.2020 •

Last Revision Received/Son Revizyon: 11.03.2020 • **Accepted/Kabul:** 20.04.2020 • **Published Online/Online Yayın:** 24.06.2020

©Telif Hakkı 2020 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2020 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

INTRODUCTION

Surgical repositioning of the eyelids increases the pressure vectors on the cornea, and this may change astigmatism in with-the-rule direction (1,2). It has been reported that the upper eyelid gold weight implantation resulting in 1.4 ± 2.0 diopters increases in corneal astigmatism in the vertical axis caused by compression of the upper eyelid (3). Knowing that a change in astigmatism will occur after eyelid surgery in patients with ptosis and dermatochalasis is important. If a patient with upper eyelid pathology undergoes refractive surgery, the change in astigmatism after eyelid surgery may affect results of the refractive surgery. Since surgically induced astigmatism may be significant, surgeons may wish to postpone any refractive surgery until after upper eyelid surgery is performed. For these reasons, surgically induced astigmatism after upper eyelid surgery in adult patients was examined in this study.

METHODS

After approval from the Institutional Ethics Committee of the Istanbul Faculty of Medicine, informed consents were obtained from patients to participate in the study in accordance with the Declaration of Helsinki. The records of 53 patients older than 18 who were treated for ptosis and/or dermatochalasis between January 2013 and July 2016 were retrospectively reviewed. Among 18 patients, 28 eyes were examined by corneal topography pre- and postoperatively. If measurement quality was appropriate and the follow-up period was at least three months, they were included in the study. Patients with dry eye, irregular astigmatism and keratoconus were excluded from the study. Best corrected visual acuity, intraocular pressure, and dilated fundus examinations were performed preoperatively and on the third month postoperatively. The presence of dermatochalasis, the amount of ptosis, interpalpebral fissure height (IPF), LF, and margin reflex distance (MRD) 1 and 2 were recorded in all patients. IPF was determined by measuring the distance between the upper and lower lids with a ruler from the pupil level, and LF was assessed by applying pressure on the eyebrow with a finger and making the patient look up and down. The distance between the light reflex obtained from the pupil center and edge of the upper lid was considered to be MRD-1, and the distance between the light reflex obtained from the pupil center and edge of the lower lid was considered to be MRD-2. Preoperative corneal topography of the patients was obtained by an experienced technician under scotopic conditions with a Pentacam® HR (OCULUS Inc., Wetzlar, Germany) without pupillary dilatation, and measurements were repeated at the third postoperative month. The keratometry values obtained from corneal topography were calculated and obtained by Eğrilmez and Dalkılıç's vectorial analysis program pre-

pared for astigmatism analysis, and surgically induced astigmatism values due to eyelid surgery (4,5).

The surgical treatment was chosen according to LFs and the presence of dermatochalasis. Frontalis suspension was performed in eyes with a LF less than 5 mm, and levator resection was performed in eyes with a LF more than 5 mm. An upper eyelid blepharoplasty was performed in the presence of dermatochalasis. When ptosis was found with dermatochalasis, levator resection was added to surgery. Frontalis suspension surgery was performed using the Fox pentagon technique while using a frontalis suspension set with a silicone tube (Beaver-Visitec International, Inc., Waltham, MA, USA) (6).

Levator resection was performed by making a horizontal cutaneous and subcutaneous incision at the upper eyelid fold or 8–10 mm from edge of the eyelid, opening the orbital septum and reaching the levator aponeurosis under the preaponeurotic fat tissue. The Levator resection was performed according to the degree of ptosis. The lid position was then evaluated and sutured by passing through the double-needle 6.0 Vicryl suture from the tars and levator aponeurosis.

After determining the amount of skin to be excised using the "pinch" technique, upper eyelid blepharoplasty was performed by removing the skin and preseptal orbicularis muscle after incision from the upper eyelid fold or 8–10 mm from the lid edge, opening the orbital septum and excising the fat packets (7). In patients who had levator surgery added to blepharoplasty, the levator resection was also performed as described above.

The Mann-Whitney-U test and IBM SPSS Statistics for Windows (Version 21.0. Armonk, NY:IBM Corp.) were used for statistical analysis of the data. $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Included in the study were results comprised of 28 eyes from 18 patients with a mean age of 45.46 ± 18.8 . Ten of the patients (55.6%) were male, and eight (44.4%) were female.

Blepharoplasty was performed in 11 eyes with dermatochalasis. Levator resection was performed in nine of 11 eyes with ptosis, and frontalis suspension was performed in the remaining two eyes. Blepharoplasty with levator repair was performed in six eyes with ptosis and dermatochalasis.

There was no significant difference between preoperative and postoperative keratometric (K1 and K2) values and LF values (Table 1). However, there was a significant increase in IPF and MRD 1 values (Table 1).

Mean surgically induced astigmatism was 0.54 ± 0.22 D.

Table 1: Comparison of preoperative and postoperative measurements

	Preoperative	Postoperative	P value*
K1 (Diopter)	42.76±1.11	42.81±1.21	0.385
K2 (Diopter)	44.21±1.08	44.71±1.23	0.256
Interpalpebral fissure height (mm)	6.67±1.83	9.2±1.61	0.006
Levator function (mm)	12.56±4.04	13.55±2.48	0.132
Margin reflex distance 1 (mm)	2.1±0.23	4.1±0.32	0.008

K1: Flat keratometry, K2: Steep keratometry, *Mann-Whitney-U test

DISCUSSION

Visual near and distance acuity is significantly impaired by residual astigmatism after cataract surgery (8). Even a spherical equivalent refraction of ± 0.5 D can cause spectacle dependence in patients (9). Distance-spectacle dependence after bilateral monofocal intraocular lens implantation is determined by the amount of astigmatism (9). After multifocal intraocular lens implantation, distance and near vision of the eyes are impaired with residual astigmatism greater than 1.0 diopter (10). There are conflicting results in existing literature regarding astigmatism change after upper eyelid surgery. Simsek et al. reported that 60% of eyes showed a significant increase in corneal astigmatism (-0.15 ± 0.68) and Altin Ekin and Karadeniz Ugurlu reported 0.22 D of decrease in astigmatism after upper eyelid blepharoplasty (11). However, Dogan et al. did not report any significant change after upper eyelid blepharoplasty (12,13). Savino et al. reported a reduction in corneal astigmatism of 0.26 ± 1.12 D after the anterior levator complex tightening for ptosis surgery. On the other hand, Gingold et al. reported no statistical change after ptosis surgery (14,15). Kim et al. reported that corneal astigmatism decreased in 50% of the eyes (average 0.60 D; range 0.25–1.00 D) and increased in 19.2% of the eyes (average 0.40 D; range 0.25–0.50 D). They showed no change in 30.8% of the eyes in patients who underwent levator resection, while astigmatism decreased in 16.7% of the eyes (average 0.25 D; range 0.25–0.25 D), increased in 16.7% of the eyes (average 0.25 D; range 0.25–0.25 D) and showed no change in 66.7% of the eyes in patients who underwent blepharoplasty (16). Holck et al. reported 72% of eyes steepened along the 90° axis and 14% of eyes steepened along the 180° axis six weeks after ptosis surgery, but regression toward the amount and pattern of preoperative astigmatism in all of the operated eyes was seen one year after surgery (17). Kao et al. found an insignificant decrease of 0.18 D in astigmatism following congenital ptosis surgery (18). However, Klimek et al. observed a postoperative 1.23 D decrease in sphere ($p=0.061$) and a 0.83 D increase in cylinder ($p=0.002$) after unilateral levator resection in patients with congenital ptosis (19).

Changes in astigmatism after blepharoplasty and ptosis surgeries have been compared in previous studies. Zinkernagel et al. reported a 0.25 D astigmatism change after ptosis and a 0.21 D astigmatism change after blepharoplasty surgery (20). Brown et al. reported greater values than Zinkernagel et al., but postoperative astigmatism changes were similar between the groups (0.57 D for the blepharoplasty group and 0.60 D for the ptosis group) (21). On the other hand, Kim et al. reported that levator resection surgery showed significantly greater changes in corneal curvature than blepharoplasty (22). The differences in the results of previous studies may be due to differences in the sample sets or due to differences in follow-up times.

In our study, surgically induced astigmatism after superior eyelid surgery was calculated to be 0.54 ± 0.22 D. If a patient having upper eyelid pathology undergoes a refractive surgery such as toric intraocular lens implantation, presbyopia-correcting intraocular lens implantation or laser refractive surgery, the change in astigmatism after eyelid surgery may affect results of the previous refractive surgeries. Patient satisfaction after refractive surgery might be impaired if surgically induced astigmatism after superior eyelid surgery is not considered.

To our knowledge, this is the first study that used a surgically induced astigmatism program to calculate the change of astigmatism after upper eyelid surgery. The sample size in our study was relatively small. It would be better to confirm the results in further studies with larger patient groups.

In conclusion, upper eyelid surgery can induce astigmatism. Therefore, it might be better to perform upper eyelid surgery before refractive procedures.

Informed Consent: Written consent was obtained from the participants.

Ethics Committee Approval: This study was approved by the Ethical Committee of the İstanbul University School of Medicine.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study- E.A., N.A.C.; Data Acquisition- E.A., N.A.C.; Data Analysis/Interpretation- E.A., N.A.C.; Drafting Manuscript- E.A., N.A.C.; Critical Revision of Manuscript- E.A., N.A.C.; Final Approval and Accountability- E.A., N.A.C.; Technical or Material Support- E.A., N.A.C.; Supervision- E.A., N.A.C.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: Authors declared no financial support.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan alınmıştır.

Bilgilendirilmiş Onam: Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- E.A., N.A.C.; Veri Toplama- E.A., N.A.C.; Veri Analizi/Yorumlama- E.A., N.A.C.; Yazı Taslağı- E.A., N.A.C.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- E.A., N.A.C.; Son Onay ve Sorumluluk- H E.A., N.A.C.; Malzeme ve Teknik Destek- E.A., N.A.C.; Süpervizyon- E.A., N.A.C.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

REFERENCES

1. Merriam WW, Ellis FA, Helveston EM. Congenital blepharoptosis, anisometropia and amblyopia. *Am J Ophthalmol* 1980;89:401-7. [\[CrossRef\]](#)
2. Gullstrand A. The cornea. In: Southall JPC, editor. *Helmholtz's treatise on physiological optics*. New York, NY: Dover Publications Inc; 1962:320-1.
3. Mavrikakis I, Detorakis ET, Baltatzis S, Yiotakis I, Kandiloros D. Corneal topography with upper eyelid platinum chain implantation using the pretarsal fixation technique. *Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol* 2015;4(1):9-13.
4. Eğrilmez S, Dalkılıç G, Yagci A. Vector analysis software on analyzing astigmatism. *Turk J Ophthalmol* 2003;33:404-16.
5. Eğrilmez S, Ates H, Nalcaci S, Andac K, Yagci A. Surgically induced corneal refractive change following glaucoma surgery: nonpenetrating trabecular surgeries versus trabeculectomy. *J Cataract Refract Surg* 2004;30(6):1232-9. [\[CrossRef\]](#)
6. Fox SA. *Surgery of Ptosis*. Baltimore, MD: The Williams & Wilkins Company; 1980:75-80.
7. Rosenfield LK. The pinch blepharoplasty revisited. *Plast Reconstr Surg* 2005;115(5):1405-12. [\[CrossRef\]](#)
8. Lehmann RP, Houtman DM. Visual performance in cataract patients with low levels of postoperative astigmatism: full correction versus spherical equivalent correction. *Clin Ophthalmol* 2012;6:333-8. [\[CrossRef\]](#)
9. Wilkins MR, Allan B, Rubin G. Spectacle use after routine cataract surgery. *Br J Ophthalmol* 2009;93(10):1307-12. [\[CrossRef\]](#)
10. Hayashi K, Hayashi H, Nakao F, Hayashi F. Influence of astigmatism on multifocal and monofocal intraocular lenses. *Am J Ophthalmol* 2000;130(4):477-82. [\[CrossRef\]](#)
11. Altın Ekin M, Karadeniz Ugurlu S. Prospective analysis of visual function changes in patients with dermatochalasis after upper eyelid blepharoplasty. *Eur J Ophthalmol*. 2019 Jun 17;1120672119857501. [\[CrossRef\]](#)
12. Simsek IB, Yılmaz B, Yildiz S, Artunay O. Effect of upper eyelid blepharoplasty on vision and corneal tomographic changes measured by Pentacam. *Orbit* 2015;34(5):263-7. [\[CrossRef\]](#)
13. Dogan E, Akbas Kocaoglu F, Yalniz-Akkaya Z, Elbeyli A, Burcu A, Ornek F. Scheimpflug imaging in dermatochalasis patients before and after upper eyelid blepharoplasty. *Semin Ophthalmol* 2015;30(3):193-6. [\[CrossRef\]](#)
14. Savino G, Battendieri R, Riso M, Traina S, Poscia A, D'Amico G, Caporossi A. Corneal topographic changes after eyelid ptosis surgery. *Cornea* 2016;35(4):501-5. [\[CrossRef\]](#)
15. Gingold MP, Ehlers WH, Rodgers IR, Hornblase A. Changes in refraction and keratometry after surgery for acquired ptosis. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg* 1994;10:241-6. [\[CrossRef\]](#)
16. Kim YK, In JH, Jang SY. Changes in corneal curvature after upper eyelid surgery measured by corneal topography. *J Craniofac Surg* 2016;27(3):e235-8. [\[CrossRef\]](#)
17. Holck DE, Dutton JJ, Wehrly SR. Changes in astigmatism after ptosis surgery measured by corneal topography. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg* 1998;14(3):151-8. [\[CrossRef\]](#)
18. Kao SC, Tsai CC, Lee SM, Liu JH. Astigmatic change following congenital ptosis surgery. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 1998;61(12):689-93.
19. Klimek DL, Summers CG, Letson RD, Davitt BV. Change in refractive error after unilateral levator resection for congenital ptosis. *JAAPOS* 2001;5(5):297-300. [\[CrossRef\]](#)
20. Zinkernagel MS, Ebnetter A, Ammann-Rauch D. Effect of upper eyelid surgery on corneal topography. *Arch Ophthalmol* 2007;125(12):1610-2. [\[CrossRef\]](#)
21. Brown MS, Siegel IM, Lisman RD. Prospective analysis of changes in corneal topography after upper eyelid surgery. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg* 1999;15:378-83. [\[CrossRef\]](#)
22. Kim YK, In JH, Jang SY. Changes in corneal curvature after upper eyelid surgery measured by corneal topography. *J Craniofac Surg* 2016;27(3):e235-8. [\[CrossRef\]](#)

EVALUATION OF REPETITIVE NERVE STIMULATION WITH DIFFERENT STIMULATION FREQUENCIES IN PATIENTS WITH MYASTHENIA GRAVIS

MYASTHENİA GRAVİS HASTALARINDA FARKLI UYARI FREKANSLARI İLE ARDIŞIK SINİR UYARIM TESTİNİN İNCELENMESİ

Nermin Görkem ŞİRİN¹ , Elif KOCASOY ORHAN¹ , Emel OĞUZ AKARSU¹ , Hacer DURMUŞ¹ ,
Feza DEYMEER¹ , Mehmet Barış BASLO¹ 

¹Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Department of Neurology, Istanbul, Turkey

ORCID IDs of the authors: N.G.Ş. 0000-0001-8792-2929, E.K.O. 0000-0002-2110-4832; E.O.A. 0000-0002-0465-4218; H.D. 0000-0002-6426-676X; F.D. 0000-0002-6433-2093; M.B.B. 0000-0003-1551-0559

Cite this article as: Sirin NG, Kocasoy Orhan E, Oguz Akarsu E, Durmus H, Deymeer F, Baslo MB. Evaluation of repetitive nerve stimulation with different stimulation frequencies in patients with Myasthenia Gravis. J Ist Faculty Med 2020;83(3):197-203.
doi: 10.26650/IUITFD.2019.0096

ABSTRACT

Objective: To investigate the effect of voluntary contraction at low frequency repetitive nerve stimulation (RNS) as a sign of pre-synaptic compensation in patients with Myasthenia Gravis (MG).

Material and Method: Thirty-five patients with MG were included. RNS at 3 Hz, recorded from the abductor digiti minimi, trapezius, nasalis, and orbicularis oculi muscles were performed. In muscles with more than 10% decrement, RNS at 1 Hz with 20-90 stimuli was applied after 10-second maximal isometric voluntary muscle contraction (MIVMC). Progressive decremental pattern was considered when decrement values were increasing until the last response. Facilitation after MIVMC was determined by dividing the amplitude of motor response in resting state by the amplitude of the motor response recorded just after contraction.

Results: Among 15 patients having RNS at 1 Hz, nine had facilitation after MIVMC. In the muscle with facilitation, there was a significant positive correlation between the increment ratio and the progressive decrement difference between responses 1-4 and 1-9 (correlation coefficient 0.730, $p=0.026$). Although not statistically significant, muscles showing facilitation following decrement tended to have a progressive decremental pattern.

Conclusion: During RNS, facilitation after MIVMC followed by progressive decremental pattern may be related to presynaptic compensation of neuromuscular transmission failure in MG.

Keywords: Myasthenia Gravis, repetitive nerve stimulation, low frequency stimulation, post-exercise facilitation, decrement

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, Myasthenia Gravis (MG) hastalarında pre-sinaptik kompensasyonun bir göstergesi olarak maksimal istemli kası sonrasında ardışık sinir uyarım testinde (ASU) değişikliklerin incelenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Otuz beş MG hastası çalışmaya dahil edildi. Bu hastalara abdükör digiti minimi, trapez, nazalis ve orbikularis okuli olmak üzere 4 kasın 3 Hz ASU incelemesi yapıldı. Dekrement oranı %10 üzerinde olan kaslarda 10 saniye izometrik maksimal kası sonrasında 1 Hz ASU incelemesi tekrarlandı. Bu kaslarda kası sonrası fasilitasyon ve progresif dekrement paterni varlığı değerlendirildi. Progresif dekrement paterni, ASU incelemesinde dekrement oranının son uyarıya kadar artması olarak belirlendi. Progresif dekrement farkı ise 1-4 ve 1-9 ile 1-4 ve 1-son uyarı ile kaydedilen dekrement değerlerinin birbirinden çıkartılması ile hesaplandı. Fasilitasyon ise kası sonrası ve istirahatte kaydedilen motor yanıt amplitüdlerinin birbirine oranlanması ile belirlendi.

Bulgular: İstemli kası sonrası 1 Hz ASU yapılan 15 hastanın 9'unda fasilitasyon saptandı. Fasilitasyon izlenen kaslarda inkrement oranı ile progresif dekrement farkı (1-4 ve 1-9 uyarı arası) istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir korelasyon gösterdi (korelasyon katsayısı 0,730; $p=0,026$). İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte ilk 9 uyarıda progresif dekrement paterni varlığı dekrementi takiben fasilitasyon izlenen kaslarda daha fazlaydı.

Sonuç: İzometrik kası sonrasında düşük frekanslı ASU incelemesi MG hastalarında presinaptik kompensasyonu gösterebilir.

Anahtar Kelimeler: Myasthenia Gravis, ardışık sinir uyarımı, düşük frekanslı uyarım, egzersiz sonrası fasilitasyon, dekrement

Corresponding author/İletişim kurulacak yazar: gorkemsirin@yahoo.com.tr

Submitted/Başvuru: 02.12.2019 • **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 30.01.2020 •

Last Revision Received/Son Revizyon: 13.02.2020 • **Accepted/Kabul:** 27.02.2020 • **Published Online/Online Yayın:** 15.06.2020

©Telif Hakkı 2020 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2020 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

INTRODUCTION

Myasthenia Gravis (MG) is an autoimmune disorder that affects neuromuscular transmission in skeletal muscles (1). The autoimmune process is caused by autoantibodies mostly against acetylcholine receptors (AChR), located at the postsynaptic membrane of the neuromuscular junction (2, 3). Dysfunction of neuromuscular transmission is related to clinical manifestations of muscle weakness that predominate in certain muscle groups and fluctuate in response to fatigue. It is vital to diagnose MG because immunomodulatory and immunosuppressant treatments are available (4).

The diagnosis of MG is based mainly on clinical findings; however, some immunologic and electrophysiologic findings are expected to support the diagnosis (5, 6). Immunologic findings are the presence of antibodies against AChR and muscle specific tyrosine kinase (MuSK) (3). Electrodiagnostic (EDX) tests consist of repetitive nerve stimulation (RNS) and single fiber electromyography (SFEMG) (7).

Three Hz RNS is recommended in the diagnosis of MG, and a more than 10% decrement between the first and the fourth motor response indicates failure of neuromuscular transmission with high sensitivity especially in generalized MG (8, 9). Isometric voluntary muscle contraction is performed in the electrodiagnostic evaluation of neuromuscular junction (NMJ) function, in order to detect post-exercise facilitation and exhaustion (8). Post-exercise facilitation is mainly used in the diagnosis of presynaptic neuromuscular diseases such as Lambert-Eaton myasthenic syndrome, as an equivalence for high frequencies of RNS (≥ 10 Hz) which results in the accumulation of calcium ions in the presynaptic nerve terminal (8, 10). On the other hand, at low frequencies of RNS, ACh is gradually tapered at each stimuli revealing different types of decremental patterns in diseases with NMJ conduction failure. The decremental pattern showing the most prominent decrease in the amplitude of motor response between the first and fourth or fifth stimuli indicates a postsynaptic transmission defect (8, 11). However, a progressive decremental pattern consisting of a progressive decrease in the amplitude of motor response until the ninth stimuli is related to a defect of ACh release, present in presynaptic transmission (12, 13). By using these data, one might assume that post-exercise facilitation and progressive decrement at low frequencies of RNS in MG might give some information about the presynaptic ability of ACh release, known as presynaptic compensation of NMJ.

The aim of this study was to investigate the effect of isometric voluntary muscle contraction at low frequency RNS as a sign of presynaptic compensation in NMJ.

MATERIAL AND METHOD

Patients

Patients who were followed in our Neuromuscular clinic between 2015 and 2017 and were diagnosed as having MG were included in the study. The diagnosis of MG was made in the presence of fluctuating muscle weakness clinically when one of the following was present: treatment response to cholinesterase inhibitors or antibodies against AChR or MuSK in sera of the patients (1, 14). All patients were evaluated clinically, using the Myasthenia Gravis Foundation of America (MGFA) scale and the MG Composite scale (8, 9, 15). The clinical response to cholinesterase inhibitors was determined by either clinical examination or the patient's history.

Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine Ethics Committee approved the study (2014/1617, 10.24.2014) and informed consent was obtained from each subject.

Electrodiagnostic tests

The electrodiagnostic (EDX) tests were performed prior to the immunomodulatory or immunosuppressant treatment. Cholinesterase inhibitors were ceased 12 hours before EDX tests (8). In patients who could not tolerate stopping cholinesterase inhibitors for such a long time, tests were performed within the last hour before the subsequent dose. RNS was performed using Medelec Synergy and Keypoint EMG devices (Natus, Inc).

Repetitive nerve stimulation

RNS were recorded from the abductor digiti minimi (ADM), trapezius, orbicularis oculi (OO), and nasalis muscles. Nine stimuli at 3 Hz stimulation frequency were applied to the ulnar nerve at the wrist, accessory nerve at the neck and facial nerve at the tragus, respectively,

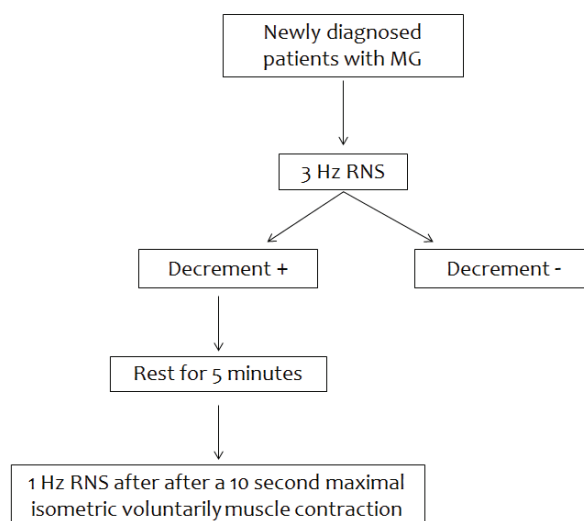


Figure 1: The scheme for electrodiagnostic tests. MG; Myasthenia Gravis, RNS; repetitive nerve stimulation.

during rest and every minute for 4 minutes after 30 seconds exercise with maximal isometric muscle contraction of the recording muscle. A decrement of more than 10% between the first and fourth motor response was considered as positive (8, 16). If a positive decrement was found, RNS at 1 Hz stimulation frequency was performed with 20-90 stimuli after a 10-second maximal isometric muscle contraction. The decrement between the first and fourth (dec1-4), the first and ninth motor response (dec1-9), and the first and last motor response (dec1-l) were calculated. The changes in decrements ($\Delta\text{dec}1-4$) were calculated by subtracting (dec1-l) from (dec1-4) and $\Delta\text{dec}9-4$ were determined by subtracting (dec1-9) from (dec1-4) (12). A positive Δdec indicates that motor responses continue to decline after the fourth response, whereas a negative result or zero value indicates that motor responses increase or remain unchanged. RNS studies with different stimulation frequencies were applied with a resting period of at least 5 minutes (Figure 1 and 2). The increment ratios were also calculated by dividing the amplitude of the mo-

tor response in the resting state by the amplitude of the motor response recorded just after a 10-second maximal isometric voluntary contraction multiplied by 100.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS version 21.0). Presence of Δdec was compared using the Fisher's test between patients with and without facilitation ($p \leq 0.05$). Correlation analyses between increment ratios and Δdec values were performed using the Spearman's rank test.

RESULTS

Thirty-five patients with newly diagnosed MG were recruited to the study. The clinical features of the patients are summarized in Table 1.

All patients had RNS studies recorded from four muscles. Twenty-eight patients had abnormal decrement in one of the muscles evaluated in RNS studies. Among these patients, RNS at 1 Hz stimulation was performed in 26 muscles of 15 patients. The patients' clinical features, decrement and increment ratios in each muscle are shown in Table 2 and 3. In nine muscles of nine patients, facilitation was seen after a 10-second maximal isometric voluntary muscle contraction. The mean increment ratio was 17.1 ± 9.6 (range, 4-33). $\Delta\text{dec}1-4$ was positive in six of

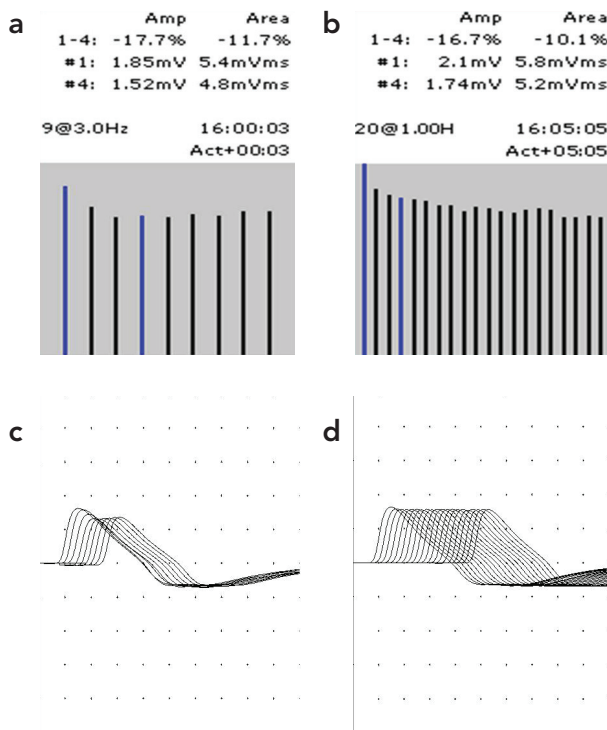


Figure 2: Repetitive nerve stimulation (RNS) tests with different stimulation frequencies. a and b shows RNS recorded from the orbicularis oculi muscle using 3 Hz RNS and 1 Hz RNS after 10-second maximal voluntary isometric muscle contraction, respectively. Compound muscle action potential amplitude increase in b (2.1 mV) compared with a (1.85 mV), showing facilitation and a progressive decremental pattern after exercise. RNS shown in c and d were recorded from the trapezius muscle using 3 and 1 Hz stimulation frequencies, respectively, without facilitation and decrement.

Table 1. Demographic and clinical features of the patients

Age, mean (range)	51.3±16.1 (22-79)	
Sex	n	%
Female	13	37.1
Male	22	62.9
Mean duration of the symptom onset (month), mean (range)	3.4±2.6 (1-12)	
MGFA	n	%
I (Ocular)	19	54.3
II (Mild)	8	22.9
III (Moderate)	7	20.0
IV (Severe)	1	2.8
V (intubated)	0	0
Composite score, mean (range)	7.3±7.2 (0-32)	
Serology	n	%
AChR-ab positive	20	57.1
MuSK-ab positive	5	14.3
AChR-ab negative	5	14.3
Seronegative (AChR-ab and MuSK negative)	5	14.3

AChR-ab, acetylcholine receptor antibody; MuSK-ab, muscle-specific kinase antibody

Table 2. Patients having 1 Hz repetitive nerve stimulation after evaluation of decrement analysis

	Symptom duration (months)	MGFA	Composite score	Serology	Muscle	Decrement-3 Hz(%)
1	3	1	3	AChR-ab +	OO	13
2	3	1	3	AChR-ab -	OO	15
3	2	3b	12	AChR-ab +	OO/Nas/Trapezius/ADM	43/58/15/14
4	6	1	1	AChR-ab +	OO	14
5	2	2b	9	AChR-ab +	OO/Nas	33/23
6	1	1	7	AChR-ab +	OO	43
7	3	1	7	AChR-ab -	OO/Trapezius	17/20
8	3	3b	26	AChR-ab +	OO/Nas	49/72
9	6	1	0	AChR-ab +	OO/Nas	23/11
10	1	1	7	MuSK +	Nas/Trapezius	15/14
11	1	2b	5	AChR-ab +	Nas/Trapezius	15/12
12	1	1	3	AChR-ab +	OO	19
13	2	1	3	AChR-ab +	OO	14
14	1	2b	17	AChR-ab +	Nas/OO/Trapezius	10/17/16
15	2	2b	8	AChR-ab +	OO	60

MGFA, Myasthenia Gravis Foundation of America; AChR-ab, acetylcholine receptor antibody; MuSK-ab, muscle-specific kinase antibody; OO, orbicularis oculi; Nas, nasalis; ADM, abductor digiti minimi

Table 3. Decrement and increment ratios in the studied muscles

Muscle	3 Hz decrement	1 Hz dec1-4	1 Hz dec1-9	1 Hz dec1-1
OO	13	-7	0	0
OO	15	8	8	7
OO	43	15	15	15
Nas	58	7	15	23
Trapezius	15	5	5	4
ADM	14	6	6	6
OO	14	7	5	16
OO	33	-5	0	0
Nas	23	0	-4	8
OO	43	11	29	29
OO	17	17	24	27
Trapezius	20	0	0	3
OO	49	0	0	2
Nas	72	28	32	32
OO	23	-12	73	73
Nas	11	5	6	15
Nas	15	2	2	2
Trapezius	14	4	4	4
Nas	15	10	18	19
Trapezius	12	11	8	7
OO	19	9	12	18
OO	14	5	13	22
Nas	10	2	1	1
OO	17	-4	-18	-13
Trapezius	16	5	4	5
OO	60	5	5	18

OO: orbicularis oculi, Nas: nasalis, ADM: abductor digiti minimi

nine muscles (66.7%) showing facilitation, whereas $\Delta\text{decl-4}$ was positive in seven of 17 muscles (41.2%) without facilitation without a statistical significance ($p>0.05$). A positive $\Delta\text{dec9-4}$ was found in four of nine muscles with facilitation (44.4%) and in five of 17 muscles without facilitation (29.4%, $p>0.05$). The analysis between increment ratio and $\Delta\text{dec9-4}$ values showed a positive significant correlation (correlation coefficient 0.730, $p=0.026$, Figure 3). However, no significant correlation presented between increment ratio and $\Delta\text{decl-4}$.

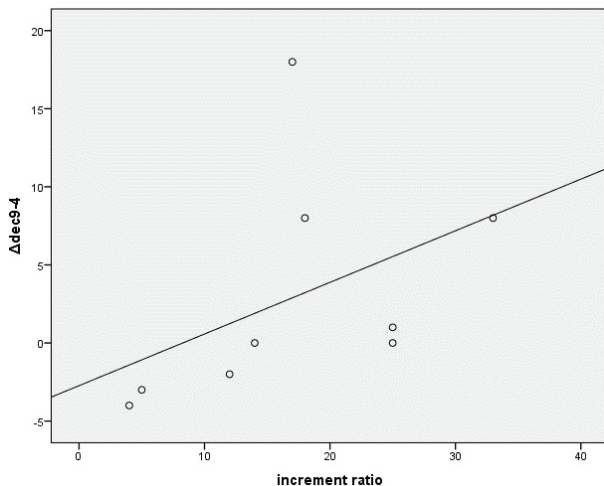


Figure 3: Correlation graph between increment ratio and $\Delta\text{dec9-4}$ in patients showing facilitation after 10-second maximal isometric voluntary muscle contraction.

Among nine patients with facilitation after a 10-second maximal isometric voluntary muscle contraction, six had a response to cholinesterase inhibitors, and one patient, with a positive MuSK-ab, did not benefit from cholinesterase inhibitors. In the other two, the response to cholinesterase inhibitors could not be assessed because one was lost to follow-up, and the other had minor symptoms and did not use cholinesterase inhibitors. All six patients who had no facilitation were clinically responsive to cholinesterase inhibitors. Among these six patients, five were AChR-ab positive and one was AChR-ab negative.

DISCUSSION

In electrophysiologic studies, a 10-second isometric voluntary muscle contraction was used to test the presynaptic function of the NMJ (8, 11). A single motor response was recorded just after a 10-second isometric voluntary muscle contraction. An increase in the compound muscle action potential (CMAP) amplitude relative to CMAP recorded at resting is called facilitation, and facilitation of more than 100% is accepted as a presynaptic dysfunction of the NMJ (10). In RNS studies, isometric voluntary contraction of the studied muscle was used to exacer-

bate the amount of decrement found in the resting state (17-19). The decremental response decreases just after isometric voluntary contraction. After several minutes following the exercise decrement exacerbated, which is called post-exercise exhaustion (17). The mechanism of facilitation and the decrease in decremental response after isometric voluntary contraction was considered to be the accumulation of calcium ions in the presynaptic axon terminal, resulting in increased ACh release through the synaptic cleft (17, 20).

The progressive decremental pattern at 3 Hz RNS was related to a presynaptic NMJ disorder, Lambert-Eaton myasthenic syndrome, and was first described by Baslo et al (12), and confirmed by other studies (13, 21). This finding can be explained as follows: ACh release at low frequency RNS cannot be compensated by secondary and tertiary ACh vesicles in presynaptic NMJ disorders. However, in MG, decremental response starts at second stimulus and becomes most obvious at the fourth or fifth stimulus. From the fifth to the ninth response, the CMAP amplitude stays the same or increases a little (11). This decremental pattern is called a U-shaped or saddle-shaped decrement which is assumed to be related to post-synaptic NMJ dysfunction. In MG, the progressive decremental pattern is not commonly accepted as described above.

In the present study, a progressive decremental pattern was presented in patients with MG, which appears after 10-second maximal isometric voluntary muscle contraction. The progressive decrement after facilitation may possibly be associated with the presynaptic compensation in NMJ, related to an increase in ACh release preceding the accumulation of calcium ions. We hypothesized that the progressive and slow decline during low frequency RNS was an indirect finding of the amount of facilitation after exercise, which could indicate presynaptic compensation in MG. Correspondingly, this kind of compensation would be associated with the response to cholinesterase inhibitors. In this study, we found facilitation after voluntary muscle contraction in nine muscles of nine patients. There was a significant positive correlation between the increment ratio and $\Delta\text{dec9-4}$, but not $\Delta\text{decl-4}$. This correlation indicates that the more facilitation found in a muscle, the more progressive decrement at 1 Hz RNS. In addition, the progressive decrement until the ninth and last response was found to be more frequent in muscles showing facilitation after 10-second isometric voluntary muscle contraction than those without facilitation; however, these differences did not reach a significant level. These findings could provide some evidence that the mechanism underlying this phenomenon might be associated with presynaptic compensation. In a manner of clinical practice, this electrophysiologic pattern could be tested in a larger number of patients, and its relation with clinical parameters could be investigated in future studies.

The clinical correlation of presynaptic compensation could be linked with a cholinesterase response. However, we found no such relation in our study. The main reason for this might be the small number of subjects in our study. Another reason could be the insufficient muscle contraction. To evaluate facilitation, one should perform a maximal voluntary muscle contraction. Our patients without any treatment and with weakness may not have been able to perform sufficient contraction.

CONCLUSION

During RNS, facilitation after maximal isometric voluntary muscle contraction and progressive decremental pattern might be related with presynaptic compensation in MG.

Ethics Committee Approval: This study was approved by the Ethical Committee of the Istanbul University Istanbul Faculty of Medicine. (2014/1617, 10.24.2014)

Informed Consent: Written consent was obtained from the participants.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study- N.G.Ş, M. B.B., E.K.O., F.D.; Data Acquisition- N.G.Ş, M.B.B., E.K.O., H.D.; Data Analysis/Interpretation- N.G.Ş, M.B.B., E.K.O., F.D.; Drafting Manuscript- N.G.Ş, M.B.B., E.K.O., F.D.; Critical Revision of Manuscript- N.G.Ş, M.B.B., E.K.O., F.D., H.D.; Final Approval and Accountability- N.G.Ş, M.B.B., E.K.O., F.D., H.D., E.O.A.; Technical or Material Support- N.G.Ş, M.B.B., E.K.O., H.D.; Supervision- M.B.B., E.K.O., F.D.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: Authors declared no financial support.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan alınmıştır. (2014/1617, 10.24.2014)

Bilgilendirilmiş Onam: Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- N.G.Ş, M.B.B., E.K.O., F.D.; Veri Toplama- N.G.Ş, M.B.B., E.K.O., H.D.; Veri Analizi/Yorumlama- N.G.Ş, M.B.B., E.K.O., F.D.; Yazı Taslağı- N.G.Ş, M.B.B., E.K.O., F.D.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- N.G.Ş, M.B.B., E.K.O., F.D., H.D.; Son Onay ve Sorumluluk- N.G.Ş, M.B.B., E.K.O., F.D., H.D., E.O.A.; Malzeme ve Teknik Destek- N.G.Ş, M. B.B., E.K.O., H.D.; Süpervizyon- M.B.B., E.K.O., F.D.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.








REFERENCES

1. Jaretzki A, 3rd, Barohn RJ, Ernstoff RM, Kaminski HJ, Keeseey JC, Penn AS, et al. Myasthenia gravis: recommendations for clinical research standards. Task Force of the Medical Scientific Advisory Board of the Myasthenia Gravis Foundation of America. *Ann Thorac Surg* 2000;70(1):327-34. [CrossRef]
2. Stalberg E. Clinical electrophysiology in myasthenia gravis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1980;43(7):622-33. [CrossRef]
3. Oh SJ, Morgan MB, Lu L, Hatanaka Y, Hemmi S, Young A, et al. Different characteristic phenotypes according to antibody in myasthenia gravis. *J Clin Neuromuscul Dis* 2012;14(2):57-65. [CrossRef]
4. Farmakidis C, Pasnoor M, Dimachkie MM, Barohn RJ. Treatment of Myasthenia Gravis. *Neurol Clin* 2018;36(2):311-37. [CrossRef]
5. Benatar M. A systematic review of diagnostic studies in myasthenia gravis. *Neuromuscul Disord* 2006;16(7):459-67. [CrossRef]
6. Kelly JJ, Jr., Daube JR, Lennon VA, Howard FM, Jr., Younge BR. The laboratory diagnosis of mild myasthenia gravis. *Ann Neurol* 1982;12(3):238-42. [CrossRef]
7. Oh SJ, Kim DE, Kuruoglu R, Bradley RJ, Dwyer D. Diagnostic sensitivity of the laboratory tests in myasthenia gravis. *Muscle Nerve* 1992;15(6):720-4. [CrossRef]
8. Medicine AQACAAoE. Practice parameter for repetitive nerve stimulation and single fiber EMG evaluation of adults with suspected myasthenia gravis or Lambert-Eaton myasthenic syndrome: summary statement. *Muscle Nerve* 2001;24(9):1236-8. [CrossRef]
9. Benatar M, Sanders DB, Burns TM, Cutter GR, Guptill JT, Baggi F, et al. Recommendations for myasthenia gravis clinical trials. *Muscle Nerve* 2012;45(6):909-17. [CrossRef]
10. Oh SJ, Kurokawa K, Claussen GC, Ryan HF, Jr. Electrophysiological diagnostic criteria of Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Muscle Nerve* 2005;32(4):515-20. [CrossRef]
11. Ozdemir C, Young RR. Electrical testing in myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci* 1971;183:287-302. [CrossRef]
12. Baslo MB, Deymeer F, Serdaroglu P, Parman Y, Ozdemir C, Cuttini M. Decrement pattern in Lambert-Eaton myasthenic syndrome is different from myasthenia gravis. *Neuromuscul Disord* 2006;16(7):454-8. [CrossRef]
13. Sanders DB, Cao L, Massey JM, Juel VC, Hobson-Webb L, Guptill JT. Is the decremental pattern in Lambert-Eaton syndrome different from that in myasthenia gravis? *Clin Neurophysiol* 2014;125(6):1274-7. [CrossRef]
14. Sirin NG, Kocasoy Orhan E, Durmus H, Oflazer P, Parman Y, Oge AE, Deymeer F, Baslo MB. Jitter Measurement using a Concentric Needle in 133 Patients with Myasthenia Gravis: A Retrospective Analysis. *J Neurol Sci-Turk* 2017;34(3):207-14. [CrossRef]
15. Burns TM, Conaway MR, Cutter GR, Sanders DB, Muscle Study G. Construction of an efficient evaluative instrument for myasthenia gravis: the MG composite. *Muscle Nerve* 2008;38(6):1553-62. [CrossRef]
16. Sirin NG, Kocasoy Orhan E, Durmus H, Deymeer F, Baslo MB. Repetitive nerve stimulation and jitter measurement with disposable concentric needle electrode in newly diagnosed myasthenia gravis patients. *Neurophysiol Clin* 2018;48(5):261-7. [CrossRef]

17. Oh SJ, Nagai T, Kizilay F, Kurt S. One-minute exercise is best for evaluation of postexercise exhaustion in myasthenia gravis. *Muscle Nerve* 2014;50(3):413-6. [\[CrossRef\]](#)
18. Sanders DB, Stalberg EV. AAEM minimonograph #25: single-fiber electromyography. *Muscle Nerve* 1996;19(9):1069-83. [\[CrossRef\]](#)
19. Sanders DB, Howard JF, Jr. AAEE minimonograph #25: Single-fiber electromyography in myasthenia gravis. *Muscle Nerve* 1986;9(9):809-19. [\[CrossRef\]](#)
20. Oh SJ, Eslami N, Nishihira T, Sarala PK, Kuba T, Elmore RS, et al. Electrophysiological and clinical correlation in myasthenia gravis. *Ann Neurol* 1982;12(4):348-54. [\[CrossRef\]](#)
21. Luigetti M, Modoni A, Lo Monaco M. Low rate repetitive nerve stimulation in Lambert-Eaton myasthenic syndrome: peculiar characteristics of decremental pattern from a single-centre experience. *Clin Neurophysiol* 2013;124(4):825-6. [\[CrossRef\]](#)

ANTERIOR TRANSPOSITION VERSUS *IN SITU* NEUROLYSIS IN CUBITAL TUNNEL SYNDROME: A COMPARISON BASED ON FUNCTIONAL AND ELECTRO-DIAGNOSTIC EVALUATION

KÜBİTAL TÜNEL SENDROMUNDA ANTERİOR TRANSPOZİSYON İLE *İN SİTU* GEVŞETMENİN FONKSİYONEL VE ELEKTRODİAGNOSTİK SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Ömer Naci ERGİN¹ , Necmettin TURGUT¹ , Serkan BAYRAM¹ , Mehmet DEMİREL¹ , Murat ALTAN¹ , Ahmet SALDUZ¹ , Hayati DURMAZ¹ 

¹Istanbul University Istanbul Faculty of Medicine, Department of Orthopedics and Traumatology, Istanbul, Turkey

ORCID IDs of the authors: Ö.N.E. 0000-0001-6848-6930; N.T. 0000-0003-4994-5059; S.B. 0000-0001-7651-1200; M.D. 0000-0003-1131-7719; M.A. 0000-0001-5602-1458; A.S. 0000-0001-9448-6416; H.D. 0000-0002-2571-6617

Cite this article as: Ergin ON, Turgut N, Bayram S, Demirel M, Altan M, Salduz A et al. Anterior transposition versus *in situ* neurolysis in cubital tunnel syndrome: a comparison based on functional and electro-diagnostic evaluation. J Ist Faculty Med 2020;83(3):204-8. doi: 10.26650/IUITFD.2019.0084

ABSTRACT

Objective: The aim of the present study is to compare that results of *in situ* neurolysis and anterior transposition procedures both clinically and electro-diagnostically in those patients diagnosed with cubital tunnel syndrome.

Material and Methods: Twenty of 34 patients who had undergone both preoperative, postoperative electromyogram (EMG) nerve conduction tests and regular follow-up were included in our study. Then, the patients were divided into 2 groups - *in situ* neurolysis (group A) and anterior transposition (group B). Both groups were compared based on modified Bishop functional scores, preoperative and postoperative EMG parameters.

Results: There was no statistically significant difference in relation to EMG parameters between the two groups. When comparing preoperative and postoperative EMG results, in the patients with anterior transposition surgery 'elbow to below-elbow' and 'below-elbow to wrist' motor conduction velocity was increased significantly ($p=0.018$ and 0.04). While the average Bishop score was 7.9 in group A and 9.3 in group B, there was no statistical difference between the two groups in terms of Bishop Scores.

Conclusion: In the management of cubital tunnel syndrome, the choice of technique doesn't affect the functional results; however, anterior transposition of the nerve provides better recovery in 'elbow to below-elbow' and 'below-elbow to wrist' motor conduction velocity.

Keywords: Ulnar nerve, EMG, Anterior transposition

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı, kübital tünel sendromu olan hastalarda *in situ* gevşetme ve anterior transpozisyon prosedürlerinin klinik ve elektrodagnostik sonuçlarının karşılaştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntemler: Çalışmamıza preoperatif ve postoperatif elektromiyogram (EMG) sinir iletim testi olan düzenli takip uygulanan 34 hastanın 20'si dahil edildi. Hastalar *in situ* gevşetme (A grubu) ve anterior transpozisyon (B grubu) olarak 2 gruba ayrıldı. Her iki grup modifiye Bishop fonksiyonel skorları, preoperatif ve postoperatif EMG parametreleri kullanılarak karşılaştırıldı.

Bulgular: İki grup arasında EMG parametrelerinin ilişkisi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Preoperatif ve postoperatif EMG sonuçları karşılaştırıldığında, anterior transpozisyon uygulanan grupta "dirsek- dirsek altı" ve "dirsek altı-el bileği" motor iletim hızının anlamlı olarak arttığı saptandı ($p=0,018$ ve $0,04$). Bishop skoru A grubunda ortalama 7,9 iken, B grubunda 9,3 olarak saptandı. Bishop skorları açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

Sonuç: Kübital tünel sendromunun tedavisinde, teknik seçimi fonksiyonel sonuçları etkilememektedir; Bununla birlikte, sinirin anterior transpozisyonu, "dirsek- dirsek altı" ve "dirsek altı-el bileği" motor iletim hızında daha fazla iyileşme sağladığı saptandı.

Anahtar Kelimeler: Ulnar sinir, EMG, Anterior transpozisyon

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

Submitted/Başvuru: 01.11.2019 • **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 04.11.2019 •

Last Revision Received/Son Revizyon: 12.02.2020 • **Accepted/Kabul:** 04.03.2020 • **Published Online/Online Yayın:** 05.06.2020

©Telif Hakkı 2020 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2020 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

INTRODUCTION

Cubital tunnel syndrome is the second most common compressive neuropathy of the upper extremity following carpal tunnel syndrome, which is characterized by pain around the elbow and paresthesia in ulnar side of the hand (1, 2). Miscellaneous surgical treatment methods have been described in the management of this common entity in the literature, the leading method of which is simple decompression, also known as *in situ* neurolysis. Whether open surgically or endoscopically, decompression of the cubital tunnel may be performed. Either treatment modality basically focuses on release of the Osborne ligament. Besides decompression of cubital tunnel syndrome, the transposition of the ulnar nerve to the anterior side of the elbow is frequently used as a procedure in the management of this compressive neuropathy. Three anterior transposition techniques have been described: submuscular, intramuscular and subcutaneous. Apart from these, medial epicondylectomy may be employed as well. Regarding a change of motor nerve conduction velocity among these surgical techniques, clinical and functional results have not yet shown any superiority in any of these (3); however, the literature indicates good functional results following surgical treatment (4).

The main aim of the present study is to compare that results of *in situ* neurolysis and anterior transposition procedures as both clinically and electro-diagnostically in those patients diagnosed with cubital tunnel syndrome.

MATERIAL AND METHOD

After approval of the institutional review board, the charts of 34 patients who have been treated for cubital tunnel syndrome in our department were reviewed between 2004 and 2015. The inclusion criteria included patients who had undergone surgery due to cubital tunnel syndrome and who had regular follow-up data at least 1 year after the surgery with pre-and post-operative EMG tests. The exclusion criteria included presence of osteoarthritis or osteophytes in the anteroposterior and lateral radiographs of the affected elbow, previous surgery for cubital syndrome, related to cervical radiculopathy, carpal tunnel syndrome, ulnar tunnel syndrome, thoracic outlet syndrome, having no follow-up data for at least 1 year, having no EMG test.

Fourteen patients who did not meet the criteria listed above were excluded. After exclusion, we had 20 patients (15 females, 5 males) treated surgically due to cubital tunnel syndrome, confirmed by preoperative EMG test. The mean age of the patients was 45.8 (29-71) years. The left side was affected in 15 patients, the right side was affected in 5 patients. The average follow-up duration was 64.8 (range 13-147) months. The severity of the ulnar neuropathy was Grade II in all patients according to

the McGowan classification (5). In the physical examination; in addition to pain in the medial side of the elbow and forearm, sensorial deficit of the entire 5th finger and medial half of the 4th finger was observed in all patients preoperatively. Some of the patients had weakness and wasting in the interosseous muscles. Functional status of patients was evaluated by a modified Bishop score (6). Surgical technique was chosen as simple *in situ* neurolysis in 9 patients and anterior subfascial transposition in 11 patients according to the surgeon preferences.

Motor and sensorial conduction velocity 'from the elbow to below-elbow' and 'from the below-elbow to wrist' respectively was measured both preoperatively and postoperatively. Electro diagnostic studies were carried out and interpreted by a professional rehabilitation physician at our institution. Postoperative EMG was obtained at least 6 months after surgery. In nerve conduction studies, the ulnar nerve was stimulated by single pulses of 0.2 ms duration at the wrist, 5 cm below as well as 10 cm above the elbow. The reference electrode was fixed to the base of the fifth finger. Stimulus strength was increased until a maximum CMAP could be recorded. Sensorial and motor conduction velocities were recorded with bipolar surface electrodes from the abductor digiti minimi muscle (ADM) with the active electrode placed over the muscle belly.

Patients were divided into two groups as simple *in situ* neurolysis (Group A), anterior transposition (Group B). Group A included 9 patients with a mean age of 44.9 (34-52) years. Group B included 11 patients with a mean age of 50.3 (30-72) years. The mean follow-up period after the operation was 55 (12-147) months in group A and 73.8 (17-105) months in group B.

The Mann-Whitney U test was used in comparison of functional status based on the Bishop score between the groups. The paired Student's t-test was used, in order to compare preoperative and postoperative results of EMG tests. The results were assessed statistically significant in 95% confidence interval and $p < 0.05$ level.

RESULTS

In group A, while the mean sensorial conduction velocity was 44.4 m/s preoperatively, postoperative mean values were found to be 55.3 m/s. Mean elbow to below-elbow motor conduction velocity was 43.5 m/s preoperatively and 49.1 m/s postoperatively. Below-elbow to wrist motor conduction velocity was 54.1 m/s preoperatively and 59 m/s postoperatively. In group A, although postoperative values were increased to preoperative values, there was no statistically significant difference ($p > 0.05$) (Figure 1).

In group B, preoperative with postoperative main values of sensorial conduction velocity were, 54 m/s and 55.8 m/s respectively ($p > 0.05$). While preoperatively mean 'el-

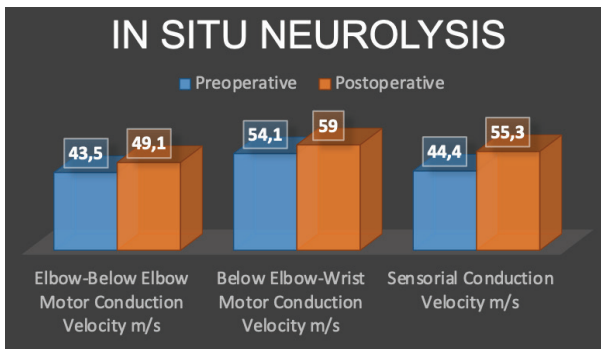


Figure 1: The results of electro diagnostic studies for simple *in situ* neurolysis. There was no statistical difference between pre and post-operative values.

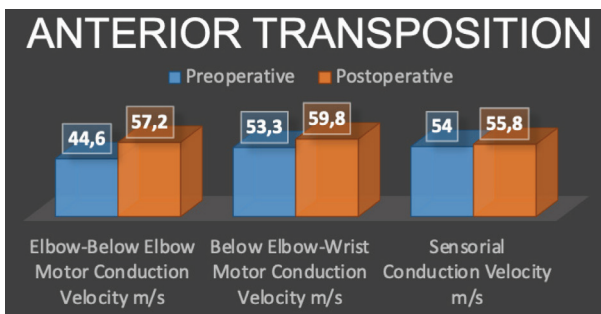


Figure 2: The results of electro diagnostic studies for anterior decompression. In the postoperative EMG results the 'elbow to below-elbow' and 'below-elbow to wrist' motor conduction velocity was increased significantly compared to preoperatively ($p=0.018$ and 0.04).

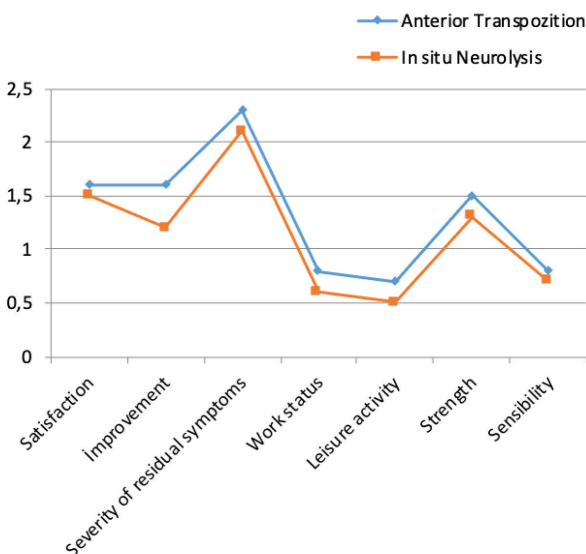


Figure 3: The comparison of the postoperative Bishops score is shown in the graph. There was no statistical difference between groups.

bow to below-elbow' motor conduction velocity was 44.6 m/s, it was 57.2 m/s postoperatively. Mean below-elbow to wrist motor conduction velocity was preoperatively 53.3 m/s and postoperatively 59.8 m/s. When comparing preoperative with postoperative EMG results, in group B, the 'elbow to below-elbow' and 'below-elbow to wrist' motor conduction velocity was increased significantly ($p=0.018$ and 0.04) (Figure 2).

There was no statistically significant difference in terms of EMG parameters between the two groups. While the average Bishop score was as 7.9 in group A and 9.3 in group B, there was no statistical differences between the two groups in terms of Bishop scores (Figure 3).

DISCUSSION

Even though cubital tunnel syndrome is a well-defined compression neuropathy, its treatment remains controversial. It is unclear which treatment modality should be preferred in which period in the management of cubital tunnel syndrome; however, there is a consensus with respect to primary treatment being non-surgical methods. As a general conception, if nonsurgical treatment fails, surgical treatment is indicated (7-9).

There are a variety of treatment modalities in the management of cubital tunnel syndrome. Example of this includes epicondylectomy, *in-situ* decompression (*in-situ* neurolysis), anterior transposition of the ulnar nerve. However, there is no consensus in relation to the best surgical treatment procedure in the literature. The surgical treatment process is conducted in view of physicians' experiences and preferences (7, 10, 11). Operative treatment was recommended, if patients suffered from intrinsic atrophy or considerable hand weakness and had clinical symptoms of pain, or weakness following conservative treatment.

Although medial epicondylectomy is considered as a standard procedure in the surgical treatment of cubital tunnel syndrome, *in situ* neurolysis and anterior transposition of the ulnar nerve have been performed more often recently. Compressive tissues, especially Osborne's ligament, are released in simple decompression; another method covers anterior transposition of the ulnar nerve to subcutaneous or submuscular area following release of compressive tissues. These two methods, simple decompression and anterior transposition of the nerve, are frequently employed in our clinic as well. Therefore, we aimed to compare the functional and EMG test results of two surgical treatment methods.

There are many clinical studies comparing the advantages and disadvantages of these methods. *In situ* decompression basically requires a simpler technique and less invasive dissection compared to anterior transposition of the nerve. Thus; it is believed that *in situ* neurolysis dimin-

ishes the risk of vascular compromise of the ulnar nerve. In light of the Gelberman et al. findings, anterior transposition of the ulnar nerve does not effectively relieve the symptoms (12). However, more recently, some clinical studies have shown that anterior transpositions of the ulnar nerve were less routinely done. Furthermore, it has been suggested that anterior transposition of the nerve may pose some problems such as injury of the medial antebrachial cutaneous nerve and vascular compromise of the ulnar nerve. An experimental study by Ogata et al. showed that regional blood supply may be disturbed for a minimum of 3 days (13). In another study, it was proposed that *in situ* neurolysis should be the first option to manage cubital tunnel syndrome because, there was no significant difference regarding results of either technique and much fewer complications related to *in situ* decompression (14).

In another study by Bartels et al. each group was found similar in terms of effectivity of the treatment (15). Nevertheless, complication rates were 23% and 7% respectively, in the anterior transposition and decompression group. Therefore, they stated that if there was no preoperative subluxation, performing only *in situ* decompression would be necessary. Related to this, some studies also found no significant difference (6, 16, 17). In one of these studies, Keiner et al. suggested that, *in situ* decompression should be preferred because of being less invasive than anterior transposition of the nerve (17). Besides these, in two meta-analysis composed of 4 randomized clinical studies in terms of comparison of either technique, the authors found no significant difference. However, it is observed that regardless of type of transposition of the ulnar nerve (sub-muscular or sub-cutaneous), anterior transposition procedure can provide satisfactory results (3, 18).

Conversely, some authors advocated that anterior transposition of the nerve should be performed in the management of the cubital tunnel syndrome because, to achieve more satisfactory results, the nerve should be carried to a more convenient tissue region, and tension of the nerve should be decreased. The core point is that removal of the compressive forces in a flexed elbow is possible only performing anterior transposition of the nerve, *in situ* decompression does not address this problem. Although it is known that vascular compromise can be much more frequent when performing anterior transposition, Seyfettinoğlu et al. stated that vascular compromise following anterior transposition had no influence over functional results of the nerve (19). Because of this, the vascular compromise related to anterior transposition remains controversial in the literature. To enlighten this issue, new prospective studies are required. In spite of being a treatment modality in the management of cubital tunnel syndrome, medial epicondylectomy occupies a limited area. Successful results related to medial epicondylectomy have been

published; however, the pain around the medial epicondyle remains a worrying problem (1, 20).

In a recent meta-analysis, there was no difference regarding motor conduction velocity and clinical results (20). In our study, 'elbow to below-elbow' and 'below-elbow to wrist' motor conduction velocity was significantly increased in the anterior transposition group (respectively p: 0.018 and 0.04), when comparing preoperative and postoperative electro diagnostic results. In the simple *in situ* neurolysis group, in spite of postoperative values being higher than preoperative values, no significant difference was observed. In a similar way, there was no significant difference in relation to sensorial conduction velocity, despite increased postoperative values. This results can be beneficial to choosing the anterior transposition technique.

The modified Bishop score was used to evaluate functional condition of the patients. In view of the Bishop scores, there was no significant difference, when comparing anterior transposition and simple *in situ* neurolysis group. According to these results, no functional effect of increased postoperative motor conduction velocity in anterior transposition group was observed in the clinical process.

There are several limitations to this study. Firstly, we utilized one outcome measure, the modified Bishop scale in order to evaluate the clinical outcomes after surgical treatment; however, this scoring system has no reliable outcome parameter to assess cubital tunnel syndrome. Second, our investigation is a retrospective clinical study. When taking the literature into account, prospective studies comparing each treatment modality are necessary. Third, this study includes only a limited number of cases with a relatively short-term follow-up period. In our series, the interval between the onset of symptoms and surgeries was relatively longer than other studies.

CONCLUSION

In the management of cubital tunnel syndrome, choice of technique doesn't affect the functional results; however, anterior transposition of the nerve provides better recovery in the 'elbow to below-elbow' and 'below-elbow to wrist' motor conduction velocity. As a result, each technique has advantages and disadvantages. According to our opinion, anterior transposition of the nerve can be preferred in terms of obtaining better motor recovery.

Acknowledgements: We thank the department of Neurology for their participation in the electrodiagnostic tests and analysis.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was not received due to the retrospective nature of the study.

Informed Consent: Written consent was obtained from the participants.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: CConception/Design of Study- Ö.N.E., S.B., M.A., A.S.; Drafting Manuscript- N.T., S.B., M.D.; Final Approval and Accountability- Ö.N.E., N.T., S.B., M.D., M.A., A.S., H.D.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: Authors declared no financial support.

Teşekkür: Elektrodiagnostik testlere ve analizlere katıldıkları için Nöroloji bölümüne teşekkür ediyoruz.

Etik Komite Onayı: Retrospektif çalışma olduğundan etik komite onayı alınmamıştır.

Bilgilendirilmiş Onam: Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- Ö.N.E., S.B., M.A., A.S.; Yazı Taslağı- N.T., S.B., M.D.; Son Onay ve Sorumluluk- Ö.N.E., N.T., S.B., M.D., M.A., A.S., H.D.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

REFERENCES

1. Muermans S, De Smet L. Partial medial epicondylectomy for cubital tunnel syndrome: outcome and complications. *J Shoulder Elbow Surg* 2002;12(2):248-52. [CrossRef]
2. Soltani AM, Best MJ, Francis CS, Allan BJ, Panthaki ZJ. Trends in the surgical treatment of cubital tunnel syndrome: an analysis of the national survey of ambulatory surgery database. *J Hand Surg Am* 2013;38(8):1551-6. [CrossRef]
3. Zlowodzki M, Chan S, Bhandari M, Kalliainen L, Schubert W. Anterior transposition compared with simple decompression for treatment of cubital tunnel syndrome, *J Bone Joint Surg Am* 2007;89(12):2591-8. [CrossRef]
4. Cutts S. Cubital tunnel syndrome. *Postgrad Med J* 2007; 83(975):28-31. [CrossRef]
5. McGowan AJ. The results of transposition of the ulnar nerve for traumatic ulnar neuritis. *J Bone Joint Surg Br* 1950;32(3):293-301. [CrossRef]
6. Nabhan A, Ahlhelm F, Kelm J, Reith W, Schwerdtfeger K, Steudel WI. Simple decompression or subcutaneous anterior transposition of the ulnar nerve for cubital tunnel syndrome. *J Hand Surg Br* 2005;30(5):521-4. [CrossRef]
7. Chan RC, Paine KW, and Varughese G. Ulnar neuropathy at the elbow: comparison of simple decompression and anterior transposition. *Neurosurgery* 1980;7(6):545-50. [CrossRef]
8. Glowacki KA, Weiss AP. Anterior intramuscular transposition of the ulnar nerve for cubital tunnel syndrome. *J Shoulder Elbow Surg* 1997;6(2):89-96. [CrossRef]
9. Oskay D, Meriç A, Kirdi N, Firat T, Ayhan C, Leblebicioğlu G. Neurodynamic mobilization in the conservative treatment of cubital tunnel syndrome: long-term follow-up of 7 cases. *J Manipulative Physiol Ther* 2010;33(2):156-63. [CrossRef]
10. Dellon AL, Coert JH. Results of the musculofascial lengthening technique for submuscular transposition of the ulnar nerve at the elbow. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85(7):1314-20. [CrossRef]
11. Lascar T, Laulan J. Cubital tunnel syndrome: a retrospective review of 53 anterior subcutaneous transpositions. *J Hand Surg Br* 2000;25(5):453-6. [CrossRef]
12. Gelberman RH, Yamaguchi K, Hollstien SB, Winn SS, Heidenreich FP Jr, Bindra RR, Hsieh P, Silva MJ. Changes in interstitial pressure and cross-sectional area of the cubital tunnel and of the ulnar nerve with flexion of the elbow. An experimental study in human cadavera. *J Bone Joint Surg Am* 1998;80(4):492-501. [CrossRef]
13. Ogata K, Manske PR, Lesker PA. The effect of surgical dissection on regional blood flow to the ulnar nerve in the cubital tunnel. *Clin Orthop Relat Res* 1985;193:195-8. [CrossRef]
14. Biggs M, Curtis JA. Randomized, prospective study comparing ulnar neurolysis *in situ* with submuscular transposition. *Neurosurgery* 2006;58(2):296-304. [CrossRef]
15. Bartels RH, Verhagen WI, van der Wilt GJ, Meulstee J, van Rossum LG, Grotenhuis JA. Prospective randomized controlled study comparing simple decompression versus anterior subcutaneous transposition for idiopathic neuropathy of the ulnar nerve at the elbow: Part 1. *Neurosurgery* 2005;56(3):522-30. [CrossRef]
16. Gervasio O, Gambardella G, Zaccone C, Branca D. Simple decompression versus anterior submuscular transposition of the ulnar nerve in severe cubital tunnel syndrome: a prospective randomized study. *Neurosurgery* 2005;56(1):108-17. [CrossRef]
17. Keiner D, Gaab MR, Schroeder HW, Oertel J. Comparison of the long-term results of anterior transposition of the ulnar nerve or simple decompression in the treatment of cubital tunnel syndrome-a prospective study. *Acta Neurochir (Wien)* 2009;151(4):311-5. [CrossRef]
18. Macadam SA, Gandhi R, Bezuhly M, Lefavre KA. Simple decompression versus anterior subcutaneous and submuscular transposition of the ulnar nerve for cubital tunnel syndrome: a meta-analysis. *J Hand Surg Am* 2008;33(8):1314:e1-12. [CrossRef]
19. Seyfettinoğlu F, Karaer A, Sertöz Z, Dülgeroğlu A, Koruyucu MB, Bora OA. Assessment of the effects of surgical treatment options for cubital tunnel syndrome on the ulnar nerve by USG and EMG. *Eklemler Hastalıkları Cerrahisi* 2012;23(2):88-93.
20. Efstathopoulos DG, Themistocleous GS, Papagelopoulos PJ, Chloros GD, Gerostathopoulos NE, Soucacos PN. Outcome of partial medial epicondylectomy for cubital tunnel syndrome. *Clin Orthop Relat Res* 2006;444:134-9. [CrossRef]

THE CONNECTION BETWEEN POLYSOMNOGRAPHY RESULTS, EPWORTH SCORES AND DRUG-INDUCED SLEEP ENDOSCOPY FINDINGS IN PATIENTS WITH OSAS*

OUAS HASTALARINDA İLAÇLA İNDÜKLENMİŞ UYKU ENDOSKOPİSİ BULGULARININ POLİSOMNOGRAFİ VE EPWORTH SKALASI SONUÇLARI İLE İLİŞKİSİ

Mustafa Sıtkı GÖZELER¹ , Yusufhan SUOĞLU² 

¹Ataturk University, Faculty of Medicine, Department of Otorhinolaryngology, Erzurum, Turkey

²Acibadem Hospital, Department of Otorhinolaryngology, Istanbul, Turkey

ORCID IDs of the authors: M.S.G. 0000-0002-9716-9579; Y.S. 0000-0002-4547-5320

Cite this article as: Gozeler MS, Suoglu Y. The connection between polysomnography results, Epworth scores and drug-induced sleep endoscopy findings in patients with OSAS. J Ist Faculty Med 2020;83(3):209-14. doi: 10.26650/IUITFD.2019.0041

ABSTRACT

Objective: To determine the usefulness of drug-induced sleep endoscopy (DISE) and evaluate correlations between DISE findings, polysomnography and Epworth sleepiness scale values.

Material and Method: Included in this study are patients with major OSAS symptoms and apnea-hypopnea index (AHI) values between 5 and 30 who were scheduled for soft palate surgery. The patients were sedated with propofol (0.25 cc/kg) in the operating room for examination of obstructive regions. Anatomical structures affected by obstruction were observed with flexible endoscopy. The images from this examination were analyzed with Ulead video study. Patients with soft palate pathologies were operated and the endoscopic examination repeated post-operatively. Changes in pre- and post-operative obstruction areas were compared with changes in pre- and post-op PSG and Epworth sleepiness scale values.

Results: Changes in retropalatal area values were correlated with changes in AHI values. The most important factor affecting this correlation was the formation of base of tongue pathology, despite being absent preoperatively. We also determined the correlation between patients' Epworth scores, AHI and retropalatal area. Changes in the retropalatal area following OSAS surgery were correlated with changes in AHI and Epworth scores.

Conclusion: DISE is an effective diagnostic technique in OSAS with advantages such as a low radiation risk, cost effectiveness and precise findings.

Keywords: Drug-induced sleep endoscopy, Obstructive sleep apnea, Epworth sleepiness scale

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada tıkaçıcı uyku apnesi sendromlu (TUAS) hastalarda ilaçla indüklenmiş uyku endoskopisinin (İİUE) önemini ortaya koymak ve İİUE bulguları ile polisomnografi ve Epworth uyku skalası sonuçları arasındaki ilişkiyi araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Çalışma prospektif olarak planlandı. Çalışmaya major TUAS semptomlarına sahip, apne-hipopne indeksi (AHI) 5 ile 30 arasında olan ve yumuşak damak cerrahisi adayı olan hastalar dahil edildi. Hastalar tıkaçıcı lezyonun muayenesi için ameliyathane şartlarında propofol ile (0,25 cc/kg) sedatize edildi. Tıkanma sonucu etkilenen anatomik yapılar fleksible endoskop ile araştırıldı. Bu muayene sonucu elde edilen görüntü Ulead video study programı ile analiz edildi. Yumuşak damak patolojisi olan hastalar opere edilerek operasyon sonrası endoskopi işlemi tekrarlandı. Operasyon öncesi ve sonrası tıkanma alanlarındaki değişim ile polisomnografi ve Epworth skalasındaki değişimler karşılaştırıldı.

Bulgular: Retropalatal alandaki değişim ile AHI değişimi korele idi. Bu korelasyonu en fazla etkileyen faktör operasyon öncesi olmayan dil kökü patolojisinin ortaya çıkması idi. Ayrıca Epworth skorları ile AHI ve retropalatal alan arasında da korelasyon tespit ettik. TUAS cerrahisi sonrası retropalatal alandaki değişim AHI ve Epworth skorundaki değişim ile korele olarak tespit edildi.

Sonuç: İİUE, TUAS hastalarında düşük radyasyon riski, ucuz olması ve değerli verileri sayesinde etkili bir tanı tekniğidir.

Anahtar Kelimeler: İlaç ile indüklenmiş uyku endoskopisi, tıkaçıcı uyku apnesi, Epworth uyku skalası

*The study was based on Mustafa Sıtkı Gozeler's specialty thesis under the supervision of Yusufhan Suoglu and was published as a poster presentation in Otolaryngology-Head and Neck Surgery in August 2010.

Corresponding author/İletişim kurulacak yazar: msgozeler@gmail.com

Submitted/Başvuru: 23.05.2019 • **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 18.09.2019 •

Last Revision Received/Son Revizyon: 19.09.2019 • **Accepted/Kabul:** 24.09.2019 • **Published Online/Online Yayın:** 21.10.2019

©Telif Hakkı 2020 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2020 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

INTRODUCTION

Sleep is an essential component of a healthy life. Although sleep is primarily a cerebral function, there has been increased understanding of its effects on respiration in recent decades (1). Sleep-related breathing disorders include various diseases that carry the risk of mortality and morbidity. The most common sleep-related breathing disorder is obstructive sleep apnea syndrome (OSAS).

OSAS is a widespread condition affecting 4% of males and 2% of females (2). The most common symptoms are snoring, witnessed apnea, and excessive daytime sleepiness caused by transient upper airway collapse. The most useful tool in the diagnosis of OSAS and in treatment planning is polysomnography (PSG). The apnea-hypoxia index (AHI), a parameter of polysomnographic evaluation, is regarded as indicating the severity of the disease. The Epworth sleepiness scale is a simple questionnaire applied to investigate eight common situations in daily life (3).

Drug-induced sleep endoscopy (DISE) has become widely used in the diagnosis of OSAS and treatment planning over the last two decades. DISE is an endoscopic examination that can be performed during sleep to visualize possible upper airway collapses and that was recommended by Croft and Pringle in 1990 (4).

The therapeutic modality of preference in the treatment of OSAS is continuous positive airway pressure (CPAP). However, various difficulties in the use of CPAP encourage patients to investigate alternative treatments (5). The most important of these are upper airway surgery, mandibular advancement, and weight loss.

The purpose of this study was to reveal the relations between DISE findings, PSG and Epworth sleepiness scale scores, and postoperative OSAS surgery outcomes in patients scheduled for upper airway surgery due to OSAS.

MATERIALS AND METHODS

Approval was granted for this prospective study by the ethical committee of Istanbul University, Faculty of Medicine. Patients scheduled for soft palate surgery due to OSAS symptoms with AHI scores between 5 and 30 were included in the study. Consent was obtained from all patients before the study began.

Physical examination with detailed history was performed in all cases. Subjects with previous history of upper airway surgery, with chronic obstructive pulmonary disease, with cardiovascular disease and contraindicated for sedation, or with anemia or hypothyroidism were excluded from the study. Body mass index (BMI) and Mallampati scores at physical examination were also recorded.

The Epworth sleepiness scale was applied to all patients

to assess the degree of daytime sleepiness, one of the major symptoms of OSAS. This questionnaire is based on scoring eight different situations widely observed in daily life. Total scores higher than 10 were regarded as significant in terms of OSAS.

All patients underwent polysomnography preoperatively and 6 months postoperatively, using a 15-channel Medilog Replay (Oxford Medical Ltd., Clearwater, FL, USA) device. Full-night parameters were collected from an electroencephalogram, electrooculogram, submental and anterior tibialis electromyogram, and electrocardiogram. AHI, desaturation index and minimum oxygen desaturation values recorded from the PSG findings were used in the study.

DISE was performed with a surgeon and an anesthetist and with the patient in the supine position in all cases. Patients received 0.25 mg atropine by the intramuscular route before the procedure in order to reduce upper airway secretions. Two puffs of lidocaine 10 mm/puff (xylocaine spray 10%, ASTRA) were administered to both nostrils to reduce the potential effects of the flexible nasopharyngoscope and thus reduce arousals to a minimum. Patients were monitored throughout the procedure, and cardiac rhythms and oxygen saturations were kept under observation. Propofol (200 mg / 20 ml flask; ABBOTT) was used to provide adequate sedation. A bolus injection of propofol 1.5-2.5 mg/kg was administered, and bolus was repeated at 25-50 mg as required. When a sufficient level of sleep had been established, a 3.5 mm flexible nasopharyngoscope (Karl Storz 11101 RP, Germany) was inserted through the nasal cavity. The nasal cavity, nasopharynx, the base of the tongue, and the larynx were then evaluated. DISE was applied with the assistance of a monitor, and the findings were recorded onto computer for analysis. The images from this examination were analyzed using Ulead video study (Corel Corporation, Canada). On the basis of the findings, appropriate surgery was decided and performed in cases with isolated soft palate pathology. All DISE examinations, calculations and surgeries were performed by the same surgeon. Patients with pathologies associated with the base of the tongue or the hypopharynx were excluded from the study. DISE was repeated in the sixth month after surgery. Changes in pre- and post-operative obstruction areas were compared with changes in pre- and post-operative PSG and Epworth sleepiness scale scores. Pre- and post-operative AHI, desaturation index, minimal oxygen saturation, Epworth scores and retro palatal region values were investigated.

Statistical analysis

SPSS 12.0 software was used for the statistical analysis of all data. The Shapiro-Wilk test was used to determine distribution of data. Student's t-test was employed for two-group comparisons of normally distributed data, and

the Mann Whitney U test was used when distribution was not normal. The chi-square test was used for the analysis of categorical data. Correlations were determined using Pearson's test. P-values <0.05 were regarded as statistically significant for all tests.

RESULTS

Forty-one patients aged 35-68 were included in the study, 30 men and 11 women. Mean preoperative AHI was 20.0 ± 5.6 . No significant difference was determined between men and women in terms of preoperative AHI ($p=0.806$). Mean preoperative BMI was 29.8 ± 2.6 , and no statistically significant difference was observed between the gender ($p=0.624$). Measurements performed with DISE revealed a mean preoperative retropalatal area of 2.7 ± 1.1 .

The mean postoperative AHI was 16.4 ± 6.3 , and the decrease in AHI values was statistically significant ($p=0.009$). The mean postoperative retropalatal region was 6.5 ± 4.8 , representing a significant increase ($p<0.001$) (Table 1).

Table 1: Pre-postoperative values

	Preoperative	Postoperative	p
AHI	20 ± 5.6	16.4 ± 6.3	0.009*
Area	2.7 ± 1.1	6.5 ± 4.8	0.000*
MOS	90.3 ± 3.8	91.4 ± 3.5	0.180

*Statistically significant

The imaging of the retropalatal region of a patient before and after the operation is given in Figure 1.

No statistically significant difference was observed between pre- and postoperative Epworth scores ($p=0.137$), but the operation-related change in Epworth scores was positively correlated with change in AHI ($r=0.524$, $p=0.000$) and negatively correlated with change in the retropalatal region ($r=-0.311$, $p=0.047$).

Significant reverse correlation was determined between operation-related change in AHI and change in the retropalatal region ($p=0.03$). These results have shown that significant enlargement in retropalatal areas postoperatively resulted in significant decreases in AHI values and Epworth scores. Correlations are given in Table 2.

While patients with isolated soft palate pathology were included in the study, those with pathologies of the base of the tongue were excluded. Follow-ups of patients undergoing soft palate surgery revealed enlargement of the retropalatal areas, but base of the tongue pathology was observed in 11 of the cases. Collapse in the base of the tongue which was not present at preoperative examination was one important factor affecting operative success. Postoperative AHI in patients with postoperatively occurred collapse in the base of the tongue was 18.7 ± 5.6 , and the change in AHI before-after surgery was determined as 2.8 ± 2.4 . These values in subjects without

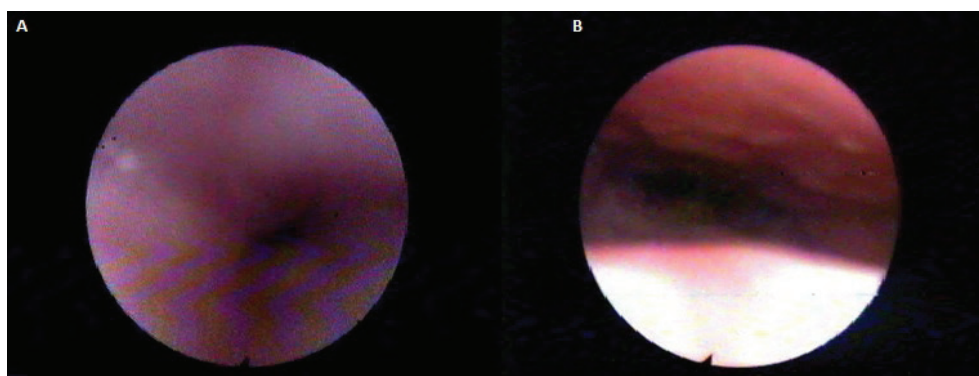


Figure 1: Enlargement of retropalatal region in a patient after surgery. A. Preoperative B. Postoperative.

Table 2: Correlations between changes in AHI, area and Epworth scores

	Changes in AHI	Changes in area	Changes in Epworth
Changes in AHI		$r=-0.323$ $p=0.039^*$	$r=0.524$ $p=0.000^*$
Changes in area	$r=-0.323$ $p=0.039^*$		$r=-0.311$ $p=0.04$
Changes in Epworth	$r=0.524$ $p=0.000^*$	$r=-0.311$ $p=0.04^*$	

*Statistically significant

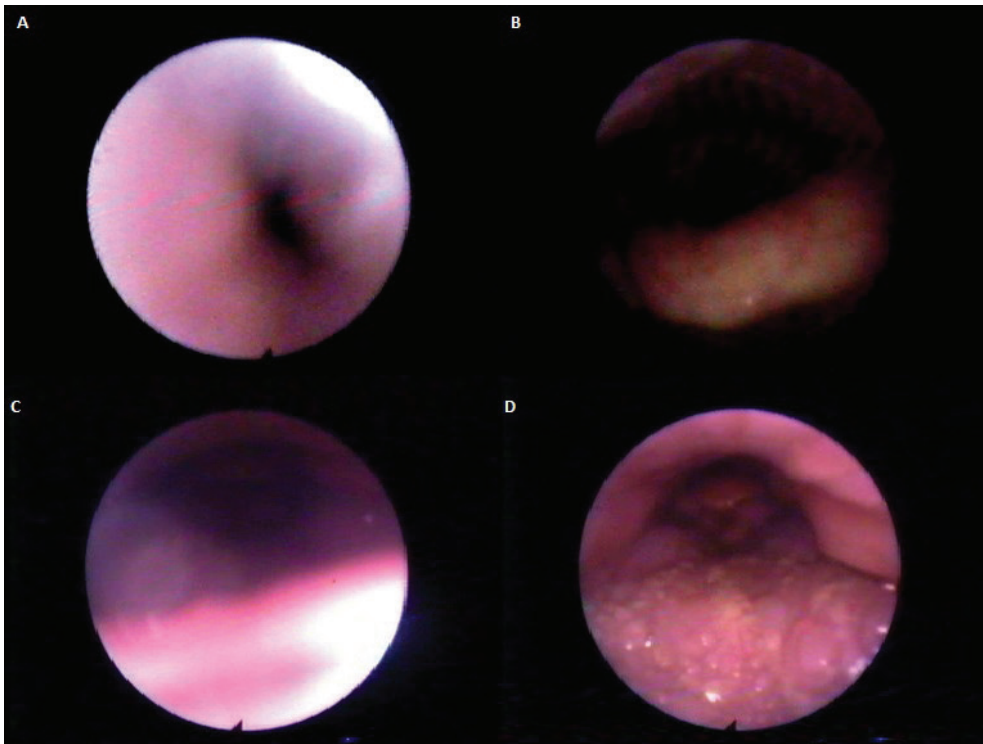


Figure 2: Preoperative and postoperative images of the retropalatal and base of tongue regions of a patient. A. Preoperatively, the retropalatal region is narrowed. B. Preoperatively, the base of tongue is normal. C. After operation there is an enlargement at the retropalatal region. D. After operation a collapse in the base of tongue occurred.

base of the tongue pathology were 15.5 ± 6.5 and 3.7 ± 3.6 , respectively. While there was no difference between preoperative retropalatal area and AHI values of the patients in the two groups, retropalatal area ($p=0.006$) and postoperative change in retropalatal area ($p=0.002$) were significantly greater in patients with base of tongue collapse, although postoperative AHI values were higher in patients with no base of the tongue pathology. Figure 2 demonstrates a patient without preoperative collapse in the base of tongue, but a collapse occurred after the operation.

DISCUSSION

The standard test in the diagnosis of OSAS is PSG, yet this is not sufficient to determine the diseased region. The areas most commonly affected in patients with OSAS are the soft palate, the lateral pharyngeal wall, and the base of the tongue. Locating the affected region is very important in terms of guiding treatment and in the selection of patients for surgery. Various tools and tests have been used for this purpose in the diagnosis of OSAS. One of the most commonly employed tests is Müller's maneuver, which helps to assess the dynamics, site, and severity of airway collapse. Some authors have suggested that it may also be useful as a predictor of surgical success (6), although its usefulness in surgical planning is

still controversial. Indeed, in their study of the effectiveness of Müller's maneuver, snoring endoscopy and DISE, Lovato et al. reported that the maneuver is less effective than DISE in determining upper airway collapse patterns (7). Similarly, Zerpa et al. described Müller's maneuver as less effective than DISE in locating the obstruction (8).

Another method used to locate the obstruction in OSAS is cephalometric analysis. This involves the measurement of cephalometric distance, angle, area, and volume between distinct reference points in bony and soft tissues on a film. It is not only used for diagnostic purposes, but also to evaluate bony and soft tissues in the preoperative period in patients scheduled for surgical therapy for OSAS. Sakat et al. employed cephalometric measurements with multislice CT in patients with OSAS and reported that cephalometry yielded significant results in terms of locating the area of obstruction in OSAS (9). However, since all these examinations are performed with the patient awake, they may still be inadequate in terms of showing the area that is actually affected during sleep. For that purpose, in 1990 Croft and Pringle developed a method for observing the upper airways during sleep (4). DISE, an endoscopic method performed to visualize collapse in the upper airway during drug-induced sleep, is reliable, dynamic, effective

and simple to perform. Operations performed with indications based on DISE findings are more effective. Better results have been reported to be capable of being achieved with upper airway surgery, particularly under conditions of grade 3-4 tonsil hypertrophy and soft palate collapse, during surgery (10). Belgü et al. compared AHI, Epworth score and DISE findings and reported that AHI scores are not effective in determining the site of collapse in the upper airways outside the base of the tongue, for which reason sleep endoscopy must be performed on all patients for whom surgical decisions are to be made (11). In our study, we compared PSG findings with Epworth score and DISE findings. Our findings also showed correlation between patients' Epworth scores, AHI and retropalatal areas, and that changes in retropalatal area after OSAS surgery were correlated with changes in AHI and Epworth scores.

Viana et al. reviewed various studies investigating the effectiveness of DISE use in locating the area of obstruction in OSAS. They concluded that DISE use is particularly effective in revealing problems in the larynx and hypopharynx region (12). Salamanca et al. investigated the use of DISE in 614 patients, the highest number to date in the literature, and reported obstruction in a single region in 61.3% of patients with AHI<15, that this single region was the oropharynx in 92.6% of cases, and that obstruction was present in more than one region in 28.2% of patients. They also reported a single obstruction in 46.5% of patients with AHI>15, that the oropharynx represented this single region at a level of 95%, and that obstruction was observed in more than one region in 53.5% of cases. In addition, they showed that the larynx also contributed to the pathology in 12.5% of patients with AHI>15 (13).

The most significant limitation of our study was the low number of cases. Another important limitation was that a particular patient population was investigated, with only OSAS patients with isolated soft palate pathology being included. However, pathologies in other areas of the upper respiratory tract are also associated with OSAS. Third, since patients were only followed-up for one year post-operatively, long-term follow-up data are not available.

CONCLUSION

DISE is an effective diagnostic technique in OSAS with advantages such as cost effectiveness and precise findings. We think that DISE in patients scheduled for surgery due to OSAS will contribute to operation selection.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the Istanbul University, Faculty of Medicine Ethics Committee.

Informed Consent: Written consent was obtained from the participants.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study- M.S.G., Y.S.; Data Acquisition- M.S.G., Y.S.; Data Analysis/Interpretation- M.S.G., Y.S.; Drafting Manuscript- M.S.G., Y.S.; Critical Revision of Manuscript- M.S.G., Y.S.; Final Approval and Accountability- M.S.G., Y.S.; Technical or Material Support- M.S.G., Y.S.; Supervision- M.S.G., Y.S.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: Authors declared no financial support.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan alınmıştır.

Bilgilendirilmiş Onam: Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- M.S.G., Y.S.; Veri Toplama- M.S.G., Y.S.; Veri Analizi/Yorumlama- M.S.G., Y.S.; Yazı Taslağı- M.S.G., Y.S.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- M.S.G., Y.S.; Son Onay ve Sorumluluk- M.S.G., Y.S.; Malzeme ve Teknik Destek- M.S.G., Y.S.; Süpervizyon- M.S.G., Y.S.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

REFERENCES

1. Kocurk O. Breathing disturbances in sleep: history, definition, spectrum and dimension of the disease (in Turkish). *Tüberküloz ve Toraks* 1998;46:187-92.
2. Amos JM, Durr ML, Nardone HC, Baldassari CM, Duggins A, Ishman SL. Systematic review of drug-induced sleep endoscopy scoring systems. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2018;158(2):240-8. [CrossRef]
3. Johns MW. A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth sleepiness scale. *Sleep* 1991;14:540-5. [CrossRef]
4. Croft CB, Pringle M. Sleep nasendoscopy: a technique of assessment in snoring and obstructive sleep apnoea. *Clin Otolaryngol* 1990;16:504-9. [CrossRef]
5. Storesund A, Johansson A, Bjorvatn B, Lehmann S. Oral appliance treatment outcome can be predicted by continuous positive airway pressure in moderate to severe obstructive sleep apnea. *Sleep Breath* 2018;22(2):385-92. [CrossRef]
6. Ko MT, Su CY. Computer-assisted quantitative evaluation of obstructive sleep apnea using digitalized endoscopic imaging with Muller maneuver. *Laryngoscope* 2008;118:909-14. [CrossRef]
7. Lovato A, Kotecha B, Vianello A, Giacomelli L, Staffieri A, Marchese-Ragona R. Nasal and oral snoring endoscopy: novel and promising diagnostic tools in OSAS patients. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2015;272(7):1793-9. [CrossRef]
8. Zerpa Zerpa V, Carrasco Llatas M, Agostini Porras G, Dalmau Galofre J. Drug-induced sedation endoscopy versus clinical exploration for the diagnosis of severe upper airway obstruction in OSAS patients. *Sleep Breath* 2015;19(4):1367-72. [CrossRef]

9. Sakat MS, Sütbeyaz Y, Yüceler Z, Kantarci M, Kilic K, Kurt S. Cephalometric Measurements with Multislice Computed Tomography in Patients with Obstructive Sleep Apnea Syndrome. *J Craniofac Surg* 2016;27(1):82-6. [\[CrossRef\]](#)
10. Wang Y, Sun C, Cui X, Guo Y, Wang Q, Liang H. The role of drug-induced sleep endoscopy: predicting and guiding upper airway surgery for adult OSA patients. *Sleep Breath* 2018;22(4):925-31. [\[CrossRef\]](#)
11. Belgü AU, Erdoğan B, San T, Gürkan E. The relationship between AHI, Epworth scores and sleep endoscopy in patients with OSAS. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2015;272(1):241-5. [\[CrossRef\]](#)
12. Viana Ada C Jr, Thuler LC, Araújo-Melo MH. Drug-induced sleep endoscopy in the identification of obstruction sites in patients with obstructive sleep apnea: a systematic review. *Braz J Otorhinolaryngol* 2015;81(4):439-46. [\[CrossRef\]](#)
13. Salamanca F, Costantini F, Bianchi A, Amaina T, Colombo E, Zibordi F. Identification of obstructive sites and patterns in obstructive sleep apnea syndrome by sleep endoscopy in 614 patients. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2013;33:261-6.

KARACİĞER KİST HİDATİĞİNDE PERİKİSTEKTOMİ: TEK MERKEZ DENEYİMİMİZ

PERICYSTECTOMY FOR LIVER HYDATID CYST: SINGLE CENTER EXPERIENCE

Kürşat Rahmi SERİN¹ , Cem İBİŞ¹ , Yaman TEKANT¹ , İlgin ÖZDEN¹ 

¹İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Karaciğer Safra Yolları Cerrahisi Birimi, İstanbul, Türkiye

ORCID IDs of the authors: K.R.H. 0000-0001-9023-9151; C.İ. 0000-0002-5602-375X; Y.T. 0000-0001-8926-7948; İ.Ö. 0000-0001-7360-628X

Cite this article as: Serin KR, Ibis C, Tekant Y, Ozden I. Pericystectomy for liver hydatid cyst: single center experience. J Ist Faculty Med 2020;83(3):215-20. doi: 10.26650/IUITFD.2020.0010

ÖZET

Amaç: Karaciğer kist hidatiğinde total perikistektomi uygulanan hastaların sonuçlarını irdelemek.

Gereç ve Yöntem: 1999-2019 yılları arasında yatırılarak tedavi edilmiş hastaların verileri incelenerek, total perikistektomi yapılan hastalar çalışmaya dahil edilmiştir.

Bulgular: Toplam 308 hastanın 32'sinde (17 kadın, 15 erkek, ortalama yaş 44 (17-73)) perikistektomi yapıldığı saptandı. Perikistektomi endikasyonları, ulaşımı kolay anatomik yerleşim (20), albendazol toksisitesi (4), albendazole cevapsız kist (4), kistik tümör kuşkusu (2), hamilelik (1) ve albendazol kullanımına uyumsuzluktu (1). Ortanca kist boyutu 75 mm (42-100), ortalama kist sayısı 1 (1-8) saptanırken, 14 hastada birden fazla kist vardı. Yirmi üç hastaya sadece total perikistektomi uygulanırken 9 hastada mevcut ek kistlere de drenaj uygulandı. Sadece perikistektomi uygulanan 23 hastadan 18'ine kapalı, 5'ine açık perikistektomi yapıldı. Perikistektomi sırasında 10 hastada ortalama 36 dk (12-78) Pringle klampajı uygulandı. Ortanca yatış süresi 6 gündü (1-60). Üç hastada düşük debili (<150 cc/gün) safra fistülü, 2 hastada karın içi enfeksiyon, 2 hastada da yüzeysel yara yeri enfeksiyonu gelişti. Sadece total perikistektomi yapılan ve ortalama 62 ay (14-236) takip edilen 20 hastanın hiçbirisinde nüks gözlenmedi.

Sonuç: Perikistektomi, deneyimli merkezde, seçilmiş hastalarda düşük morbidite ve mortalite ile uygulanmaktadır. Nüks riskinin de düşük olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ekinokok, hepatektomi, radikal cerrahi, albendazol

ABSTRACT

Objective: To analyze the results of total pericystectomy in hepatic hydatid disease.

Material and Method: The data of patients who underwent total pericystectomy between 1999-2019 was evaluated.

Results: Of 308 patients treated as in-patients, 32 (17 females-15 males) were found to have had total pericystectomy. Median age was 44 (range:17-73) years. Indications were: easily accessible anatomic location (20), albendazole toxicity (4), unresponsiveness to albendazol treatment (4), tumor suspicion (2), pregnancy (1) and nonadherence to albendazole use (1). Median cyst diameter was 75 mm (42-100), median cyst number was 1 (1-8). Fourteen patients had more than one cyst. Total pericystectomy alone was performed in 23 patients, while additional cysts were treated in a further 9. Of the 23 pericystectomy only patients, 18 received closed and 5 open pericystectomy. Median 36 minutes (12-78) Pringle clamping was performed in 10 patients. Median hospital stay was 6 days (1-60). Low output (<150 cc/day) bile fistula was seen in 3 patients, intraabdominal infection in 2 patients and superficial infection in 2 patients. No recurrence was observed during a median follow-up of 62 months (14-236) in 20 pericystectomy only patients.

Conclusion: Pericystectomy can be performed with low morbidity and mortality in an experienced center. Recurrence risk is reduced in comparison with conservative surgery.

Keywords: Echinococcus, hepatectomy, radical surgery, albendazol

İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: krserin@istanbul.edu.tr

Başvuru/Submitted: 30.01.2020 • **Kabul/Accepted:** 18.02.2020 • **Online Yayın/Published Online:** 09.03.2020

©Telif Hakkı 2020 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2020 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

GİRİŞ

Karaciğer kist hidatiği tedavisinin temeli cerrahidir; yapılan ameliyatlar, konservatif yöntemlerden majör karaciğer rezeksiyonuna kadar uzanan geniş bir yelpazeyi kapsamaktadır (1, 2). Ameliyatların çoğunluğu karaciğer-safra yolları cerrahisi alanında uzman olmayan genel cerrahlar tarafından yapıldığı için, konservatif yöntemler daha sık tercih edilmektedir (3-6). Konservatif yöntemlerde kist içeriği boşaltılır ve kavite skolosidal ajan ile muamele edilir. Perioperatif dönemde albendazol kullanımının da nüks oranını azalttığı bildirilmiştir (7-9). Seçilen yöntemle göre, geride kalıntı kavite bırakılmasının oluşturacağı enfeksiyon ve safra kaçağı riskini azaltmak için kaviteyi küçültücü (kist duvarının parsiyel eksizyonu sonrası kapatılması) veya içeriğini doldurucu (omentoplasti) yöntemler kullanılmaktadır (3, 6). Radikal yöntemler ise, kistin karaciğer içi ana anatomik yapılarla ilişkisine göre, perikistektomi veya karaciğer rezeksiyonudur. Bu yöntemlerin avantajları geride kavite kalmaması, ameliyat sonrasında medikal tedavi gereksinimini ortadan kaldırması ve nüks riskinin düşük olmasıdır. Dezavantajları ise uygulanan cerrahinin daha karmaşık, uzun ve riskli olması ve rezeksiyonun karaciğer parenkim kaybı yaratmasıdır (5, 10, 11).

Birimimize sevk edilen hastalar öncelikle perikistektomiye uygunluk açısından değerlendirilmektedir. Perikistektomi deneyimimiz olumlu olup (12), uygun hastalarda seçkin tedavi yöntemi olarak önerilmiştir.

Bu çalışmada, karaciğer cerrahisinde son 20 yıldaki gelişmeler ışığında total perikistektomi uygulanan hastaların erken ameliyat sonrası ve uzun dönem izlem sonuçlarının sunulması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

1999-2019 yılları arasında İstanbul Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Karaciğer Safra Yolları Cerrahisi Birimi'nde tedavi edilmiş karaciğer kist hidatiği hastalarının dosyaları geriye dönük olarak incelendi. Total perikistektomi yapılan hastalar demografik verileri, klinik ve radyolojik bulguları, laboratuvar değerleri, cerrahi uygulamaları, yatış süresi, komplikasyonlar, adjuvan tedavi uygulaması ve uzun dönem izlemde nüks gelişimi açısından irdelendi. Ameliyat sonrası görülen komplikasyonlar Clavien-Dindo sınıflamasına göre bildirildi (13). Tüm hastalardan aydınlatılmış onam alınmış ve çalışma Helsinki bildirgesinde belirtilen kurallara uygun olarak yapılmıştır.

Evreleme ve yaklaşım

Kliniğimizde tüm hastalar radyolojik bulguları ile Gharbi evreleme sistemine göre evrelenmektedir (14). Genel yaklaşım evre 1-2 kistlerin öncelikle medikal tedavi ve perkütan girişimler için değerlendirilmesi, evre 3-4 olanların ise cerrahi olarak tedavi edilmeleridir. Ancak girişim

endikasyonu olan ve perikistektomi ile güvenle çıkarılabileceği düşünülen evre 1-2 kistler de cerrahi adayı olabilmekte, evre 5 kistler ise inaktif kabul edildiklerinden herhangi bir tedavi gereği görülmemektedir.

Perikistektomi

Majör vasküler yapılardan uzak (özellikle hepatik venlerden), anatomik olarak ulaşımı kolay lezyonlar (subkapsüller, ön-aşağı segment yerleşimli) ve majör cerrahi için risk oluşturan ek hastalığı olmayan hastalar perikistektomi adayı olarak değerlendirilmektedir. Ameliyat sırasında karaciğer pedikülü askıya alınarak, gereğinde Pringle manevrası uygulamasına hazırlanılmaktadır. Kist eksizyonu aşamasında karaciğer parenkimi ultrasonik disektör veya klamp ile ezilerek kist sınırından diseksiyon uygulanmakta, ayrıştırılan vaskülo-biliyer yapılar bağlanarak kesilmektedir. Saçılma olursu ekilmeyi engellemek amacıyla ameliyat öncesi 15 günden daha kısa olmamak üzere ve tercihen 1 ay süresince hastalara 10 mg/kg/gün albendazol tedavisi verilmektedir. Kist içeriği ile karın içi organlar ve karın duvarı kontamine olduğunda (açık perikistektomi), tedaviye ameliyat sonrası dönemde de 3 aydan daha kısa olmamak üzere devam edilmektedir.

Takip

Ameliyat sonrası albendazol tedavisi devam eden hastalar toksisite takibi yönünden tedavi süresince aylık biyokimya tetkikleri ile (kan sayımı ve karaciğer fonksiyon testleri), diğer tüm hastalar yıllık biyokimya ve görüntüleme (ultrasonografi (US), bilgisayarlı tomografi (BT) veya manyetik rezonans görüntüleme (MR)) yapılarak takip edilmektedir.

BULGULAR

Çalışma döneminde kliniğimizde tedavi edilen 308 karaciğer kist hidatiği hastasının 32'sine perikistektomi uygulanmış olduğu saptandı. Hastaların 17'si kadın, 15'i erkek ve ortalama yaş 44 idi (aralık 17-73). Başvuruda en sık şikâyet 19 hastada görülen karın ağrısı idi (Tablo 1). İki hasta akciğer, bir hasta beyin ve akciğer kist hidatiği tanısı ile ameliyatlı idi. Bu hastaların karaciğer girişimleri sırasında diğer vücut bölgelerinde nüks hastalıkları yoktu.

US ile tanı alan her hastaya ameliyat planlaması amacıyla en az bir aksiyel görüntüleme yöntemi kullanıldı. Altı hastada sadece BT, 5 hastada ise sadece MR ile ameliyat planı yapıldı. Yirmibir hastada ise birden fazla görüntüleme yöntemi kullanıldı; ikinci kesitsel görüntüleme yöntemine başvurulmasının ana sebebi, hastanın başvuru sırasında mevcut filmlerin yetersiz oluşuydu (Tablo 1).

Perikistektomi için en sık endikasyon anatomik olarak ulaşımı kolay yerleşimli kist varlığıydı (Tablo 3). Yirmi dört hastada ameliyat öncesi 10 mg/kg albendazol, ortalama 2 ay (sınırlar: 15 gün-6 ay) süresince verildi.

Tablo 1: Hasta demografik verileri ve tanısal bulgular.

	n (32)
Yaş	44 (17-73)
Cinsiyet	
Kadın	17 (%53)
Erkek	15 (%47)
Klinik	
Karın ağrısı	19
Kolanjit	4
Asemptomatik	6
Diğer	3
Görüntüleme yöntemi	
BT	6
MR	5
US+BT	9
US+MR	3
BT+MR	7
US+BT+MR	2

Ortanca kist boyutu 75 mm (sınırlar: 42-100) idi. Ortanca kist sayısı 1 (sınırlar: 1-8) olarak saptanırken, 14 hastada birden fazla sayıda kist mevcuttu. Kistlerin en sık yerleşim yeri 6-7.segmentti (19 hasta). İki hastada laparoskopik olmak üzere toplam 23 hastaya sadece total perikistektomi (toplam 25 lezyona; 2 hastada 2 lezyona) yapıldı. Çoğul kistleri olan, 9 hastanın bir kistine total perikistektomi, diğer kistlerine konservatif cerrahi yöntemler uygulandı. Kistlerin özellikleri ve cerrahi tedavi sonuçları tablo 2'de verilmiştir.

Albendazol toksisitesi olan 4 hasta ile kolanjit bulguları olan 4 hastanın transaminaz düzeyleri ve her iki gruptan ikiser hastanın kolestaz enzimleri yüksekti. Diğer hastaların karaciğer enzimi düzeyleri normal sınırlar içindeydi. Kolanjit hikayesi olan her 4 hastanın aynı zamanda görüntülemelerinde de safra yolu iştiraki kuşkusu olduğundan ameliyat öncesi endoskopik retrograd kolanjiografi ve sfinkterotomi yapıldı, iki hastada safra yolundan kist hidatik membranı kalıntısı çıkarıldı. Diğer iki hastanın kistlerinin safra yolları ile iştiraki görüntülenemedi.

Sadece perikistektomi yapılan 23 hastadan 18'ine kapalı, 5'ine ise açık perikistektomi uygulandı. Kapalı perikistektomi uygulanan 18 hastanın 2'sinde anatomik ulaşımı kolay olan kistlerine laparoskopik perikistektomi yapıldı (Resim 1). İki hastada ameliyat sırasında kist ile majör safra yolu iştiraki görüldüğü için ameliyata koledok eksplorasyonu ve T-tüp ile drenaj eklendi. Perikistektomi sırasında 10 hastaya peroperatif kanama kontrolü amacıyla ortanca 36 dk (sınırlar: 12-78) Pringle manevrası uygulandı.

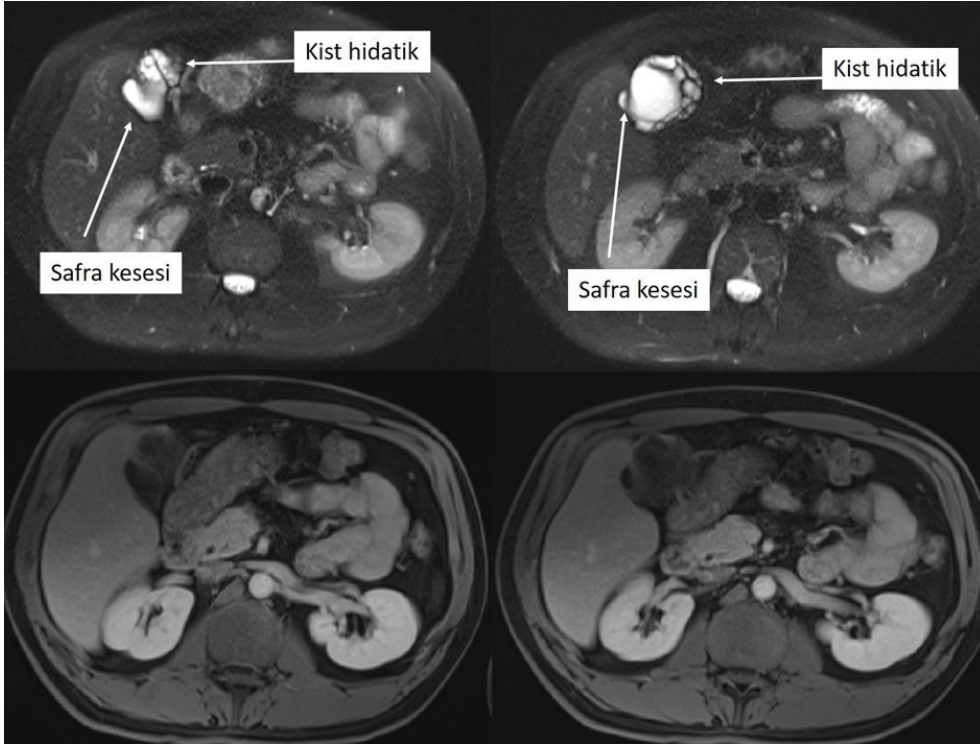
Tablo 2: Hidatik kistlerin özellikleri ve cerrahi tedavi sonuçları.

	n
Kist boyutu (ortanca)	75 mm (42-100)
Kist sayısı	
Tek	18
>1 adet	14
Kist yerleşim yeri	
Sağ lob	15
Sol lob	8
Bilober	9
Gharbi evresi	
Evre 1	1
Evre 2	4
Evre 3	16
Evre 4	11
Cerrahi girişim	
Perikistektomi	23
(+) Ek kist drenajı	9
Pringle manevrası	36 dakika (12-78)
Komplikasyonlar	
Kanama	1
Safra fistülü	3
Karın içi enfeksiyon	2
Yüzeysel enfeksiyon	2

Tablo 3: Perikistektomi endikasyonları.

Endikasyon	n	%
Ulaşımı kolay anatomik yerleşimli kist	20	63
Albendazol toksisitesi	4	12,5
Albendazole cevapsız kist hidatik	4	12,5
Kistik tümör kuşkusu	2	6
Albendazol kullanamayan hasta (hamilelik)	1	3
Albendazol kullanımına uyumsuzluk	1	3

Hastanede ortanca yatış süresi 6 gün olarak saptandı (sınırlar: 1-60). Ameliyat sonrası dönemde 3 hastada düşük debili safra fistülü (<150 cc/gün), 2 hastada karın içi enfeksiyon, 2 hastada da yüzeysel yara yeri enfeksiyonu gelişti. Batın içi kanama gelişen diğer bir hastaya 4 eritrosit süspansiyonu ve 3 taze donmuş plazma verilerek konservatif iyileşme sağlandı. Karın içi enfeksiyon gelişen hastalardan biri perkütan drenaj+antibiyotik, diğeri ise antibiyotik te-



Resim 1: Sol lobda safra kesesi ile komşu evre 3 kist hidatik; safra kesesi ile enblok laparoskopik olarak perikistektomi yapıldı.

davisi ile iyileşti. Safra fistülü gelişen her 3 hasta da konservatif izlem ile iyileşti (sınırlar: 14-25 gün), hiçbirinde ek girişim gereği olmadı. Açık perikistektomi uygulanan 5 hastada ameliyat sonrası dönemde ortanca 3 ay (sınırlar: 1-6) süreyle albendazol tedavisine devam edildi.

Sadece total perikistektomi yapılan 23 hastadan 2'si izlem dışı kaldı. Ağır kolanjit tablosunda, kist hidatik + periampuller tümör tanıları ile acil ameliyata alınan hastaya laparotomi eksploratis + perikistektomi + kolesistektomi + koledokotomi + koledok eksplorasyonu + T tüp drenaj yapıldı. Septik şoktan çıkan hasta 3 ay sonra ameliyata alındığında karsinoz peritoneal saptandı, 1 yıl sonra da kaybedildi. Kalan 20 hastada ortanca 62 ay takipte (sınırlar: 14-236) nüks kist hidatik gelişmedi.

Perikistektomi ile beraber ek kistlerine drenaj yapılan 9 hastaya adjuvan albendazol tedavisi verildi. Bu hastalardan da sadece birinde ameliyatının ikinci yılında drene edilen kist alanı dışında kalan karaciğer parenkiminde nüks kist hidatik gelişti. Ameliyat öncesi yapılan görüntülemelerinde bu alanda sorun görülmeyen hastanın nüks lezyonunun radyolojik olarak gösterilemediği için tedavinin etkisiz kaldığı mikroskobik bir odaktan geliştiği düşünüldü.

Uzun dönem izlemde ise, 5 hastada kesi fıtığı, 1 hastada da ameliyatının 5. yılında bridlere bağlı olduğu düşünülen subileus atağı gelişti, konservatif izlem ile iyileşti.

TARTIŞMA

Tedavisiz kalan aktif (canlı skoleks barındırdığı düşünülen) hidatik kist büyüyeceğinden ve düşük oranda olsa da ciddi / ölümcül komplikasyonlara sebep olabileceğinden tedavi edilmesi gerekir (1). Medikal tedavi ile kür şansı yaklaşık %30'dur (2, 15-18). Albendazol ile tedavinin ana kist içerisindeki skoleksleri öldürmekte başarılı olduğu ancak kız kistler içerisine etkisinin kısıtlı olduğu bildirilmiştir (9). Seçilmiş hastalar için (özellikle Gharbi evre 1 ve 2) girişimsel radyolojik yöntemler uygulanabilirse de tedavinin temelini cerrahi oluşturur (19). Radikal ameliyatlara (perikistektomi, karaciğer rezeksiyonu) morbidite ve mortalite riski daha yüksek, teknik olarak daha zor girişimler olduğundan konservatif ameliyatlara (basit kist drenajı ve kavite obliterasyonu yöntemleri) daha çok tercih edilmektedir (2). Ancak bu yöntemlerde de nüks (>%10) ve kalıntı kavite ile ilgili komplikasyon riski (>%25) mevcuttur (2, 3, 6, 10, 20). Serimizde de cerrahi tedavi uygulanan hastaların büyük çoğunluğunda konservatif yöntemler tercih edilmiş, ancak %11'inde (n=32) perikistektomi uygulanmıştır.

Güncel teknolojinin karaciğer cerrahisine uygulanması sonucu laparoskopik girişim sayısının artmasıyla, özellikle ulaşımı kolay olan inferiyör-anteryör segmentlerde yüze-yakın yerleşimli kistlerin laparoskopik tedavisi mümkün

hale gelmiştir (21). Bizim de 23 hastamızın 2'sinde sol lob yerleşimli kistler laparoskopik perikistektomi ile çıkarılmıştır (Resim 1).

Hasta seçiminde anatomik ulaşımın kolaylığı kadar anatomik oluşumlar ile olan iştiraki de dikkate alınmalıdır (2). Majör damarlarda (özellikle portal ven-hepatik ven) veya safra kanalında tıkanıklık o segment veya lobda atrofiye sebep olurken diğer segmentler veya karşı lobda da hipertrofi sebebi olabilmektedir. Atrofi-hipertrofi kompleksi olarak adlandırılan bu durum ile karşılaşılan vakalarda kistin büyük damarlar veya safra kanalı ile iştirakli olması olasılığı akılda tutulmalıdır (22). Bizim serimizde de tüm hastalar kontrastlı BT veya MR ile kistin ana vasküler yapılar ile olan iştiraki açısından değerlendirilmiş, atrofi-hipertrofi kompleksi görülen hiçbir hastaya perikistektomi uygulanmamıştır.

Kist hidatik cerrahisinde ameliyat sonrası yüksek ortanda enfeksiyon kökenli komplikasyon görülmektedir. Kistin kalın ve sert çeper ile sınırlı olması, çok odacıklı olabmesinin kolaylaştırdığı ölü boşluk oluşumu bu riski artırmaktadır. Konservatif yöntemler sonrası ameliyata bağlı olarak hastaların %50'ye yakınında komplikasyon görülürken, radikal cerrahi ile ölü boşluk oluşumu bertaraf edildiğinden komplikasyon oranının daha düşük olduğu bildirilmiştir (2, 6, 10). Bizim serimizde de sadece total perikistektomi uygulanan 23 hastanın 5'inde (%22) grad 3 komplikasyon görülürken, hiçbirisine ikinci cerrahi girişim gerekmedi. Yalnızca bir hastada perkütan girişimle karın içi abse drenajı yapıldı.

Uygulanacak tedavinin komplikasyon ve mortalite riskinin yanı sıra, göz önünde bulundurulması gereken bir diğer sorun da hastalığın uzun dönemde nüks etme olasılığıdır. Konservatif ameliyatlar sonrası nüks oranı %10-30 arasında bildirilmişken, radikal ameliyatlardan sonra bu oran %5'den azdır (2, 12, 16, 23). Medikal tedavinin radikal cerrahi girişimler sonrası devamı ise tartışmalıdır. Literatür ile uyumlu şekilde, kliniğimizin perikistektomi sonrası nüks ile ilgili verileri, çok olumludur.

SONUÇ

Karaciğer kist hidatiği tedavisinde radikal cerrahi girişimlerin uygulanmasını kısıtlayan en önemli sorun ameliyat sonrası gelişebilecek ağır komplikasyonlar ve bunlara bağlı mortalitedir. Serimizde uygun hasta seçimi, ameliyat öncesi değerlendirme ve hazırlıkların iyi yapılması ile düşük morbidite ve mortalite ile perikistektomi uygulanabileceği gösterilmiştir. Bu yöntemle geride kist kavitesi bırakılmasının, muhtemel komplikasyonlardan korunma sağlanması yanı sıra, nüks riskini de düşürdüğü saptanmıştır.

Bilgilendirilmiş Onam: Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- K.R.S., C.İ., Y.T., İ.Ö.; Veri Toplama- K.R.S., C.İ., Y.T., İ.Ö.; Veri Analizi/Yorumlama- K.R.S., C.İ., Y.T., İ.Ö.; Yazı Taslağı- K.R.S., C.İ., Y.T., İ.Ö.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- K.R.S., C.İ., Y.T., İ.Ö.; Son Onay ve Sorumluluk- K.R.S., C.İ., Y.T., İ.Ö.; Süpervizyon- C.İ., Y.T., İ.Ö.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

Informed Consent: Written consent was obtained from the participants.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study- K.R.S., C.İ., Y.T., İ.Ö.; Data Acquisition- K.R.S., C.İ., Y.T., İ.Ö.; Data Analysis/Interpretation- K.R.S., C.İ., Y.T., İ.Ö.; Drafting Manuscript- K.R.S., C.İ., Y.T., İ.Ö.; Critical Revision of Manuscript- K.R.S., C.İ., Y.T., İ.Ö.; Final Approval and Accountability- K.R.S., C.İ., Y.T., İ.Ö.; Supervision- C.İ., Y.T., İ.Ö.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: Authors declared no financial support.

KAYNAKLAR

1. Abdelraouf A, El-Aal AA, Shoeib EY, Attia SS, Hanafy NA, Hassani M, et al. Clinical and serological outcomes with different surgical approaches for human hepatic hydatidosis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2015;48(5):587-93. [CrossRef]
2. Goja S, Saha SK, Yadav SK, Tiwari A, Soim AS. Surgical approaches to hepatic hydatidosis ranging from partial cystectomy to liver transplantation. *Ann Hepatobiliary Pancreat Surg* 2018;22(3):208-15. [CrossRef]
3. Sayek I, Yalın R, Sanaç Y. Surgical treatment of hydatid disease of the liver. *Arch Surg* 1980;115:847-50. [CrossRef]
4. Dziri C, Haouet K, Fingerhut A. Treatment of hydatid cyst of the liver: where is the evidence? *World J Surg* 2004;28(8):731-6. [CrossRef]
5. Yagci G, Ustunsoz B, Kaymakcioglu N, Bozlar U, Gorgulu S, Simsek A, et al. Results of surgical, laparoscopic, and percutaneous treatment for hydatid disease of the liver: 10 years experience with 355 patients. *World J Surg* 2005;29(12):1670-9. [CrossRef]
6. Chautems R, Buhler L, Gold B, Chilcott M, Morel P, Mentha G. Long term results after complete or incomplete surgical resection of liver hydatid disease. *Swiss Med Wkly* 2003;133(17-18):258-62.
7. Shams-Ul-Bari, Arif SH, Malik AA, Khaja AR, Dass TA, Naikoo ZA. Role of albendazole in the management of hydatid cyst liver. *Saudi J Gastroenterol* 2011;17(5):343-7. [CrossRef]
8. Franchi C, Di Vico B, Teggi A. Long-term evaluation of patients with hydatidosis treated with benzimidazole carbamates. *Clin Infect Dis* 1999;29(2):304-9. [CrossRef]
9. Arif SH, Shams-Ul-Bari, Wani NA, Zargar SA, Wani MA, Tabassum R, et al. Albendazole as an adjuvant to the standard surgical management of hydatid cyst liver. *Int J Surg* 2008;6(6):448-51. [CrossRef]

10. Buttenschoen K, Carli Buttenschoen D. Echinococcus granulosus infection: the challenge of surgical treatment. *Langenbecks Arch Surg* 2003;388(4):218-30. [\[CrossRef\]](#)
11. Asenov Y, Akin M, Ibiş C, Tekant Y, Özden I. Observed or Predicted Albendazole Hepatotoxicity as an Indication for a Resection Procedure in Hepatic Hydatid Disease- A Short Series of Cases. *Chirurgia (Bucur)* 2019;114(4):522-7. [\[CrossRef\]](#)
12. Bilge O, Özden İ, Birsel Y, Tekant Y, Acarlı K, Alper A, et al. The role of total pericystectomy in hepatic hydatidosis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1997;4:212-4. [\[CrossRef\]](#)
13. Dindo D, Demartines N, Clavien PA. Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. *Ann Surg* 2004;240(2):205-13. [\[CrossRef\]](#)
14. Gharbi HA, Hassine W, Brauner MW, Dupuch K. Ultrasound examination of the hydatid liver. *Radiology* 1981;139(2):459-63. [\[CrossRef\]](#)
15. Horton RJ. Chemotherapy of Echinococcus infection in man with albendazole. *Trans of Roy Soc of Trop Med Hyg* 1989;83:97-102. [\[CrossRef\]](#)
16. Gomez I Gavara C, López-Andújar R, Belda Ibáñez T, Ramia Ángel JM, Moya Herraiz Á, Orbis Castellanos F, et al. Review of the treatment of liver hydatid cysts. *World J Gastroenterol* 2015;21:124-31. [\[CrossRef\]](#)
17. Kapan S, Turhan AN, Kalayci MU, Alis H, Aygun E. Albendazole is not effective for primary treatment of hepatic hydatid cysts. *J Gastrointest Surg* 2008;12(5):867-71. [\[CrossRef\]](#)
18. Brunetti E, Kern P, Vuitton DA; Writing Panel for the WHO-IWGE. Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Acta Trop* 2010;114:1-16. [\[CrossRef\]](#)
19. El Sheikh A, Al Malki A, El Shiekh MA, Al Robayan A. Non-surgical management in 336 patients of hydatid disease: 23 years experience at Riyadh Military Hospital. *Hepatogastroenterology* 2011;58(106):336-46.
20. Sielaff TD, Taylor B, Langer B. Recurrence of hydatid disease. *World J Surg* 2001;25(1):83-6. [\[CrossRef\]](#)
21. Alper A, Emre A, Acarlı K, Bilge O, Ozden I, Ariogul O. Laparoscopic treatment of hepatic hydatid disease. *J Laparoendosc Surg* 1996;6(1):29-33. [\[CrossRef\]](#)
22. Karabulut K, Ozden I, Poyanlı A, Bilge O, Tekant Y, Acarlı K, et al. Hepatic atrophy-hypertrophy complex due to Echinococcus granulosus. *J Gastrointest Surg* 2006;10(3):407-12. [\[CrossRef\]](#)
23. Vennarecci G, Manfredelli S, Guglielmo N, Laurenzi A, Goletti D, Ettore GM. Major liver resection for recurrent hydatid cyst of the liver after suboptimal treatment. *Updates Surg* 2016;68(2):179-84. [\[CrossRef\]](#)

THE ROLE OF GASTRIC LOCALIZATION AND THE GASTRITIS SCORE OF HELICOBACTER PYLORI IN THE DEVELOPMENT OF EROSIVE ESOPHAGITIS

EROZİV ÖZOFAJİT GELİŞİMİNDE HELICOBACTER PYLORI'NİN GASTRİK LOKALİZASYONUNUN VE GASTRİT SKORUNUN ROLÜ

Serkan YALAKI¹ , Hüseyin PULAT² 

Mersin City Training and Research Hospital, ¹Department of Gastroenterology, ²Department of General Surgery, Mersin, Turkey

ORCID IDs of the authors: S.Y. 0000-0001-8137-0924; H.P. 0000-0003-0635-3387

Cite this article as: Yalaki S, Pulat H. The role of gastric localization and the gastritis score of Helicobacter Pylori in the development of erosive esophagitis. J Ist Faculty Med 2020;83(3):221-6. doi: 10.26650/IUITFD.2019.0085

ABSTRACT

Objective: The interactions between Helicobacter pylori (Hp) and gastroesophageal reflux disease (GERD) are a complex issue. The aim of this study was to investigate the correlation between Hp infection and the gastric localization of Hp and reflux esophagitis (RE) in adult patients.

Material and Method: Two hundred thirty-nine patients with RE were compared with 229 age and sex matched participants in a control group. Biopsy specimens obtained from the gastric antrum and corpus were histologically evaluated.

Results: The prevalence of Hp infection was significantly lower in the patients with RE than in the control group (Odds ratio 1.56, 95% CI 1.08-2.27; $p=0.02$, $p<0.05$). Hp colonization in the corpus and gastritis scores in the corpus were significantly lower in the esophagitis group ($p=0.01$, $p<0.05$), but there was no significant difference in Hp colonization in the antrum and gastritis scores in the antrum. It was found that Hp colonization and gastritis score in the corpus showed a negative correlation with esophagitis development.

Conclusion: This study demonstrated that the prevalence of Hp infection and corpus gastritis score were significantly lower in patients with erosive reflux esophagitis than in the control group. Furthermore, it demonstrated that Hp colonization and corpus gastritis score were negatively correlated with esophagitis development.

Keywords: Helicobacter pylori, Reflux esophagitis, GERD, Corpus dominant gastritis

ÖZET

Amaç: Helicobacter pylori (Hp) enfeksiyonu ve gastroözofageal reflü hastalığı (GÖRH) dünya çapında yaygın hastalıklardır. Hp ve GÖRH arasındaki etkileşim ise karmaşık bir konudur. Bu çalışmanın amacı erişkin hastalarda Hp enfeksiyonu ve Hp'nin gastrik lokalizasyonu ile reflü özofajit arasındaki ilişkiyi araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Reflü özofajit tanılı 239 hasta, 229 yaş ve cinsiyet uyumlu kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Gastrik antrum ve korpus elde edilen biyopsi örnekleri histolojik olarak değerlendirildi. Enflamasyon, aktivite ve Hp kolonizasyonunun ciddiyeti, 0 (hiçbiri) ile 3 (en ağır) arasında skorlandı. Enflamasyon ve aktivite skorları toplandı ve gastrit skoru olarak ifade edildi.

Bulgular: Hp enfeksiyonu prevalansı RE'li hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşüktü (olasılık oranı 1,56 %95 güven aralığı 1,08-2,27; $p=0,02$, $p<0,05$). Korpusdaki Hp kolonizasyonu özofajit grubunda anlamlı derecede düşüktü, fakat antrumda Hp kolonizasyonunda anlamlı bir fark yoktu (sırasıyla $p=0,01$, $p<0,05$ ve $p=0,09$, $p>0,05$). Korpusdaki Hp kolonizasyonu ve gastrit skorunun özofajit gelişimi ile negatif korelasyon gösterdiği, antrum ve gastrit skorundaki Hp kolonizasyonunun özofajit ile korelasyon göstermediği bulundu.

Sonuç: Sonuç olarak, bu çalışmada Hp enfeksiyonu ve korpus gastrit skoru sıklığının, eroziv reflü özofajit hastalarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, Hp kolonizasyonu ve korpus gastrit skorunun özofajit gelişimi ile negatif korele olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Helicobacter pylori, Reflü özofajit, GÖRH, Korpus dominant gastrit

Corresponding author/İletişim kurulacak yazar: serkanyalaki@hotmail.com

Submitted/Başvuru: 21.10.2019 • **Accepted/Kabul:** 27.02.2020 • **Published Online/Online Yayın:** 24.06.2020

©Telif Hakkı 2020 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2020 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

INTRODUCTION

Gastroesophageal reflux disease (GERD) is characterized by the presence of reflux symptoms caused by damage to the esophageal mucosa or abnormal backflow of gastric content into the esophagus. Although it is common in Western societies, in recent years, GERD has become more prevalent in Asian populations, which may be associated with numerous factors such as increased Western dietary habits, advanced age, male gender, obesity, increased gastric acid secretion and reduced *Helicobacter pylori* (Hp) infection (1, 2). The acidity of reflux content (ie pH<4) is a very important risk factor in the development of esophageal mucosal damage (3).

Hp is a type of bacteria that commonly colonizes the inner surface of the stomach. Hp infection is considered an important risk factor for the development of gastric and duodenal ulcers. Hp infection has also been shown to be associated with the development of chronic active gastritis, gastric atrophy, gastric metaplasia, dysplasia and gastric malignancies (ie gastric carcinoma, gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma). There is strong evidence that eradication is important for the treatment of Hp-related diseases (4).

Both Hp infection and GERD are common diseases worldwide and the relationship between the two diseases is a very complex issue. There are various pathophysiological factors in the development of GERD and Hp infection may be only one of them. Many studies accentuate the coexistence of Hp infection and GERD. The acidity of reflux content is an important factor in the pathophysiology of reflux esophagitis (RE). Hp infection may increase or decrease acid secretion depending on the type of gastritis caused, so Hp infection can be a factor or protective factor contributing to the development of GERD. Gastritis and inflammation in the corpus cause hypoacidity, while antral gastritis and inflammation have the opposite effect. Hyperacidity caused by antral gastritis can be responsible for the development of duodenal ulcers and GERD, thus an improvement in pre-existing RE may occur after Hp elimination. Hp infection in adults usually causes corpus-associated gastritis, which may result in the development of atrophic gastritis. Atrophic gastritis may provide protection against GERD due to hypoacidity. Pangastritis is usually associated with CagA strains of Hp, causing more severe gastric inflammation. This intense inflammation may also result in gastric atrophy. In the case of Hp-positive corpus gastritis, pangastritis and atrophic gastritis in the stomach, the expectation is that RE is exacerbated if Hp is eliminated (5-12).

The aim of this study was to investigate the correlation between RE and gastric localization of Hp and the score of gastritis caused by Hp infection in adult patients.

MATERIALS AND METHODS

The records of 3850 patients who underwent endoscopy between December 2017 and March 2019 in the endoscopy unit of territory hospital were retrospectively reviewed. Of the scanned group, there were 284 patients with RE. The inclusion criteria were established to include patients with biopsy specimens taken from the antrum and corpus. The exclusion criteria were determined as follows: those with upper gastrointestinal malignancy, gastric outlet obstruction, previous gastric surgery, hiatal hernia, and obese individuals (BMI>30). The study group was created with 239 patients with RE who met these criteria. The Los Angeles classification system was used to describe the presence and severity of GERD. RE was confirmed by endoscopy according to a 5 grade severity scale. The control group consisted of age- and sex-matched patients (226 patients) randomly selected from the non-esophagitis group who underwent endoscopy.

Ethics committee approval was received for this study from the ethics committee of our hospital.

Histology

Biopsy specimens acquired from gastric antrum and corpus were evaluated histologically. The intensity of inflammation, activity and Hp colonization was scored from 0 (none) to 3 (severe) according to the updated Sydney system. The gastritis score was found by adding the inflammation and activation scores of the patients (13). The presence of Hp in any specimen in the biopsy reports was considered as positive.

Statistical analysis

The results were analyzed with SPSS (version 22 SPSS, Chicago, Illinois USA) software. Descriptive statistics were used to report the prevalence of the distribution of age, sex and of endoscopic-pathological findings in the groups. The Student's t test was applied for parametric rates between the independent groups. The Chi-square test or Mann-Whitney U test was used for the statistical analysis between the endoscopic data and pathology findings. Correlation analyses were carried out for the correlation between the results. A p value of <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

There were 239 patients (138 males (57.7%), 101 females (43.3%)) in the study group and 226 patients (128 males (56.6%), 98 females (43.4%)) in the control group. The mean ages in the study and control groups were 49.37 (SD±14.48 years) and 49.09 (SD±14.85 years) years, respectively. There was no statistically substantial distinction between two groups in terms of age (p=0.22, p>0.05) and gender (p=0.63, p>0.05) (Table 1).

Table 1: Descriptive statistics of groups.

	Study group	Control group	p
n	239	226	
Age	49.37 (SD±14.48)	49.09 (SD±14.85)	(p=0.22, p>0.05)
Gender	138 Male (%57.7) 101 Female (%43.3)	128 Male (%56.6) 98 Female (%43.4)	(p=0.63, p>0.05)
H pylori (+)	131 (%54.08)	147 (%65.00)	(p=0.02, p<0.05)

In accordance with the Los Angeles classification, there were 113 patients (47.3%) with grade A RE, 117 patients (49%) with grade B RE, 6 patients (2.5%) with grade C RE and 3 patients (1.3%) with grade D RE in the RE group.

Hp infection was defined in 131 (54.80%) of 239 patients with the diagnosis of RE and in 147 (65.00%) of 226 matched subjects in the control group. The prevalence of infection was significantly lower in the patients with RE than in the control group (Odds ratio 1.56, 95% confidence interval 1.08-2.27; p=0.02, p<0.05, Chi square test) (Figure 1).

According to the Sydney classification, the groups were categorized for Hp colonization in the corpus and antrum. In the study group, Hp colonization in the corpus was as follows: None 142 patients (59.4%), mild + 54 patients (22.6%), moderate ++ 33 patients (13.8%), severe +++ 10 patients (4.2%). In the control group, it was as follows: none 106 patients (46.9%), mild + 67 patients (29.6%), moderate ++ 41 patients (18.1%), severe +++ 12 patients (5.3%). Hp colonization in the corpus was significantly different in the esophagitis group (p=0.01, p<0.05; Mann-Whitney U test). In the study group, Hp colonization in the antrum was as follows: None 111 patients (46.4%), mild + 68 patients

(28.5%), moderate ++ 45 patients (18.8%), severe +++ 15 patients (6.3%). In the control group, it was as follows: none 86 patients (38.1%), mild + 75 patients (33.2%), moderate ++ 48 patients (21.2%), severe +++ 17 patients (7.5%).

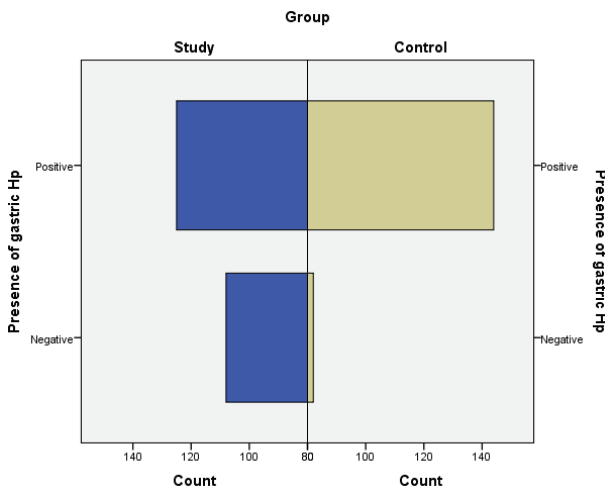


Figure 1: Presence of gastric Hp. The prevalence of infection was significantly lower in the patients with reflux esophagitis than in the control group (Odds ratio 1.56, 95% confidence interval 1.08-2.27; p=0.02, p<0.05, Chi square test). (Hp: Helicobacter pylori).

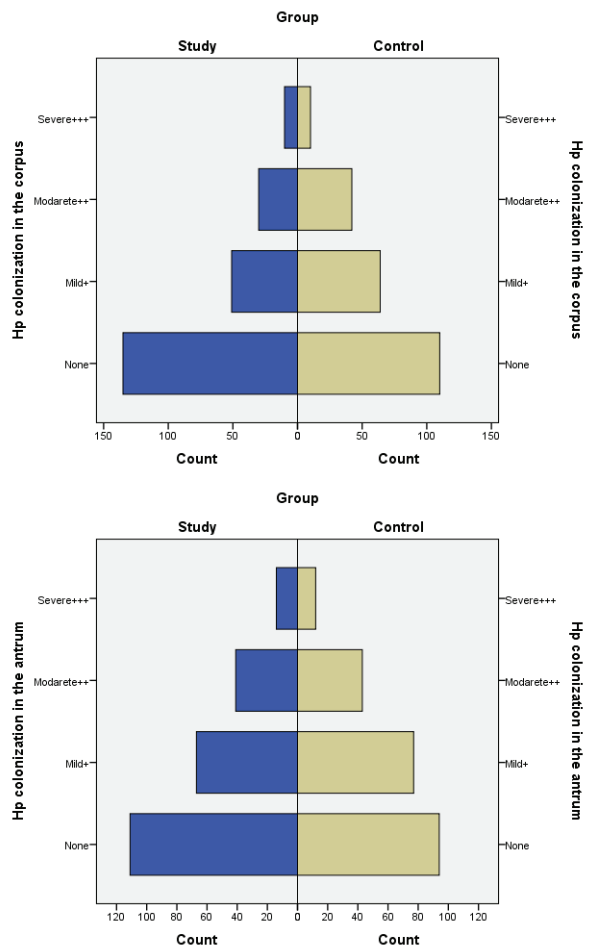


Figure 2: H pylori colonization in corpus and antrum. Hp colonization in the corpus was significantly different in the esophagitis group, but there was no significant difference in Hp colonization in the antrum (p=0.01, p<0.05 and p=0.09, p>0.05 respectively, Mann-Whitney U test). It was found that Hp colonization in the corpus showed a weak negative correlation with esophagitis development, whereas Hp colonization in the antrum was not correlated with esophagitis development ($r_s=-0.12$, p=0.01, p<0.05 and $r_s=-0.54$; p=0.19, p>0.05 respectively, Spearman's correlation analysis).

There was no disparity between the groups in terms of Hp colonization in the antrum ($p=0.09$, $p>0.05$; Mann-Whitney U test).

When the correlation between esophagitis development and gastric Hp localization was investigated, it was found that HP colonization in the corpus was weakly negatively correlated with esophagitis development ($r_s=-0.12$, $p=0.01$, $p<0.05$, Spearman's correlation analysis). Whereas, it was found that Hp colonization in the antrum was not correlated with esophagitis development ($r_s=-0.54$; $p=0.19$, $p>0.05$, Spearman's correlation analysis) (Figures 2).

When the groups were compared according to corpus and antrum gastritis scores, the mean corpus gastritis score of the study group was 1.94 ($SD\pm 1.24$); in the control group, the mean was 2.39 ($SD\pm 1.23$). Corpus gastritis score was significantly lower in the study group ($p=0.01$, $p<0.05$;

Mann-Whitney U test). Antrum gastritis scores were 2.33 ($SD\pm 1.47$) and 2.63 ($SD\pm 1.61$), respectively. There was no significant difference between the groups in terms of antral gastritis scores ($p=0.17$, $p>0.05$; Mann-Whitney U test). It was found that corpus gastritis score was negatively correlated with esophagitis development ($r_s=-0.19$; $p=0.00$, $p<0.05$, Spearman's correlation analysis). Whereas, antrum gastritis score was not correlated with esophagitis development ($r_s=-0.86$; $p=0.63$, $p>0.05$, Spearman's correlation analysis) (Figures 3).

DISCUSSION

Hp infection and GERD are common diseases worldwide. The nature of the relationship between Hp and RE has not been fully understood. In 1997, Labenz first reported the protective role of Hp infection for GERD (7). Afterwards, some authors highlighted the interaction between these diseases involving gastric acid secretion. The acidity of reflux content is an important factor in the pathophysiology of RE and for this reason efficacious treatments are set on suppression of gastric acid secretion (3). Hp infection may contribute to GERD through the agency of diverse mechanisms. It may have both preventive and offensive roles in the incidence and severity of GERD (5-10). Hp infection has been shown to be one of the most important reasons contributing to inflammation and atrophy of the gastric corpus and as a result it has been shown to cause gastric hyposecretion (11).

In our study, we clearly showed that the prevalence of Hp infection was significantly lower in the study group compared to the age and sex matched control group (Odds ratio 1.56, 95% confidence interval 1.08-2.27; $p=0.02$, $p<0.05$, Chi square test). When the literature is reviewed, similarly, many studies have shown that the incidence of HP is lower in GERDs, and that Hp infection may have a protective effect on GERD (9-12). In a systematic review, Raghunath et al. (8) estimated the Hp rate in patients with and without GERD and showed a lower incidence in patients with GERD. These results suggest that the elimination of Hp may increase the incidence of GERD (7). However, there are also studies reporting conflicting results in the literature, and there are some publications reporting that the eradication of Hp has a curative effect on GERD (14-18).

The features of Hp gastritis have already been studied in GERD patients. The negative correlation between the severity of corpus gastritis activity and the severity of GERD was also confirmed by our study in accordance with the study by DeKoster et al. (19). In our study, the intensity of Hp colonization in the corpus and the severity of gastritis were milder in the RE group than in the control group. Hp colonization in the corpus was found to be weakly negatively correlated with esophagitis development ($r_s=-0.12$; $p=0.01$, $p<0.05$, Spearman's correlation analysis). In addition, we found that corpus gastritis score was lower than

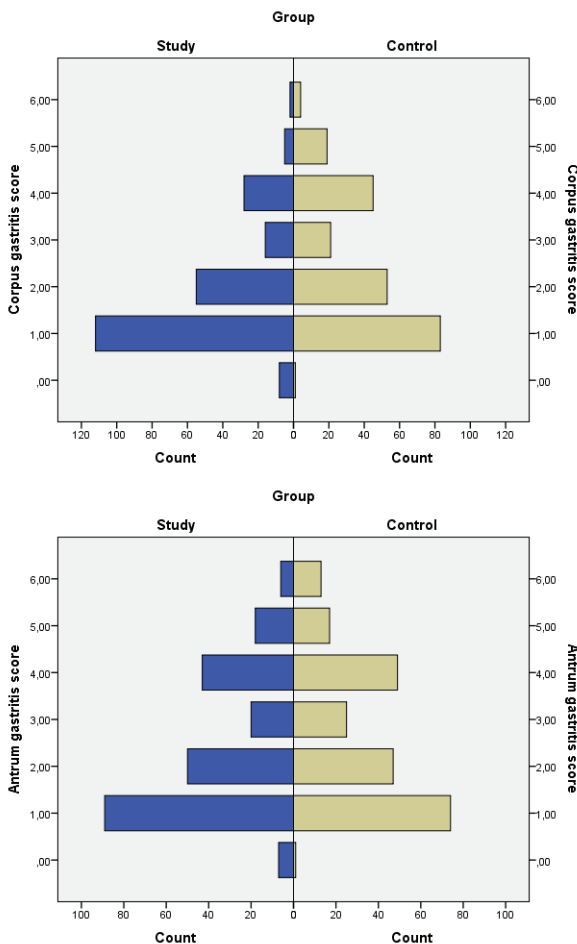


Figure 3: Corpus gastritis and antral gastritis scores in study and control groups. Corpus gastritis score was negatively correlated with esophagitis, whereas antrum gastritis score did not correlate with esophagitis ($r_s=-0.19$; $p=0.00$, $p<0.05$ and $r_s=-0.86$; $p=0.63$, $p>0.05$ respectively, Spearman's correlation analysis).

the study group. There was also a negative correlation with esophagitis development ($r_s=-0.19$; $p=0.00$, $p<0.05$, Spearman correlation analysis). The higher intensity of corpus gastritis in the control group suggests that Hp infection of the gastric mucosa has two possible mechanisms effective in the development and evolution of GERD: first, the exposure of esophageal mucosa to acid may be reduced and the development of erosion may be prevented by suppressing acid release in patients with reflux and severe gastritis in the corpus mucosa; secondly, continuous release of inflammatory mediator in the proximal stomach may have direct or indirect effects on the esophageal mucosa by increasing the sensitivity to acid (10, 20).

Hp infection in the antrum dominant gastritis type is characterized by hypergastrinemia and lower pH. Patients with antral gastritis have a high risk of peptic ulcer or GERD due to low pH. After the elimination of Hp infection, acid secretion will at least normalize in antral-dominant gastritis. The prospect is that the eradication of Hp in these patients should improve RE or at least not affect RE (5, 21, 22). In our study, it was found that there was no correlation between Hp colonization in the antrum and esophagitis development ($r_s=-0.54$; $p=0.19$, $p>0.05$, Spearman's correlation analysis). It was also found that the antrum gastritis score was not correlated with esophagitis development ($r_s=-0.86$; $p=0.63$, $p>0.05$, Spearman's correlation analysis). This difference may be due to the fact that the prevalence of Hp infection and the type of gastritis it causes are different in Asian and Western populations. Epidemiological studies show that the prevalence of GERD is more common in Western countries than in Asian countries (20 to 40%, 5 to 17%, respectively). According to the previous studies based on Asian population, it is reported that the prevalence of GERD is lower in patients with Hp infection and the rates of GERD-related complications are also low. The reason for this is that Hp infection is mainly located in the corpus in East Asian patients and causes inflammation here (5, 6). However, in the Far East, European and North American populations, Hp infection generally causes antral-dominant gastritis and related complications (5).

In conclusion, this study showed that the frequency of Hp infection in the corpus and corpus gastritis score was significantly lower in patients with erosive reflux esophagitis than in the control group. Furthermore, it demonstrated that Hp colonization and corpus gastritis score were negatively correlated with esophagitis development. Therefore, Hp infection in the corpus and associated gastric hyposecretion may be important to prevent the progress of RE.

Ethics Committee Approval: This study was approved by the Ethical Committee of Mersin City Training and Research Hospital.

Informed Consent: Written consent was obtained from the participants.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study- S.Y., H.P.; Data Acquisition- S.Y., H.P.; Data Analysis/Interpretation- S.Y., H.P.; Drafting Manuscript- S.Y., H.P.; Critical Revision of Manuscript- S.Y., H.P.; Final Approval and Accountability- S.Y., H.P.; Technical or Material Support- S.Y., H.P.; Supervision- S.Y., H.P.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: Authors declared no financial support.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı Mersin Şehir Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulu'ndan alınmıştır.

Bilgilendirilmiş Onam: Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- S.Y., H.P.; Veri Toplama- S.Y., H.P.; Veri Analizi/Yorumlama- S.Y., H.P.; Yazı Taslağı- S.Y., H.P.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- S.Y., H.P.; Son Onay ve Sorumluluk- S.S.Y., H.P.; Malzeme ve Teknik Destek- S.Y., H.P.; Süpervizyon- S.Y., H.P.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

REFERENCES

1. Adachi K, Notsu T, Mishiro T, Kinoshita Y. Long-term effect of Helicobacter pylori eradication on prevalence of reflux esophagitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2019;34(11):1963-7. [CrossRef]
2. Kim BJ, Cheon WS, Oh HC, Kim JW, Park JD, Kim JG. Prevalence and risk factor of erosive esophagitis observed in Korean National Cancer Screening Program. *J Korean Med Sci* 2011;26(5):642-6. [CrossRef]
3. Kinoshita Y, Adachi K, Fujishiro H. Therapeutic approaches to reflux disease, focusing on acid secretion. *J Gastroenterol* 2003;38(S15):13-9.
4. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Gisbert JP, Kuipers EJ, Axon AT, et al. European Helicobacter and Microbiota Study Group and Consensus panel. Management of Helicobacter pylori infection-the Maastricht V/Florence Consensus Report *Gut* 2017;66(1):6-30.
5. Yuçel O. Interactions between Helicobacter pylori and gastroesophageal reflux disease. *Esophagus* 2019;16(1):52-62. [CrossRef]
6. Mungan Z, Pınarbaşı SB. Gastroesophageal reflux disease and the relationship with Helicobacter pylori. *Türk J Gastroenterol* 2017;28(S1):61-7. [CrossRef]
7. Labenz J, Blum AL, Bayerdörffer E, Meining A, Stolte M, Börsch G. Curing Helicobacter pylori infection in patients with duodenal ulcer may provoke reflux esophagitis. *Gastroenterology* 1997;112(5):1442-7. [CrossRef]
8. Raghunath A, Hungin AP, Wooff D, Childs S. Prevalence of Helicobacter pylori in patients with gastro-oesophageal reflux disease: systematic review. *BMJ* 2003;326(7392):737. [CrossRef]

9. Haruma K. Review article: influence of *Helicobacter pylori* on gastro-oesophageal reflux disease in Japan. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;20 (S8):40-4. [\[CrossRef\]](#)
10. Take S, Mizuno M, Ishiki K, Nagahara Y, Yoshida T, Yokota K, et al. *Helicobacter pylori* eradication may induce de novo, but transient and mild, reflux esophagitis: Prospective endoscopic evaluation. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24(1):107-13. [\[CrossRef\]](#)
11. Koike T, Ohara S, Sekine H, Iijima K, Abe Y, Kato K, et al. *Helicobacter pylori* infection prevents erosive reflux oesophagitis by decreasing gastric acid secretion. *Gut* 2001;49(3):330-4. [\[CrossRef\]](#)
12. Sugimoto M, Uotani T, Ichikawa H, Andoh A, Furuta T. Gastroesophageal Reflux Disease in Time Covering Eradication for All Patients Infected with *Helicobacter pylori* in Japan. *Digestion* 2016;93(1):24-31. [\[CrossRef\]](#)
13. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 1996 ;20(10):1161-81. [\[CrossRef\]](#)
14. Schwizer W, Thumshirn M, Dent J, Guldenschuh I, Menne D, Cathomas G, et al. *Helicobacter pylori* and symptomatic relapse of gastro-oesophageal reflux disease: a randomised controlled trial. *Lancet* 2001;357(9270):1738-42. [\[CrossRef\]](#)
15. Xue Y, Zhou LY, Lin SR, Hou XH, Li ZS, Chen MH, et al. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on reflux esophagitis therapy: a multi-center randomized control study. *Chin Med J (Engl)* 2015;128(8):995-9. [\[CrossRef\]](#)
16. Fallone CA, Barkun AN, Friedman G, Mayrand S, Loo V, Beech R, et al. Is *Helicobacter pylori* eradication associated with gastroesophageal reflux disease? *Am J Gastroenterol* 2000;95(4):914-20. [\[CrossRef\]](#)
17. Befrits R, Sjöstedt S, Odman B, Sörngård H, Lindberg G. Curing *Helicobacter pylori* infection in patients with duodenal ulcer does not provoke gastroesophageal reflux disease. *Helicobacter* 2000;5(4):202-5. [\[CrossRef\]](#)
18. Moschos JM, Kouklakis G, Vradelis S, Zazos P, Pitiakoudis M, Chatzopoulos D, et al. Patients with established gastro-oesophageal reflux disease might benefit from *Helicobacter pylori* eradication. *Ann Gastroenterol* 2014;27(4):352-6.
19. DeKoster E, Ferhat M, Deprez C, Deltenre M. H. pylori, gastric histology and gastro-oesophageal reflux disease. *Gut* 1995;37(S1):A36.
20. Manes G, Mosca S, Laccetti M, Lioniello M, Balzano A. *Helicobacter pylori* infection, pattern of gastritis, and symptoms in erosive and nonerosive gastroesophageal reflux disease. *Scand J Gastroenterol* 1999;34(7):658-62. [\[CrossRef\]](#)
21. Graham DY, Yamaoka YH. H. Pylori and cagA: relationship with gastric cancer, duodenal ulcer, and reflux esophagitis and its complications. *Helicobacter* 1998;3:145-51. [\[CrossRef\]](#)
22. Iijima K, Koike T, Shimosegawa T. Reflux esophagitis triggered after *Helicobacter pylori* eradication: a noteworthy demerit of eradication therapy among the Japanese? *Front Microbiol* 2015;6:566. [\[CrossRef\]](#)

TORAKOLOMBER BİLEŞKE DİSK HERNİASYONLARININ CERRAHİ TEDAVİSİNDE POSTEROLATERAL TRANSKAMBİN YAKLAŞIM

POSTEROLATERAL TRANSCAMBİN APPROACH FOR SURGICAL TREATMENT OF THORACOLOMBER DISC HERNIATIONS

Halil CAN^{1,2} , Furkan DİREN^{3,4} 

¹Biruni Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²Medicine Hospital, Beyin ve Sinir Cerrahisi Kliniği, İstanbul, Türkiye

³İstinye Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Anestezi Bölümü, İstanbul, Türkiye

⁴Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Kliniği, İstanbul, Türkiye

ORCID IDs of the authors: H.C. 0000-0002-5699-4089; F.D. 0000-0001-6169-9722

Cite this article as: Can H, Diren F. Posterolateral transcambin approach for surgical treatment of thoracolumber disc herniations. J Ist Faculty Med 2020;83(3):227-33. doi: 10.26650/IUITFD.2019.0100

ÖZET

Amaç: Torakolomber bileşke disk herniasyonlarının (TLBDH) tedavisi için optimal cerrahi yaklaşım biçimi halen tartışmalıdır. TLBDH'nin güncel cerrahi tedavisinde anterolateral retroperitoneal, anterior transtorasik, posterolateral, lateral ve transforaminal endoskopik yaklaşımlar uygulanmaktadır. Posterolateral transkambin yaklaşımında, pars interartikularis ve faset ekleminde minimal kemik alınarak, instabiliteye yol açmadan diskektomi ile dekompresyon sağlanmaktadır. Transkambin yaklaşımın, ileri düzeyde nöral doku retraksiyonu olmaksızın diskektomi yapılabilmesi, iyileşme süresinin kısa olması ve postoperatif komplikasyonların daha az görülmesi gibi avantajları vardır.

Yöntemler: Kliniğimizde 2016-2018 tarihleri arasında posterolateral transkambin yaklaşım ile ameliyat edilen 3'ü T12-L1 ve 5'i L1-2 TLBDH'li 8 hasta retrospektif olarak sunuldu. Çalışmamıza far lateral, foraminal ve paramedian uzanım gösteren, klinik olarak kauda equina sendromu, konus medullaris sendromu ve radikülopatiyeye neden olmuş, ekstrüde veya sekestre disk hernili hastalar dahil edildi. Hastalarda cilt insizyonu ve fasyanın açılışı orta hattan yapıldı. Paravertebral adeleler subperiosteal sıyrılarak pars lateralde çıkan kök açığa konulup sekestre veya ekstrüde disk fragmanlarının alınması hedeflendi.

Bulgular: Hastaların 3'ü erkek, 5'i kadın ve ortalama yaşı 45,1 (32-66) olarak saptandı. Ortalama operasyon süresi 57,8 dakikaydı. Preoperatif VAS değerleri 8,75±0,51, postoperatif VAS değerleri 1,25±0,65 saptandı. MacNab klasifikasyonuna göre postoperatif 6 ay sonraki sonuçları; %62,5'i mükemmel, %25'i iyi, %12,5'i vasat olarak bulundu. Hastalarda nörolojik hasar, beyin omurilik sıvısı (BOS) fistülü, pnömotoraks ve operasyon lojunda hematoma gelişmedi.

ABSTRACT

Objective: The optimal surgical approach for treatment of thoracolumbar junction disc herniations (TLJDH) remains controversial. Anterolateral retroperitoneal, anterior transthoracic, posterolateral, lateral and transforaminal endoscopic approaches are used in current surgical treatment of TLJDH. In a posterolateral transcambin approach, a small piece of bone is removed from the pars interarticularis and facet joints, and decompression is achieved by discectomy without causing instability. The transcambin approach has advantages such as discectomy without advanced neural tissue retraction, short recovery time and less postoperative complications.

Methods: The eight patients with 3 T12-L1 and 5 L1-2 TLJDH who were operated on using the posterolateral transcambin approach between 2016-2018 in our clinic were presented retrospectively. The study included patients with extruded or sequestered disc herniation that had far lateral, foraminal, and paramedian extension, and caused cauda equina syndrome, conus medullaris syndrome, and radiculopathy. A skin incision and fascia opening were done from midline. The exiting root was revealed at laterally of pars interarticularis by subperiosteally stripping of paravertebral muscles and the removal of disc fragments were targeted.

Results: Three male and five female patients with a mean age of 45.1 (32-66). Mean operation time was 57.8 minutes. Preoperative VAS values were 8.75±0.51 and postoperative VAS values were 1.25±0.65. According to the MacNab classification, 62.5% excellent, 25% good and 12.5% were fair. There was no neurological injury, cerebrospinal fluid (CSF) fistula, pneumothorax, or operation field hematoma.

İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: furkandiren@yahoo.com

Başvuru/Submitted: 19.12.2019 • **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 30.01.2020 •

Son Revizyon/Last Revision Received: 04.03.2020 • **Kabul/Accepted:** 13.04.2020 • **Online Yayın/Published Online:** 24.06.2020

©Telif Hakkı 2020 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2020 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

Sonuç: TLBDH'li hastalarda transkambin yaklaşım, görece kısa operasyon süresi, düşük morbidite olasılığı ve daha az postoperatif ağrıya sebep olması açısından yararlı bir yaklaşım olarak bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Posterolateral transkambin , çıkan kök, torakolomber

Conclusion: The transcambin approach was found to be useful in terms of a relatively short operation time, low morbidity probability, and less postoperative pain in patients with TLJDH.

Keywords: Posterolateral transcambin, exiting root, thoracolumbar

GİRİŞ

Torakolomber bileşke T10-11 den L1-2'ye kadar olan disk seviyelerini içerir. Torakal ve lomber omurgalar arasında bir geçiş bölgesidir. Bu bölge aynı zamanda spinal korddan konus medüllerise bir geçiş bölgesi olup spinal kord, konus medülleris, kauda equina ve sinir köklerini içerir. TLBDH'ı tüm lomber dejeneratif hastalıkların yaklaşık %0,25 ile %5'ini oluşturur (2). TLBDH'nun klinik semptomları bu bölgenin karmaşık yapısından dolayı oldukça çeşitlidir. Sırt veya bel ağrısı, TLBDH'nın en sık görülen belirtisidir (1).

Torakolomber bileşkede, diskektomi için bildirilen sonuçlar alt lomber omurgada bildirilen sonuçlara göre daha kötüdür. Torakolomber bileşkenin disk cerrahisi ile ilgili kötü sonuçları büyük oranda torakolomber bileşkenin benzersiz anatomik özellikleriyle ilgilidir. İki pars interartikularis arasındaki dar aralık ve konus medüllerise yakınlık gibi bazı önemli anatomik özellikler, torakolomber bileşkedeki disk herniasyonlarının cerrahi tedavisi için farklı operasyonların geliştirilmesini sağlamıştır (3).

Yaklaşık 10 yıl öncesine kadar TLBDH'nın cerrahi tedavisi için posterior dekompresif laminektomi sık uygulanmaktaydı. Mixer and Barr, 1934'de ruptüre olmuş 3 torasik disk herniasyonlu vaka bildirmiştir. Bu hastaların ikisinde postoperatif transvers myelopati gelişmiş ve yalnızca birisinde orta derecede bir düzelme görülmüştür (4). Son yıllarda da TLBDH'nın cerrahi tedavisi için anterolateral retroperitoneal, anterior transtorasik, posterolateral ve lateral yaklaşımlar uygulanmaktadır (1). Transforaminal endoskopik lomber diskektomi 1973'de Kambin ve Gellman (5) tarafından minimal invazif bir cerrahi metodu olarak sunulmuştur. Telfeian ve ark. transforaminal endoskopik diskektomiyi TLBDH'ı için uygulamışlardır (3).

Bu çalışmadaki amacımız TLBDH'nın cerrahi tedavisi için uyguladığımız, güvenli ve komplikasyon oranı oldukça düşük, orta hat insizyonu ve ameliyat mikroskobu ile gerçekleştirilen minimal invazif posterolateral transkambin yaklaşım ile ameliyat ettiğimiz 8 hastadan oluşan deneyimimizi sunmak ve literatür eşliğinde tartışmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda, 2016-2018 yılları arasında posterolateral transkambin yaklaşım ile opere ettiğimiz TLBDH'lu 8 olgu retrospektif olarak analiz edildi. Çalışma tek merkezde gerçekleştirildi. Hastalardan yazılı ve sözlü bilgilendirilmiş onamları alındı.

Bel ve bacak ağrısı şikayeti ile başvuran hastalara detaylı nörolojik muayene yapıldı. Nörolojik muayenesinde defisit saptanan ve torakolomber bileşkenin Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG)'sinde ekstrüde veya sekestre disk hernisi izlenen hastalar için operasyon kararı verildi.

Hastaların ağrı şikayeti operasyon öncesi ve sonrası visual analog scale (VAS) kullanılarak değerlendirildi. Operasyon sonrası memnuniyet kriterleri MacNab sınıflamasına göre değerlendirildi (mükemmel, iyi, vasat ve kötü).

Cerrahi teknik

Hastalar ameliyat masasında gerekli ameliyat öncesi hazırlıklar yapıldıktan sonra prone olarak pozisyonlandırıldılar. Skopi ile seviye tespit edildikten sonra yaklaşık 3 cm'lik orta hat cilt insizyonu ile ameliyata başlandı. Paravertebral adele fasyası hastanın şikayetinin olduğu taraftan, orta hattan açıldı. Paravertebral adaleler subperiostal diseksiyonla sıyrıldı. Üst ve alt faset bileşkeyi ortaya koymak için disk herniasyonunun bulunduğu seviyenin faseti ile bir üst komşu fasete birer adet ince Taylor ekartör yerleştirildi. Ameliyat mikroskobu altında inferior faset bileşkesi, superior faset bileşkesi ve pars interartikularis ortaya konuldu. T12-L1 seviyesi için; pars interartikularisin ve L1 superior artiküler proses laterali, L1-2 seviyesi için; pars interartikularisin ve L2 superior artiküler proses laterali, elektrikli motor ile drillenerek inceltildi. Daha sonra pars interartikularisin alt lateral kısmından mediale doğru kerrison ronjeurla minimal kemik rezeksiyonu yapıldı ve pars interartikularisin üst kısmına ve pars-faset eklem bileşkesinin alt kısmına doğru gidilerek alındı. Üst vertebranın faset eklemının alt kısmında minimal kemik rezeksiyonuyla üst pedikülün medialinde seyreden çıkan kök (T12-L1 seviyesinde T12 çıkan kök, L1-2 seviyesinde ise L1 çıkan kök) ameliyatın erken safhasında ortaya konuldu. Çıkan kök üst pedikülün alt lateral kısmında, çıkış seviyesinde künt bir sinir kancası ile palpe edildi. Daha sonra inferior vertebranın faset eklem-pars bileşkesinde yapılan minimal kemik rezeksiyonuyla çıkan kök tamamen ortaya konuldu. Bu esnada intertransvers kas ve intertransvers fasyanın açılmasına gerek olmadı. Çıkan kökün medialinde ve dural kesenin lateralindeki venöz damarlar gerekli görüldüğünde bipolar ile koagüle edildi. Künt bir sinir hook'u ile kranyale doğru sekestre veya ekstrüde olmuş far lateral, foraminal disk fragmanları palpe edilerek alındı.

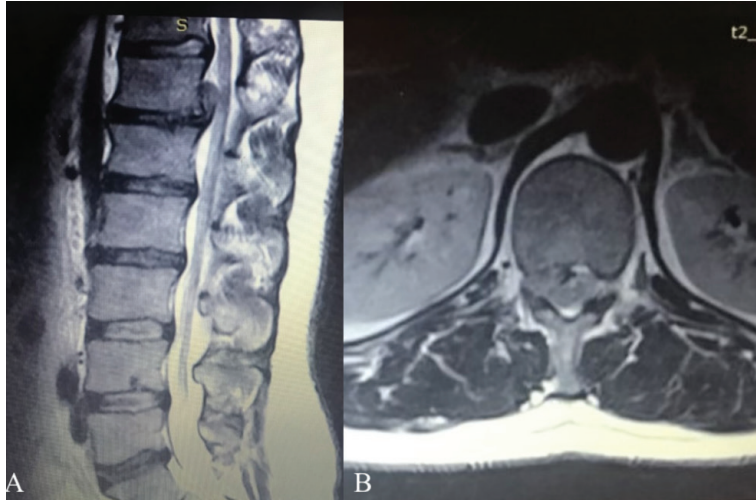
Gerekli durumlarda kerrison ronjeur ile parsın lateralinden mediale doğru ve inferior vertebranın superior artiküler prosesinin üst kısmından kaudale doğru bir miktar daha

kemik rezeksiyonu yapılarak dural kese ve disk mesafesi ortaya konuldu, aynı zamanda inen kök dekompresyonu (T12-L1 mesafesi için L1 inen kök, L1-2 mesafesi için L2 inen kök) yapıldı. Kaudale migre sekestre disk fragmanları hook ve punch ile alındı. İhtiyaç duyulduğunda, posterior longitudinal ligaman (PLL) insize edilerek intervertebral disk mesafesindeki far lateral, foraminal ve paramedian disk fragmanları alındı. Diskektomi sonrası hemostaz yapıldı ve katlar anatomisine uygun kapatıldı. Ameliyat sonrası dönemde serviste takip edilen hastalar aynı gün mobilize edildiler ve ertesi gün taburcu edildiler.

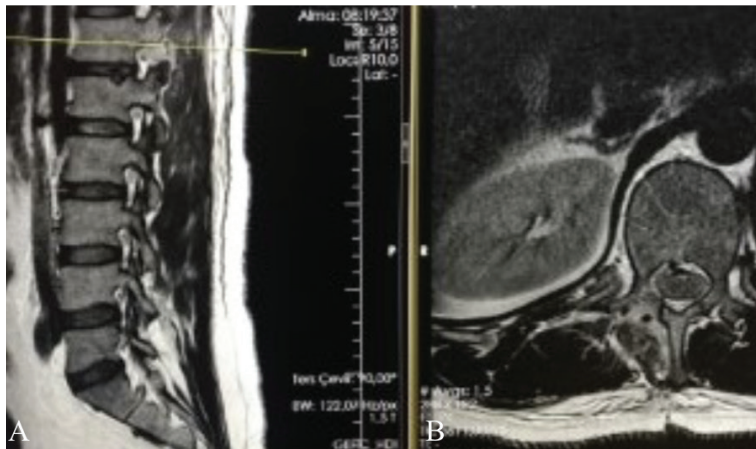
BULGULAR

Çalışmamıza retrospektif olarak T12-L1 ve L1-2 TLBDH'lı 8 olgu dahil edildi. Bu hastaların 3'ü T12-L1 ve 5'i L1-2 seviyelerindeki far lateral, foraminal veya paramedian komponenti olan TLBDH sebebiyle ameliyat edildi. Bu hastaların

yaşlarının ortalaması 45,1 olup (32-66 yaş arasında), 3'ü erkek ve 5'i kadındı. Operasyon öncesi semptom süresi ortalama 4,7 haftaydı. 5 hastada femoral germe testi pozitif bulundu (T12-L1 disk hernilerinde negatif, L1-2 disk hernilerinde pozitif), laseque testi pozitifliğine hiçbir hastada rastlanılmadı. Bir hastada motor defisit (sağ kuadriseps kas gücü -4/5 kas gücündeydi), 4 hastada uyluk ön yüzünde, 1 hastada uyluk ön-iç yüzünde, 1 hastada kasıkta, 1 hastada kasık ve baldırın üst önünde ve 1 hastada perianal bölgede sensoriyel defisit saptandı. Bir hastada üriner sfinkter kusuru saptandı. Pre-op MR görüntülemelerinde, 2 hastada sadece far lateral, 3 hastada far lateral ve foraminal, 1 hastada paramedian ve foraminal, 1 hastada far lateral ve paramedian ve 1 hastada da paramedian disk herniasyonu mevcuttu (Resim 1). Dört hastaya sadece sekestrektomi, 3 hastaya diskektomi ve 1 hastaya da sekestrektomi ve diskektomi yapıldı (Resim 2 ve 3). Ortalama



Resim 1: T12-L1 seviyesinden çıkan foraminal-paramedian disk hernisi preop MR görüntüsü, A. sagittal kesit, B. aksiyel kesit.



Resim 2: T12-L1 seviyesinden çıkan paramedian-foraminal disk hernisinin postop MR görüntüsü, A. T2 ağırlıklı sagittal kesit, B. T2 ağırlıklı aksiyel kesit.



Resim 3: T12-L1 seviyesinden çıkan foraminal-paramedian disk hernisi postop BT görüntüsü, A. koronal kesit, B. aksiyel kesit.

Tablo 1: Ameliyat edilen hastalar ile ilgili klinik veriler.

Yaş	Cinsiyet	Şikayet	Nörolojik muayene	Preoperatif MRG	Operasyon	Operasyon süresi(dk)	Kanama miktarı (ml)
32	E	Bel ve sağ kasık ağrısı	Perianal hipoestezi ve dizestezi, FGT -	Sağ T12-L1 farlateral-foraminal	Sekestrektomi	80	120
40	E	Bel ve sol bacak ağrısı (bacağın önünde)	Uyluk ön yüzünde hipoestezi, FGT +	Sol L1-2 paramedian-farlateral	Sekestrektomi ve diskektomi	68	80
66	K	Bel ve sağ kasık ağrısı	Uyluk ön yüzünde hipoestezi, FGT +	Sağ L1-2 paramedian	Sekestrektomi	45	65
36	E	Bel ve sağ kasık ağrısı	Kasık ve bacağın üst-ön yüzünde hipoestezi, FGT -	Sağ T12-L1 paramedian-foraminal	Diskektomi	65	85
55	K	Bel ve sağ bacak ağrısı	Uyluk ön-yan yüzde hipoestezi, FGT +	Sağ L1-2 paramedian-foraminal	Diskektomi	50	70
33	K	Bel ve sol bacak ağrısı	Uyluk ön yüzünde hipoestezi, FGT +	Sol L1-2 paramedian	Diskektomi	68	90
44	K	Bel ve sol kasık ağrısı	Kasıkta hipoestezi, FGT -	Sol T12-L1 farlateral	Sekestrektomi	42	55
55	K	Bel ve sol bacak ağrısı	Uyluk ön yüzünde hipoestezi, FGT +	Sol L1-2 farlateral	Sekestrektomi	45	60

FGT: femoral germe testi, MRG: manyetik rezonans görüntüleme, +: mevcut, -: izlenmedi.

operasyon süresi 57,8 dakikaydı ve peroperatif ortalama kanama miktarı 78,1 ml idi (Tablo 1). Hastalarda kalıcı nörolojik hasarlanma, sfinkter kusuru, pnömotoraks, hemotoraks, kaburga yaralanması, BOS fistülü, operasyon lojunda hematoma, enfeksiyon, gibi komplikasyonlar gelişmedi.

Hastaların 6 aylık takipleri sonrasında pre op VAS değerleri $8,75 \pm 0,51$ 'den, $1,25 \pm 0,65$ 'e geriledi. MacNab klasifikasyonuna göre de postoperatif 6 ay sonraki memnuniyet sonuçları; %62,5 mükemmel, %25 iyi ve %12,5 vasat olarak bulundu. Bir hastada medikal tedaviyle kontrol altına alınan sensoriyel disestezi gelişti.

TARTIŞMA

Torakolomber bileşke spinal kord ve kauda equina arasında bir geçiş bölgesi olduğundan dolayı, lezyonların nörolojik semptomları farklı şekillerde kendini gösterebilir. Bu semptomlar alt ve üst spinal kord nöronları, kauda equina ve sinir köklerinden kaynaklanabilir. Ayrıca bu lezyonların nörolojik semptomları, spinal kord sonlanmasındaki bireysel farklılıklardan ve bu lezyonların nispeten seyrek görülmesinden dolayı hala belirsizdir (13, 14). Torakolomber bileşke disk herniasyonları nispeten nadir olmasına rağmen MRG ve Bilgisayarlı Tomografi (BT)'deki son gelişmeler teşhisi kolaylaştırmış ve ek olarak konus medullaris'in (KM) lokalizasyonunu belirlemek mümkün hale gelmiştir. Tokushashi ve ark. TLBDH'lu 26 hastalık vaka serilerinde KM'i MRG ve BT myelografi imajları ile değerlendirmişlerdir. KM'in 26 hastanın 12'sinde (%46,1) L1-L2 seviyesinde olduğunu, 18 hastada (%69,2) L1 korpusunun alt yarısı ile L2 korpusunun üst yarısı arasında lokalize olduğunu bildirmişlerdir. KM'in hastalarda T12-L1 seviyesinin kranyalinde veya L2 vertebra korpusunun üst yarısının kaudalinde lokalize olmadığını belirtmişlerdir. T12-L1 disk herniasyonlarının alt motor nöron bozukluğu, L1-L2 disk herniasyonlarının da kauda equina ve radikülopatinin kombine bozuklukları olarak düşünülmesi gerektiğini, T12-L1 seviyesindeki tutulumlar da kesin bir nörolojik bulgunun olmadığını belirtmişlerdir. Disk mesafesini yeterli şekilde ortaya koymak için, 26 hastanın tümüne faset eklem rezeksiyonundan sonra disektomi yaptıklarını bildirmişlerdir (6).

T12-L1 ve L1-L2 disk herniasyonları gerçekte ne torasik ne de lomber disk herniasyonlarıdır. Onlar kaudal spinal kord, KM ve kauda equina arasında bir geçiş bölgesinde yerleşmiştir. Filum terminale KM'in kaudal ucunda başlar, çoğunlukla T12 vertebra korpusunun alt 1/3'ü ile L2 vertebra korpusunun orta 1/3'ü arasında yerleşmiştir (15, 16).

Saberi ve ark. (17) daha düşük lomber seviyeler ile kıyaslandığında, üst lomber disk herniasyonlarının cerrahi sonrası daha az olumlu sonuçlara sahip olduğunu bildirmişlerdir. Spinal kanal alt lomber seviyelere göre üst lomber seviyelerde daha dardır, lamina uzunlukları kısadır. Üst lomber seviyeler de ağrının lokasyonu değişikdir ve disk herniasyonları ile doğrudan spinal kord kompres-

yonu oluşabilir. Bu benzersiz özelliklerinden dolayı uygun cerrahi yaklaşımın seçimi zordur (8).

TLBDH'nın tedavisi için konservatif tedavi ve cerrahi tedavi seçenekleri vardır. Semptomatik olarak belirti veren, ciddi spinal kord ve sinir kökü basısı olan hastalarda optimal birinci tedavi seçeneği cerrahi tedavidir (1). Üç aylık tedaviye rağmen iyileşme göstermeyen, kas atrofisi ve sfinkter bozukluğu gibi kas tonusunda azalma ile seyreden hızlı progresif semptomlar gösteren ve temin edilen nöroradyolojik tetkiklerine göre kesinlikle ciddi kompresyonu olan hafif semptomlu hastalarda da cerrahi tedavi endikasyonu vardır (1).

Torakolomber bileşkenin biyomekanik özelliklerinin bir sonucu olarak annulus fibrozus ve posterior longitudinal ligamanın kalsifikasyonu TLBDH'a eşlik edebilir (19). Spinal kord, KM ve kauda equina liflerinin bu bölgede bulunması, posterior yaklaşım yoluyla torakolomber bileşkenin intervertebral disk mesafesinin ortaya konulmasını ve ekzizyonunu lomber omurgadan daha güç hale getirir. TLBDH'ı için optimal cerrahi yaklaşım biçimi hala tartışmalıdır. Literatürde önceki çalışmalarda TLBDH'nın tedavisi için, posterior orta hat yaklaşımıyla laminektomi ve disektomi tarif edilmiştir. Fakat spinal kord, KM, kauda equina ve sinir köklerinin kaçınılmaz traksiyonundan dolayı iatrojenik yaralanma riski oldukça yüksektir. Arce ve Dohrmann posterior orta hat cerrahi yaklaşım ile opere ettikleri 129 vakanın, %28'nde semptomların kötüleştiğini, %11'ine geçersiz ameliyat yapıldığını ve %4'nde de hastaların öldüğünü bildirmişlerdir (20).

Üst lomber disk herniasyonlarına geleneksel posterior yaklaşım, üst lomber omurganın lamina açıklığının darlığından kaynaklanan yetersiz cerrahi alandan dolayı spinal kord ve çıkan sinir hasarında bir artışa sebep olabilir. Bu tür problemlerden kaçınmak için Kim ve ark. (18) oblik paraspinal yaklaşımı sunmuşlardır. Öte yandan bazı yazarlar da büyük, santral, geniş tabanlı ve kalsifiye disk herniasyonları için transdural yaklaşım uyguladıklarını belirtmişlerdir (8).

1958' de Crafoord ve ark. ilk kez torasik disk herniasyonu için anterior yaklaşımı tarif etmiştir. T10-11 diskinin fenestrasyonu için sağ tarafta torakotomi yaparak, trans-torasik anterolateral yaklaşım ile opere ettikleri bir hastayı sunmuşlardır. Hastanın nörolojik semptomlarının hızlı bir şekilde düzeldiğini belirtmişlerdir. Anterior yaklaşım doğrudan dekompresyon sağlar ve spinal kord yaralanmasını önlemeye yardımcı eder. Literatürde torasik veya retroperitoneal yol ile anterior yaklaşım, torakal disk herniasyonlarının cerrahi tedavisi için bir seçenek olarak sunulmuştur. Fakat pnömoni, enfeksiyon, plevra ve periton yaralanmasını içeren perioperatif komplikasyonlar sıklığı (9).

Kang ve ark. posterolateral yaklaşım ile opere ettikleri 10 vakalık serilerinde, prone pozisyonda orta hat insizyonu sonrasında laminektomi ile dekompresyon yaptıklarını ve

tüm hastalara pedikül-rod sistemi ile implant yerleştirdiklerini, sonrasında ise diskektomi uyguladıklarını belirtmişlerdir. Ortalama VAS skorunun pre op 4,70±2,37'lerden erken dönemde 0,80±0,75'lere, sonrasındaki takiplerde de 0,40±0,20'lere gerilediğini bildirmişlerdir (1).

Yamasaki ve ark. torasik disk herniasyonlu 11 hastaya posterolateral yaklaşım ile diskektomi uygulamışlar ve memnuniyet verici sonuçlar elde etmişlerdir. Ortalama iyileşme oranını %61, pre op JOA skorunu 4,9, post op JOA skorunu 8,8 olarak bildirmişlerdir (12). Posterolateral yaklaşım diğer yaklaşımlar ile kıyaslandığında, etkili posterior dekompresyon elde etmek için lamina, lig. flavum ve artiküler çıkıntının yeterli eksizyonu yapılabilir. Ayrıca aşırı spinal kord ve sinir kökü retraksiyonu olmaksızın torakolomber bileşkede diskektomi yapılabilmesini sağlar. Ayrıca stabilite elde etmek için yeterli kemik greftleme ve internal fiksasyon yapılabilmesi, iyileşme süresinin kısa olması ve anterior yaklaşım ile kıyaslandığında postoperatif komplikasyonların daha az olması gibi bazı avantajlara da sahiptir (1).

Straus ve ark. torakolomber bileşkeye (T10-11, T11-12, T12-L1, L1-2 ve L2-3) yönelik direkt lateral yaklaşım ile diskektomi ile ilgili 6 kadavra ve 3 hasta içeren çalışmalarını sunmuşlardır. Kadavra çalışması sonucunda, torakolomber bileşkeye, L2'nin altındaki seviyelerde retroperitoneal olarak, T12'nin üstündeki seviyelerde ise retroplevral olarak ulaşılabildiğini bildirmişlerdir. T12-L1 ve L1-L2 seviyelerinin bir geçiş bölgesi olduğunu, bu seviyelere ulaşmak için hem retroperitoneal hem de retroplevral olarak girilmesi gerektiğini belirtmişlerdir. L1-L2 seviyesinin altında psoas lifleri ile karşılaşılabileceği, T12-L1 seviyesinde nadir karşılaşılabileceği ve T12'nin üzerinde ise karşılaşılmadığını, diyafram lifleri ile en sık T12-L1 seviyesinde karşılaşıldığını, bazen de L1-L2 seviyesinde karşılaşıldığını belirtmişlerdir. Yalnızca L1'in üzerindeki seviyelerde postoperatif pnömotoraks ile karşılaşıldığını gözlemişlerdir. Başlangıçta plevra ile karşılaşırsa parmak veya dilatör diseksiyonuyla uzaklaştırılabildiğini, paryetal plevra açılmış olsa bile göğüs tübüne gerek olmadığını bildirmişlerdir. T12-L1 ve L1-L2 aralıklarına tipik olarak 11-12. interkostal aralık yoluyla ulaşılabildiğini, parsiyel kosta rezeksiyonunun sıklıkla otogreft materyali için gerekli olduğunu belirtmişlerdir. Operasyonun sonunda 3 hastanın hiçbirine göğüs tüpü takılmadığını, 2 hastada post operatif göğüs röntgenogramlarında asemptomatik küçük pnömotoraks geliştiğini bildirmişlerdir (7).

Telfeian ve ark., TLBDH'nin cerrahi tedavisi için transforaminal endoskopik diskektomi ve foraminotomiyi, lomber radikülopatili hastaların çözümünde olduğu gibi minimal invazif bir çözüm olarak tariflemişlerdir. Böbrek ve kaburga hasarından kaçınmak amacıyla, ameliyat öncesi güvenli bir koridor oluşturmak için pre op aksiyal MR görüntülemelerinde bir hesaplama yapılması gerektiğini

belirtmişlerdir. Pre op VAS değerlerini 8,3, post op VAS değerini de 1,7 olarak bildirmişlerdir (3).

Qi ve ark. 15 ve 17 hastalık iki TLBDH'lu hasta grubunu iki farklı yöntemle ameliyat etmişler ve hastaları klinik sonuç, ameliyat süresi, kanama miktarı, perioperatif komplikasyonlar, hastanede kalış süresi, nörolojik iyileşme, bel ağrısı ve kifozdaki düzelme açısından karşılaştırmışlardır. On beş hastalık grubu çevresel dekompresyon olarak adlandırdıkları yöntemle ameliyat ettiklerini bildirmişlerdir. Orta hat insizyonu ile laminektomi uygulamışlar, sonrasında dekompresyon mesafelerine pedikül vidaları yerleştirmişlerdir. Faset eklem rezeksiyonu yaparak sinir köklerini ortaya koymuşlar, plevra ve peritonu vertebradan uzaklaştırarak diskin posterolateral sınırının ortaya çıkmasını sağlamışlardır. Diğer 17 hastalık grubu da anterior transtorasik yaklaşım ile ekstraplevral veya ekstraperitoneal olarak ameliyat ettiklerini bildirmişlerdir. Genellikle sol yan anterolateral yaklaşımı tercih ettiklerini belirtmişlerdir. Bu hastalara cage ve lateral vida-rod sistemiyle internal fiksasyon uygulamışlardır. Çevresel dekompresyon uygulanan grupta perioperatif komplikasyon oranının %20 olduğunu, bu komplikasyonların hiçbirinin solunum sistemiyle ilgili olmadığını ve hiçbir hastaya göğüs tüpü takılmadığını belirtmişlerdir. Anterior transtorasik yaklaşımla ameliyat ettikleri grupta peroperatif komplikasyon oranının ise %52,6 olduğunu ve çoğunun solunum sistemiyle ilgili komplikasyonlar olduğunu bildirmişlerdir (10).

Mulier ve ark. 3 farklı yöntem ile ameliyat edilen torakal disk herniasyonlu 331 hastayı değerlendirmişler ve karşılaştırmışlardır. Hastaları transtorasik (transplevral torakotomi, ekstraplevral torakotomi, torakoskopi), posterolateral (transpediküler, transfaset, transversoartropedikülotomi, kostotransversektomi) ve lateral yaklaşım ile opere etmişlerdir. Klinik sonuçları sırasıyla %93, %87 ve %80 olarak bildirmişlerdir (11).

TLBDH'lu 8 hasta için orta hat insizyonu ile uyguladığımız posterolateral transkambin yaklaşım ile MacNab sınıflamasına göre de postoperatif dönemde %62,5 mükemmel, %25 iyi sonuçlar elde ettik. Hastaların hiçbirinde spinal kord hasarı ve sinir kökü yaralanması, üriner ve gaita inkontinansı, pnömotoraks, hemotoraks, kaburga yaralanması, BOS fistülü, operasyon lojunda hematoma, enfeksiyon, gibi komplikasyonlar gelişmedi. Sadece 1 hastamızda şiddetli sensoriyel disestezi gelişti ve ameliyat sonrası medikal tedaviyle kontrol altına alındı. TLBDH'ı için uygulanan minimal invazif transkambin yaklaşımın uygulanması kolaydır ve komplikasyon oranı oldukça düşüktür. Stabiliteyi bozmaz ve ameliyat sonrası hastanede kalış süresi kısadır.

SONUÇ

Posterolateral transkambin yöntemi diğer yaklaşımlara göre bazı avantajlara sahiptir. Spinal kord, KM, kauda ve kök retraksiyonu olmadan intervertebral disk mesafesine

ulaşılabilir, foraminal, far lateral ve paramedian serbest disk fragmanlarının güvenli bir şekilde çıkartılabilmesi mümkün olur. Çıkan kök ve inen kökler açığa konulabilir, bu yüzden de kök hasarı riskinden kaçınılmış olur. Doku diseksiyonu minimaldir, kaburga ve transvers çıkıntılarının alınmasına gerek yoktur. Ameliyat sahasında plevra ve diyafram lifleri ile karşılaşılmadığından, plevra ve diyafram yaralanması riski yoktur, hiçbir hastaya göğüs tübü takılması gibi riskler ile karşılaşılmamıştır.

Teşekkür: Desteklerinden ötürü Doç. Dr. Erdiç Civelek'e teşekkür ederiz.

Bilgilendirilmiş Onam: Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- H.C., F.D.; Veri Toplama- H.C.; Veri Analizi/Yorumlama- N H.C., F.D.; Yazı Taslağı- H.C., F.D.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- H.C., F.D.; Son Onay ve Sorumluluk- H.C., F.D.; Malzeme ve Teknik Destek- H.C., F.D.; Süpervizyon- H.C.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

Acknowledgement: We thank to Doç. Dr. Erdiç Civelek for his support.

Informed Consent: Written consent was obtained from the participants.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study- H.C., F.D.; Data Acquisition- H.C.; Data Analysis/Interpretation- H.C., F.D.; Drafting Manuscript- H.C., F.D.; Critical Revision of Manuscript- H.C., F.D.; Final Approval and Accountability- H.C., F.D.; Technical or Material Support- H.C., F.D.; Supervision- H.C.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: Authors declared no financial support.

KAYNAKLAR

1. Kang J, Chang Z, Huang W, Yu X. The posterior approach operation to treat thoracolumbar disc herniation: A minimal 2-year follow-up study. *Medicine (Baltimore)* 2018;97(16):e0458. [CrossRef]
2. Albert TJ, Balderston RA, Heller JG, et al. Upper lumbar disc herniations. *J Spinal Disord* 1993;6:351-9. [CrossRef]
3. Telfeian AE, Jasper GP, Oyelese AA, Gokaslan ZL. Technical considerations in transforaminal endoscopic spine surgery at the thoracolumbar junction: report of 3 cases. *Neurosurg Focus* 2016;40(2):E9. [CrossRef]
4. Mixter WJ, Barr JS: Rupture of the intervertebral disc with involvement of the spinal canal. *N Engl J Med* 1934;211:210-5. [CrossRef]
5. Kambin P, Gellman PH: Percutaneous lateral discectomy of the lumbar spine: a preliminary report. *Clin Orthop* 1983;174:127-32. [CrossRef]
6. Tokuhashi Y, Matsuzaki H, Uematsu Y, Oda H. Symptoms of thoracolumbar junction disc herniation. *Spine (Phila Pa 1976)* 2001;26(22):E512-8. [CrossRef]
7. Straus D, Takagi I, O'Toole J. Minimally invasive direct lateral approach to the thoracolumbar junction: cadaveric analysis and case illustrations. *J Neurol Surg A Cent Eur Neurosurg* 2015;76(1):56-62. [CrossRef]
8. Kim DS, Lee JK, Jang JW, Ko BS, Lee JH, Kim SH. Clinical features and treatments of upper lumbar disc herniations. *J Korean Neurosurg Soc* 2010;48(2):119-24. [CrossRef]
9. Crafoord C, Hiertonn T, Lindblom K, Olsson SE. Spinal cord compression caused by a protruded thoracic disc: report of a case treated with anterolateral fenestration of the disc. *Acta Orthop Scand* 1958;28:103-7. [CrossRef]
10. Qi Q, Chen ZQ, Liu N, Guo ZQ, Shi ZF, Liu ZJ, Liu XG, Li WS, Zeng Y, Sun CG. Circumspinal decompression through a single posterior incision to treat thoracolumbar disc herniation. *Chin Med J (Engl)* 2011;124(23):3852-7.
11. Mulier S, Debois V. Thoracic disc herniations: thansthoracic, lateral, or posterolateral approach? A review. *Surg Neurol* 1998;49:599-608. [CrossRef]
12. Yamasaki R, Okuda S, Maneo T, et al. Surgical outcomes of posterior thoracic interbody fusion for thoracic disc herniations. *Eur Spine* 2013;22:2496-503. [CrossRef]
13. Balague F, Frankhauser H, Rosazza A, et al. Unusual presentation of thoracic disc herniation. *Clin Rheumatol* 1989;8:269-73. [CrossRef]
14. Lyu RK, Chang HS, Tang LM, et al. Thoracic disc herniation mimicking acute lumbar disc disease. *Spine* 1999;24:416-8. [CrossRef]
15. Cornips EMJ, Beuls EAM, Weber BW, Johannes SH, Vles JSH. Thoraco-Lumbar Junction Disc Herniation and Tight Filum: A Unique Combination? *International Journal of Clinical Medicine* 2014;5:681-94. [CrossRef]
16. Kesler H, Dias MS, Kalapos P. Termination of the Normal Conus Medullaris in Children: A Whole Spine Magnetic Resonance Imaging Study. *Neurosurgical Focus* 2007;23(2):E7. [CrossRef]
17. Saberi H, Isfahani AV: Higher preoperative Oswestry Disability Index is associated with better surgical outcome in upper lumbar disc herniations. *Eur Spine J* 2008;17:117-21. [CrossRef]
18. Kim JS, Lee SH, Moon KH, Lee HY. Surgical results of the oblique paraspinal approach in upper lumbar disc herniation and thoracolumbar junction. *Neurosurgery* 2009;65:95-9. [CrossRef]
19. Otani K, Yoshida M, Fujii E, et al. Thoracic disc herniation. Surgical treatment in 23 patients. *Spine* 1988;13:1262-7. [CrossRef]
20. Arce CA, Dohrmann GJ. Thoracic disc herniation: improved diagnosis with computed tomographic scanning and a review of the literature. *Surg Neurol* 1985;23:356-61. [CrossRef]

1,2 DİMETİLHİDRAZİN İLE OLUŞTURULAN KOLON KANSERİ MODELİNDE ZEOLİT DESTEKLİ BESLENMENİN KANSER GELİŞİMİNE ETKİLERİ

THE EFFECTS OF ZEOLITE SUPPORTED NUTRITION ON CANCER DEVELOPMENT IN THE 1,2 DYMETHYLHYDRASIN INDUCED -COLON CANCER MODEL

Serap KURUCA¹ , Kadriye AKGÜN DAR¹ , Ayşegül KAPUCU¹ , Dilşad ÖZERKAN² 

¹İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²Kastamonu Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Kastamonu, Türkiye

ORCID IDs of the authors: S.K. 0000-0002-5566-7844; K.A.D. 0000-0003-2060-1199; A.K. 0000-0002-0946-1407; D.Ö. 0000-0002-0556-3879

Cite this article as: Kuruca S, Agun Dar K, Kapucu A, Ozerkan D. The effects of zeolite supported nutrition on cancer development in the 1,2 dymethylhydrasin induced -colon cancer model. J Ist Faculty Med 2020;83(3):234-40. doi: 10.26650/IUITFD.2019.0039

ÖZET

Amaç: Çevre kirliliği ve 1,2-Dimetilhidrazin (DMH) gibi kimyasal maddelere maruz kalan bitki ve hayvanlarla beslenmek insanlarda çeşitli hastalıklara yol açar. Bunlardan biri kolon kanseridir. Yapılan çalışmalarda DMH'in gastrointestinal sistemde birikerek organların fonksiyonlarını bozduğu ve kansere yol açtığı görülmüştür. Zeolit, adsorbsiyon ve iyon değiştirme özelliği nedeniyle birçok alanda kullanılmakla birlikte özellikle tıpta kullanımı da yaygınlaşan alüminyum silikat yapısındaki bir volkanik mineraldir. Zeolitin en bilinen türü olan ve zararsız olduğu kanıtlanan klinoptilolit, insanlara oral yolla verildiğinde kana geçmediği ve gastrointestinal sistemden feçes olarak atıldığı görülmüştür. Ayrıca insanlara oral yolla verilen klinoptilolit, kanda çözünmeden gastrointestinal sistemden geçtiği görülmüştür.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada sıçanlarda DMH ile oluşturulan kolon kanserine klinoptilolit ile beslenmenin etkileri araştırılmıştır. Deneyde kontrol, klinoptilolit, DMH ve klinoptilolit+DMH grubu olmak üzere 27 Wistar albino sıçan kullanılmıştır. On altı hafta boyunca DMH grubuna haftada bir DMH enjekte edilirken; klinoptilolit ve klinoptilolit+DMH grupları klinoptilolit ile beslenmiştir. Alınan tüm kolon örnekleri rutin preparasyon işlemlerinden geçirilerek, ışık mikroskopunda incelenmiştir. Ayrıca kolon kanserinde sık rastlanan Wnt-β-katenin sinyal yoluna özgü β-katenin antikoru ile immunhistokimyasal boyama yapılarak moleküler değişiklikler belirlenmiştir.

Bulgular: DMH grubunda epitel hücrelerinin boylarında kısalma, nükleuslarında şekil değişiklikleri, kripta hücrelerinde büyüme, kan damarı ve bağ doku miktarında artış ve lökosit infiltrasyonu gözlenmiştir. DMH+klinoptilolit uygulanmasının bu değişiklikleri azalttığı saptanmıştır. β-katenin reaksiyon şiddeti sırasıyla DMH>

ABSTRACT

Objective: Environmental pollution and nutrition with plants and animals exposed to chemical substances such as 1,2-Dimethylhydrazine (DMH) causes many diseases. Colon cancer is one of them. DMH has been found to accumulate in the gastrointestinal tract, impairing the functions of its organs and causing cancer. Zeolite is a volcanic mineral which contains aluminum silicate, which is used in many areas due to its absorption and ion exchange capability, and which has had widespread medical use in recent years. Clinoptilolite, the most well-known species of zeolite, proved to be harmless, did not enter the blood when administered orally to humans and was excreted as a faeces from the gastrointestinal tract. In addition, clinoptilolite administered orally to humans passes through the gastrointestinal tract without dissolving in the blood.

Material and Method: The aim of this study was to investigate the effects of clinoptilolite nutrition on colon cancer induced by DMH in rats. The rats were divided into four experimental groups which were control, clinoptilolite, DMH, and clinoptilolite+DMH using a total of 46 Wistar albino rats. Rats of DMH and clinoptilolite + DMH groups were injected with DMH subcutaneously once a week for 16 weeks at a dose of 20 mg/kg and also clinoptilolite and clinoptilolite+DMH groups were fed a diet with 50% clinoptilolite for eight months.

Results: Molecular changes were examined by immunohistochemical staining in colon tissue samples with β-catenin antibody specific for Wnt-β-catenin signaling pathway, which is common in colon cancer. The reaction intensity of β-catenin was determined as DMH> clinoptilolite control> DMH + clinoptilolite, respectively.

İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: sererdem@yahoo.com

Başvuru/Submitted: 14.05.2019 • **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 12.07.2019 •

Son Revizyon/Last Revision Received: 17.07.2019 • **Kabul/Accepted:** 22.08.2019 • **Online Yayın/Published Online:** 18.11.2019

©Telif Hakkı 2020 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2020 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

klinoptilolit> kontrol > DMH + klinoptilolit olarak belirlenmiştir.

Sonuç: Klinoptilolitin, hücre proliferasyonunu azaltarak DMH'nin olası toksik etkilerini azalttığı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Klinoptilolit, DMH, Kolon kanseri, histokimya

Conclusion: We may think that clinoptilolite reduces the potential toxic effects of DMH by decreasing cell proliferation.

Keywords: Clinoptilolite, DMH, Colon cancer, histochemistry

GİRİŞ

Kolon kanseri gelişmiş ülkelerde görülme sıklığı ve ölüm oranı oldukça fazla olan önemli bir hastalıktır. Yapılan araştırmalara göre, kolon kanserinin görülme sıklığının yüksek olması ve beslenme ile ilişkisi bu hastalığın öneminin bir kez daha vurgulanmasına yol açmıştır. Kadın ve erkekte görülme sıklığı hemen hemen eşit olmakta, ancak yaşa ve tümörün bulunduğu bölgeye göre değişiklik göstermektedir. Ölüme sebebiyet verme anlamında da aynı dereceye sahiptir. Kolorektal kanserin etyolojisi tam olarak bilinmese de yüksek proteinli, yağca zengin, az lifli diyetle beslenmek; obezite, sigara kullanımı ve birinci derecedeki akrabalarda kolon kanseri görülmesi gibi genetik faktörler, kişilerde kolon kanseri riskini artırır (1).

Kolon kanseri modellerinde en sık kullanılan toksik ve karsinojenik madde olan 1,2 dimetilhidrazin (DMH) sıçan gibi kemirgenlerde gastrointestinal sistem organlarında birikerek onların fonksiyonlarını bozar ve kolon kanserine yol açar (2, 3). Deneysel kanser araştırmalarında (hayvan modellerinde) genellikle kimyasal karsinojenler ile spontan tümör oluşturulması veya transplante edilebilen tümörlerin kullanılması tercih edilir (4). Deneysel kanser oluşturmada kullanılacak olan tümörün ve ilacın etkisinin istenildiği gibi olması ve yüksek oranda kanserli hayvan elde edilebilmek için tür, soy, yaş ve cinsiyetin seçilmesi önemlidir. Deneysel hayvanlarında kimyasal karsinojenlerle ilk çalışma Lorenz ve Stewart tarafından 1941 yılında yapılmıştır. Bu çalışmada oral yolla dibenzantresan veya metilkolantren verilen farelerin ince barsaklarında çoklu tümörlerin geliştiği fakat kolonda tümör gelişmediği belirtilmiştir (5). 1952 yılında Walpole ve arkadaşları sıçanlarda deri altına dimetilaminobifenil enjeksiyonu yaparak ince barsak ve kolonda adenokarsinoma oluşturmuştur (6). 1962 yılında kemirgenlerde kalın barsakta kanser oluşturma çalışmaları Laqueur tarafından geliştirilmiştir. Bu çalışmada bitkisel bir ürün olan cycin'in (methyloxymethanol glycoside) kemirgenler için karsinojen olduğu tespit edilmiştir (7). Daha sonra 1,2 Dimetilhidrazin (DMH) ve azoksimetan (AOM) gibi sıçanlarda daha etkili olan karsinojen maddeler bulunmuştur. Bu kimyasalların çeşitli kemirgenlerde tümör oluşturma derecesi farklıdır ve sıçanlarda daha iyi sonuç verirler. 1,2 Dimetilhidrazin toksik kimyasal bir maddedir ve günümüzde kolon kanseri modellerinde en sık kullanılan karsinojendir (8). DMH; DNA, RNA ve protein sentezini bozar. DMH ve azoksimetanla yapılan çalışmalarda DMH'nin karaciğerde azoksimetan ve azoksimetanole dönüşmesiyle karsinogenezin başladığı tespit edilmiştir.

DMH tarafından indüklenen kolon tümörleri insan kolon neoplazmasına benzer histolojik, morfolojik ve anatomik özellik gösterir. Ayrıca çabuk metabolize olması ve vücuttan temizlenmesi DMH'nin kullanılmasının diğer bir avantajıdır (9). DMH'nin sıçanlara oral yolla verilmesi sonucu %30 tümör görülürken subkutan yolla verilmesi sonucu %100 tümör görülmüştür (10). Dolayısıyla DMH gibi vücutta birikip kolon kanserine sebep olabilecek karsinojenik maddelerin vücuttan uzaklaştırılması organizma sağlığı açısından son derece önemlidir.

Zeolit, özellikle son yıllarda tıpta kullanımı artan doğal bir adsorbenttir. Bir zeolit türü olan klinoptilolit ile atık suların ağır metaller uzaklaştırılarak, suların temizlenmesi sağlanmaktadır (11). Ayrıca, hayvanlarda verim ve kilo artırıcı, barsak metabolizmasını düzenleyici olması nedeniyle yem katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Tavuk ve horoz kümeslerinde, büyükbaş hayvan ahırlarında, kedi kumlarına katılarak antibakteriyel ve amonyak tutucu özelliklerinden dolayı kullanımı yaygındır. Zeolitin bu uygulamalar için seçilme nedeni yapısındaki iyon değiştirme özelliğidir (12). Yapılan araştırmalarda klinoptilolitin tavuklara besin ile birlikte verildiğinde besin metabolizmasını ve üretim performansını artırdığı gözlenmiştir (13). Bunun yanı sıra klinoptilolitin fare ve sıçan deneylerinde oral yolla verilmesinde, 6 aydan 12 aya kadar yapılan gözlemlerde, herhangi bir toksik etkisinin olmadığı da gözlenmiştir (14). Klinoptilolitin farelerde serum biyokimyasına olan etkileri araştırıldığında, klinoptilolit diyetinin farelerdeki potasyum seviyesini ortalama %20 oranında artırdığı bildirilmiştir (15). Ayrıca karsinomali farelerde klinoptilolitin fare beyinindeki serotonerjik reseptörleri değiştirerek orta beyin, hipotalamus, rafe çekirdeklerinde serotonin düzeylerini artırdığı gösterilmiştir. Bu farelerde ayrıca elektrolit dengesinin daha düzgün hale geldiği ve bağırsıklıklarının da düzene girdiği tespit edilmiştir (16). Bunun yanı sıra klinoptilolit diyeti ile beslenmenin, kanserli fare ve köpeklerde anlamlı bir iyileşme sağladığı ve hatta bazı fare ve köpeklerin genel sağlığının da düzeldiği görülmüştür (17). Yine farelerde yapılan bir kanser modelinde, klinoptilolitin akciğer metastazlarını engellediği tespit edilmiştir (18). Klinoptilolit araştırmaları sadece hayvan deneyleri ile sınırlı değildir son yıllarda tıpta kullanımı da artmaktadır. Klinoptilolit, toksik etkisinin gözlenmemesi nedeniyle biyomedikal alanlarda kullanılan zeolit türüdür. Antimikrobiyal özelliği nedeniyle geleneksel tıpta yara iyileştirici olarak kullanılmakta, antikanser ve immun sistemi güçlendirici özelliklerinden söz edilmektedir (19). Yapılan klinik çalışmalarında

amonyak, üre, nitrik oksit gibi metabolizma sonucu üretilen toksik maddelerin insan vücudundan uzaklaştırılması ve insanlarda toksik ağır metallerin vücuttan atılmasını kolaylaştırmak için kullanılabileceği tespit edilmiştir (20, 21). Ayrıca klinoptilolit Küba'da ishal tedavisinde anti-diaretik ilaç olarak kullanılmıştır (22). Bu çalışmalarda klinoptilolit, insanlara oral yolla verildiğinde kanda çözünmeden direkt olarak gastrointestinal sistemden geçip vücuttan atılması özelliği nedeniyle kullanılmaktadır.

Kolon kanserinin erken dönemlerinde β -katenin geni ve ürünündeki değişimlerin erken dönem tümör oluşumu ile ilişkili olduğu da bilinmektedir. β -katenini kodlayan gende mutasyonların gerçekleşmesi sonucunda hücre çoğalması gözlenir. Kolon kanseri oluşumunun erken safhasında, intestinal epitel hücrelerinde Wnt- β -katenin sinyal yolunun anormal aktivasyonu erken bir kanıt olarak kabul edilmektedir (23). β -katenin gen mutasyonları, β -kateninin nükleus içerisinde aşırı birikimine ve hedeflediği genlerin uyarılmasına yol açar (24, 25). Bu doğrultuda çalışmada, kolon spesifik karsinojen olan DMH ile sıçan kolon kanseri modelinde klinoptilolit destekli beslenmenin DMH'nin etkilerine karşı koruyuculuğu incelenerek, tedaviye katkısı araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

İstanbul Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 27.06.2012 tarih'li 2012/100 no'lu izni alınarak çalışma planlanmıştır. Bu çalışmada 5 haftalık, 250–350 g ağırlığında *Wistar albino* erkek sıçanlar kullanıldı. İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE)'den alınan 5 haftalık, 250–350 g ağırlığında 27 adet *Wistar albino* erkek sıçanlar

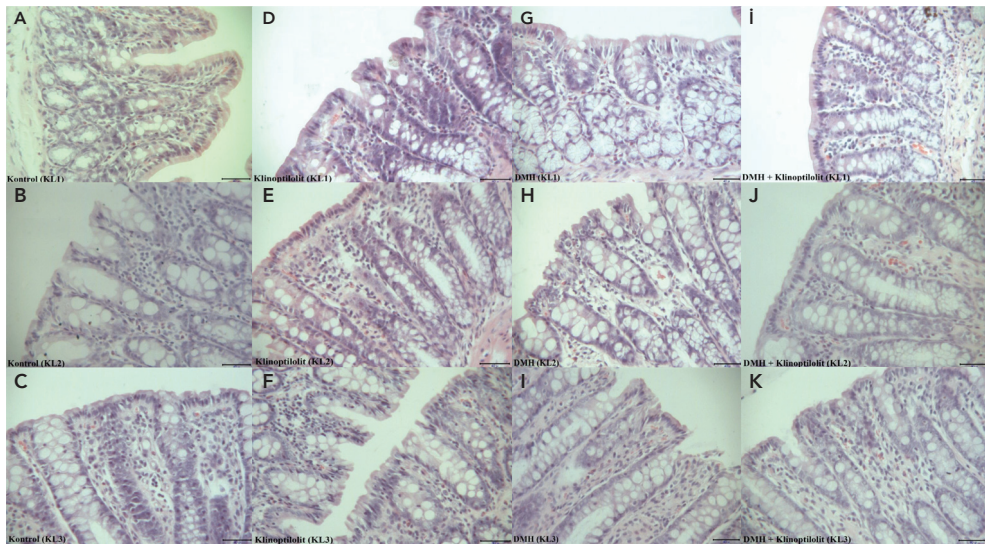
kullanıldı. Sıçanlar deney boyunca kontrollü çevresel koşullar altında (7:00–19:00 aydınlık / karanlık döngüsü ve 22–24°C) muhafaza edildi.

1- Kontrol grubu (n=5) normal sıçan yemiyle;
2- Klinoptilolit (n=5) grubundaki sıçanlar normal yemle ve %50 klinoptilolit karıştırılarak oluşturulan bisküvilerle;
3- DMH (n=9) grubundaki sıçanlara 15 hafta boyunca, ilk haftadan itibaren hafta bir defa olmak üzere 20 mg/kg subkutan olarak DMH uygulandı ve normal sıçan yemiyle;
4- DMH + klinoptilolit (n=8) sıçanlara 15 hafta boyunca, ilk haftadan itibaren haftada bir defa olmak üzere 0,6 mg/hayvan (20 mg/kg) subkutan yolla DMH enjeksiyonu uygulandı ve klinoptilolitli bisküvilerle 32 hafta boyunca oral yolla beslendi.

Bu süre sonunda ketamin HCl (60 mg/kg) anestezisi altında tüm deney ve kontrol grubu sıçanlardan alınan karaciğer, proksimal ve distal kolon örnekleri rutin histolojik yöntemlerle parafine gömüldü, alınan kesitler H+E ve beta katenin ile immunohistokimyasal olarak boyandı, histopatolojik olarak incelendi.

BULGULAR

DMH uygulanan sıçanların kolonlarında epitel hücrelerinin boylarında kısalma, nükleuslarında şekil değişiklikleri, kripta hücrelerinde büyüme, kan damarı ve bağ doku miktarında artış, çok sayıda ve bazıları oldukça büyük alanı kaplayan lökosit infiltrasyonu görüldü. Bu değişiklikler kolonun distal bölümünde daha belirgindi. DMH + klinoptilolit uygulanmasıyla lökosit infiltrasyonu dışındaki değişikliklerin büyük oranda düzeldiği saptandı (Şekil 1).



Şekil 1: Kontrol ve deney gruplarının kolonların farklı bölgelerindeki (KL1: Kolonun başlangıç kısmı, KL2: Kolonun orta kısmı ve KL3: Kolonun son kısmı) histolojik değişiklikler. **A.** Kontrol (KL1) **B.** Kontrol (KL2) **C.** Kontrol (KL3) **D.** Klinoptilolit (KL1) **E.** Klinoptilolit (KL2) **F.** Klinoptilolit (KL3) **G.** DMH (KL1) **H.** DMH (KL2) **I.** DMH (KL3) **İ.** DMH+Klinoptilolit (KL1) **J.** DMH+Klinoptilolit (KL2) **K.** DMH+Klinoptilolit (KL3) Bar 40 μ m.

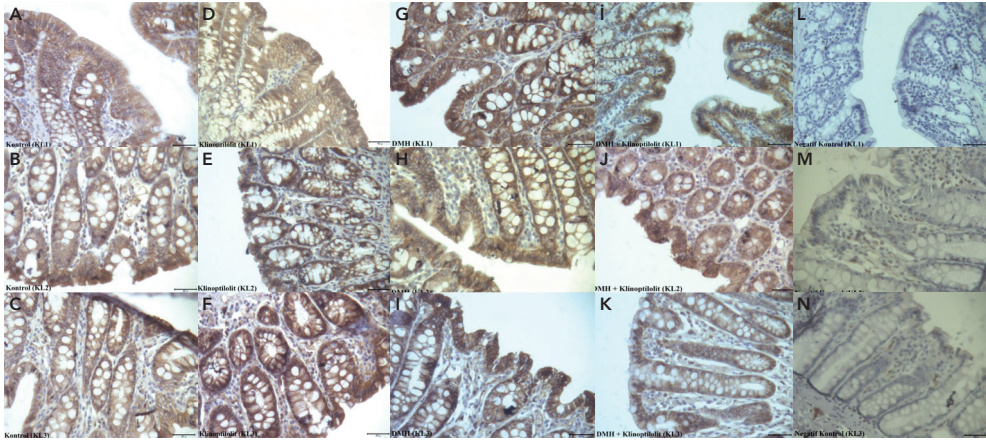
Beta katenin ile immunohistokimyasal olarak boyanan kontrol ve deney gruplarının kolon kesitlerinde reaksiyonun şiddeti çoktan aza doğru sırasıyla, DMH> klinoptilolit> kontrol > DMH + klinoptilolit olarak belirlendi

(Tablo 1, Şekil 2).

Şekil 3'de ise kolonda oluşan tümörlerin makroskopik görünümü bulunmaktadır.

Tablo 1: Kontrol ve deney gruplarında kolonun farklı bölgelerindeki (KL1: Kolonun başlangıç kısmı, KL2: Kolonun orta kısmı ve KL3: Kolonun son kısmı) β katenin immünohistokimyasal boyanma şiddeti.

Deney Grupları	β katenin reaksiyon şiddeti		
	KL1	KL2	KL3
Kontrol	+	+(KL1'den daha az)	+
Klinoptilolit	++	++	++
DMH	+++	+++	+++ (bağ doku ↑)
DMH+klinoptilolit	+	+	+(bağ doku ↓)



Şekil 2: Kontrol ve deney gruplarında kolonun farklı bölgelerindeki beta katenin (kahverengi boyama) immünreaksiyonları ve negatif kontrol örnekleri. **A.** Kontrol (KL1) **B.** Kontrol (KL2) **C.** Kontrol (KL3) **D.** Klinoptilolit (KL1) **E.** Klinoptilolit (KL2) **F.** Klinoptilolit (KL3) **G.** DMH (KL1) **H.** DMH (KL2) **I.** DMH (KL3) **İ.** DMH+Klinoptilolit (KL1) **J.** DMH+Klinoptilolit (KL2) **K.** DMH+Klinoptilolit (KL3) **L.** Negatif Kontrol (KL1) **M.** Negatif Kontrol (KL2) **N.** Negatif Kontrol (KL3) Bar 40 µm.



Şekil 3: Kolonda oluşan tümörlerin makroskopik görünümü. **A,B,C.** 0,5 mm çapındaki tümörler **D.** Yagın tümörler **E.** Tümör olmayan kolon.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Kolon kanseri, gelişmiş ülkelerde görülme sıklığı ve ölüm oranı oldukça fazla olan önemli bir hastalıktır. Kolon kanserinin etiyojisi tam olarak bilinmese de yüksek proteinli, yağca zengin, az lifli diyetle beslenmek; obezite, sigara kullanımı ve birinci derecedeki akrabalarda kolon kanseri görülmesi gibi genetik faktörler, kişilerde kolon kanseri riskini arttırır (1). Dolayısıyla kolon kanseri gelişim mekanizmasını anlamak ve tedaviye yönelik yeni stratejiler geliştirmek oldukça önemlidir. Kolon kanseri hayvan modeli oluşturma amacıyla sıklıkla kullanılan karsinogenler 1,2-dimetilhidrazin (DMH) ve onun metabolitleri olan azoksimetan, N-metil-N nitro-N-nitrosoguanidin ve N-metil-N-nitrosoüre'dir (26). Bir metil hidrazin türevidir olan DMH, organizma da metil radikali salıveren bileşiklere dönüşmek suretiyle etkinlik kazanan bir ajandır. DNA moleküllerini metilleyerek mutajenik etki yapan DMH, aynı zamanda RNA ve dolayısıyla protein sentezini de bozarak kolon kanseri oluşumuna neden olur (5). Hayvan modellerinde kolon kanser gelişme oranı, kullanılan karsinogenin dozuna, uygulama yoluna, uygulama sıklığı ve süresine bağlıdır. Bunlara ilaveten farelerin cinsiyeti, yaşı ve genetik geçmişi de kolon kanser gelişme oranını etkileyebilmektedir (27). Genetik farklılıklar ile ilgili farelerde yapılan bir çalışmada, iki farklı karsinogen farklı tür farelere enjekte edilmiş ve fare ırkları arasında Balb/C farelerinin DMH'ye karşı cevapta en duyarlı ırk olduğu belirtilmiştir (28). DMH ile kolon kanseri indüklemeye farklı deney hayvanları kullanıldığı gibi farklı veriliş yolları da tercih edilmiş ve en çok kullanılan yöntem s.c yol olmuştur. Çünkü DMH'nin oral yoldan sıçanlara verilmesi sonucu düşük tümör insidansı görülürken (%30), kas içi (i.m) uygulamalar da %80 oranında, s.c uygulamalar da ise %100 oranında tümör geliştiği gözlenmiştir (10). Çalışmamızda da Wistar türü erkek sıçanlar kullanıldı ve DMH s.c yoldan enjekte edilmesine rağmen %20 oranında makroskopik tümör oluşturulabildi (Şekil 3). Grupta hiç ölen hayvan bulunmaması bu dozun toksik düzeyde olmadığını ama karsinogenesis için de yeterli olmadığını düşündürmektedir. Oysa bizim kullandığımız dozla aynı bir başka çalışmada (DMH 20 mg/kg) ilk 16 hafta boyunca, hayvanların %53'ünün öldüğü rapor edilirken 16 aynı doz verilen başka bir çalışmada, DMH enjeksiyonundan sonra farklı zamanlarda 210 farenin 13 tanesinin öldüğü belirtilmiştir (29).

Ayrıca Beta katenin ile immunohistokimyasal olarak boyanan kontrol ve deney gruplarının kolon kesitlerinde reaksiyonun şiddeti çoktan aza doğru sırasıyla, DMH > klinoptilolit > kontrol > DMH + Klinoptilolit olarak belirlenmesi hücre proliferasyonunun ve bağ dokunun arttığı displazik değişimler olduğu belki deney süresi uzatıldığında makroskopik tümör artışı da gözlenebileceğini düşünebiliriz.

Bu çalışmada doğal bir adsorbent olan klinoptilolitin DMH'in toksik etkilerini azaltarak antikanser kullanımının

mümkün olup olmadığını araştırmak istedik. Klinoptilolit, toksik etkisinin gözlenmemesi nedeniyle biyomedikal alanlarda kullanılan zeolit türüdür. Klinoptilolitin fare ve sıçan deneylerinde oral yolla verilmesinde, 6 aydan 12 aya kadar yapılan gözlemlerde, herhangi bir toksik etkisinin olmadığı da gözlenmiştir (14). Klinoptilolitin farelerde serum biyokimyasına olan etkileri araştırıldığında, klinoptilolit diyetinin farelerdeki potasyum seviyesini ortalama %20 oranında arttırdığı bildirilmiştir (15). Ayrıca karsinomali farelerde klinoptilolitin fare beyinindeki serotonerjik reseptörleri değiştirerek orta beyin, hipotalamus, rafe çekirdeklerinde serotonin düzeylerini artırdığı gösterilmiştir. Bu farelerde ayrıca elektrolit dengesinin daha düzgün hale geldiği ve bağışıklıklarının da düzene girdiği tespit edilmiştir (16). Bunun yanısıra klinoptilolit diyeti ile beslenmenin, kanserli fare ve köpeklerde anlamlı bir iyileşme sağladığı ve hatta bazı fare ve köpeklerin genel sağlığının da düzeldiği görülmüştür (17). Yine farelerde yapılan bir kanser modelinde, klinoptilolitin akciğer metastazlarını engellediği tespit edilmiştir (18). Klinoptilolit araştırmaları sadece hayvan deneyleri ile sınırlı değildir son yıllarda tıpta kullanımı da artmaktadır. Klinoptilolit, toksik etkisinin gözlenmemesi nedeniyle biyomedikal alanlarda kullanılan zeolit türüdür. Antimikrobiyal özelliği nedeniyle geleneksel tıpta yara iyileştirici olarak kullanılmakta, antikanser ve immün sistemi güçlendirici özelliklerinden söz edilmektedir (19). Yapılan klinik çalışmalarında amonyak, üre, nitrik oksit gibi metabolizma sonucu üretilen toksik maddelerin insan vücudundan uzaklaştırılması ve insanlarda toksik ağır metallerin vücuttan atılmasını kolaylaştırmak için kullanılabileceği tespit edilmiştir (20, 21). Ayrıca klinoptilolit Küba'da ishal tedavisinde anti-diyetetik ilaç olarak kullanılmıştır (22). Bu çalışmalarda klinoptilolit, insanlara oral yolla verildiğinde kanda çözünmeden direkt olarak gastrointestinal sistemden geçip vücuttan atılması özelliği nedeniyle kullanılmaktadır.

Aynı zamanda deney grupları histopatolojik olarak değerlendirildiğinde, DMH uygulanan bireylerin kolonlarında epitel hücrelerinin boylarında kısalma, nukleuslarında şekil değişiklikleri, kripta hücrelerinde büyüme, kan damarı ve bağ doku miktarında artış, çok sayıda ve bazıları oldukça büyük alanı kaplayan lökosit infiltrasyonu görüldü. Bu değişiklikler kolonun distal bölümünde daha belirgindi. DMH + Klinoptilolit uygulanmasıyla lökosit infiltrasyonu dışındaki değişikliklerin büyük oranda düzeldiği saptandı (Şekil 1).

Sonuç olarak DMH ile kolon kanseri insidansımız düşük olsa da, sıçanlarda klinoptilolit uygulaması ile kanser bulgularının azaldığı ve özellikle kolon kanseri markırı olan beta-katenin boyanmasının azaldığını gözlemlenmiştir. Yapılacak yeni deneylerle birlikte zeolit tıptaki ve medikal uygulamalardaki kullanım alanlarından biri olan kanserde de tedavi amaçlı kullanımının artırılıp artırılamayacağı da araştırılmış olacak ve bu sayede hem ülke ekonomisine hem de zeolit kullanım alanlarının artırılmasına katkıda bulunulacaktır. Doğal zeolit yani klinop-

tilolitin dünyadaki rezervlerinin %50 ye yakını Türkiye’de bulunmaktadır (30). Ancak medikal uygulamaları ülkemizde ve bunun yanısıra dünyadaki diğer ülkelerde de yaygın değildir. Dolayısıyla yapılan araştırmalarla doğal bir zenginlik kaynağımız olan klinoptilolitin tıpta kullanımı değerlendirilebilecektir.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı İstanbul Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan alınmıştır. (2012/100).

Bilgilendirilmiş Onam: Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- S.K., K.A.D.; Veri Toplama- A.K.; Veri Analizi/Yorumlama- S.K., D.Ö.; Yazı Taslağı-S.K., A.K., D.Ö.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- S.K., A.K., D.Ö.; Son Onay ve Sorumluluk- S.K., K.A.D., A.K., D.Ö.; Malzeme ve Teknik Destek- S.K., A.K., D.Ö.; Süpervizyon- S.K., D.Ö.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Biriminin 25342 numaralı projesi kapsamında desteklenmiştir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the ethics committee of Istanbul Faculty of Medicine Animal Experiments Local Ethics Committee. (2012/100).

Informed Consent: Written consent was obtained from the participants.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study- S.K., K.A.D.; Data Acquisition- A.K.; Data Analysis/Interpretation- S.K., D.Ö.; Drafting Manuscript- S.K., A.K., D.Ö.; Critical Revision of Manuscript- S.K., A.K., D.Ö.; Final Approval and Accountability- S.K., K.A.D., A.K., D.Ö.; Technical or Material Support- S.K., A.K., D.Ö.; Supervision- S.K., D.Ö.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: This study was supported by Istanbul University Scientific Research Projects Coordination Unit Project 25342.

KAYNAKLAR

1. Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, Ahnen DJ, Meester RG, Barzi A, et al. Colorectal cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2017;67(3):177-93. [CrossRef]
2. Fernia AP, Caderni G. Rodents Models of Colon Carcinogenesis for the Study of Chemopreventive Activity of Natural Products. *Planta Med* 2008;74:1602-7. [CrossRef]
3. Rosenberg DW, Giardina C, Tanaka T. Mouse models for the study of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2009;30(2):183-96. [CrossRef]
4. Irving AA, Yoshimi K, Hart ML, Parker T, Clipson L, Ford MR, Kuramoto T, Dove WF, Amos-Landgraf JM. The utility of Apc-mutant rats in modeling human colon cancer. *Dis Model Mech* 2014;7(11):1215-25. [CrossRef]
5. Lorenz E, Stewart HL. Intestinal carcinoma and other lesion in mice following oral administration of 1,2,5,6-dibenzathracene and 20-methylcholanthrene. *J Natl Cancer* 1941;1(1):17-40.
6. Walpole AL, Williams M, Roberts DC. The carcinogenic action of 4-aminodiphenyl and 3,2 dimethyl 4-aminodiphenyl. *Br J Ind Med* 1952;9:255-263. [CrossRef]
7. Laquer GL, Mickelson O, Whiting MG, Kurland LT. Carcinogenic properties of nuts from cycas circinalis indigenous to Guam. *J Natl Cancer Inst* 1963;31:919-23.
8. Rosenberg DW, Giardina C, Tanaka T. Mouse models for the study of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2009;30(2):183-96. [CrossRef]
9. Perše M, Cerar A. Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *J Biomed Biotechnol* 2011;473964. [CrossRef]
10. Heijstek MW, Kranenburg O, Rinkes IB. Mouse Models of Colorectal Cancer and Liver Metastases. *Dig Surg* 2005;22:16-25. [CrossRef]
11. Mastinu A, Kumar A, Maccarinelli G, Bonini SA, Premoli M, Aria F. et al. Zeolite Clinoptilolite: Therapeutic Virtues of an Ancient Mineral. *Molecules* 2019;24(8):1517. [CrossRef]
12. Inglezakis V, Loizidou MD, Grigoropoulou HP. Ion Exchange of Pb²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, and Cr³⁺ on Natural Clinoptilolite: Selectivity Determination and Influence of Acidity on Metal Uptake. *J Colloid Interf Sci* 2003;261:49-54. [CrossRef]
13. Mihoslov M, Vecerek V, Mas N. Effect of the Feed Additive Clinoptilolite (ZeoFeed) on Nutrient Metabolism and Production Performance of Laying Hens. *Acta Vet Brno* 2010;79: 29-34. [CrossRef]
14. Grce M, Pavelic K. Antiviral Properties of Clinoptilolite. *Micropor Mesopor Mat* 2005;79:165-9. [CrossRef]
15. Kleiner M, Flegar Z, Zadro R. The Effect of the Zeolite Clinoptilolite on Serum Chemistry and Hematopoiesis in Mice. *Food Chem Toxicol* 2001;39:717-27. [CrossRef]
16. Mück D, Pivac N. The Effect of Natural Clinoptilolite on The Serotonergic Receptors in The Brain of Mice with Mammary Carcinoma. *Life Sci* 2003;73:2059-69. [CrossRef]
17. Pavelić K, Hadzija M, Bedrica L, Pavelić J, Dikić I, Katić M, et al. Natural zeolite clinoptilolite: new adjuvant in anticancer therapy. *J Mol Med Berl* 2001;78:708-20. [CrossRef]
18. Pavelic K, Katic M, Sverko V. Immunostimulatory Effect of Natural Clinoptilolite as a Possible Mechanism of its Antimetastatic Ability. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002;128:37-44. [CrossRef]
19. Pavelic K, Hadzija M, Bedrica L. Natural Zeolite Clinoptilolite: New Adjuvant in Anticancer Therapy. *J Mol Med* 2001;78:708-20. [CrossRef]
20. Genuis JS. Elimination of Persistent Toxicants from The Human Body. *Hum Exp Toxicol* 2011;30(1):3-18. [CrossRef]
21. Flowers JL, Lonkey SA, Deitsch JE. Clinical Evidence Supporting The Use of an Activated Clinoptilolite Suspension as an Agent to Increase Urinary Excretion of Toxic Heavy Metals. *J Nutr Diet Supp* 2009;1(4):11-8. [CrossRef]

22. Rodriguez-Fuentes G, Barrios MA, Iraizoz A, Perdomo I, Cedre B. Enterex: Anti-diarrheic Drug Based On Purified Natural Clinoptilolite. *Zeolites* 1997;19:441-8. [\[CrossRef\]](#)
23. Lecarpentier Y, Claes V, Vallée A, Hébert JL. Interactions between PPAR gamma and the canonical Wnt/beta-catenin pathway in type 2 diabetes and colon cancer. *PPAR research* 2017;2017:1-9. [\[CrossRef\]](#)
24. He T-C, Chan TA, Vogelstein B, Kinzler KW. PPAR delta is an APC regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell* 1999;99:335-45. [\[CrossRef\]](#)
25. Tetsu O, McCormick F. b-Catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999;39:422-6. [\[CrossRef\]](#)
26. Heijstek MW, Kranenburg O, Borel Rinkes IH. Mouse models of colorectal cancer and liver metastases. *Dig Surg* 2005;22(1-2):16-25. [\[CrossRef\]](#)
27. Harris CC, Autrup H, Stoner GD, McDowell EM, Trump BF, Schafer P. Metabolism of dimethylnitrosamine and 1,2-dimethylhydrazine in cultured human bronchi. *Cancer Res* 1977;37:2309-11.
28. Kuraguchi M, Cook H, Williams ED, Thomas GA. Differences in susceptibility to colonic stem cell somatic mutation in three strains of mice. *J Pathol* 2001;193(4):517-21. [\[CrossRef\]](#)
29. Thulesen J, Hartman B, Hare KJ, Kissow H, Ørskov C, Holst JJ. Glucagon-like peptide 2 (GLP-2) accelerates the growth of colonic neoplasms in mice. *Gut* 2004;53(8):1145-50. [\[CrossRef\]](#)
30. Maden tetkik arama (MTA). Zeolit. (Cited 2019, August 30). Available from: URL: <http://www.mta.gov.tr/v3.0/bilgi-merkezi/zeolit>

MEKANİK VE ENZİMATİK YÖNTEM İLE İZOLE EDİLEN STROMAL VASKÜLER FRAKSİYONUN YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN *İN VİTRO* İNCELENMESİ

IN VITRO INVESTIGATION OF THE EFFECT OF STROMAL VASCULAR FRACTION ISOLATED BY MECHANICAL AND ENZYMATIC METHODS ON WOUND HEALING

Kemal Tunç TİRYAKI¹ 

¹Cellest Klinik, Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Uzmanı, İstanbul, Türkiye

ORCID IDs of the authors: K.T.T 0000-0002-7710-2414

Cite this article as: Tiryaki KT. In vitro investigation of the effect of stromal vascular fraction isolated by mechanical and enzymatic methods on wound healing. J Ist Faculty Med 2020;83(3):241-6. doi: 10.26650/IUITFD.2019.0051

ÖZET

Amaç: Yağ dokusundan elde edilen Stromal Vasküler Fraksiyon (SVF) hücre süspansiyonun yara iyileşmesindeki rolü gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Bu çalışmada enzimatik ve mekanik yöntemler ile izole edilen SVF hücre popülasyonunun yara iyileşmesindeki rolü incelenecektir.

Gereç ve Yöntem: 10 farklı hastadan yağ alma yöntemi ile elde edilen yağ dokusu (eşit miktarda iki farklı gruba bölüldükten sonra) mekanik ve enzimatik yöntemler kullanılarak SVF hücre kokteyli izole edilmiştir. İzolasyon sonrasında hücre canlılığı ve hücre sayısı akış sitometrisi kullanılarak sayılmış, hücre proliferasyon hızları WST-1 testi ile ölçümlenmiştir. Yara iyileşmesinde *in-vitro* model olarak kullanılan Scratch Assay testi her iki grup ile elde edilen hücre kokteylleri ile gerçekleştirilmiştir. İzolasyon sonrasında, yara iyileşmesinde rol aldığı bilinen kolajen tip 1 geninin ifade edilme seviyesi her iki grup içinde ölçümlenmiştir.

Bulgular: Enzimatik yöntem ile elde edilen SVF (E-SVF) hücre kokteyli $1,52 \times 10^6/\text{ml}$ ($\pm 3,63$, $n=10$, $p=0,015$) iken, mekanik yöntem ile elde edilen SVF (M-SVF) hücre kokteyli sayısı $0,67 \times 10^6/\text{ml}$ ($\pm 1,69$, $n=10$, $p=0,015$) olarak ölçümlenmiştir. İki farklı yöntem ile izole edilen SVF hücre kokteylinin izolasyon sonrası hücre canlılıkları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. M-SVF hücre kokteylinin, E-SVF ile karşılaştırıldığında %10 daha fazla hücre proliferasyon hızına sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca, M-SVF hücrelerinin migrasyon hızlarının ve *Col1* gen seviyelerinin E-SVF hücrelerine oranla daha fazla olduğu saptanmıştır.

Sonuç: M-SVF hücre kokteylinin hücre sayısının E-SVF hücre kokteylinin hücre sayısından az olmasına rağmen, M-SVF hücre kokteylinin kolajen tip 1 gen seviyesinin arttığı görülmüş, böylece M-SVF hücre kokteylinin daha yüksek yara iyileşme özelliklerine sahip olduğunu gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Stromal vasküler fraksiyon, kök hücre, yara iyileşmesi

ABSTRACT

Objective: The role of Stromal Vascular Fraction (SVF) cell suspension obtained from adipose tissue in wound healing is gaining importance day by day. In this study, the role of SVF cell population, isolated by enzymatic and mechanical methods in wound healing, will be examined in vitro.

Material and Method: An SVF cell cocktail was isolated by mechanical and enzymatic methods after adipose tissue was obtained from 10 different patients by the liposuction method (the adipose tissue was divided into two equal groups for enzymatic and mechanical methods). After the isolation process is done, cell viability and cell number were counted using flow cytometry, and cell proliferation rates were measured by WST-1 assay. The Wound Healing Scratch Assay test, which is used as an in vitro model for wound healing, was performed with cell cocktails obtained from both groups. After isolation, the level of expression of the collagen type 1 gene, known to be involved in wound healing, was measured in both groups.

Results: While the SVF (E-SVF) cell cocktail obtained by the enzymatic method was $1,52 \times 10^6/\text{ml}$ ($\pm 3,63$, $n=10$, $p=0,015$), the number of SVF (M-SVF) cell cocktails obtained by mechanical method was $0,67 \times 10^6/\text{ml}$ ($\pm 1,69$, $n=10$, $p=0,015$). No significant difference was observed between cell viability of SVF cell cocktails isolated by two different methods. The M-SVF cell cocktail had a 10% higher cell proliferation rate compared to E-SVF. Furthermore, M-SVF cell migration rates and *Col1* gene levels were found to be higher than E-SVF cells.

Conclusion: Although the cell number of the M-SVF cell cocktail was less than the cell number of the E-SVF cell cocktail, the collagen type 1 gene level of the M-SVF cell cocktail was found to be higher, so the M-SVF cell cocktail had higher wound healing properties.

Keywords: Stromal vascular fraction, wound healing, stem cell

İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: tunc@tunctiryaki.com

Başvuru/Submitted: 10.07.2019 • Revizyon Talebi/Revision Requested: 18.09.2019 •

Son Revizyon/Last Revision Received: 20.09.2019 • Kabul/Accepted: 24.10.2019 • Online Yayın/Published Online: 25.10.2019

©Telif Hakkı 2020 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2020 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

GİRİŞ

Yara iyileşmesi; homeostaz, inflamasyon, proliferasyon ve matürasyon adı verilen dört farklı evreden oluşan fizyolojik bir süreçtir (1). Her ne kadar yara iyileşmesi uzun yıllardır çalışılıyor olsa da geliştirilen yara tedavi yöntemlerinin çoğu yüksek maliyetli, düşük etkinlikte ve yan etkileri olması sebebiyle yeterince tatmin edici bulunmamaktadır (2).

Yağ doku kaynaklı SVF olarak adlandırılan heterojen hücre popülasyonu, epitelizasyon, anjiyogenez ve immüno-modülasyon gibi kesin fizyolojik gerekliliklere dayalı yara iyileşmesi için en umut verici terapötik stratejilerden biri olarak bilinir. Ancak, bazı dezavantajların halen çözülmesi gerekmektedir. Örneğin; kolajenaz enziminin SVF izolasyonunda kullanılması biyolojik kontaminasyon riskini artırabilir. Ayrıca bazı ülke regülasyonları enzim kullanımı ile ilgili birçok kısıtlama getirmiştir (3).

Yağ dokusu, çoğunlukla adipositlerden oluşmasına rağmen önemli bir mezenkimal kök hücre rezervi olarak bilinmektedir. SVF, cerrahi yöntemler ile toplanılan yağ dokusunun yıkımı sonucunda elde edilen, mezenkimal kök hücre, mezenkimal hücrelerin yansira pre-adiposit, endotel hücreleri, hematopoietik hücreleri, fibroblast ve perisitleri içeren heterojen bir hücre kokteylidir. SVF, kök hücre konsepti içinde önemli bir yere sahip plastik cerrahi ve diğer klinik branşlarda kullanımı olan son derece güncel bir gelişmedir (4). SVF, plastik cerrahi için rutin bir işlem olan lipoaspirasyon işlemi sonucunda elde edilen lipoaspiratın izolasyonundan sonra kolaylıkla elde edilebilmektedir.

SVF elde edilmesi için izolasyon yöntemleri temelde, manuel yöntem (enzimatik yöntem), otomatik cihazlar ve mekanik ayrıştırma yöntemi olarak üçe ayrılabilir. Genellikle, laboratuvar ortamında enzim kullanılarak gerçekleştirilen SVF izolasyonu enzimatik izolasyon yöntemi olarak bilinmektedir. Enzimatik yöntem ile izole edilen Lipoaspiratın gramı başına yaklaşık 100,000- 1,300,000 çekirdekli hücre, %80'den fazla canlılıkla elde edilebilir. Ancak, bu yöntem pahalı, zaman alıcı (90-120 dakika) ve yasal ve idari kaygıları artırıcı durumdadır (3).

Enzim yönteminin dezavantajları göz önünde tutularak, klinik ortamında ve cerrahide kullanılmak üzere SVF izole eden otomatik cihazlar yaygınlaşmaya başlamıştır. Otomatik cihazların temel avantajları arasında kapalı ortam olması, kontaminasyon riskinin minimum olması, klinik uygulamada standardizasyon sağlama ve uygulamanın ameliyat ortamında veya klinikte gerçekleşiyor olması gibi sebepleri ile avantaj oluşturmuştur. Fakat bahsi geçen otomatik bu cihazların çok maliyetli oluşlarından ve cihazı kullanacak ekstra bir kullanıcıya ihtiyaç duyulmasından dolayı fazla yaygınlaşmamıştır. Bu nedenle, SVF'in mekanik izolasyonu araştırılmaya başlanmıştır. Bu bakış

açısı ile birlikte birçok mekanik ayrıştırma yöntemi denenmiştir. Bu yöntemler arasında sadece çalkalama, titreşim, santrifüjleme yöntemlerine dayanan mekanik izolasyonlar gerçekleştirilmiştir.

Fakat mekanik izolasyon yöntemleri, enzimatik izolasyon teknikleriyle kıyaslandığında hücre sayısı ve canlılık açısından çok düşük kalmıştır (5). Daha sonra yapılan çalışmalarda, hücre sayısı ve canlılığının az olduğu mekanik izolasyon yöntemlerinde hücre aktivitesinin, enzimatik yöntemler kullanılarak ayrıştırılan hücre popülasyonlarından daha fazla olduğu gösterilmiştir (6).

Bu çalışmada; literatürde daha önce yara iyileşmesindeki etkinliği kanıtlanmış olan yağ dokusu kullanılarak mekanik ve enzimatik yöntem ile izole edilen SVF'in yara iyileşmesi üzerindeki etkisinin *in vitro* incelenmesi hedeflenmiştir (7, 8, 11).

GEREK VE YÖNTEM

Hücre izolasyon yöntemi

Bu çalışma için 26-52 yaşları arasında 25-27 kg/m² BMI aralığında liposakşın yağ alımı operasyonu geçiren toplamda 10 kadın seçilmiş ve kurumsal inceleme kurulumuz tarafından onaylanmıştır. 2 mm çapında çok delikli bir kanül kullanarak her hastanın lateral kalça bölgesinden 20 ml lipoaspirat yağ dokusu toplanmıştır. Dekantasyon sonrası, yağ doku iki eşit parçaya bölünmüş, enzimatik ve mekanik yöntemler ile SVF izolasyonu için 2 farklı gruba ayrılmıştır.

Enzimatik İzolasyon (E-SVF)- Enzimatik izolasyon için ayrılan 10 ml yağ doku, 0.1 U/mL konsantrasyonunda ve 1: 1 (h/h) oranda GMP dereceli kolajenaz NB6 (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Almanya) kullanılarak 30 dakika boyunca 37°C su banyosunda sabit hız ile çalkalanmıştır. Çalkalama sonunda adipoz doku PBS solüsyonu ile yıkanmış ve 5 dakika boyunca 300 G'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant (yağ hücreleri ve yıkama/enzim sıvısı) atılmış ve üzerine 10 PBS eklenerek SVF hücreleri homojenize edilmiştir. Daha sonra, homojenize edilen hücre süspansiyonu 70 µm'lik steril süzgeçten (BD, LSR00159) geçirilmiştir.

Mekanik Yöntem ile SVF İzolasyonu (M-SVF)- Mekanik sindirim için ayrılmış olan 10 ml yağ doku üç yollu musluk yardımı ile 20 cc'lik luer-lock bağlantılı şırıngalara aktarılmıştır. Döner bir göbek yoluna sahip üç luer-lock portunda 3 farklı filtre bulunan küp şeklinde bir aparat kullanılarak mekanik izolasyon gerçekleştirilmiştir. Yağ doku dolu enjektör birinci porta yerleştirilmiş, boş enjektör ise ikinci porta yerleştirilmiştir. Portların birinde 1000 mikron deliklere sahip bir filtre bulunmaktadır. Bu iki port arasında adipoz doku 10 kez ileri geri geçirilerek küçük parçalara ayrılmıştır. Dönen göbek yolu ikinci ve üçüncü portlar arasında bulunan 750 mikronluk filtreye doğru çevrilmiştir. Yağ doku

dolu enjektör ikinci porta, boş enjektör ise üçüncü porta bağlanmış ve bu filtre arasında 10 defa geçirilmiştir. Böylece yağ doku daha küçük parçalara ayrılmıştır. Aynı işlem üçüncü ve dördüncü port arasında bulunan 500 mikronluk filtre için de tekrarlanmıştır. Böylece yağ doku tam olarak parçalanmıştır. Parçalanmış yağ doku üzerine 1:3 oranda kalsiyum-magnezyum (Ca-Mg) dengeli bir tampon çözeltisi eklenmiş ve 10 dakika boyunca oda ısısında inküasyon gerçekleştirilmiştir. Bu tampon çözeltisini eklemenin asıl amacı eritrositlerden kurtulmak ve kontaminasyonu engellemektir. Santrifüj işlemi ve kapalı ortamı sağlamak amacıyla, 20 cc luer-lock şırıngaların gövde kısımları, içbükey, hücre yapışkanlığına sahip özel yapılmış ayrılabılır pistonlarla değiştirilmiştir. Parçalanmış yağ doku bu pistonlara aktarılmış, pistonların baş kısımları çıkartılarak 2000 G'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlem sırasında SVF'in içbükey contalar içinde birikebilmesi için luer-lock uçları içe doğru yerleştirilmiştir. Santrifüj sonrasında, pistonların çıkartılmış baş kısımları tekrar takılmış ve hücre pelleti dışındaki yağ doku ve tampon çözeltisi bir üç yollu musluk yardımı ile boş bir enjektöre aktarılmıştır. Hücre pelleti salin solüsyonu ile homojen haline getirilmiştir.

Hücre sayısı ve canlılığı analizi

E-SVF ve M-SVF ile izole edilen hücre popülasyonunun toplam çekirdekli hücre sayısı ve canlılığı, kırmızı kan hücresi lizizinden sonra akış sitometresi (Muse CellTM Analyzer) ile ölçümlenmiştir.

Hücre proliferasyonu testi

Yukarıda 2 farklı yöntem ile izole edilen SVF hücre popülasyonu, hücre kültürü koşullarında büyütülmüştür. Hücre proliferasyonu analizi için, iki farklı yöntem ile izole edilen hücre kokteyllerinden 3×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde, 96 oyuklu hücre kültür kaplarına ekilerek, %10'luk fetal sıgır serumu (Gibco, UK) ile desteklenmiş düşük glukozlu DMEM besiyerinde 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edilmiştir. Hücre proliferasyonu testi, literatürde belirtilen WST-1 testi (BioVision, CA) ile değerlendirilmiştir (9). WST-1 test sonuçları Absorbans değeri, 540 nm'de spektrotometre kullanılarak ölçümlenmiştir. Bu deney, 3 biyolojik tekrar yapılarak tamamlanmıştır. Kontrol grubu olarak ATCC (American Type Culture Collection) sipariş edilmiş ve büyüme ortamıyla muamele edilmiş adipoz kaynaklı kök hücreler kullanılmıştır.

Yara iyileşmesi scratch assay

İki farklı yöntem ile izole edilen SVF hücre popülasyonu 6 oyuklu hücre kültürü tabaklarına (TPP, İsviçre) 1×10^6 hücre/kuyucuk konsantrasyonunda ekilmiştir. 1000 µL steril uç kullanılarak, yara iyileşmesi modeli oluşturulmuştur. İki grup da %2 FBS içeren taze besiyeri ile beslenmiştir. Hücreler inkübatörde 24 saat inkübe edilerek, yara kapanması invert ters mikroskop (Nikon Eclipse TE200: Nikon, Tokyo, Japonya) kullanılarak ölçülmüştür. Kontrol grubu olarak ATCC (American Type Culture Collection) sipariş edilmiş

ve büyüme ortamıyla muamele edilmiş adipoz kaynaklı kök hücreler kullanılmıştır.

Gerçek zamanlı PZR ile gen ekspresyonu analizi

Yara iyileşmesinde etkin role sahip Kolajen tip I primeri, Ulusal Biyoteknoloji Merkezi'nden (Bethesda, MD, ABD) Primer-BLAST yazılımı kullanılarak tasarlanmıştır. İki farklı metotla izole edilen SVF hücre popülasyonlarından toplam RNA izolasyonu, üreticinin protokolüne göre Total RNA Saflaştırma Artı Kiti (Norgen, CAN) kullanılarak izole edilmiştir. RNA'nın cDNA'ya dönüştürülmesi için QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Fransa) kullanılmıştır. Kollajenaz tip 1 geninin mRNA ekspresyon seviyesi, QuantiTect SYBR Green PCR kiti (Qiagen, Fransa) kullanılmıştır. Reaksiyonlar üreticinin protokolüne göre iCycler RT-PCR sistemi (Bio-Rad, Hercules, CA) kullanılarak okutulmuştur. Analiz sırasında, 18S rRNA referans geni olarak kullanılmıştır. Kontrol grubu olarak ATCC (American Type Culture Collection) sipariş edilmiş ve büyüme ortamıyla muamele edilmiş adipoz kaynaklı kök hücreler kullanılmıştır.

İstatistiksel analiz

İstatistiksel analiz için yüzde bazında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve GraphPad Prism 5 (GraphPad, La Jolla, CA) yazılımı kullanılmıştır. $P \leq 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Hücre sayısı ve canlılığı analizi

E-SVF yöntemi ile izole edilen hücre popülasyonunun toplam çekirdekli hücre sayısı $1,52 \times 10^6$ iken M-SVF ile edilen ortalama çekirdekli hücre sayısı $0,67 \times 10^6$ olarak ölçümlenmiştir. İzolasyon sonrasında elde edilen hücre popülasyonlarının hücre canlılıkları E-SVF grubunda %96,6 iken M-SVF grubunda %97,5 dur. Hücre canlılıkları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 1).

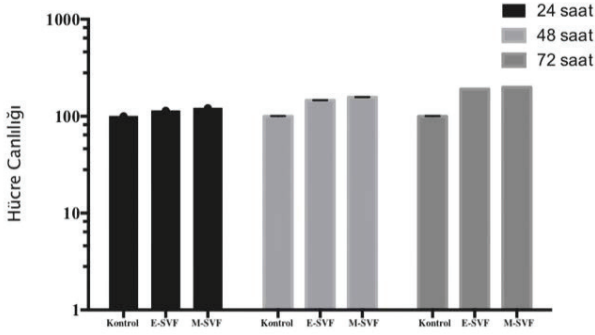
	Hücre Sayısı/cc (10^6)	Hücre Canlılığı (%)
A M-SVF	0,67	97,5
E-SVF	1,52	96,6



Şekil 1: a. Mekanik izolasyon ve enzimatik izolasyon sonrası elde edilen hücre kokteyli hücre sayısı ve hücre canlılığı sonuçları b. Mekanik izolasyon ve enzimatik izolasyon sonrası elde edilen hücre kokteyli çekirdekli hücre boyaması ardından faz-kontast mikroskopu altındaki görüntüleri.

Hücre proliferasyonu testi

Yukarıda bahsedildiği üzere, M-SVF ile izole edilen hücre popülasyonunun *in vitro* yara iyileşmesi modelinde hücre proliferasyonunun kontrol grubuna ve E-SVF grubuna kıyasla daha fazla olduğu saptanmıştır. E-SVF grubunda A490 nm değeri 72. Saat sonunda $199 \pm 0,3$, M-SVF grubunda $191 \pm 0,1$ kontrol grubunda ise $100 \pm 0,1$ olarak tespit edilmiştir ($P \leq 0,05$). Hücre popülasyonu Şekil 2'de görüldüğü üzere mekanik yolla elde edilen hücrelerin proliferasyonu E-SVF ile izole elde edilen hücrelere oranla daha fazla bulunmuştur.



Şekil 2: Hücre proliferasyonu WST-1 testi ile gerçekleştirilmiştir. Analiz mekanik yöntem ve enzimatik yöntem ile izole edilen SVF hücre kokteylinin 24., 48. ve 72. saat sonrası ölçümlerinin göstermektedir.

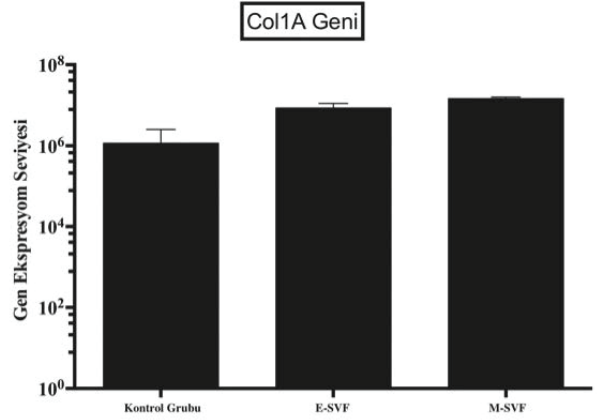
Yara iyileşmesi scratch assay

İki farklı yolla elde edilen SVF hücre popülasyonunun yara iyileşme sürecindeki etkilerini gözlemleyebilmek ve hücrelerin migrasyon özelliklerindeki muhtemel değişimi incelemek amacı ile, 6 kuyucuklu kültür tabaklarına 100,000 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücreler ekilmiştir (10,11). Hücreler kap yüzeyini tam olarak kapladıklarında 200 µL pipet ucu yardımıyla kabın tam ortasında steril koşullarda bir yarığın oluşturulmuştur. Oluşturulan bu yarığın

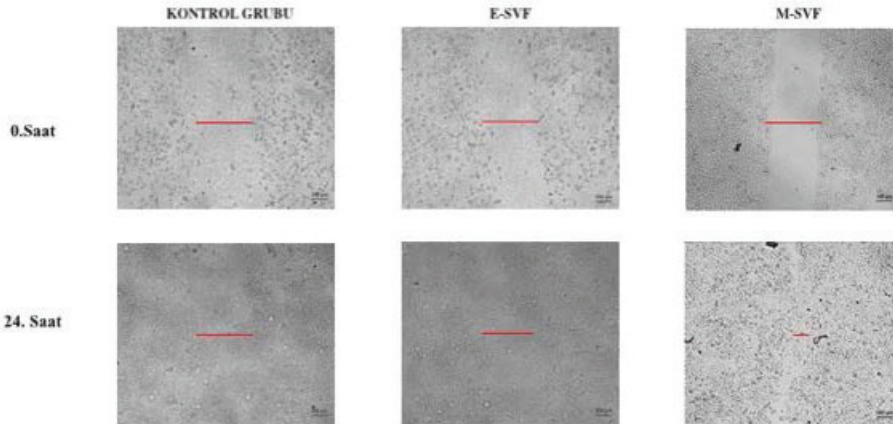
kapanma hızı ve aralığı ışık mikroskobu yardımıyla 24, 48 ve 72. saatlerde ölçümlenmiştir. M-SVF ile elde edilen hücre kokteylinin migrasyon eğilimi bir diğer deyişle yara iyileşmesi potansiyellerinin daha yüksek olduğu saptanmıştır (Şekil 3).

Gerçek zamanlı PZR ile gen ekspresyonu analizi

Gerçek zamanlı PZR deneyi, anlatımı yapılan gen miktarlarının belirlenmesini sağlayan bir yöntemdir (12). Floresan ışık veren boya (SYBR) DNA ya bağlanarak yeterli miktarda ürün oluştuğu zaman ışık verir ve gen anlatımı belirlenir. (13) Yukarıda bahsedilen hücre canlılığı ve yara kapanması analizlerinin sonuçlarına anlamlı olarak, yara iyileşmesinde rol aldığı bilinen kolajen tip 1 geninin ifade edilme seviyesi M-SVF ile elde edilen hücre popülasyonunun, E-SVF ile elde edilen hücre popülasyonundan 1,5 kat daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. (Kontrol; $1,15 \times 10^6 \pm 1,3$; E-SVF; $8,5 \times 10^6 \pm 2,4$; M-SVF; $1,4 \times 10^7 \pm 1,2$; $P \leq 0,05$) (Şekil 4).



Şekil 4: Mekanik izolasyon ve enzimatik izolasyon sonrası elde edilen hücrelerin kolajen tip1 seviyesinin 18sRNA referans genine oranla ifadesinin qz-PZR ile tespiti.



Şekil 3: Mekanik izolasyon ve enzimatik izolasyon sonrası elde edilen hücrelerin çizik analizi ve yara kapanma oranları. Kontrol: ATCC (American Type Culture Collection) sipariş edilmiş ve büyüme ortamıyla muamele edilmiş adipose kaynaklı kök hücreler, görüntüler invert mikroskopunda, büyüme oranı 40x olarak alınmıştır.

Bu sonuçlardan yola çıkarak, yağ dokudan mekanik yol ile elde edilen SVF hücre kokteylinin, enzimatik yolla elde edilen hücrelere göre yara iyileştirici özelliğinin daha fazla olduğu yapılan deneylerce gözlemlenmiştir.

TARTIŞMA

Cilt bütünlüğü, dokuda herhangi bir bozulma durumunda cildin sürekliliğini korumak için iş birliği yapan sitokinlerden ve büyüme faktörlerinden kaynaklanan uyarılar kadar içsel ve dışsal faktörler dizisi ile sağlanır. Ayrıca, kollajen gibi hücre dışı matriks bileşenleri, yara iyileşmesinde önemli bir rol oynar. Yara iyileşme süreci, önceden şekillendirilmiş fibrin pıhtının kollajen matriks tip I ile değiştirilmesini gerektirir. Hücreler tarafından üretilen kollajen, cilt iyileşmesi sırasında hem hücre yapışmasını hem de hücre göçünü kontrol eder. Hücre göçü ve proliferasyon yara iyileşme oranını sınırlayan faktörlerdir. Bu çalışmada enzimatik ve mekanik yöntemler ile izole edilen SVF hücre kokteyl kullanılarak bahsi geçen faktörler uyarlanmaya çalışılmıştır. M-SVF hücre sayısı, E-SVF hücre sayısının %30-50'si kadar olduğu görülmektedir. Sadece hücre sayısı açısından bakıldığında enzimatik yöntem ile izole edilen SVF hücre kokteyli bir avantaj sayılabilir. Ancak, ileri çalışmalar yapıldığında, bulgularımız M-SVF hücre kokteylinin izolasyon sonrası hücre sayısının daha az olmasına rağmen, hücre bölünme hızının daha yüksek olduğunu ve buna ek olarak kollajen tip I gen ifadesi düzeyini arttırdığını göstermektedir. Ayrıca, bu artışın kollajen üretimiyle sonuçlandığını ve yara iyileşme sürecinde hücrelerinin çoğalmasında ve göçünü arttırdığını kuvvetle vurgulamaktadır.

Mekanik izolasyon, adipositlerin, adipoz matriksinden ayrılması sonucu SVF hücrelerinin santrifüj yöntemi ile çökmeye dayanır. Bazı çalışmalar, mekanik manipülasyonun ve mekanik kuvvetlerin, hücre işlevselliğini ve etkinliğini pozitif anlamda etkileyebileceğini göstermiştir (8). Hücre aktivitesinin artması, hücrelerin gen ekspresyon seviyelerinde artışa ve buna bağlı olarak protein sentezinin daha fazla olmasını sağlar.

Enzimatik yöntemlerde kullanılan enzim kimyasalının, Clostridium gibi bakterilerin patogenezi sonucu elde edilmekte ve bu enzimin insan sağlığı üzerinde etkisi tam olarak bilinmemektedir. Bu sebepten dolayı birçok ülkede bu kimyasalın insan doku ve hücrelerinin işlenmesinde kullanılması önerilmemektedir (14). Enzimatik SVF izolasyonunun dezavantajlarının üstesinden gelmek için, birçok mekanik SVF izolasyon metodu ortaya çıkmıştır. Mekanik izolasyon yöntemi, ameliyathane ortamında gerçekleştirebileceğinden enzimatik izolasyon yöntemlerine oranla daha kolay, daha kısa ve tercih edilebilir bir yöntem olarak değerlendirilebilir. Mekanik izolasyonun dezavantajı ise enzimatik yöntem ile elde edilen hücre sayısının en fazla %10 kadar hücre sayısı izole edebilmektir (15). Geliştirilen yeni mekanik izolasyon

yöntemleri ile birlikte bu oran %50-60'a kadar yükselmiştir (16, 17). Ayrıca Banyard DA ve arkadaşları tarafından yayınlanan bir çalışmada hücre sayısının etkisinin çok önemli olmadığı, hücre aktivitesinin daha önemli olduğu vurgulanmıştır (8). Bu ışık çerçevesinde bakıldığında mekanik izolasyon yöntemi ile elde edilen SVF hücre kokteylinin yara iyileşmesinde çok büyük umut vaat ettiği ön görülmektedir.

SONUÇ

Bu çalışmada, in vitro yara iyileşme modeli kullanılarak 2 farklı yöntemle elde edilen kök hücrelerin karşılaştırmalı yara iyileştirici tedavisinin potansiyel kullanımı belirlenmiştir.

Sonuçlarımız, M-SVF hücre kokteylinin kollajen tip 1 gen seviyesinin arttığı görülmüş, böylece M-SVF hücre kokteylinin daha yüksek yara iyileşme özelliklerine sahip olduğunu gözlemlenmiştir. Tüm bu bilgiler sonucunda bulgular, cilt yaralanmalarının tedavisi için mekanik yöntem kullanılarak elde edilen SVF kokteylinin alternatif bir tedavi olmasını öngörmektedir.

Etik Komite Onayı: Etik komite onayı bu çalışma için, yerel etik komiteden alınmıştır.

Bilgilendirilmiş Onam: Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- K.T.T.; Veri Toplama- K.T.T.; Veri Analizi/Yorumlama- K.T.T.; Yazı Taslağı- K.T.T.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- K.T.T.; Son Onay ve Sorumluluk- K.T.T.; Malzeme ve Teknik Destek- K.T.T.; Süpervizyon- K.T.T.

Çıkar Çatışması: Yazar çıkar çatışması beyan etmemiştir.

Finansal Destek: Yazar finansal destek beyan etmemiştir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the local ethics committee.

Informed Consent: Written consent was obtained from the participants.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study- K.T.T.; Data Acquisition- K.T.T.; Data Analysis/Interpretation- K.T.T.; Drafting Manuscript- K.T.T.; Critical Revision of Manuscript- K.T.T.; Final Approval and Accountability- K.T.T.; Technical or Material Support- K.T.T.; Supervision- K.T.T.

Conflict of Interest: Author declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: Author declared no financial support.

KAYNAKLAR

1. Balekar N, Katkam NG, Nakpheng T, Jehtae K, Srichana T. Evaluation of the wound healing potential of *Wedelia trilobata* (L.) leaves. *J Ethnopharmacol* 2012;141(3):817-24. [\[CrossRef\]](#)
2. Yates CC, Hebda P, Wells A. Skin wound healing and scarring: fetal wounds and regenerative restitution. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2012;96(4):325-33. [\[CrossRef\]](#)
3. Aronowitz JA, Ellenhorn JD. Adipose stromal vascular fraction isolation: a head-to-head comparison of four commercial cell separation systems. *Plast Reconstr Surg* 2013;132:932e-939e. [\[CrossRef\]](#)
4. Condé-Green A1, Baptista LS, de Amorin NF, de Oliveira ED, da Silva KR, Pedrosa Cda S, et al. Effects of centrifugation on cell composition and viability of aspirated adipose tissue processed for transplantation. *Aesthet Surg J* 2010;30:249-55. [\[CrossRef\]](#)
5. Condé-Green A, Kotamarti VS, Sherman LS, Keith JD, Lee ES, Granick MS. Shift toward Mechanical Isolation of Adipose-derived Stromal Vascular Fraction: Review of Upcoming Techniques. *Plast Reconstr Surg Glob Open* 2016;4:e1017. [\[CrossRef\]](#)
6. Tiryaki T. A novel three-step mechanical digestion method for ADSC. Oral presentation at the 14th Annual International Federation of Adipose Therapeutics and Science IFATS meeting. 2016 Nov 17-20, San Diego, California.
7. Tonnard P, Verpaele A, Peeters G, Hamdi M, Cornelissen M, Declercq H. Nanofat grafting: basic research and clinical applications. *Plast Reconstr Surg* 2013;132:1017-26. [\[CrossRef\]](#)
8. Banyard DA, Sarantopoulos CN, Borovikova AA, Qiu X, Wirth GA, Paydar KZ, et al. Phenotypic analysis of stromal vascular fraction after mechanical shear reveals stress-induced progenitor populations. *Plast Reconstr Surg* 2016;138:237e-247e. [\[CrossRef\]](#)
9. Koçak P, Canikyan S, Batukan M, Attar R, Şahin F, Telci D. Comparison of enzymatic and nonenzymatic isolation methods for endometrial stem cells. *Turk J Biol* 2016;40(5):1081-9. [\[CrossRef\]](#)
10. Lauffenburger, DA, Horwitz AF. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell J* 1996;84(3):359-69. [\[CrossRef\]](#)
11. Martin P, Martin P. Wound healing aiming for perfect skin Regeneration. *Science* 1997;276(5309):75-81. [\[CrossRef\]](#)
12. Demirci S, Doğan A, Demirci Y, Şahin F. In vitro wound healing activity of methanol extract of *Verbascum speciosum*. *Int J Appl Res Nat Prod* 2014;7(3):37-44.
13. Şahin F, Koçak P, Yıldırım GM, Özkan İ, Yıldırım E, Kala E. In Vitro Wound Healing Activity of Wheat-Derived Nanovesicles. *Appl Biochem Biotechnol* 2018;188(2):381-94. [\[CrossRef\]](#)
14. Lockhart RA. Tissue Dissociation Enzymes for Adipose Stromal Vascular Fraction Cell Isolation: A Review, *J Stem Cell Res Ther* 2015;5:12. [\[CrossRef\]](#)
15. Aronowitz JA, Lockhart RA, Hakakian CS. Mechanical versus enzymatic isolation of Stromal vascular fraction cells from adipose tissue. *Springerplus* 2015;4:713. [\[CrossRef\]](#)
16. Tonnard P, Verpaele A, Peeters G, Hamdi M, Cornelissen M, Declercq H. Nanofat Grafting: Basic Research and Clinical Applications. *Plast Reconstr Surg* 2013. [\[CrossRef\]](#)
17. Bora P, Majumdar AS. Adipose tissue-derived Stromal vascular fraction in regenerative medicine: a brief review on biology and translation. *Stem Cell Res Ther* 2017;8:145. [\[CrossRef\]](#)

KURKUMİN UYGULAMASININ YÜKSEK YAĞLI DİYETLE BESLENEN SIÇANLARIN TESTİS DOKUSUNDA OKSİDAN-ANTIOKSİDAN SİSTEM ÜZERİNE ETKİSİ

EFFECT OF DIETARY CURCUMIN ON OXIDANT-ANTIOXIDANT STATUS IN TESTIS TISSUES OF RATS FED A HIGH-FAT DIET

Muhammed SEYİTHANOĞLU¹ , Sevda TANRIKULU KÜÇÜK² , Yıldız ÖNER İYİDOĞAN^{3,4} , Hikmet KOÇAK² , Parvana MİKAİLOVA⁴ 

¹Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Kahramanmaraş, Türkiye

²Demiroğlu Bilim Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

³İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Tıbbi Laboratuvar Programı, İstanbul, Türkiye

⁴İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ORCID IDs of the authors: M.S. 0000-0002-8027-7549; Ş.T.K. 0000-0001-9446-4399; Y.Ö.İ. 0000-0001-6956-8794; H.K. 0000-0003-1720-9102; P.M. 0000-0002-6883-9051; A.F.A. 0000-0002-2595-0833

Cite this article as: Seyithanoglu M, Tanrikulu Kucuk S, Oner Iyidogan Y, Kocak H, Mikailova P, Aydin AF. Effect of dietary curcumin on oxidant-antioxidant status in testis tissues of rats fed a high-fat diet. J Ist Faculty Med 2020;83(3):247-53. doi: 10.26650/IUITFD.2019.0049

ÖZET

Amaç: Yüksek yağlı diyetin (YYD) neden olduğu oksidatif stresin testis fonksiyonlarını olumsuz yönde etkilediği bilinmektedir. Zerdeçal baharatının aktif bileşeni olan kurkuminin oksidan-antioksidan denge üzerine olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmanın amacı; YYD birlikte alınan kurkuminin testiste oksidan-antioksidan denge üzerine olan etkisini incelemektir.

Gereç ve Yöntem: Sprague-Dawley erkek sıçanlar dört gruba ayrılmış ve 16 hafta süreyle beslenmiştir. Birinci gruba kalorisinin %10'unun yağdan karşılandığı normal diyet, ikinci gruba kalorisinin %60'ının yağdan karşılandığı YYD, üçüncü gruba YYD'e karıştırılmış kurkumin (1g/kg yem) ve dördüncü gruba sadece normal diyet+kurkumin (1g/kg yem) verilmiştir. Deney süresi sonunda testis dokusu homojenize edilerek postmitokondriyal ve mitokondriyal fraksiyonlara ayrılmış; testiste reaktif oksijen türleri (ROS) düzeyleri florometrik yöntemle, malondialdehit (MDA) ve glutatyon (GSH) düzeyleri ile glutatyon peroksidaz (GPx), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon transferaz (GST) aktiviteleri spektrofotometrik yöntemlerle ölçülmüştür.

Bulgular: YYD uygulaması, testiste postmitokondriyal ve mitokondriyal MDA düzeylerini arttırmış; sitozolik GSH düzeylerini ise azaltmıştır. YYD+kurkumin uygulaması YYD'e bağlı artış gösteren MDA düzeylerini düşürmüş; GSH düzeyini ve GST

ABSTRACT

Objective: High fat diet (HFD) induced oxidative stress is known to adversely affect testicular functions. Curcumin, which is an active ingredient of turmeric spice, has been shown to reduce lipid peroxidation and stimulate cellular antioxidant enzymes. The aim of this study is to investigate the effect of dietary curcumin on the testicular oxidant-antioxidant status in rats fed on a HFD.

Material and Method: Male Sprague-Dawley rats were divided into four groups. Group 1 was fed with a control diet (10% of total calories from fat). Group 2 was fed with a HFD (60% of total calories from fat). Groups 3 and 4 received a HFD and a control diet with curcumin (1g/kg diet; w/w) respectively for 16 weeks. The testis tissue was homogenized and divided into postmitochondrial and mitochondrial fractions and the reactive oxygen species (ROS) levels were measured with the fluorometric method. The malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) levels and glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD) and glutathione transferase (GST) activities were measured with spectrophotometric methods.

Results: HFD supplementation increased postmitochondrial and mitochondrial MDA levels and decreased cytosolic GSH levels in testis. MDA levels decreased with curcumin supplementation. Moreover, GSH levels and GST activity increased.

İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: dr.muh.seyit@gmail.com

Başvuru/Submitted: 07.07.2019 • **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 14.10.2019 •

Son Revizyon/Last Revision Received: 15.10.2019 • **Kabul/Accepted:** 27.11.2019 • **Online Yayın/Published Online:** 11.02.2020

©Telif Hakkı 2020 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2020 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

aktivitesini ise arttırmıştır. Ancak sadece kurkumin uygulaması oksidan-antioksidan göstergeleri etkilememiştir. ROS düzeyleri ile SOD ve GPx aktiviteleri ise gruplar arasında anlamlı değişim göstermemiştir.

Sonuç: Bulgularımız, YYD ile birlikte alınan kurkuminin testiküler oksidan-antioksidan dengesi koruyucu olabileceğini göstermektedir. Ancak bu etkinin moleküler mekanizmalarının incelenmesi için ileri çalışmalar yapılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kurkumin, Yüksek Yağlı Diyet, Oksidan-Antioksidan Sistem, Testis

However, curcumin supplementation alone did not affect oxidant-antioxidant status. ROS levels, SOD and GPx activities did not change significantly between the groups.

Conclusion: Our data has shown that curcumin supplementation with HFD may prevent testicular oxidant damage. However, further studies are needed to investigate the underlying molecular mechanisms.

Keywords: Curcumin, High Fat-Diet, Oxidant-Antioxidant Status, Testis

GİRİŞ

Yağ içeriği yüksek gıdalarla beslenme alışkanlığı, özellikle teknolojinin yoğun kullanıldığı ve hazır besin tüketiminin yaygınlaştığı modern toplumlarda, obezite, tip 2 diyabet, hipertansiyon gibi birçok metabolik hastalıkla ilişkilendirilmesi nedeniyle önlem alınması gereken bir sağlık sorunudur. Obeziteye bağlı artan vücut yağ miktarının inflamatuvar ve oksidatif yolları etkileyerek, sistemik veya lokal doku hasarına neden olabileceği bildirilmiştir (1). Obezitenin özellikle erkek üreme sistemi üzerine olan zararlı etkileri, klinik ve deneysel çalışmalarla gösterilmiştir (1,2). Erkeklerde sperm fonksiyonlarını etkileyen başlıca faktörlerden biri oksidatif strese bağlı olarak sentezi artan reaktif oksijen türleridir (ROS). Yüksek yağlı diyetle (YYD) beslenmenin mitokondriyal oksidatif fosforilasyonda artışa yol açtığı ve buna bağlı olarak ROS salınımının da arttığı bildirilmiştir (3). ROS, nötrofil granülositlerinde bakterinin yok edilmesinde, karaciğerde zehirsizleştirme reaksiyonlarında ve prostaglandin sentezi gibi bazı fizyolojik süreçlerde önemli görevler üstlenmektedir (4). Ancak ROS üretiminin normalin üzerine çıkmasının testiküler oksidatif strese, DNA hasarına ve sperm membran geçirgenliğinin bozulmasına yol açabileceği bildirilmiştir (5). Testis ve spermatazoanın ROS ve oksidatif strese karşı çok duyarlı olmasının başlıca nedeninin, sperm hücre membranlarında bulunan çok doymamış yağ asitlerinden zengin lipidlerin peroksidasyonu olduğu bildirilmiştir (6). Sağlıklı fizyolojik süreçte, testiste artan ROS düzeyleri antioksidan sistemler ile dengelenmektedir. Antioksidanlar, yeni ROS sentezini baskıladıkları gibi, aşırı düzeyde oluşan ROS'u da ortadan kaldıracırlar (7). Ancak daha önce yapılan çalışmalarda, obezite ve yağlı diyet kaynaklı oksidatif stresin, testiste antioksidan enzimler olarak görev yapan glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon S-transferaz (GST) ve süperoksit dismutaz (SOD) ile glutatyonun (GSH) koruyucu ve engelleyici etkisine rağmen arttığı bildirilmiştir (7,8).

Zerdeçal, *Curcuma longa* (*C. Longa*) bitkisinin köklerinden elde edilen bir baharattır. *C. Longa*'nın en önemli ve aktif bileşeni kurkumindir (9). Kurkuminin farmakolojik etkileri arasında olan, anti-inflamatuvar, antioksidan ve antikarsinojenik özellikler pekçok çalışma tarafından irde-

lenmiştir (10-12). Kurkuminin güçlü antioksidan etkisinin hidroksil ve süperoksit radikalleri gibi reaktif oksijen türlerini yok edici etkisine bağlı olduğu bildirilmiştir (13).

Bu çalışmada amacımız, yağlı diyetle birlikte alınan kurkuminin testis dokusunda oksidan-antioksidan denge üzerindeki düzenleyici bir etkisinin olup olmadığını incelemektir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışma protokolü

Bu çalışmada İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp ve Araştırma Enstitüsü'nden sağlanan 32 adet 3,5-4 aylık 200-250 g ağırlığında Sprague-Dawley erkek sıçan (İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu, karar no: 2013/48 ve 2014/63) kullanıldı. Tüm deneyler ulusal sağlık enstitüleri tarafından kabul edilen deney hayvanları bakımı ve kullanımı ilgili kurallar çerçevesinde yapıldı. Deney hayvanları 4 gruba ayrıldı:

1) Kontrol grubu (n=8): Sıçanlar kontrol pellet sıçan yemi ile beslendi (toplam kalorisinin %10'unun yağdan karışıldığı yem; 3,7 kcal/g yem, TD.06416 Harlan Laboratories, Madison, USA).

2) Yüksek Yağlı Diyet (YYD) grubu (n=8): Sıçanlar yağ oranı yüksek yem (toplam kalorisinin %60'ının yağdan karışıldığı yem; 5,1 kcal/g yem, TD.06414 Harlan Laboratories, Madison, USA) ile beslendi.

3) YYD+Kurkumin (YYD+Kur) grubu (n=8): Yağ oranı yüksek yeme, kg başına 1g olacak şekilde kurkumin (#820354; Merck, Germany) eklendi; karıştırılarak tekrar pellet haline getirildi ve hazırlanan bu yemle hayvanlar beslendi.

4) Kurkumin (Kur) grubu (n=8): Kontrol pellet yeme, kg başına 1g olacak şekilde kurkumin (#820354; Merck, Germany) eklendi; karıştırılarak tekrar pellet haline getirildi ve hazırlanan bu yemle hayvanlar beslendi.

Deney süresi 16 hafta olarak belirlendi. Hayvanların başlangıç ve deney sonundaki ağırlıkları ve günlük olarak yedikleri yem miktarı kaydedildi. Süre bitiminde, sıçanlar, bir gece aç bırakıldıktan sonra intraperitoneal enjeksiyonla

verilen Na-pentotal (50 mg/kg i.p) anestezisi altında kalplerinden kan alınarak sakrifiye edildi. Testis dokusu hızla çıkarıldı. Doku homojenatı %10'luk(w/v) soğuk 0.15 M KCl içinde hazırlandı. Postmitokondriyal fraksiyon elde etmek için homojenatın bir kısmı 600xg'de 10dk 4°C'de santrifüj edildi. Süpernatant 10000xg'de 20 dk santrifüj edilerek postmitokondriyal fraksiyon elde edildi. Pellet ise mitokondriyal fraksiyonda yapılacak analizler için ayrıldı. Homojenat ve tüm fraksiyonlar deneyler yapıncaya kadar -80°C'de saklandı.

Testiste yapılan biyokimyasal analizler

Doku homojenatlarında ve mitokondriyal fraksiyonlarda malondialdehit (MDA) düzeyleri Ohkawa ve ark. (1979) metodu kullanılarak ölçüldü (14). Standart olarak 1,1,3,3-tetraetoksipropan kullanıldı. GSH düzeyleri doku homojenatlarında 412 nm'de 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoat) kullanılarak ölçüldü (15).

GPx, GST ve SOD antioksidan enzim aktiviteleri postmitokondriyal ve mitokondriyal fraksiyonlarda ölçüldü. GPx ve GST aktiviteleri sırasıyla kümenhidroperoksit ve 1-kloro-2,4-dinitrobenzen substratları kullanılarak tayin edildi (16,17). SOD aktivitesi, riboflavin ile duyarlandırılmış o-dianisidinin fotooksidasyon hızını artırma yeteneği olarak ölçüldü. Mitokondriyal SOD (Mn-SOD) aktivitesi, deney ortamına 2 mmol/L KCN çözeltisi eklenerek sitozolik SOD'un (Cu-Zn SOD) inhibisyonu ile tayin edildi (18).

ROS ölçüm metodunun prensibi, önceki çalışmalarda kullanılan fluorometrik deneyin modifikasyonuna dayanmaktadır (19,20). Floresan olmayan 2,7-diklorofloresin diasetat (DCFH₂-DA) hücre zarından geçebilmektedir. DCFH₂-DA hücre içine girince esterazlar ile asetat grupları koparılmakta ve ROS tarafından güçlü floresan renk veren 2,7-diklorofloresin (DCF)'e oksitlenmektedir. Açığa çıkan 2,7-DCF düzeyleri ($\lambda_{\text{eksitasyon}}$: 485 nm, λ_{emisyon} : 538 nm) bir mikropilaka florometre ve luminometre (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Scientific Inc, ABD) kullanılarak ölçüldü ve sonuçlar relatif floresan ünite (RFU)/mg protein olarak verildi.

Protein konsantrasyonları, standart olarak sığır serum albümini kullanılarak bişinkonik asit metodu ile ölçüldü (21).

İstatistiksel analiz

İstatistik analizler için SPSS versiyon 21.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) bilgisayar programı kullanıldı. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu görsel ve analitik yöntemlerle incelendi. Tüm değişkenler medyan±min-maks olarak ifade edildi. Deney grupları non parametrik Kruskal Wallis testi kullanılarak karşılaştırıldı. p değerinin 0,05'in altında olduğu durumlarda, gruplar arası anlamlılığı test etmek üzere ikişerli karşılaştırmalar için Mann Whitney U testi kullanıldı. Korelasyon analizi Spearman testi ile yapıldı.

BULGULAR

Tüm analizler, 2014/63 sayılı İ.Ü Hayvan Etik Kurulu kararıyla daha önceki çalışmamızda (11) kullanılan hayvanların testis dokusunda yapılmıştır. Bu nedenle Tablo 1'de verilen günlük yem ve enerji alım değerleri ile vücut ağırlıkları önceki çalışmada kullanılan değerler ile aynıdır. Testis ağırlıkları Tablo 1'e eklenmiştir.

Oksidatif hasarın göstergesi olarak testis doku homojenatlarında MDA ve ROS, homojenatların mitokondriyal fraksiyonunda ise MDA düzeyleri ölçüldü. ROS düzeyleri gruplar arasında anlamlı değişim göstermedi (Şekil 1). Ancak YYD uygulaması ile artış gösteren doku ve mitokondriyal MDA düzeyleri, YYD+Kur alan grupta anlamlı olarak azaldı. Sadece kurkumin alan grupta ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında doku ve mitokondriyal MDA düzeylerinde değişim gözlenmedi (Şekil 2).

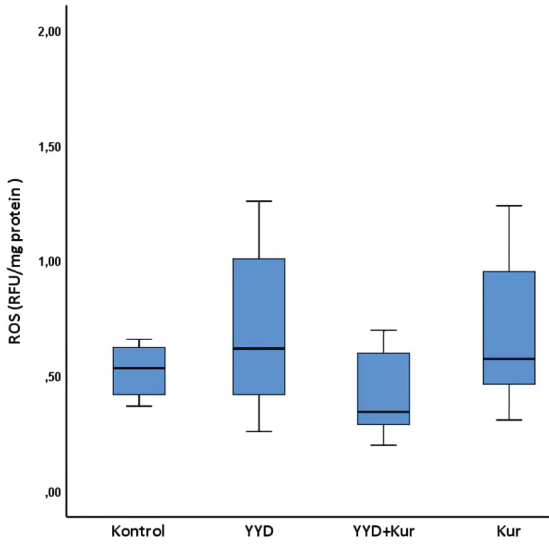
Enzim olmayan antioksidan olarak kabul edilen doku GSH düzeyleri YYD uygulaması ile azaldı. Ancak YYD ile YYD+Kur grupları karşılaştırıldığında, YYD+Kur grubunda GSH düzeyleri artış göstererek kontrol grubu düzeylerine yaklaştı. Sadece kurkumin alan grupta kontrole göre GSH düzeylerinde anlamlı değişim olmadı (Şekil 3).

Antioksidan enzimlerden SOD ve GPx'in postmitokondriyal fraksiyonda ölçülen aktivitelerinde gruplar arasında farklılık gözlenmedi. GST aktivitesi YYD uygulaması ile an-

Tablo 1: Çalışma gruplarını oluşturan sıçanların günlük yem tüketimi-enerji alımı ve vücut- testis ağırlıkları. Değerler ortalama±SD olarak verilmiştir (n=8/grup)

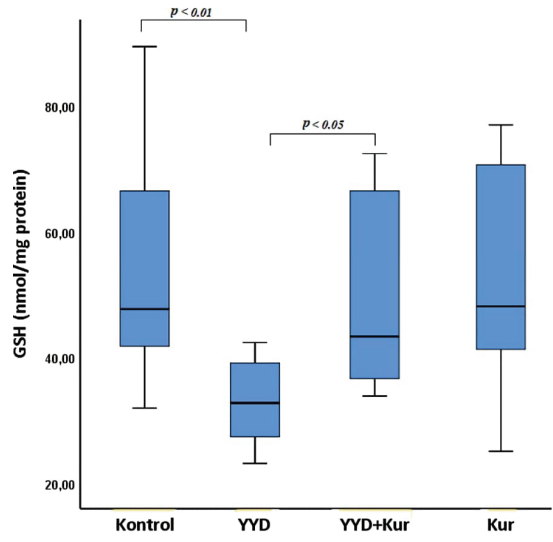
	Kontrol (n=8)	YYD (n=8)	YYD+Kur (n=8)	Kur (n=8)
Günlük yem tüketimi (g/sıçan)	15,6±0,27	12,1±0,48	11,5±0,99	16,1±0,20
Günlük enerji alımı (g/sıçan)	57,6±1,01	61,8±2,45	58,9±5,02	59,5±0,75
Başlangıç vücut ağırlığı (g)	255±11	255±11	249±9	259±12
16 hafta sonra vücut ağırlığı (g)	361±14	364±22	357±38	351±25
Testis ağırlığı (g)	1,60±0,06	1,66±0,19	1,62±0,14	1,54±0,07

YYD: Yüksek yağlı diyet grubu; Kur: Kurkumin grubu; YYD+Kur: Yüksek yağlı diyet ile birlikte kurkumin alan grup



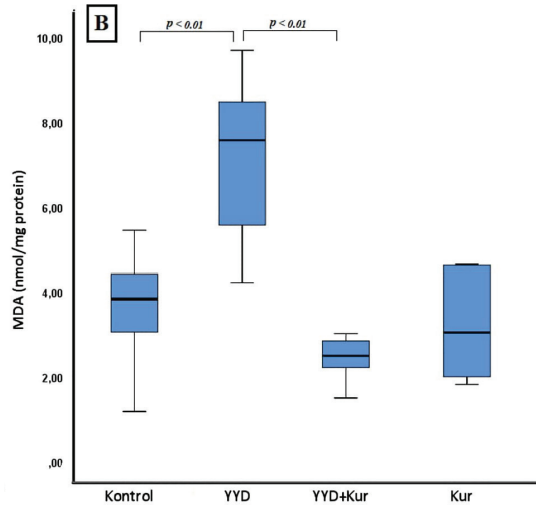
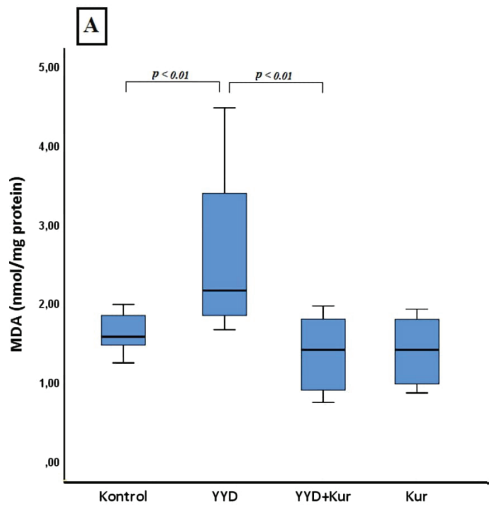
Şekil 1: Çalışma gruplarını oluşturan sıçanların testis ROS düzeyleri. Değerler medyan (min-maks) olarak verilmiştir. Yatay çizgiler medyan değerleri, kutular %50 dağılımı, üst çizgiler %75, alt çizgiler ise %25 dağılımı göstermektedir. Yukarı ve aşağı doğru olan "T" şeklinde çizgiler uç olmayan en düşük ve en yüksek değeri göstermektedir. (n=8/grup).

YYD: yüksek yağlı diyet grubu; Kur: kurkumin grubu; YYD+Kur: Yüksek yağlı diyet ile birlikte kurkumin alan grup; ROS: reaktif oksijen türleri; RFU: relatif floresan ünite



Şekil 3: Çalışma gruplarını oluşturan sıçanların testis GSH düzeyleri. Değerler medyan (min-maks) olarak verilmiştir. Yatay çizgiler medyan değerleri, kutular %50 dağılımı, üst çizgiler %75, alt çizgiler ise %25 dağılımı göstermektedir. Yukarı ve aşağı doğru olan "T" şeklinde çizgiler uç olmayan en düşük ve en yüksek değeri göstermektedir. (n=8/grup).

YYD: yüksek yağlı diyet grubu; Kur: kurkumin grubu; YYD+Kur: Yüksek yağlı diyet ile birlikte kurkumin alan grup; GSH: glutatyon



Şekil 2: Çalışma gruplarını oluşturan sıçanların testis homojenatında (A) ve mitokondrisinde (B) MDA düzeyleri. Değerler medyan (min-maks) olarak verilmiştir. Yatay çizgiler medyan değerleri, kutular %50 dağılımı, üst çizgiler %75, alt çizgiler ise %25 dağılımı göstermektedir. Yukarı ve aşağı doğru olan "T" şeklinde çizgiler uç olmayan en düşük ve en yüksek değeri göstermektedir. (n=8/grup).

YYD: yüksek yağlı diyet grubu; Kur: kurkumin grubu; YYD+Kur: Yüksek yağlı diyet ile birlikte kurkumin alan grup; MDA: Malondialdehit

lamalı düzeyde değişmedi. Ancak YYD ile birlikte kurkumin alan grupta YYD grubu ile kıyaslandığında GST aktivitesi artmış bulundu. Sadece kurkumin alan grupta ise kontrole göre postmitokondriyal GST aktivitesi değişmedi (Tablo 2). Mitokondriyal antioksidan enzim aktiviteleri ise YYD ve kurkumin uygulamasından etkilenmedi (Tablo 3). Doku MDA ile mitokondriyal MDA düzeyleri arasında ileri derecede anlamlı pozitif korelasyon bulundu ($r=0.562$, $p=0.001$, $n=32$).

üzerine olan etkisini incelemektir. Bu konuda daha önce yapılmış çalışmalar sınırlıdır ve net bir sonuca varabilmek açısından yetersizdir.

Bulgularımıza göre, testis dokusunda postmitokondriyal ve mitokondriyal fraksiyonlarda yağlı beslenmeye bağlı artış gösteren MDA düzeyleri, kurkumin kullanımı ile anlamlı olarak azalmıştır. Sadece kurkumin alan grupta ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir değişiklik

Tablo 2: Postmitokondriyal bakır-çinko süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon S- transferaz aktiviteleri. Değerler medyan (min-maks) olarak verilmiştir.

	Kontrol (n=8)	YYD (n=8)	YYD+Kur (n=8)	Kur (n=8)
Cu-Zn SOD (U/mg prot)	16,87 (14,09-29,24)	16,04 (8,93-25,25)	14,91 (11,18-27,18)	14,87 (11,76-19,66)
GPx (nmol/mg prot)	317,6 (287,2-348,4)	286,3 (171,1-387,4)	360,1 (248,7-576,7)	316,8 (256,5-394,1)
GST (nmol/mg prot)	840,2 (683,9-981,7)	815,4 (520,6-899,7)	991,0 ^a (821,0-1182,5)	972,5 (716,3-4512,6)

^aYYD grubu ile karşılaştırma $p=0,003$; YYD: Yüksek yağlı diyet grubu; Kur: Kurkumin grubu; YYD+Kur: Yüksek yağlı diyet ile birlikte kurkumin alan grup; Cu-Zn SOD: Bakır-çinko süperoksit dismutaz; GPx; Glutatyon peroksidaz; GST; Glutatyon S-transferaz

Tablo 3: Mitokondriyal Mangan-süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon S- transferaz aktiviteleri. Değerler medyan (min-maks) olarak verilmiştir

	Kontrol (n=8)	YYD (n=8)	YYD+Kur (n=8)	Kur (n=8)
Mn-SOD (U/mg prot)	7,63 (4,66-9,36)	7,29 (2,02-9,04)	6,02 (5,21-8,69)	5,98 (3,20-13,03)
GPx (nmol/mg prot)	70,40 (30,59-92,54)	76,05 (62,28-91,86)	73,77 (61,90-88,65)	70,95 (53,81-126,64)
GST (nmol/mg prot)	480,3 (380,5-550,6)	504,9 (226,6-692,5)	396,5 (108,5-586,8)	463,1 (241,7-710,0)

YYD: yüksek yağlı diyet grubu; Kur: kurkumin grubu; YYD+Kur: Yüksek yağlı diyet ile birlikte kurkumin alan grup; Mn-SOD: mangan süperoksit dismutaz; GPx; glutatyon peroksidaz; GST; glutatyon S-transferaz

TARTIŞMA

Obezite ve yağlı diyetle beslenmenin erkek üreme sistemi üzerine olan olumsuz etkileri birçok çalışma ile gösterilmiştir (7, 22). Obez kişilerde artış gösteren yağ kütlesinin testis skrotumunda biriktiği ve oksidatif strese yol açtığı bildirilmiştir (7). Testis dokusunun ve sperm membranlarının çok doymamış yağ asitlerinden zengin içerikte olması erkek üreme sistemini oksidasyona açık hale getirmektedir (6). Membran lipidlerinin oksidatif strese bağlı peroksidasyonu sonucu, başta MDA olmak üzere doku hasarına yol açan pekçok doymamış reaktif aldehit türevleri oluştuğu bilinmektedir (23). Bu çalışmadaki amacımız, YYD ile beslenen sıçanlarda kurkuminin testiküler oksidatif stres

görülmemiştir. Bu sonuç, yağlı diyetle uyarılmış oksidatif stresi, kurkuminin başarılı bir şekilde baskılayabildiğini göstermektedir. Kurkuminin antioksidan etkisini oksidasyonu uyarıcı transkripsiyon faktörlerini baskılama yoluyla gerçekleştirdiği bildirilmiştir (24). *In vitro* bir çalışmada kurkuminin nükleer faktör κ B (NF- κ B) aktivasyonunu baskılayarak antioksidan etki gösterdiği bildirilmiştir (24). Başka bir çalışmada, kurkuminin peroksil oluşumunu ve oksidatif stresi azaltıp, antioksidan enzim aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir (25). Çalışmamızda yağlı diyet alan grupta MDA düzeylerinin artıp ROS düzeylerinin değişmemesi, testiküler ROS salınımının, MDA sentezi ile sonuçlanan lipid peroksid oluşumuna göre daha az olduğunu düşündürmektedir. Çoklu doymamış yağ asidi oranının

testiste fazla olması, lipid peroksit salınımını artırarak MDA düzeylerinin yükselmesine neden olabilir. Ancak MDA düzeyindeki bu artış ROS düzeyleri ile ilişkili değildir. 2019 yılında 16 hafta kurkumin ve kapsaisin alan YYD ile beslenmiş sıçanların testis dokusunda yaptığımız bir çalışmada, YYD grubunda artan MDA düzeyleri, YYD ile birlikte kurkumin+kapsaisin alan grupta azalmıştır. ROS düzeyleri ise değişim göstermemiştir (10). Bulgularımız daha önceki çalışmamızla uyumludur. Kanter ve ark'larının yaptığı başka bir çalışmada, streptozotosinle uyarılmış diyabetik sıçanların testis dokusunda MDA düzeyleri artmış, kurkumin alan diyabetik grupta ise azalmıştır (22). Zhao ve ark'larının yaptığı bir çalışmada ise, 8 hafta YYD ve sıçan vücut kg'ı başına 100 mg kurkumin verilen sıçanların testis dokusunda YYD ile birlikte artan MDA düzeyleri kurkumin ile azalmıştır (26). Kurkuminin testis dokusunda yağlı beslenmeye verdiği koruyucu cevabın uygulanan doz ve süre ile ilişkili olduğu görülmektedir.

Testis fonksiyonlarının fizyolojik olarak normal düzeylerde sürdürülmesi ancak serbest radikal tutucu ve/veya antioksidan sistemin yeterli olması ile mümkündür. GSH hücrel redoks potansiyelini düzenleyen en önemli antioksidanlardan biridir (27). Deney grubumuzda GSH düzeyleri YYD uygulaması ile azalmıştır. Ancak YYD ile birlikte alınan kurkumin, GSH düzeylerini kontrol grubuna yakın düzeylere yükselterek süreci tersine çevirmiştir. Bununla birlikte sadece kurkumin alan grupta GSH düzeylerinde değişim olmaması, GSH'ın yağlı beslenmeye karşı oluşan oksidatif stres ile baş etmekte ne derece önemli olduğunu göstermektedir. YYD beslenme modeli oluşturulan daha önceki hayvan çalışmalarında, plazma ve doku GSH düzeylerinde azalma olduğu bildirilmiştir (28,29). Bulgumuz bu çalışmalarla uyumludur.

Antioksidan savunma sisteminde SOD, GPx ve GST gibi antioksidan enzim aktiviteleri de önemlidir. Mitokondriyal ve postmitokondriyal fraksiyonlarda ölçtüğümüz antioksidan enzim aktivitelerinden sadece postmitokondriyal GST aktivitesi kurkumin ile artmıştır. Bu sonuç GST'nin substratı olan sitozolik GSH düzeylerinin kurkumin ile uyarılıp artmasına bağlı olarak GST aktivitesinin de artması ile açıklanabilir. Testiküler antioksidan enzim aktivitelerini ölçen çalışmalarda verilen sonuçlar çok değişken ve çeşitlidir. Gujjala ve ark'larının yaptığı çalışmada 90 gün YYD ve *Caralluma fimbriata* ile beslenen sıçanların testis dokusunda GSH ve enzim aktivitelerinin arttığı gösterilmiştir (2). 2017'de yapılan farklı bir çalışmada, YYD ile beslenen diyabetik sıçanların testislerinde kurkumin uygulaması ile MDA azalmış; SOD aktivitesi ise artmıştır (26). 2019 yılındaki çalışmamızda ise 16 hafta kurkumin ve kapsaisin alan sıçanların testis GSH düzeyleri ile SOD, GPx ve GST aktivitelerinde değişiklik bulunmamıştır (10).

Sonuç olarak, 16 hafta süreyle YYD ve yem kg'ı başına 1g kurkumin alan sıçanların testislerinde oksidatif hasar göz-

tergesi olan MDA düzeyleri artmıştır. MDA düzeylerinin mitokondriyal fraksiyonda da artmış olması ve sitozolik MDA düzeyleri ile pozitif korelasyon göstermesi mitokondriyal oksidatif hasarın oluştuğunu ve bunun sitozolik oksidan stresle ilişkili olduğunu göstermektedir. Oksidatif hasar, kurkumin uygulaması ile gerilemiş; ancak bu durum antioksidan enzim aktivitelerini etkilememiştir. Kurkuminin antioksidan sistem üzerine etkisi GSH düzeylerini uyarıcı boyutla sınırlı kalmıştır. Kurkuminin oksidatif stresi baskılayıcı etkisinin özellikle serbest radikal yok edici özelliğine bağlı olduğu bildirilmiştir (30). Bu etki testis dokusunda oldukça etkili gözükmemektedir. Kurkuminin özellikle MDA düzeyleri üzerine etkili olması, testiste yüksek miktarda bulunan çok doymamış yağ asitlerinin peroksitlere dönüşümünü baskılayıcı özelliğine bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda testiküler antioksidan enzim aktivitelerinin kurkuminle değişmiş olmasının bir nedeninin de, kurkuminin testiste transkripsiyon faktörleri, özellikle NF- κ B üzerine baskılayıcı etki göstermiş olma ihtimalidir. Bu konuda yapılacak ileri çalışmalar, erkek üreme sisteminde kurkuminin oksidan-antioksidan sistem üzerindeki koruyucu etkilerinin moleküler mekanizmalarının belirlenmesinde önemli olacaktır.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan alınmıştır. (No: 2013/48 ve 2014/63)

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

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

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

Ethics Committee Approval: This study was approved by the Ethics Committee of Istanbul University Animal Experiments. (No: 2013/48 and 2014/63)

Peer Review: Externally peer-reviewed.

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

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: Authors declared no financial support.

KAYNAKLAR

1. Liu Y, Ding Z. Obesity, a serious etiologic factor for male subfertility in modern society. *Reproduction* 2017;154(4):123-31. [CrossRef]
2. Gujjala S, Putakala M, Gangarapu V, Nukala S, Bellamkonda R, Ramaswamy R, Desireddy S. Protective effect of Caralluma fimbriata against high-fat diet induced testicular oxidative stress in rats. *Biomed Pharmacother* 2016;83:167-76. [CrossRef]
3. Nakamura S, Takamura T, Matsuzawa-Nagata N, Takayama H, Misu H, Noda H, et al. Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria. *J Biol Chem* 2009;284:14809-18. [CrossRef]
4. Webster NR, Nunn JF. Molecular structure of free radicals and their importance in biological reactions. *Br J Anaesth* 1988;60(1):98-108. [CrossRef]
5. Rato L, Alves MG, Cavaco JE, Oliveira PF. High-energy diets: a threat for male fertility? *Obesity Reviews* 2014;15:996-1007. [CrossRef]
6. Dohle GR, Diemer T, Giwercman A, Jungwirth A, Kopa Z, Krausz C. Guidelines on Male Infertility. E.A.U. 2010:6-8.
7. Mortazavi M, Salehi I, Alizadeh Z, Vahabian M, Roushandeh AM. Protective Effects of Antioxidants on Sperm Parameters and Seminiferous Tubules Epithelium in High Fat-fed Rats. *J Reprod Infertil* 2014;15(1):22-8.
8. Chen H, Zhao HX, Huang XF, Chen GW, Yang ZX, Sun WJ, et al. Does high load of oxidants in human semen contribute to male factor infertility? *Antioxid Redox Signal* 2012;16(8):754-9. [CrossRef]
9. Sharma RA, Gesch er AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. *Eur J Cancer* 2005;41:1955-68. [CrossRef]
10. Tanrikulu-Küçük S, Başaran-Küçükgergin C, Seyithanoğlu M, Doğru-Abbasoğlu S, Koçak H, Beyhan-Özdaş Ş, Öner-İyidoğan Y. Effect of dietary curcumin and capsaicin on testicular and hepatic oxidant-antioxidant status in rats fed a high-fat diet. *Appl Physiol Nutr Metab* 2019;3:1-9. [CrossRef]
11. Öner-İyidoğan Y, Tanrikulu-Küçük S, Seyithanoğlu M, Koçak H, Doğru-Abbasoğlu S, Aydın AF, et al. Effect of curcumin on hepatic heme oxygenase 1 expression in high fat diet fed rats: is there a triangular relationship? *Can J Physiol Pharmacol* 2014;92:805-12. [CrossRef]
12. Aggarwal BB, Harikumar KB. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:40-59. [CrossRef]
13. Goel A, Jhurani S, Aggarwal BB. Multi-targeted therapy by curcumin: How spicy is it? *Molecular Nutrition and Food Research* 2008;52:1010-30. [CrossRef]
14. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-8. [CrossRef]
15. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1979;61:882-8.
16. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976;71:952-8. [CrossRef]
17. Habig WH, Jacoby WB. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods Enzymol* 1981;77: 398-405. [CrossRef]
18. Mylorie AA, Collins H, Umbles C, Kyle J. Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate. *Toxicol Appl Pharmacol* 1986;82:512-20. [CrossRef]
19. Lu J, Wu DM, Zheng YL, Hu B, Cheng W, Zhang ZF, Li MQ. Troxerutin counteracts domoic acid-induced memory deficits in mice by inhibiting CCAAT/enhancer binding protein β -mediated inflammatory response and oxidative stress. *J Immunol* 2013;190:3466-79. [CrossRef]
20. Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 1999;27:612-6. [CrossRef]
21. Smith S. The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. *FASEB J* 1994; 8:1248-59. [CrossRef]
22. Kanter M, Aktas C, Erboğa M. Curcumin attenuates testicular damage, apoptotic germ cell death, and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Nutr Food Res* 2013;57(9):1578-85. [CrossRef]
23. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991;11(1):81-128. [CrossRef]
24. Xu DP, Li Y, Meng X, Zhou T, Zhou Y, Zheng J, et al. Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. *Int J Mol Sci* 2017;18:96. [CrossRef]
25. Alappat L, Awad AB. Curcumin and obesity: evidence and mechanisms. *Nutr Rev* 2010;68(12):729-38. [CrossRef]
26. Zhao L, Gu Q, Xiang L, Dong X, Li H, Ni J, et al. Curcumin inhibits apoptosis by modulating Bax/Bcl-2 expression and alleviates oxidative stress in testes of streptozotocin-induced diabetic rats. *Ther Clin Risk Manag* 2017;28:1099-105. [CrossRef]
27. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* 2003;333(1):19-39. [CrossRef]
28. Sudhakara G, Mallaiha P, Sreenivasulu N, Sasi Bhusana Rao B, Rajendran R, Saralakumari D. Beneficial effects of hydroalcoholic extract of Caralluma fimbriata against high-fat diet induced insulin resistance and oxidative stress in Wistar male rats. *J Physiol Biochem* 2014;70:311-20. [CrossRef]
29. Lee SJ, Choi SK, Seo JS. Grape skin improves antioxidant capacity in rats fed a high fat diet. *Nutr Res Pract* 2009;3(4):279-85. [CrossRef]
30. Dikmen M, Kaya-Tilki E, Engur S, Ozturk Y. Neuritogenic activity of epigallocatechin gallate and curcumin combination on rat adrenal pheochromocytoma cells. *Fresenius Environ Bull* 2017;26:4726-33.

RESULTS OF URINE DIPSTICK SCREENING TEST IN ELEMENTARY SCHOOL CHILDREN

İLKÖĞRETİM ÇAĞINDAKİ ÇOCUKLARDA İDRAR DİPSTİCK TARAMA TESTİ SONUÇLARI

Günay MURADOVA¹ , Zeynep YÜRÜK YILDIRIM² , Özde Nisa TÜRKKAN² , Ahmet NAYIR² 

Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, ¹Department of Pediatrics, ²Department of Pediatric Nephrology, Istanbul, Turkey

ORCID IDs of the authors: G.M. 0000-0001-8211-1182; Z.Y.Y. 0000-0003-2891-2231; Ö.N.T. 0000-0003-2928-9031; A.N. 0000-0002-3357-9237

Cite this article as: Muradova G, Yuruk Yildirim Z, Turkkan ON, Nayir A. Results of urine dipstick screening test in elementary school children. J Ist Faculty Med 2020;83(3):254-8. doi: 10.26650/IUITFD.2019.0037

ABSTRACT

Objective: Renal diseases may present with proteinuria, hematuria and pyuria without any symptoms. The aim of the study is to determine of urinalysis abnormalities by urine dipstick screening program in healthy school-aged children.

Material and Method: We evaluated results of urine dipstick tests of 1052 children (541 male, 511 female) between the ages of 9 and 10. A second urine dipstick test was performed on those students who had hematuria and/or proteinuria in the first test.

Results: Abnormality in urine dipstick test was detected in a total of 137 (13%) children. Sixteen cases had isolated hematuria (1.5%), 22 cases isolated proteinuria (2.1%) and one case (0.1%) combined hematuria-proteinuria. In the second evaluation with the dipstick test, we determined that hematuria persisted only in 8 (0.8%) and proteinuria in 2 cases (0.2%). Additionally, 96 cases (9.1%) were positive for leucocyte-esterase, and 18 cases (1.7%) were nitrite positive in the first screening.

Conclusion: Our findings revealed that prevalence of hematuria and proteinuria was reduced in the second urine dipstick screening. Therefore, asymptomatic patients with isolated proteinuria or hematuria should be re-evaluated with a urine dipstick. Our study suggests that with the help of screening tests in school-aged children; hematuria, and proteinuria can be determined and this might be an indication for the asymptomatic period of a kidney disease.

Keywords: Children, dipstick, hematuria, proteinuria, screening, urinalysis

ÖZET

Amaç: Renal hastalıklar herhangi bir semptomu neden olmadan hematüri ve proteinüri ile ortaya çıkabilirler. Çalışmamızın amacı sağlıklı, okul çağındaki çocuklarda idrar analizi anormalliklerinin idrar dipstick testi ile değerlendirilmesidir.

Gereç ve Yöntem: Yaşları 9-10 aralığında olan 1052 (541, erkek, 511 kız) çocuğun idrar dipstick test sonuçları değerlendirildi. İlk idrar analizinde anormallik tespit edilen çocuklarda kalıcı hematüri ve proteinürinin değerlendirilmesi için ikinci bir idrar dipstick testi yapıldı.

Bulgular: Anormal idrar dipstick test sonucu 137 (%13) hastada tespit edildi. On altı (%1,5) çocukta izole hematüri, 22 (%2,1) çocukta izole proteinüri ve bir (%0,1) çocukta kombine hematuria ve proteinuri tespit edildi. İkinci idrar dipstick testinde hematürinin yalnızca 8 çocukta (%0,8) ve proteinürinin 2 (%0,2) çocukta persiste ettiği görüldü. Ayrıca ilk idrar analizinde 96 (%9,1) çocukta lökosit esterase pozitifliği, 18 (%1,7) çocukta nitrit pozitifliği, 10 (%0,95) çocukta hem lökosit esterase hem de nitrit pozitifliği tespit edildi.

Sonuç: Çalışmamızın sonuçlarında ikinci bir idrar analizi yapıldığında hematüri ve proteinüri sıklığının düştüğü görülmüştür. Bu nedenle izole hematüri ya da proteinüri saptanan asemptomatik hastalar ikinci bir idrar analizi ile yeniden değerlendirilmelidir. Çalışmamızın sonuçları okul çağı çocuklarında dipstick tarama testi ile hematüri ve proteinüri tespit edilebileceğini ve bu durum böbrek hastalıklarının asemptomatik döneminin bulgusu olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Çocuk, dipstick, hematuria, proteinüri, tarama, idrar analizi

Corresponding author/İletişim kurulacak yazar: znyuruk@gmail.com

Submitted/Başvuru: 13.05.2019 • **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 18.09.2019 •

Last Revision Received/Son Revizyon: 18.11.2019 • **Accepted/Kabul:** 02.01.2020 • **Published Online/Online Yayın:** 11.02.2020

©Telif Hakkı 2020 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2020 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

INTRODUCTION

Renal diseases may present with proteinuria, hematuria and pyuria and patients may not show any symptoms (1). Therefore, diagnosis and treatment might be delayed for such patients. Diagnosis of kidney diseases by routine urine screening programs before the symptomatic period may prevent or delay the progression of chronic kidney diseases (CKD) to end-stage renal disease (ESRD) (2-4). The urine dipstick test is the most common, practical and sensitive screening method for the early diagnosis of a kidney disease by determining erythrocyte, leukocyte, nitrite and protein in urine (1, 5, 6). Additionally, urine pH and specific gravity evaluation by urine dipstick test provide information about the status of hydration and nutritional habits of children.

Isolated proteinuria or hematuria is often transient and indicates mostly an underlying benign disorder. However, when albuminuria, and urine sediment abnormalities persist more than 3 months, patients are accepted as CKD according to the KDIGO guideline (7). Therefore, the children with persistent proteinuria or hematuria must be evaluated further and followed in case of progression to CKD. To determine and evaluate hematuria and proteinuria, the urine dipstick test is an inexpensive and practical tool to use.

The aim of the study was to screen healthy school aged children by urine dipstick test to determine proteinuria and hematuria, and thereby determine the prevalence of the patients who are at risk of progression to CKD.

MATERIAL AND METHOD

Between December 2016 and January 2017, 1052 students in 4th and 5th grades of 7 schools in İstanbul were enrolled in the study. This study was approved by the local ethical committee (No: 2016/1341) and written informed consent was obtained from the children's parents. Non-voluntary children (despite parental approval) and children with any acute and chronic disorder during the study were excluded from the study.

At least 2 ml of urine were obtained for urinalysis by urine dipstick test. Urinalysis was performed within 0.5-1 min after urine collection in a mobile laboratory.

Urine pH, specific gravity, protein, hemoglobin, glucose, ketone, acetone, bilirubin, urobilinogen, nitrite and leucocyte were determined by immersion method in urine with urine dipstick test (URIT 11G brand). Within one month, a second urinalysis with the same procedure was performed in children who had hematuria and/or proteinuria according to the first urinalysis. Written information was given to the parents of the children who had abnormal urinalysis during the first and second test, and recommended to apply to outpatient clinic for the further evaluation.

Statistical calculations were performed with IBM SPSS Statistics for Windows, Version 24.0. Armonk, NY: IBM Corp. Besides standard descriptive statistical calculations (mean, standard deviation, median, and IQR), the chi-square test was used for comparisons of qualitative variables. Statistical significance level was established at $p < 0.05$.

RESULTS

The gender distribution and grade of children were given in Table 1.

First urinalysis results

Urine abnormalities were detected in 137 (13%) children according to the first urinalysis results. Hematuria was detected in 16 (1.5%), proteinuria in 22 (2.1%), leukocyte esterase positivity in 96 (9.1%), nitrite positivity in 18 (1.7%), ketone bodies in 1 (0.1%) of the children. Urine abnormality was higher in the 5th grade children than the 4th grade children (16.3% vs 13.9%, respectively).

The hematuria and proteinuria prevalence according to gender and grade of children were given in Table 2. There was no difference between males and females in terms

Table 1: The distribution of gender and grade of children

	Total n (%)	Gender	
		Female n (%)	Male n (%)
	1052 (100%)	511 (51.4%)	541(48.6%)
4th grade	835 (79.4%)	423 (40.2%)	412 (39.2%)
5th grade	217 (20.6 %)	118 (11.2%)	99 (9.4%)

Table 2: Prevalence of hematuria and proteinuria in the first and second urine dipstick screening

	First dipstick screening			Second dipstick screening	
	Female n (%)	Male n (%)	P*	Female n (%)	Male n (%)
Isolated proteinuria	11 (1.0)	11 (1.0)	0.163	0	2 (0.2)
Isolated hematuria	14 (1.3)	2 (0.2)	0.825	7 (0.7)	1 (0.1)
Combined hematuria and proteinuria	1 (0.1)	0		0	0

of isolated proteinuria and hematuria ($p=0.163$, $p=0.825$, respectively, Table 2). Combined hematuria and proteinuria was detected only in a 4th grade girl (0.1%).

All children with leukocyte esterase and nitrite positivity were female. Ten (0.95%) children had both leukocyte esterase and nitrite positivity.

Urine specific gravity of the children ranged from 1010-1030. There were no children who had hypostenuric urine (<1010). Isostenuric urine (specific gravity: 1010-1020) was detected in 30.8% of the cases and hyperstenuric urine (specific gravity: >1020) was detected in 69.2% of the cases (Figure 1).

Urine pH of the children was ranged between 5-5.5. Eight (0.8%) children had alkaline urine.

Second urinalysis results

A second urine dipstick test was performed to determine the prevalence of persistent hematuria and proteinuria in the study subjects. Urinary abnormality was detected in only 12 children (1.14%) in the second urinalysis by urine dipstick test. Proteinuria was detected only in 2 (9.1%) boys among 22 children with proteinuria on the initial screening. The persistent proteinuria prevalence was 0.2%. Hematuria was detected in 8 (50%) children (7 female, 1 male) among 16 children with hematuria on the initial screening. The persistent hematuria prevalence was 0.8%. The second urine dipstick test was normal in the patient with combined hematuria and proteinuria according to the first urine dipstick test.

DISCUSSION

The urine dipstick test is a non-invasive, useful, inexpensive diagnostic tool which provides important clues of kidney as well as other organ disorders. It has been

considered that urinalysis is an important method for the early detection of kidney diseases since they may be asymptomatic in the early period. However, the necessity of routine urinalysis screening is still controversial. Until 2007, the American Academy of Pediatrics (AAP) recommended routine urine analysis even in healthy children (8). However, the AAP published in 2007 that the routine dipstick urinalysis is only recommended in children at higher risk for CKD (8).

Hematuria and proteinuria can be easily detected by urinalysis and can occur due to a variety of disorders. Hematuria or proteinuria can appear as an incidental finding. One of the most powerful predictors of impaired renal function is the degree of proteinuria (9-11). Proteinuria screening may be a better indicator in determining the risk of developing chronic renal failure than the screening of reduced renal function (1, 12).

Prevalence of hematuria and proteinuria were demonstrated between 1.3-13.3 and 0.23-8.7% in different regions of our country (13-17). In our study, we demonstrated a prevalence of hematuria and proteinuria of 1.5%, 2.1% respectively in the first urine dipstick screening testing. However, this prevalence was significantly reduced in the second screening as 0.8% for hematuria and 0.2% for proteinuria. These rates were lower than the other previous studies conducted in our country (13-17). Our study suggests that asymptomatic patients with isolated proteinuria or hematuria should be re-evaluated to determine whether this condition is transient or not. Therefore, a school urine dipstick screening program should be conducted by two steps, and also asymptomatic children with urinary abnormalities should have a second dipstick testing. Children with persistent proteinuria or hematuria in the second urine dipstick test should be referred to secondary or tertiary centers.

The school urinary screening programs have been performed in several countries, especially in Asian countries due to higher prevalence of glomerulonephritis (5, 10, 18, 19). Japan was the first country to introduce a national urine screening program in school age children (20). The prevalence of hematuria and proteinuria was 0.54% and 0.08%, and the annual incidence of hematuria, proteinuria and combined hematuria and proteinuria in Japan was found to be 0.19%, 0.03% and 0.02% respectively in children aged 6-10 (21, 22). It has been stated that the school urinary screening program reduced the number of ESRD due to glomerulonephritis and also increased the age of patients with ESRD (23). In our study, we demonstrated a higher prevalence of hematuria and proteinuria than the Japanese population, even in the second screening. These results suggest that a school urine dipstick screening program may be useful for our country as it is in Japan. In our

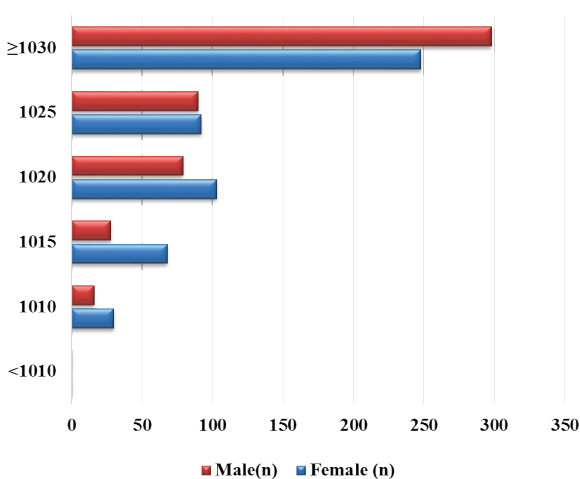


Figure 1: Distribution of specific gravity of urine.

country, the most common cause of end-stage renal disease is CAKUT and the second is glomerulonephritis in children (24). Proteinuria and hematuria can be detected in children with aforementioned renal disease in the asymptomatic period by urine dipstick screening program. Hereby, preventive treatments for progression to ESRD can be provided for these children in the early period.

The hematuria and proteinuria prevalence ranged between 0.02-2.3 and 0.12-1.85 according to urinary screening programs conducted in different countries (10, 26-28). The underlying pathology among these children with persistent hematuria was glomerular origin in 22.5-52.3% of children according to further evaluation for these children (10, 11, 27, 28). After introducing the school urine dipstick screening program, the incidence of CKD due to focal segmental glomerulosclerosis and systemic lupus erythematosus was decreased in Taiwan (2). Additionally, the number of cases who started dialysis was decreased in five years with the school screening program (2). Genetic renal disorders such as genetic FSGS, which can be insidious, are relatively common in our country due to consanguineous marriages. With the school urinary screening program, these patients will be recognized earlier and the early interventions may delay the progression of CKD to ESRD.

Hypersthenuric urine was demonstrated in 69.2% of children in the present study. These results suggest that school aged children do not consume enough water. However, this result may be an indirect consequence of poor hygiene in the school lavatory. Especially girls tend to refuse urination in school, and they reduce water intake to avoid using the school lavatory (29). Our results suggest that children should be encouraged to drink more water in terms of kidney health, and free access to clean toilets should be provided. Thus, the incidence of stone diseases and voiding dysfunction will be reduced.

Our study had some limitations. Although, the present study was conducted in the province with largest and most cosmopolite population in our country, it may not reflect the entire population. Further evaluation and long-term follow-up of the patients with urinary abnormalities were not evaluated.

The medical, social and economic burden of CKD has been increasing day by day in the whole world. Therefore, national disease management models should be developed to prevent diseases and the progression of diseases, and to build strategies for early diagnosis and treatment. As in our country and some other countries, well-child care visits can be ignored and disregarded by the parents, especially in school aged children. Therefore, urinary screenings may be a necessary strategy

and may be included in our national disease management program. For preventing CKD and for disease management, each country should determine their own strategies. We suggest that urinary screening by urine dipstick test in school aged children is necessary to increase awareness, protect kidney health and reduce the incidence of renal disease for our country. Necessity may be delineated more comprehensively by the introducing a national urine dipstick screening program in school aged children. Additionally, school urine dipstick screening programs should be organized in a two step manner for excluding the transient causes of hematuria and proteinuria and to avoid unnecessary medical testing of the children.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı Yerel Etik Kurul'ndan alınmıştır (No:2016/1341).

Bilgilendirilmiş Onam: Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

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

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

Teşekkür: Çocuk Böbrek Vakfı'na bu taramanın gerçekleştirilmesini sağladıkları için teşekkür ederiz.

Ethics Committee Approval: This study was approved by Local Ethics Committee (No:2016/1341).

Informed Consent: Written consent was obtained from the participants.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

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

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: Authors declared no financial support.




Acknowledgement: We would like to thank the Child Kidney Foundation for providing this screening.

REFERENCES

1. Yamagata K, Iseki K, Nitta K, Imai H, Iino Y, Matsuo S. Chronic kidney disease perspectives in Japan and the importance of urinalysis screening. *Clin Exp Nephrol* 2008;12:1-8. [CrossRef]
2. Lin CY, Hsieh CC, Chen WP, Yang LY, Wang HH. The underlying diseases and follow-up in Taiwanese children screened by urinalysis. *Pediatr Nephrol* 2001;16(3):232-7. [CrossRef]
3. Schumann GB, Greenberg NF. Usefulness of macroscopic urinalysis as a screening procedure. *Am Soc Clin Pathol* 1979;71:452-6. [CrossRef]
4. Shaw ST, Poon SY, Wong ET. Routine urinalysis. Is the dipstick enough? *JAMA* 1985;253:1596-600. [CrossRef]
5. Koyama A, Igarashi M, Kobayashi M. Natural history and risk factors for immunoglobulin A nephropathy. *Am J Kid Dis.* 1997;29:526-32. [CrossRef]
6. Kemper KJ, Avner ED. The case against screening urinalyses for asymptomatic bacteriuria in children. *Am J Dis Child* 1992;146:343-46. [CrossRef]
7. Stevens PE, Levin A. Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2012 clinical practice guideline. *Ann Intern Med* 2013;158(11):825-30. [CrossRef]
8. Recommendations for Preventive Pediatric Health Care. *Pediatrics*, 2007;120(6):1376. [CrossRef]
9. Lin CY, Sheng CC, Chen CH, Lin CC, Chou P. The prevalence of heavy proteinuria and progression risk factors in children undergoing urinary screening. *Pediatr Nephrol* 2002;14:953-9. [CrossRef]
10. Murakami M, Yamamoto H, Ueda Y, Murakami K, Yamauchi K. Urinary screening of elementary and junior high-school children over a 13-year period in Tokyo. *Pediatr Nephrol* 1991;5:50-3. [CrossRef]
11. Cho BS, Kim SD, Choi YM, Kang HH. School urinalysis screening in Korea: prevalence of chronic renal disease. *Pediatr Nephrol* 2001;16:1126-8. [CrossRef]
12. Halbesma N, Kuiken DS, Brantsma AH, Bakker SJ, Wetzels JF. De estimated GFR to identify individuals at risk for accelerated GFR loss in population screening. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:2582-90. [CrossRef]
13. Yayli G, Yaman H, Demirdal T. Asymptomatic bacteriuria rates in schoolchildren: results from a rural city in Turkey. *J Trop Pediatr* 2003;49:228-30. [CrossRef]
14. Yenisey C, Sonmez F. Aydın'da okul çağı çocuklarında asemptomatik hematüri, proteinüri, pyüri taraması. *Adnan Menderes Üniv Araştırmaları*, 1999.
15. Mir S, Keskinoglu A, Ozkayın N, Ozdemir O. İlkokul 1. Sınıf çocuklarında asemptomatik idrar yolu enfeksiyonu ve hipertansiyon prevalansı. *Ege Tıp Dergisi* 2005;44(1):29-33.
16. Ünalacak M, Armutcu F, Demirel F, Gürel A, Demircan N, Aktunç E. Okul çağı çocuklarda mikroskopik idrar incelemesi ile asemptomatik bakteriüri sıklığı. *Tıp Araştırmaları Dergisi* 2005;3:30-2.
17. Nebigil I, Tümer N. Asymptomatic urinary tract infection in childhood. *Eur J Pediatr* 1992;151(4):308-9. [CrossRef]
18. Murakami M. Screening for proteinuria and hematuria in schoolchildren methods and results. *Acta Paediatr Jpn* 1990;32(6):682-9. [CrossRef]
19. Lin CY, Sheng CC, Lin CC, Chen CH, Chou P. Mass urinary screening and follow-up for schoolchildren in Taiwan province. *Acta Paediatr Taiwan* 2001;42(3):134-140.
20. Ruggerenti P, Perna A, Mosconi L, Pisoni R, Remuzzi G. Urinary protein excretion rate is the best independent predictor of ESRF in non-diabetic proteinuric chronic nephropathies. "Gruppo Italiano di Studi Epidemiological Nefrologia" (GISEN). *Kidney Int* 1998;53:1209-16. [CrossRef]
21. Suleymanlar G, Utaş C, Arınsoy T, et al. A population based survey of chronic renal disease in Turkey - The CREDIT study. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:1862-71. [CrossRef]
22. Ambo K, Tsuchiya M, Murakami M, et al. Incidence of abnormalities in urinalysis in Japanese children aged six to ten years (in Japanese). *J Jpn Pediatr Soc* 1999;103:543-8.
23. Murakami M, Hayakawa M, Yanagihara T, Hukunaga Y. Proteinuria screening for children. *Kidney Int Suppl* 2005;(94):23-7. [CrossRef]
24. Ates K. Türkiye'de Nefroloji, Diyaliz ve Transplantasyon – Registry 2017. Available from URL: http://www.nefroloji.org.tr/folders/file/18104_REGISTRY2017_kontrol_v1.pdf
25. Lin CY, Hsieh CC, Chen WP, Yang LY, Wang HH. The underlying diseases and follow-up in Taiwanese children screened by urinalysis. *Pediatr Nephrol* 2001;16:232-7. [CrossRef]
26. Yap HK, Quek CM, Shen Q, Chia KS. Role of Urinary Screening Programmes in Children in the Prevention of Chronic Kidney Disease. *Ann Acad Med Singapore* 2005;34:3-7.
27. Zainal D, Baba A, Mustaffa BE. Screening proteinuria and haematuria in Malaysian Children. *SoutheastAsian J Trop Med Public Health* 1995;26:785-8.
28. Cho BS, Hahn WH, Cheong HI, Lim I, Ko CW, Kim SY, Suh JS. A nation wide study of mass urine screening tests on Korean school children and implications for chronic kidney disease management. *Clin Exp Nephrol* 2013;17(2):205-10. [CrossRef]
29. Vernon S, Lundblad B, Hellstrom AL. Children's experiences of school toilets present a risk to their physical and psychological health. *Child Care Health Dev* 2003;29:47-53. [CrossRef]

DELAYS IN INITIAL REFERRAL, DIAGNOSIS AND TREATMENT IN CHILDREN WITH CANCER

KANSERLİ ÇOCUKLARDA İLK YÖNLENDİRME, TANI VE TEDAVİDE GECİKMELER

Abbasali Hosein POURFEIZI¹ , Rana HOSSEINI² , Roghaye SHEERVALILOU³ , Sahar MEHRANFAR^{4,5} 

¹Tabriz University of Medical Science, Hematology and Oncology Research Center, Tabriz, Iran

²Urmia University of Medical Sciences, Social Determinants of Health Research Center, Urmia, Iran

³Zahedan University of Medical Science, Zahedan, Iran

⁴Urmia University of Medical Sciences, Faculty of Medicine, Department of Genetics and Immunology, Urmia, Iran

⁵Urmia University of Medical Sciences, Cellular and Molecular Research Center, Urmia, Iran

ORCID IDs of the authors: A.H.P. 0000-0003-1251-4730; R.H. 0000-0002-8745-8000; R.S. 0000-0001-7996-845x; S.M. 0000-0001-7831-7102

Cite this article as: Pourfeizi AH, Hosseini R, Sheervalilou S, Mehranfar S. Delays in initial referral, diagnosis and treatment in children with cancer. J Ist Faculty Med 2020;83(3):259-66. doi: 10.26650/IUITFD.2019.0004

ABSTRACT

Objective: Cancer has been one of the most critical health problems during the past decades which requires serious consideration, especially in developing countries.

Methods: 80 parents of children with different types of cancers were studied via both questionnaire and person-to-person interviews after declaring their informed consent.

Results: The highest delay in patients' initial referral was due to the following factors: lack of attention or ignoring the first symptoms, delay in referring to the physician, low economic status and even lack of family support for the patient. In addition, visiting several doctors after the initial diagnosis, uncertainty about the first proposed method, and the high cost of treatment can be mentioned as the main causes of delays in the start of treatment.

Conclusion: Education plays an important role in identifying the signs of cancer. In addition, proper relationship and cooperation between the health system and physicians as well as provision of adequate information to patients could lead to the long-term cooperation of these patients in continuing their treatment.

Keywords: Cancer, delay in referral, children, delay in diagnosis, delay in treatment

ÖZET

Amaç: Kanser, son yıllarda, özellikle gelişmekte olan ülkelerde, ciddi dikkat gerektiren en kritik sağlık sorunlarından biri olmuştur.

Yöntem: Farklı kanser türlerine sahip çocukların 80 ebeveyni aydınlatılmış onamları alındıktan sonra hem anket hem de bire bir görüşme yoluyla incelenmiştir.

Bulgular: Hastaların ilk sevindeki gecikmeler, aşağıdaki faktörlerden kaynaklanmaktadır: dikkat eksikliği veya ilk semptomları görmezden gelme, doktora başvurmada gecikme, düşük ekonomik durum ve hatta hasta için aile desteği eksikliği. Ek olarak, ilk tanıdan sonra farklı doktorlara başvurmak, önerilen ilk yöntem hakkında belirsizlik ve yüksek tedavi maliyeti, tedavinin başlangıcındaki gecikmelerin ana nedenleri olarak gösterilebilir.

Sonuç: Eğitim, kanser belirtilerini anlamada önemli bir rol oynamaktadır. Buna ek olarak, sağlık sistemi ve doktorlar arasında ilişki ve işbirliği ile hastalara yeterli bilgi sağlanması, bu hastaların tedavilerini sürdürmede önemli faktörler olarak görünmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kanser, sekte gecikme, çocuk, tanıda gecikme, tedavide gecikme

Corresponding author/İletişim kurulacak yazar: dr_sahar21@yahoo.com

Submitted/Başvuru: 14.01.2019 • **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 20.03.2019 •

Last Revision Received/Son Revizyon: 06.04.2019 • **Accepted/Kabul:** 06.11.2019 • **Published Online/Online Yayın:** 24.06.2020

©Telif Hakkı 2020 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2020 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

INTRODUCTION

Since the diagnosis and treatment of this disease in its early stages can reduce the related mortality rates and complications, and tangibly reduce the costs, this study attempts to investigate the factors affecting the patients' initial delay in referring to physicians and then proposes some solutions to tackle this problem and reduce its resultant impact.

Cancer can be defined as the "uncontrollable growth of cells" and it is recognized as a major problem in human societies. It causes the highest mortality rate after heart disease (1). It was Hippocrates (460-370 BC), the Greek physician who used the term "carsino" for the first time to refer to this disease. Later, Celsus (50-28 BC) changed it to "cancer", which means "Scorpion" in the Latin and since then the term cancer has been used to date (2).

Initially, cancer was identified as a problem for the health systems of developed countries; however, in the last decades; 1975 to 2012, its rate has been also increasing in developing countries.

Cancer prevalence rates have increased in all age ranges by 0.6% per year. In contrast, death rates have dropped constantly, from 6.5 in 1970 to 2.4 in 2012, per 100,000 population (1). For example, the percentage of patients with breast cancer increased from 75% in 1977 to 90% in 2009 (3).

The high rates of mortality, economic and psychological consequences as well as the disabilities created by cancer impose a huge cost on the health system of every society. This has motivated the conducting of a plethora of studies for the rapid diagnosis of cancer in its early stages for effective treatment (4, 5). With advances in screening, the diagnosis of cancers in their early stages has been made possible. Therefore, many patients can enjoy a good quality of life today because this disease can be diagnosed and treated in early stages (6).

The delay in diagnosis mainly hinges upon two different components:

1. Inattention to the illness symptoms and the patient's delay in referring to a physician (the factors related to the patient).
2. The physician's delay in the initial definitive diagnosis of the disease, which includes the inattention of some physicians to the initial and non-specific symptoms related to cancer, and it is sometimes due to the deceptive and inertial nature of some types of cancers in the early stages (the factors related to the health care system) (7, 8). Delay in the diagnosis of cancer leads to an unrealistic incidence in the rate of cancer.

We know that strategic health plans are based on this information and will be influenced by them. These causes lead to the delay in the initiation of early effective treatment, the increased relapse of the disease, no response to treatment and long-term increase of mortality. The present study tried to distinguish the causes of delay in initial referral, diagnosis and onset of treatment. In this way, we can identify the local factors and take a step forward regarding the achievement of the goals set by the World Health Organization in 2014, which emphasizes the early diagnosis with the start of education and training in schools and the implementation of an early perfect treatment plan (8). Particularly, this issue bears high importance in Iran which is currently dealing with a rise in cancer incidents.

METHODS

In the present study, the participants were selected within one year, from 2015 to 2016, through person-to-person interviews with parents of the patients in the children age group. A total of 93 patients were examined consecutively. The children were divided into two groups, i.e. patients above 7 years of age and 7 years old and below. From all patients, 58 were male and 22 were female with a mean age of 5.93 ± 3.25 years old. Graphical abstract is shown in (Figure 1).

The criterion for the inclusion of participants into the study was cancer development for children who had referred to or had been asked to refer to the Children's Hospital of Tabriz for the first time for the diagnosis of cancer or the beginning of treatment.

The patients who were not willing to be interviewed or the ones who had gone through some part of the diagnosis and treatment process in another country were eliminated from participation in this study. The data were collected through questionnaires, which were completed through interviews by the researchers. Those parents who did not provide the researchers with accurate information or opted out of the interview were also excluded from the study.

In this study, each of the delayed referrals, delayed diagnoses, and delayed treatments were identified via the following definitions. Delay in Referring: a delay of more than 30 days from the emergence of symptoms up to the visit to the physician. Delay in diagnosis: a delay of more than 30 days from the first visit to the physician to diagnosis. Delay in treatment: a delay of more than 14 days from diagnosis to treatment.

Statistical analysis

Normality of data was calculated by Kolmogorov-Smirnov test and expressed by mean and standard deviation in tables. Non-normal variables were implied as median (max & min). The causes of delays difference between 2 groups; with delay and without delay were assessed by

independent sample T-test. P-values less than 0.05 were considered statistically significant. All statistical analyses were done using the Statistical package for the Social Sciences (SPSS), version 16.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

Ethical considerations

The theme of the study was described to all the patients' parents or patients in simple language and the questionnaires with written informed consent were completed with them. The participants were assured that their information would be treated as confidential, would be protected at all research stages, and dissemination of the results would be conducted in an anonymous manner.

RESULTS

From among 93 patients under study, 13 patients were excluded from the study due to their non-compliance with the inclusion criteria and, thereby, a total of 80 patients were finally evaluated. Table 1 shows the information about the number of patients in each delay group.

Causes of delay in the initial referral

In total, a delay of more than one month from the first referral was observed in 5% of the patients. In this study, the relationship of this delay with age, gender, location of residence, occupation, and education of parents was assessed and the following results were obtained:

The relationship between patients' gender and delay in the initial referral

There was no significant correlation ($p>0.05$) in different groups. Table 2 demonstrates the correlation between gender by each delay.

The relationship between parents' occupation and delay in the initial referral

In this group, similarly, no significant relationship was found; thus, it can be concluded that there was no significant difference between different occupation groups ($p>0.05$). Table 3 represents the relevance of parent's occupation and each delay.

The relationship between education level of parents and delay in the initial referral

Parents with elementary education referred to the physician with significantly further delays ($p=0.037$) in comparison with other educational groups. On the contrary, those with secondary and higher education had the lowest delay. Table 4 shows the relation of parents' education and types of delay groups.

The relationship between children's age and delay in the initial referral

The patients were divided into two age groups, i.e. patients above 7 years of age, and patients below 7 years of age (based on school age of onset), however there was no significant difference in any of the groups. Table 5 demonstrates the relationship between age range of children and each delay.

The relationship between residence location and delay in the initial referral

Regarding the residence location of patients, there was no significant difference between urban and rural residents in referring to the physician, diagnosis, and treatment of cancer. Table 6 displays the relation between distance of residence and variety of delays.

Table 1. Number of patients in each of delay groups

Type of delay	Number of patients	≤ 30 days	> 30 days
		Delayed referral	71
Delayed diagnosis	80	60	20
		≤ 14 days	> 14 days
Delayed treatment	80	71	9

Table 2. Correlation between gender and delay groups

Type of delay	Gender	≤ 30 days	> 30 days
		Delayed referral	Male
Female	20		2
Delayed diagnosis	Male	42	16
	Female	18	4
Delayed treatment	Male	53	5
	Female	18	4

Table 3. Relevance of parent's occupation and length of delay

Type of delay	Parent's work	≤ 30 days	> 30 days
Delayed referral	Mother		
	Employee	5	-
	Farmer	13	-
	House wife	60	2
	Father		
	Employee	14	-
	Farmer	42	5
	Businessman	16	1
Delayed diagnosis	Unemployed	1	1
	Mother		
	Employee	5	-
	Farmer	12	1
	House wife	59	3
	Father		
	Employee	12	2
	Farmer	35	12
Delayed treatment	Businessman	15	2
	Unemployed	2	-
		≤ 14 days	> 14 days
	Mother		
	Employee	5	-
	Farmer	12	1
	House wife	59	3
	Father		
Employee	14	-	
Farmer	42	5	
Businessman	17	-	
Unemployed	2	-	

Effective factors in delay in the first visit to the physician

About 5% of the patients had a delay of more than one month before the first visit to the physician.

Causes of delayed diagnosis

A large number of factors are at play in this regard. Here, the patients' demographic characteristics were evaluated where delayed diagnosis was not significantly correlated with patients' age and gender nor parents' occupation.

Causes of delayed onset of treatment

Generally, 3.7% of the children had a delay of more than a month regarding the beginning of treatment.

In this study, the reasons that led to delay in the beginning of treatment include:

Visiting several physicians after the final diagnosis

From among 18 patients who had a delay of more than 16 days in the beginning of treatment, 77.7% of them had referred to two or more physicians after the final diagnosis; therefore, these patients had significant delays in regard to the beginning of treatment.

Use of witchcraft, bets and casting of spells as a method of treatment

The parents of 88.8% of the children had used this method for recovery, but only 7.8% of the parents mentioned the use of witchcraft as the reason for delay in regard to

Table 4. Relation parent's education and kinds of delay groups

Type of delay	Parent's education	≤ 30 days	> 30 days
Delayed referral	Mother		
	Illiterate	32	7
	Diploma	18	1
	Academic	21	1
	Father		
	Illiterate	37	3
	Diploma	15	4
	Academic	19	2
	Delayed diagnosis	Mother	
Illiterate		28	11
Diploma		14	5
Academic		18	4
Father			
Illiterate		31	9
Diploma		14	5
Academic		15	6
			≤ 14 days
Delayed treatment	Mother		
	Illiterate	37	2
	Diploma	13	6
	Academic	21	1
	Father		
	Illiterate	37	3
	Diploma	14	5
	Academic	20	1

Table 5. children age range and length of delay

Type of delay	Age	≤ 30 days	> 30 days
Delayed referral	< 7 years	41	5
	7 years ≤	30	4
Delayed diagnosis	< 7 years	32	14
	7 years ≤	28	6
		≤ 14 days	> 14 days
Delayed treatment	< 7 years	40	6
	7 years ≤	31	3

the beginning of treatment. Most of them did not refer to witchcraft as a method for the treatment of cancer; in fact, they mentioned witchcraft as a complementary treatment of cancer. They acknowledged that cancer should

be treated with medical and surgical procedures and this referral continued after the start of treatment, but it did not have any preventive power in the continuation of the treatment.

Table 6. Relation between distance of residence and variety of delays

Type of delay	Distance	≤ 30 days	> 30 days
Delayed referral	Urban	29	2
	Rural	42	7
Delayed diagnosis	Urban	27	4
	Rural	33	16
		≤ 14 days	> 14 days
Delayed treatment	Urban	30	1
	Rural	41	8

Table 7. In comparison with kinds of all delays and factors influencing on delays

	Age	Gender	Mother work	Father work	distance	Mother education	Father education
Delay refer	.917	1.000	1.000	.410	.470	R=-.191 .090	R=+.054 .637
Delay diagnosis	.650	.389	.311	.450	.048	R=-.094 .408	R=+.060 .596
Delay treatment	.337	.250	1.000	.097	.143	R=+.043 .707	R=+.006 .955

p<0.05 is significant, R= Pearson's correlation that can range from -1 to 1

Denial of reality

It was revealed that there is no significant relationship between the normal process of psychological reactions to the acceptance of the disease and delay in the onset of treatment.

Mistrust in the treatment

From among the patients who had a delay in the beginning of the treatment, 33.3% of them referred to this factor as the reason for their delay; thus, a long time was spent on searching for other methods to treat the disease.

It should be mentioned that the parents were asked about the distance of the route, their psychological problems after being informed of the cancer diagnosis, high cost of treatment and the reaction of relatives as the possible reasons for delayed treatment. However, they did not mention any of these factors as the ones that might have led to the delay in their referral or in the beginning of treatment, but they found these factors a major cause of continued treatment.

Decision to discontinue treatment

In response to the question of whether or not the parents decided to discontinue treatment 25% of children stated that they had made such a decision at least once, 68% referred to despair of recovery and treatment-related side effects as the reasons, 23% referred to economic factors,

and 9% referred to other factors, such as family problems and lack of family support as the causes of delay.

A comparison of the kinds of delays and factors influencing delays is illustrated in Table 7.

DISCUSSION

With the increase of human longevity and the change of environmental conditions, the improvement of cancer diagnostic methods has witnessed an increasing trend, especially in developing countries where there is a lower quality of environmental factors, food safety, health, and living conditions. However, advances in diagnostic methods have contributed to the identification of cancer patients and this along with the betterment of treatment methods has brought a higher degree of hope for the treatment and increased quality of life in these patients. Since the quick and timely diagnosis has a very important role in the treatment process of cancer, this study sought to evaluate the amounts of the aforementioned delays from the incidence of the first symptoms and to determine the causes of these three types of delays so that basic strategies would be presented with the aim of reducing patients' delay in referral, diagnosis, and treatment.

In the present study, no relationship was found between children's age and delay in referring to the physician; however, a similar study was carried out in Nigeria in 2015

where the results represented the existence of a negative significant correlation between children's age and the delay in diagnosis. In another study which was conducted in South Africa in 2010 by Dr. Stefan's team, a delay in initial referral was found to hold no significant association with age, gender, and ethnicity (9, 10). Similar results with the current findings were also obtained in terms of gender that may lead to the conclusion that most parents did not discriminate between their children in this regard despite the culture of gender discrimination in most societies.

Few studies have been conducted on the role of parents' education and knowledge, especially on children; however, Dr. Stephen also reported similar results (9). In contrast, various studies have been conducted on the overall role of education in diagnosis and treatment at various age groups and the majority of these studies have lent support to the positive effect of education, training, and knowledge in this area (8, 11).

In relation to the difference between urban and rural areas in terms of the initial referral and onset of treatment, Bain and Campbell conducted a study in 2000 at Oxford University and reported that rural patients are less hopeful about treatment and they start their treatment later under the belief that they are faced with more obstacles in receiving intensive care (12). In the same way, a study was undertaken on 200 women with breast cancer at Tehran University in 2005 and residence in rural areas was referred to as the cause of delay in initial referral (13).

In comparison with the result of the present study which was carried out a decade later and due to the non-significance of distance from treatment centers as one of the causes of delay in referral, it can be argued that the expansion of health centers, establishment of family doctors even in the most remote rural areas, and a referral system have played an effectively positive role in this domain. In fact, these patients mentioned other factors, such as referral to multiple physicians after the final diagnosis, denial of reality, lack of confidence in the treatment method, and high costs of treatment as the reasons for their delays. According to the research findings and considering the culture of our country, spells and casting spells are not regarded as an acceptable treatment method for cancer. In fact, patients stated other applications for making spells and have acknowledged that cancer should be treated with medical and surgical methods. However, they emphasized the positive impact on their spirit and psyche of using spells (14, 15).

In a systematic study which was conducted in 2015, the following four factors were identified as the most important causes of delays in referral and seeking treatment: care-giving barriers, coordination of the health system with patients, the type of communication, the interactions of the care-giving system with patients, and patients' personal values and relationships (16).

CONCLUSION

In the population of the present study, such characteristics as age, gender, occupation, and rural residence did not cause any delay in referring to the physician, but other factors, including the assignment of no importance to the primary symptoms and/or the serious consideration of these symptoms, habitual delay in referring to the physician, low level of economic status, lack of family support for the patient, and family problems were found to be the main reasons for such delays.

SUGGESTIONS

According to the research results, the following suggestions are recommended:

- 1) Necessary training and education should be taken more seriously to familiarize the public, especially school students and university students, with the warning signs of cancer.
- 2) Patients and their families who have undergone mental problems after the diagnosis and try to deny reality should be helped immediately to improve this situation through psychoanalysis and social work services.
- 3) If the physician and the treatment system provide the patients and their relatives with necessary information and assurance regarding diagnostic methods and treatment procedures, patients can spend time on the treatment rather than on visiting several doctors.
- 4) The poor and low-income strata should be financially supported and their insurance situation should be improved.
- 5) Convincing the patients about the side effects of treatment will cause them not to think of stopping the continuity of treatment nor to think of treatment discontinuation immediately after relative recovery.
- 6) Early diagnosis of cancer is important for preventing the rising death rate from cancer. In order to improve this situation, it requires a timely visit to the physician, timely diagnosis of the disease, and the improvement of treatment methods.

Acknowledgment: The authors thank all the patients and their parents who participated in study. Also, many thanks to the Department of Molecular Medicine, Faculty of Advanced Medical Science of Tabriz University for their support.

Ethics Committee Approval: This study was approved by Ethics and Human Rights Committee of Tabriz University of Medical Sciences.

Informed Consent: Written consent was obtained from the participants.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study- S.M., A.H.P.; Data Acquisition- S.M., A.H.P.; Data Analysis/Interpretation- R.H., R.S.; Drafting Manuscript- R.H., R.S., S.M.; Critical Revision of Manuscript- S.M., A.H.P.; Final Approval and Accountability- S.M., A.H.P., R.H., R.S.; Technical or Material Support- S.M.; Supervision- S.M., A.H.P.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: Authors declared no financial support.

Teşekkür: Yazarlar çalışmaya katılan tüm hastalara ve ebeveynlerine teşekkür eder. Ayrıca, Tebriz Üniversitesi İleri Tıp Bilimleri Fakültesi, Moleküler Tıp Bölümü'ne desteklerinden dolayı çok teşekkür ederiz.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı Tebriz Tıp Bilimleri Üniversitesi Etik ve İnsan Hakları Komitesi'nden alınmıştır.

Bilgilendirilmiş Onam: Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- S.M., A.H.P.; Veri Toplama- S.M., A.H.P.; Veri Analizi/Yorumlama- R.H., R.S.; Yazı Taslağı- R.H., R.S., S.M.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- S.M., A.H.P.; Son Onay ve Sorumluluk- S.M., A.H.P., R.H., R.S.; Malzeme ve Teknik Destek- S.M.; Süpervizyon- S.M., A.H.P.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

REFERENCES

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 2016;66:7-30. [CrossRef]
2. Manohar PR, editor. Descriptions and Classification of Cancer in the Classical Ayurvedic Texts. *Indian Nat Sci Acad*; 2015. [CrossRef]
3. DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, Kramer JL, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014;64:252-71. [CrossRef]
4. Girgis A, Lambert S, Johnson C, Waller A, Currow D. Physical, psychosocial, relationship, and economic burden of caring for people with cancer: a review. *J Oncol Pract* 2012;9:197-202. [CrossRef]
5. Chan CMH, Ahmad W, Azman W, MD Yusof M, Ho GF, Krupat E. Effects of depression and anxiety on mortality in a mixed cancer group: a longitudinal approach using standardised diagnostic interviews. *Psychooncology* 2015;24:718-25. [CrossRef]
6. Berry DA, Cronin KA, Plevritis SK, Fryback DG, Clarke L, Zelen M, et al. Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353:1784-92. [CrossRef]
7. Walter F, Webster A, Scott S, Emery J. The Andersen Model of Total Patient Delay: a systematic review of its application in cancer diagnosis. *J Health Serv Res Policy* 2012;17:110-8. [CrossRef]
8. Ermiah E, Abdalla F, Buhmeida A, Larbesh E, Pyrhönen S, Collan Y. Diagnosis delay in Libyan female breast cancer. *BMC Res Notes* 2012;5:452. [CrossRef]
9. Stefan DC, Siemonsma F. Delay and causes of delay in the diagnosis of childhood cancer in Africa. *Pediatr Blood Cancer* 2011;56:80-5. [CrossRef]
10. Brown BJ, Adeleye AO, Ibeh JN. A prospective study on the causes of delayed diagnosis of childhood cancer in Ibadan, Nigeria. *Pediatr Hematol Oncol* 2015;32:365-73. [CrossRef]
11. Murata C, Yamada T, Chen C-C, Ojima T, Hirai H, Kondo K. Barriers to health care among the elderly in Japan. *Int J Environ Res Public Health* 2010;7:1330-41. [CrossRef]
12. Farmer J, Iversen L, Campbell NC, Guest C, Chesson R, Deans G, et al. Rural/urban differences in accounts of patients' initial decisions to consult primary care. *Health Place* 2006;12:210-21. [CrossRef]
13. Harirchi I, Ghaemmaghami F, Karbakhsh M, Moghimi R, Mazaherie H. Patient delay in women presenting with advanced breast cancer: an Iranian study. *Public Health* 2005;119:885-91. [CrossRef]
14. Meraviglia MG. Prayer in people with cancer. *Cancer Nurs* 2002;25:326-31. [CrossRef]
15. Rezaei M, Adib-Hajbaghery M, Seyedfatemi N, Hoseini F. Prayer in Iranian cancer patients undergoing chemotherapy. *Complement Ther Clin Pract* 2008;14:90-7. [CrossRef]
16. Sampson R, Cooper J, Barbour R, Polson R, Wilson P. Patients' perspectives on the medical primary-secondary care interface: systematic review and synthesis of qualitative research. *BMJ Open* 2015;5:e008708. [CrossRef]

MULTIDRUG-RESISTANT BACTERIAL INFECTIONS OF THE LIBYAN CIVIL WAR VICTIMS: WHAT DID WE LEARN?

LİBYA İÇ SAVAŞ YARALANMALARININ ÇOKLU DİRENÇLİ BAKTERİLERLE OLAN İNFEKSİYONLARI: NE ÖĞRENDİK?

Zehra Çağla KARAKOÇ¹ , Taner BEKMEZCİ² , Ahmet BAŞEL³ , Binnur PINARBAŞI ŞİMŞEK⁴ 

Istinye University Faculty of Medicine, ¹Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, ³Department of Anesthesiology and Reanimation, ⁴Department of Gastroenterohepatology, Istanbul, Turkey
²Liv Hospital, Clinic of Orthopedics and Traumatology, Istanbul, Turkey

ORCID IDs of the authors: Z.Ç.K. 0000-0002-1618-740X; T.B. 0000-0003-3962-2491; A.B. 0000-0002-9681-074X; B.P.Ş. 0000-0003-3412-3976

Cite this article as: Karakoc ZC, Bekmezci T, Basel A, Pinarbasi Simsek B. Multidrug-resistant bacterial infections of the Libyan civil war victims: what did we learn? J Ist Faculty Med 2020;83(3):267-74. doi: 10.26650/IUITFD.2019.0075

ABSTRACT

Objective: Complicated by nosocomial infections and wide spectrum antibiotherapy, combat related injuries (CRI) are associated with resistant gram-negative microorganisms, especially at the later stage. The aim of this study is to retrospectively investigate demographic, clinical and microbiologic characteristics of 45 CRI patients transferred from Libya and hospitalized in a private clinic.

Material and Method: Surveillance cultures (nasal, rectal, wound swabs, tracheal aspirates, urine and blood cultures) were obtained and isolated bacteria and their antibiotic susceptibility were identified using VITEK® 2 system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

Results: The median age of 45 patients (44 [97.8%] male) was 30.7±12.9 years. The majority of the injuries were due to firearms (66.7%) and 22 (48.9%) patients were injured on the lower extremities. Open bone fractures were present in 30 (66.6%) patients. Primary wound site infection was present in 28 (62.2%) patients. Surveillance cultures revealed 40 microorganisms from the samples of 29 patients, which were gram-negative rods in 22 (55%), gram-positive cocci in 17 (42.5%) and fungus in 1 (2.5%) patients). Of the 40 isolated microorganisms, 13 (32.5%) were non-resistant, 10 (22.2%) were MDR, and 13 (28.9%) were XDR. None of the patients died in the study period.

Conclusion: Despite the limited number of cases, this study presents the characteristics of the Libyan combat victims treated by a multidisciplinary team at a single center. Surveillance cultures revealed many victims to be infected or colonised by MDR/XDR bacteria. Early surgical wound debridement, early initiation

ÖZET

Amaç: Savaş yaralanmalarında gelişen yara yeri enfeksiyonlarında; geç dönemde nozokomiyal bulaş ve empirik uygulanan geniş spektrumlu antibiyoterapiler nedeniyle dirençli gram negatif mikroorganizmalar sorumlu etken olarak karşımıza çıkmaktadır. Çalışmamızda Libya'dan hastanemize transfer edilen 45 sivil savaş yaralanmalı olgunun demografik, klinik ve mikrobiyolojik özelliklerinin retrospektif olarak araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Dirençli bakteri kolonizasyonlarını saptamak amacı ile sürveyans kültürleri (burun, rektal, idrar, yara, endotrakeal aspirat, kan kültürü) alınmış ve üreyen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları VITEK® 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) otomatize sistemi ile tanımlanmıştır.

Bulgular: Toplam 45 hastanın ortalama yaşı 30,7±12,9 olup, 44'ü (%97,8) erkekti. Yaralanmaların çoğunluğu (%66,7) ateşli silah yaralanmasıydı ve 22'si (%48,9) alt ekstremitede idi. Hastaların 30'unda (%66) açık kemik kırığı ve 28'inde (%62,2) primer yara yeri enfeksiyonu vardı. Sürveyans kültürlerinde 29 hastada 40 mikroorganizma üremesi saptandı ve bunların 22'si (%55) gram-negatif çomak, 17'si (%42,5) gram-pozitif kok ve 1'i (%2,5) mantardı. İzole edilen mikroorganizmaların 13'ünde (%32,5) direnç saptanmazken; 10'unda (%22,2) çoklu ilaç direnci (ÇİD), 13'ünde (%28,9) ise genişletilmiş ilaç direnci (GİD) saptandı. Hiçbir hastada mortalite gelişmedi.

Sonuç: Çalışmamızda; savaş yaralanması nedeni ile kabul edilen olgulara ait tek merkez deneyimimiz paylaşıldı. Çoğu hastanın ÇİD/GİD bakterilerle infekte veya kolonize oldukları görüldü. Olgularımızın genç ve komorbiditelerinin bulunmaması, tedavide

Corresponding author/İletişim kurulacak yazar: ckarakoc@gmail.com

Submitted/Başvuru: 08.09.2019 • **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 20.01.2020 •

Last Revision Received/Son Revizyon: 20.01.2020 • **Accepted/Kabul:** 30.01.2020 • **Published Online/Online Yayın:** 04.05.2020

©Telif Hakkı 2020 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2020 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

of antibiotic therapy in the proper dose and spectrum, and obtaining wound site cultures whenever necessary may help to provide more favorable outcomes in CRI victims.

Keywords: Combat, extensively drug resistant, Libyan, multi-drug-resistant

uzun süreli antibiyoterapilerin kullanımına olanak sağlarken, sık yara debritleme ve negatif basınçlı yara kapama tedavisinin de iyi sonuçlarımıza katkıda bulunduğu düşünüldü. Savaş yaralanmalarında; erken cerrahi debritleme, uygun doz ve spektrumda antibiyotik uygulamaları, gerekli durumlarda yara yeri ve surve-yans kültürlerinin alımı ile sonuçlar yüz güldürücü olabilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Çoklu ilaç direnci, Libya, savaş

INTRODUCTION

Combat related injuries (CRI) are associated with more severe impact, resulting in multiple sites of trauma and contamination with more bacteria, compared to injuries encountered in civilian life. Performing rapid resuscitation and proper surgical debridement to the injured patient and admitting the patient to a center specialized in trauma care is essential in CRI. Most common sites of injury in CRI are the extremities, as they have consistently been historically. Even though the frequency of upper and lower extremity injuries are similar, lower extremity injuries are prone to be more severe and are associated with infections especially when vascular structures are involved (1).

One of the major complications of CRI is the infection of the injury site, which is the second most common cause of mortality following hemorrhagic shock in this patient group. While the early infections of the wound site are generally caused by members of the dermal flora (gram-positive cocci, coagulase negative staphylococci and streptococci), later infections are associated with resistant gram-negative microorganisms (e.g., *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacteriaceae*) as a consequence of nosocomial infections and wide spectrum antibiotherapy (2).

The devastation of war extends far beyond the front lines and may hamper the advanced, or even the basic health-care facilities, at the conflict zones. The international community may intervene in these situations to transfer the wounded individuals to nearby countries for treatment and follow up. Contracts secured between Libya and Turkey in 2012 enabled the transportation of many victims of the Libyan civil war to state or private hospitals in Turkey for treatment and follow up after their primary care and stabilization in their home country. The aim of this study is to retrospectively investigate the demographic, clinical and microbiological characteristics of the Libyan CRI victims hospitalized in a private clinic in Turkey.

MATERIAL AND METHOD

A total of 97 civilian CRI victims transferred from Libya and admitted to a private hospital with a 160 bed capacity between November 2013 and October 2015 were included in this retrospective study. Patients discharged within 48 hours of admittance (n=38), those with surveillance cul-

tures sampled after 48 hours of admittance (n=8), and those with missing surveillance culture samples (n=6) were excluded and the remaining 45 subjects were included in the study group. Patient information including age, sex, comorbidities, time from injury to admission, history of previous hospitalizations, operations and antibiotic use, duration of admission, department admitting the patient, history of intensive care unit requirements, site and characteristics of injury, including type of trauma, open fracture classification (Gustilo Anderson), presence of wound site infection or sepsis, results of biochemical analysis at admission, presence of external fixator, number of debridement or vacuum assisted closure (VAC) procedures performed, transfusion requirements, complications recorded during follow up, and the antibiogram results of the surveillance cultures (nasal, rectal and wound swabs, tracheal aspirates and urine and blood cultures) were collected from the electronic medical records (3). Two groups were formed depending on the time from injury to admission which was ≤ 15 days for group 1 and ≥ 16 days for group 2. The study was carried out in accordance with the regulations of the Helsinki Declaration and a written consent form was obtained from all patients.

As a routine practice of infection control, rectal and nasal swabs and urine culture samples were collected to detect resistant bacterial colonization. Additional samples collected included blood cultures from patients with fever, endotracheal aspiration fluid from intubated or tracheostomized patients, surface swabs or deep tissue cultures obtained during the operation of patients with open wound infections. Contact isolation precautions were enforced for all subjects for 48-72 hours until the culture results were available. Contact isolation was extended throughout the hospitalization period for those whose cultures revealed resistant bacteria growth. Proper antibiotic therapy was initiated according to the suggestions of the infectious diseases consultant as soon as the culture results were available.

Nasal, perirectal and wound surface swabs were obtained using a cotton tipped swab and transport medium (Firat Med., Turkey) and sent to the microbiology laboratory. All microbiology samples were inoculated in blood agar, MacConkey agar and chocolate agar media, rectal swabs were additionally inoculated in D-Coccosel agar (bioMérieux Marcy l'Etoile, France) in order to isolate vancomycin resistant enterococci and incubated for 24-48 hours at 37°C.

BacT/Alert® 3D system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) was used to inoculate the blood culture samples. Samples from the positive blood culture vials were used to inoculate blood agar, MacConkey agar and chocolate agar media. The media were incubated at 37°C for 48 hours and isolated microorganisms were identified using VITEK® 2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) automated system in addition to conventional methods. Antibiotic sensitivity was evaluated with the same automated system and Kirby-Bauer disc diffusion susceptibility test, according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines (4, 5).

Microorganisms were defined as multi-drug resistant (MDR) if resistant (non-susceptible) to at least one agent in three or more antimicrobial categories, extensively drug resistant (XDR) if susceptible to one or two anti-

USA) software (3). Numeric variables were summarized as mean, standard deviation, minimum and maximum values and categorical variables were summarized according to frequency and percentage in the descriptive analysis.

RESULTS

A total of 45 patients, 44 (97.8%) male, with a mean age of 30.7±12.9 (range: 12-67) years were included in the study. Twenty four (53.3%) patients were hospitalized within 15 days from the time of injury (group 1) and 21 (46.6%) were hospitalized after 15 days (group 2). Mean duration of hospitalization was 32 (range: 2-117) days. Three (6.7%) patients had coexisting diabetes mellitus (DM). Demographic characteristics, biochemistry results and injury characteristics of the patients are summarized in Tables 1, 2 and 3.

Table 1: Characteristics of the patient group at admission-1

	Overall	Group 1 (≤15 days)	Group 2 (≤16 days)
Male/female	44/1	24/-	20/1
Age, years (mean±SD) (min-max)	30.7±12.9 (12-67)	30.0±13.9 (12-67)	31.4±12.0 (19-67)
Duration of hospitalization, days (mean±SD)	32±32.4 (2-117)	35.4±33.4 (2-117)	28.1±31.8 (2-102)
Admitting department	Orthopedics: 38 (84.4%) Other 7 (15.6%) (general surgery, neurosurgery, plastic surgery)	18	20
ICU requirement	7 (15.6%)	6	1
Sepsis at admission	4 (8.9%)	3	1
Operation prior to admission	41 (91.1%)	22	19
Complications	9 (20%)	5	4
Comorbidity	3 (6.7%)	1	2

icrobial categories but resistant to at least one agent in all other categories, and pandrug resistant (PDR) if resistant to all agents in all antimicrobial categories, according to definitions for standardized international terminology document (6). All MRSA isolates were classified as MDR according to the same document (6).

Data on demographic characteristics of the patients, including age and sex, existing comorbidities, biochemical and microbiological test and culture results, duration of hospitalization, department the patient was hospitalized in intensive care unit requirements, occurrence of complications, VAC requirements, number of debridements, existence of co-pathogens in the wound, level of resistance of the microorganisms, presence of external fixators, blood transfusion requirements, means of injury, site of injury and open fracture classification (Gustilo Anderson) were analysed with SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 11.0 (SPSS Inc., Chicago, IL,

Table 2: Characteristics of the patient group at admission-2

Parameters	Mean±SD
White-cell count (3980-10004)/mm ³	9066.4±3837.6
Hemoglobin (11.7-17.2) mg/dL	11.5±2.7
Hematocrit (34.1-44.9)	35.2±7.9
Platelet count (182000-369000)/mm ³	272622.2±148949.3
CRP (0-5) mg/L	85.1±116.9
ESR (0-20) mm/hour	49.9±38.8
AST (0-32) U/L	40.7±39.3
ALT (0-33)/L	45.1±50.8
BUN	15.3±10.7
Creatinine (0.5-0.9) mg/dL	0.8±1.1

Table 3: Characteristics of the injuries

	Overall	Group 1 (≤15 days)	Group 2 (≥16 days)
Injury due to			
Firearms	30 (66.7%)	11	19
Bomb	9 (20%)	9	0
Shrapnel	5 (11.1%)	3	2
Rocket propellant	1 (2.52%)	1	0
Site of injury			
Lower extremity	22 (48.9%)	11	11
Upper extremity	11(24.4%)	4	7
Lower and upper extremity	1 (2.2%)	0	1
Non-extremity	3 (6.7%)	2	1
Multiple injury	8 (17.8%)	7	1
External fixator at admission (+)	16 (35.5%)	10	6
VAC use	17 (37.8%)	9	8
Transfusion requirement	13 (28.9%)	8	5

Prior to admission, 41 (91.1%) of the patients had had an operation at a healthcare facility in Libya and all patients had had prophylactic antibiotic therapy. The majority of the injuries were due to firearms (66.7%) and 22 (48.9%) patients were injured on the lower extremities. Open bone fractures were present in 30 (66.6%) patients, the most common form of which was Type III B (24.4%), followed by Type III A (15.6%), Type III C (11.1%), Type II (8.9%), and Type I (6.7%) (3). The remaining 15 patients had closed fractures, unclassified non-extremity fractures and soft tissue injuries. Primary wound site infection was present in 28 (62.2%) patients, and bacterial growth was detected in 23 of the wound cultures from these 28 patients, with 20 of the isolated agents being classified as XDR/MDR. Debridement of the wound tissue was performed on 43 patients, 17 of whom also received VAC. The median number of debridements performed was 1 (interquartile range: 1-44). Thirty eight patients were admitted to the orthopedics clinic, the remaining 7 patients had multiple traumas and were admitted to general surgery, neurosurgery, plastic surgery and ear nose throat clinics. Seven (15.5%) of the patients had to be transferred to the intensive care unit, 6 of whom were acute phase (group 1) patients. The only difference between the characteristics of group 1 and 2 was that of the intensive care unit requirements ($p>0.05$).

The surveillance cultures inoculated in the first 48 hours of hospitalization revealed 40 microorganisms from the samples of 29 patients, which were gram-negative rods in 22 patients (55%), gram-positive cocci in 17 patients (42.5%) and fungus in 1 (2.5%) patient (Figure 1). Of the 40 isolated microorganisms, 13 (32.5%) were non-resistant, 10 (22.2%) were MDR, and 13 (28.9%) were XDR. Additionally, isolated *Candida albicans* strain was resistant to fluconazole and all coagulase negative staphylococci ($n=3$) were methicillin resistant. None of the isolated bacteria were classified as PDR. Wound swab cultures revealed 30 (75%) microorganisms, 19 (63.3%) of which were gram-negative bacilli and of this 19, 8 were *Acinetobacter baumannii* classified as MDR or XDR (Figure 1). Rectal swab cultures did not reveal any vancomycin resistant enterococci. Distribution of the gram-negative bacilli obtained from the cultures is summarized in Figure 2. Resistance profiles showed that 91.6% of the non-fermentative gram-negative bacilli and 70% of enterobacteriaceae were either MDR or XDR.

Due to resistant infections, 8 patients received intravenous colistin which was combined with beta-lactam antibiotics in seven of these patients. The remaining one patient who received colistin combined with aminoglycoside and cefoperazone-sulbactam developed acute kidney failure but did not require renal replacement therapy after the antibiotics were stopped. Renal functions resumed to normal after one week and antibiotherapy was continued with dose adjusted colistin and cefoperazone-sulbactam combination.

Major complications were observed in 8 (17.7%) patients in the study group. One patient developed acute renal failure after receiving intravenous cefoperazone-sulbactam, colistin and amikacin combination, but this was resolved following the termination of the combination therapy. Another patient developed toxic hepatitis presumed to be associated with carbapenem and non-steroid anti-inflammatory drug use. A Type III C fracture patient had a lower extremity amputation due to intractable wound site sepsis. Secondary wound site infections were detected in 4 patients, one patient had a urinary tract infection associated with urinary catheterization and one patient developed left hemiplegia due to intracranial injury. None of the patients died in the study group. Blood transfusions were performed in 13 (28.9%) patients and no patient in the study group received massive transfusion. Duration of hospitalization was longer than 30 days in 18 patients and 11 of these patients were associated with resistant bacteria colonizations and 87.5% of all complications were observed in 7 of these long term patients. Fifteen (83.3%) of these patients had Type III fractures. Of the 28 patients with primary site infections, 20 (71.4%) also had Type III fractures.

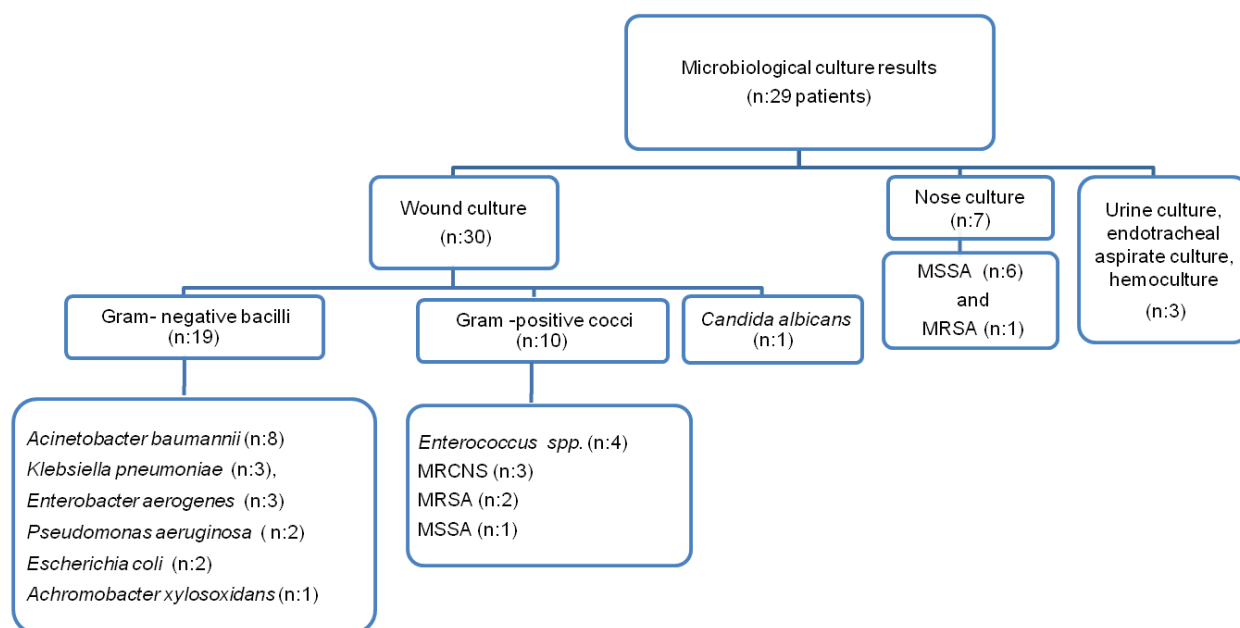


Figure 1: Distribution of microbiological culture results.

MSSA: Meticilline sensitive *Staphylococcus aureus*; MRSA: Meticilline resistant *Staphylococcus aureus*; MRCNS: Meticilline resistant coagulase negative *Staphylococcus*

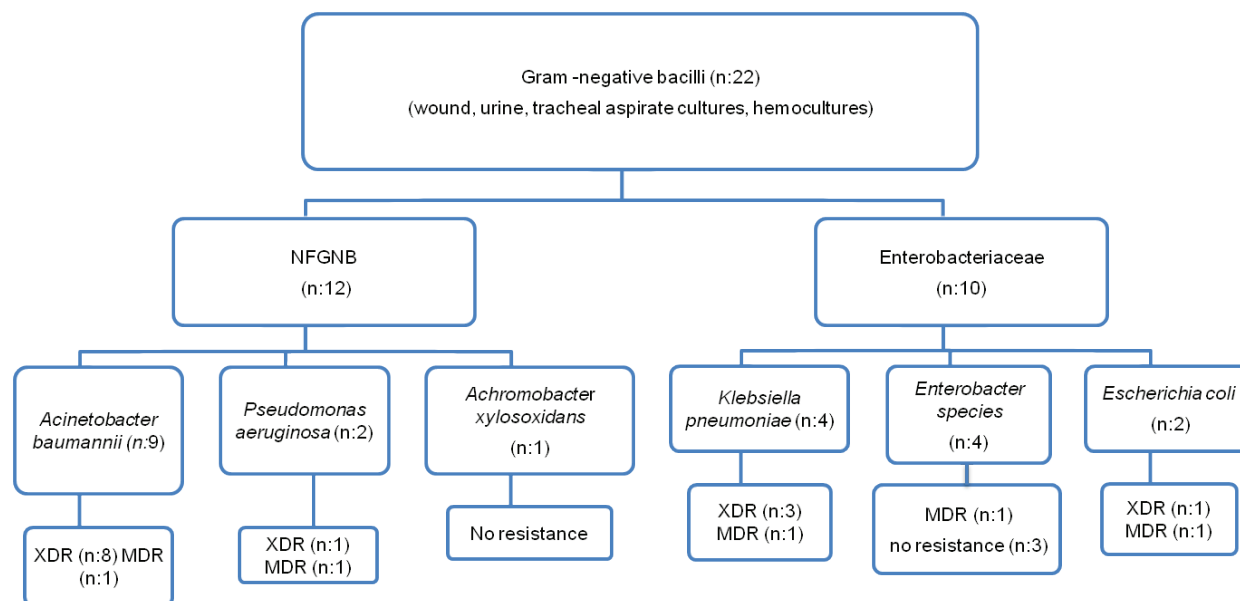


Figure 2: Distribution of gram-negative bacilli.

NFGNB: Nonfermenting gram-negative bacilli; XDR: Extensively drug-resistant; MDR: Multidrug-resistant

DISCUSSION

Warfare is a great tragedy that leaves enduring scars on communities both socially and economically. Most of the current conflicts worldwide are considered as fourth generation warfare, where the battleground is expanded to include civilian settlements, and the beginning and the

ending of the conflict are more blurred, similar to conflicts where formally organized armies are replaced by civilians. Such conflicts, as the case in Libya which started out as a nonviolent protest and escalated into a civil war, exert widespread effects on the community, including hampering of healthcare facilities and an increase in CRI (7).

CRI most commonly affects young, healthy males. Our study group consisted of mostly male (97.8%), young individuals (median age 27 years), consistent with the previous reports (7, 8). Other parameters similar with the literature were the frequency of firearm injuries (66.7%) and extremity wounds (75.5%) in our study group (7, 9). The majority of the primary wound infection cases (71.4%) had Type III fractures, which was also consistent with previous reports. Wound sepsis and amputation rates in Type III C fractures are reported as 42% and 42% (3, 10). There was one Type III C fracture case in our group with an XDR *Acinetobacter* infection of the wound who developed sepsis and had to undergo lower extremity amputation.

Guidelines recommend that narrow spectrum antibiotics like ceftriaxone should be started within the first 24 hours in CRI (11). It has been reported that empirical use of broad spectrum antibiotics may lead to resistant bacterial overgrowth and possible emergence of resistant flora due to the treatment of these resistant strains, resulting in a potential source of nosocomial infections (12). Gradual increase of imipenem resistance over a period of years has been reported in 142 *Acinetobacter* strains isolated from CRI cases from Iraq and Afghanistan, which has been associated with empirical use of imipenem in these cases and resulted in the medical center's decision to stop the prophylactic use of carbapenems (13). Another report on 36 CRI cases from Libya suggested that resistance to extended spectrum beta-lactamases (ESBL) observed in all the gram-negative strains isolated may be associated with the empirical use of wide spectrum antibiotics in this patient group, 90% of which received ceftriaxone and/or gentamicin, metronidazole and ciprofloxacin prophylactically for at least 5 days (14). Although it was not possible to obtain the complete medical records of all patients prior to their arrival, ceftriaxone, quinolone and/or metronidazole use was confirmed for 7 patients. A high frequency of wound site infection at arrival (62.2%) (28/45 patients) and a 71.8% (20/30 microorganisms) incidence of resistant bacteria, especially *A. baumannii* (26.6%), isolated from the cultures of these patients may be associated with nosocomial contamination and the use of wide spectrum antibiotics.

The third most common cause of mortality in CRI victims surviving the first 24 hours is sepsis. Wound site infection due to resistant gram-negative bacteria may be fatal (11). Although the measures to prevent wound site infection in CRI have not been thoroughly defined yet, a number of practices including proper and timely administration of antibiotics, early wound irrigation and surgical debridement, bone stabilization and delayed closure have been widely accepted as the basic principles in this patient group. In addition to removal of the necrotic tissue with aggressive debridement, initiation of VAC is also recommended, wherever possible (11). VAC accelerates wound

healing by helping to reduce the requirement for dressings, decrease the localized edema, promote the granulation tissue formation and increase the wound drainage in addition to forming a barrier between the wound and the surrounding environment to prevent further contamination (15-17). The advantages of VAC are emphasized and recommended especially for CRI cases with extensive tissue damage (11, 17). In our study group, 43 patients had surgical debridements between 1 and 44 times and 17 of these patients also received VAC treatment.

The number of reports on resistant bacteria in CRI wound infections is increasing. Most common agents causing nosocomial wound site infection are *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus*, enterococci and yeasts. *A. baumannii* appears to be an especially important pathogen in this group which commonly affects the skin and soft tissue and strains of this are increasingly reported as MDR in CRI wound infections (18). The difficulty of treating *Acinetobacter* infections is due not only to the extensive antibiotic resistance, but also to the biofilm production of the bacteria (19-21). Moran et al reported that among the 125 isolates obtained from various samples of 871 CRI victims treated in Iraq, the frequency of MDR strains was higher among *A. baumannii* compared to other gram-negative bacteria (80% and 17-29%, respectively) (22). Koole et al. reported that resistant bacteria were isolated from the samples of 59% of the 51 CRI victims treated in Holland and ESBL producing enterobacteriaceae was detected in 51% of the study group (23).

Seventy five percent of the microorganisms isolated from the study group were obtained from the wound samples and 63.3% of them were gram-negative rods. Similar to the previous reports, the majority of these isolates were *A. baumannii*, 42.4% of which were MDR or XDR, and carbapenemase producing *A. baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* isolate rates were 88% and 75%, respectively. A study from a single center in Libya which was published in 2015 reported that of the 94 gram-negative isolates that were examined, 96% of *A. baumannii* and 94% of *K. pneumoniae* strains were carbapenemase producing (24). Another study from Libya which was carried out by Buzaid et al in a trauma center showed that 31% of the 200 *S. aureus* isolates obtained from different samples were found to be methicillin resistant (25). Methicillin resistance rate among 10 *S. aureus* strains isolated from nose and wound samples in our study group was similarly 30%.

Colistin is a reasonable alternative in the treatment of multi-resistant gram-negative bacterial wound infections. After its introduction in 1960s, intravenous form of colistin was widely abandoned in the 1980s, except for the treatment of cystic fibrosis patients, due to high risk of nephrotoxicity. But currently, it has been resurrected as a

valid treatment option for the rapidly emerging multi-resistant bacteria in the absence of novel wide spectrum antibiotics. Nephrotoxicity and neurotoxicity are the two main factors limiting the use of colistin. Nephrotoxicity of colistin is dose dependent and rarely permanent (26). The frequency of nephrotoxicity (necessitating termination of treatment) among 66 CRI victims treated with colistin is reported to be 21% (27). Eight young patients with no comorbidity or underlying renal disease received IV colistin for a mean duration of 32 days in our study group and treatment was terminated in only 1 (12.5%) patient due to reversible kidney injury.

In conclusion, despite the limited number of cases, this study presents the characteristics of the Libyan combat victims treated by a multidisciplinary team in a single center. In this report we shared our experience on a limited number of CRI victims treated in a single center by a multidisciplinary team. Surveillance cultures showed that the patients were infected with multi resistant gram-negative bacteria including *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* and *Escherichia coli*. The relatively younger age of the study group and the absence of serious comorbidities made it possible to administer high doses and long term antibiotherapy. Frequent application of wound debridement, use of VAC therapy and timely closure of the wounds are also considered to be important factors in minimizing mortality. Isolation of MDR and XDR strains of *A. baumannii* and *P. aeruginosa* from wound cultures of consecutive patients suggests that empirical therapy with narrow spectrum antibiotics is not sufficient in this patient group. This experience urged us to consider earlier initiation of extended spectrum antibiotherapy in CRI patients. Surveillance cultures and contact isolation helped in limiting nosocomial contamination. In conclusion, CRI injuries require a rapid, patient and multidisciplinary approach. Early surgical wound debridement, early initiation of antibiotic therapy in the proper dose and spectrum, and obtaining wound site cultures whenever necessary may help to provide favorable outcomes in CRI victims.

Acknowledgements: We would like to thank Prof. Dr. Didem Dal and Prof. Dr. Simru Tuğrul for their help and support during the treatment of the patients.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı alınmıştır.

Bilgilendirilmiş Onam: Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- Z.Ç.K., B.P.Ş.; Veri Toplama- Z.Ç.K., T.B., A.B.; Veri Analizi/Yorumlama- Z.Ç.K., B.P.Ş.; Yazı Taslağı- Z.Ç.K., T.B., A.B.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- B.P.Ş.; Son Onay ve Sorumluluk- Z.Ç.K., T.B., A.B., B.P.Ş.; Süpervizyon- Z.Ç.K.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

Teşekkür: Prof. Dr. Didem Dal ve Prof. Dr. Simru Tuğrul'a hastaların tedavisi sırasında yardım ve destekleri için teşekkür ediyoruz

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study.

Informed Consent: Written consent was obtained from the participants.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study- Z.Ç.K., B.P.Ş.; Data Acquisition- Z.Ç.K., T.B., A.B.; Data Analysis/Interpretation- Z.Ç.K., B.P.Ş.; Drafting Manuscript- Z.Ç.K., T.B., A.B.; Critical Revision of Manuscript-B.P.Ş.; Final Approval and Accountability- Z.Ç.K., T.B., A.B., B.P.Ş.; Supervision- Z.Ç.K.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: Authors declared no financial support.

REFERENCES

1. Murray CK, Obremsky WT, Hsu JR, Andersen RC, Calhoun JH, Clasper JC, et al. Prevention of infections associated with combat-related extremity injuries. *J Trauma* 2011;71(2 suppl 2):S235-57. [CrossRef]
2. Merrens A, Rapp C, Delaune D, Danis J, Berger F, Michel R. Prevention of combat-related infections: Antimicrobial therapy in battlefield and barrier measures in French military medical treatment facilities. *Travel Med Infect Dis* 2014;12(4):318-29. [CrossRef]
3. Gustilo RB, Mendoza RM, Williams DN. Problems in the management of type III (severe) open fractures: a new classification of type III open fractures. *J Trauma* 1984;24(8):742-6. [CrossRef]
4. Hudzicki J. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. *Am Soc Microbiol* 2013;(December 2009):1-23.
5. The Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing CLSI Supplement M 100S;2016.
6. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012;18(3):268-81. [CrossRef]
7. Bodalal Z, Mansor S. Gunshot injuries in Benghazi-Libya in 2011: The Libyan conflict and beyond. *Surgeon* 2013;11(5):258-63. [CrossRef]
8. Aras M, Altaş M, Yılmaz A, Serarslan Y, Yılmaz N, Yengil E, et al. Being a neighbor to Syria: A retrospective analysis of patients brought to our clinic for cranial gunshot wounds in the Syrian civil war. *Clin Neurol Neurosurg* 2014;125:222-8. [CrossRef]
9. Geiger S, McCormick F, Chou R, Wandel AG. War wounds: Lessons learned from operation iraqi freedom. *Plast Reconstr Surg* 2008;122(1):146-53. [CrossRef]

10. Kumar G, Narayan B. Prevention of infection in the treatment of one thousand and twenty-five open fractures of long bones. retrospective and prospective analyses. *Class Pap Orthop* 2014;527-30. [\[CrossRef\]](#)
11. Hospenthal DR, Murray CK, Andersen RC, Bell RB, Calhoun JH, Cancio LC, et al. Guidelines for the prevention of infections associated with combat-related injuries: 2011 Update. *J Trauma* 2011;71:S210-34. [\[CrossRef\]](#)
12. Calhoun JH, Murray CK, Manring MM. Multidrug-resistant organisms in military wounds from Iraq and Afghanistan. *Clin Orthop Relat Res* 2008;466(6):1356-62. [\[CrossRef\]](#)
13. Hawley JS, Murray CK, Griffith ME, McElmeel ML, Fulcher LC, et al. Susceptibility of *Acinetobacter* strains isolated from deployed U.S. military personnel. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(1):376-8. [\[CrossRef\]](#)
14. Franka EA, Shembesh MK, Zaied AA, El-Turki E, Zorgani A, Elahmer OR, et al. Multidrug resistant bacteria in wounds of combatants of the Libyan uprising. *J Infect* 2012;65(3):279-81. [\[CrossRef\]](#)
15. Pollak AN. Use of negative pressure wound therapy with reticulated open cell foam for lower extremity trauma. *J Orthop Trauma* 2008;22(10):S142-5. [\[CrossRef\]](#)
16. Powell ET. The role of negative pressure wound therapy with reticulated open cell foam in the treatment of war wounds. *J Orthop Trauma* 2008;22(10):S138-S141. [\[CrossRef\]](#)
17. Leininger BE, Rasmussen TE, Smith DL, Jenkins DH, Coppola C. Experience with wound VAC and delayed primary closure of contaminated soft tissue injuries in Iraq. *J Trauma* 2006;61(5):1207-11. [\[CrossRef\]](#)
18. Sebeny PJ, Riddle MS, Petersen K. *Acinetobacter baumannii* skin and soft-tissue infection associated with war trauma. *Clin Infect Dis* 2008;47(4):444-9. [\[CrossRef\]](#)
19. Dallo SF, Weitao T. Insights into *Acinetobacter* war-wound infections, biofilms, and control. *Adv Skin Wound Care* 2010;23(4):169-74. [\[CrossRef\]](#)
20. Gaddy JA, Actis LA. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation Jennifer. *Futur Microbiol* 2009;4:273-8. [\[CrossRef\]](#)
21. Deveci Ö, Dal T, Tekin R, Bozkurt F, Tekin A, Dayan S. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: where is it heading? *Infez Med* 2013;21(3):211-5.
22. Moran KA, Murray CK, Anderson EL. Bacteriology of blood, wound, and sputum cultures from non-US casualties treated in a combat support hospital in Iraq. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008;29(10):981-4. [\[CrossRef\]](#)
23. Koole K, Ellerbroek PM, Lagendijk R, Leenen LPH, Ekkelenkamp MB. Colonization of Libyan civil war casualties with multidrug-resistant bacteria. *Clin Microbiol Infect* 2013;19(7):E285-7. [\[CrossRef\]](#)
24. Elramalli A, Almshawt N, Ahmed MO. Current problematic and emergence of carbapenemase-producing bacteria: A brief report from a libyan hospital. *Pan Afr Med J* 2017;26:180. [\[CrossRef\]](#)
25. Buzaid N, Elzouki AN, Taher I, Ghenghesh KS. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a tertiary surgical and trauma hospital in Benghazi, Libya. *J Infect Dev Ctries* 2011;5(10):723-6. [\[CrossRef\]](#)
26. Ordooei Javan A, Shokouhi S, Sahraei Z. A review on colistin nephrotoxicity. *Eur J Clin Pharmacol* 2015;71(7):801-10. [\[CrossRef\]](#)
27. Hartzell JD, Neff R, Ake J, Howard R, Olson S, Paolino K, et al. Nephrotoxicity Associated with Intravenous Colistin (Colistimethate Sodium) Treatment at a Tertiary Care Medical Center. *Clin Infect Dis* 2009;48(12):1724-8. [\[CrossRef\]](#)

ROMATOLOJİK HASTALIKLARDA HİDRADENİTİS SÜPÜRATİVA'NIN ÖNEMİ

THE IMPORTANCE OF HYDRADENİTİS SUPURATİVA IN RHEUMATOLOGIC DISEASES

Dilek TEZCAN¹ , Muhammet LİMON¹ , Semral GÜLCEMAL¹ , Sema YILMAZ¹ 

¹Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Romatoloji Bilim Dalı, Konya, Türkiye

ORCID IDs of the authors: D.T. 0000-0002-8295-9770; M.L. 0000-0002-5693-7885; S.G. 0000-0002-6085-9939; S.Y. 0000-0001-5076-1500

Cite this article as: Tezcan D, Limon M, Gulcemal S, Yilmaz S. The importance of hydradenitis supurativa in rheumatologic diseases. J Ist Faculty Med 2020;83(3):275-9. doi: 10.26650/IUITFD.2019.0046

ÖZET

Amaç: Hidradenitis suppurativa (HS), özellikle puberte sonrası, kadınlarda daha sık görülen apokrin glandların tekrarlayıcı kronik inflamatuvar bir hastalıdır. Primer tutulum bölgeleri aksiller, inguinal, perianal, perineal bölgeler olan hastalık, ağrılı bir nodülden, abse, sinüs oluşumu ve hipertrofik skarlar kadar değişen bir semptom kompleksinden oluşur. Başta obezite ve metabolik sendrom olmak üzere, spondiloartrit, otoinflamatuvar hastalıklar ve bazı otoimmün hastalıklar HS hastalarında daha sık görülür. Bu çalışmamızda romatoloji kliniğimizde takipli olan ve HS tanısı almış hastalarda etyolojik, demografik ve klinik özelliklerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler: Bu çalışma retrospektif olarak Ocak 2017-Aralık 2018 tarihleri arasında Romatoloji Bilim Dalında yapıldı. Çalışmaya 18 yaş üzeri HS tanısı konulan 11 hasta dahil edildi. Hastaların epidemiyolojik, klinik, laboratuvar bulguları ve tedavi bilgileri dosya kayıtları incelenerek elde edildi.

Bulgular: HS tanısı alan 11 hastanın 10'u erkek, biri kadındı. Hastaların ortalama yaşı 40,9 (en küçük 22-en büyük 57). Eşlik eden romatolojik hastalıklar açısından değerlendirildiğinde, dört seronegatif spondiloartropati, üç Behçet hastalığı, bir Ailevi Akdeniz Ateşi, bir romatoid artrit, bir gut ve bir SAPHO sendromu (sinovit, akne, püstüloz, hiperostoz ve osteit) tanıları mevcuttu.

Sonuç: HS'nin romatizmal hastalıklarla birlikteliği gözlenebilir. Bu nedenle HS tanısı ile izlenen hastalarda romatolojik yakınmalar olduğunda tetkik edilerek ayırıcı tanı yapılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Hidradenitis süpurativa, Spondiloartrit, Behçet hastalığı, Ailevi Akdeniz Ateşi, SAPHO sendromu

ABSTRACT

Objective: Hidradenitis suppurativa (HS) is a recurrent chronic inflammatory disease of the apocrine glands. It is more common in women, especially after puberty. The primary locations affected are the axillary, inguinal, perianal, and perineal regions, with a painful nodule and a complex of symptoms ranging from abscesses to sinus formation and hypertrophic scars. Obesity and metabolic syndrome, especially spondyloarthritis, autoinflammatory diseases and some autoimmune diseases are more common in HS patients. In this study, we aimed to determine the etiologic factors, demographic and clinical characteristics of patients with HS who were attending our rheumatology clinic.

Material and Methods: This study was performed retrospectively in the Department of Rheumatology between January 2017 and December 2018. Eleven patients diagnosed with HS and over 18 years of age were included in the study. Epidemiological, clinical, and laboratory findings, along with treatment information file records of patients, were obtained through examinations.

Results: Of 11 patients diagnosed with HS, 10 were male and one was female. The mean age of the patients was 40.9 years (minimum 22, maximum 57). When evaluated for concomitant rheumatologic diseases, four cases of spondyloarthritis, three of Behçet's disease, one of Familial Mediterranean Fever, one of rheumatoid arthritis, one of gout and one of SAPHO syndrome (synovitis, acne, pustulosis, hyperostosis and osteitis) were diagnosed.

Conclusion: HS may be associated with rheumatic diseases. Therefore, a differential diagnosis should be made in patients followed up with the diagnosis of HS in the case of rheumatologic complaints.

Keywords: Hidradenitis suppuriva, spondyloarthritis, Behçet's disease, Familial Mediterranean Fever, SAPHO syndrome

İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: dr_dilekturan@hotmail.com

Başvuru/Submitted: 28.06.2019 • **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 18.09.2019 •

Son Revizyon/Last Revision Received: 23.09.2019 • **Kabul/Accepted:** 14.10.2019 • **Online Yayın/Published Online:** 03.12.2019

©Telif Hakkı 2020 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2020 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

GİRİŞ

Hidradenitis süpürativa (Yunanca hidros=ter ve aden=bezler), aynı zamanda akne inversa ve tarihsel olarak Verneuil hastalığı olarak da bilinen kronik bir inflamatuvar cilt hastalığıdır (1). HS prevalansı %1 ile %4 arasında değişmektedir (2). Hastalık, tipik olarak puberte sonrasında görülmektedir. İnflamatuvar aktivite genellikle yaşamın üçüncü ve dördüncü dekatlarında zirve yapar ve menopoza sonrası kadınlarda iyileşme eğilimindedir. HS, kadınlarda daha siktir ve kadın/erkek oranı; 3/1 şeklindedir (3). HS'nin tanısı klinik özelliklere dayanır ve üç kritere ihtiyaç duyar. Bunlar: tipik morfoloji, lezyonların karakteristik dağılımı veya topografisi ve tekrarlayan, kronik hastalık seyridir (6 ayda > 2 kez) (4). HS'nin primer tutulum bölgeleri aksiller, inguinal, perianal, perineal cilt bölgeleridir, ancak HS, folikülofilosebasöz birimleri içeren herhangi bir cilt bölgesinde de oluşabilir. Latent sınıf analizi kullanılarak aksiller-meme (%48), foliküler (%26) ve gluteal (%26) tip olarak HS'nin üç alt tipte sınıflandırılması önerilmiştir (5). Klinik bulgular, tekrarlayan iltihaplı nodüller ve apselerden, ciddi skar bantlarına kadar değişmektedir. Hastaların %4 ile %22'sinde ciddi hastalık bildirildiği halde çoğu hasta hafif veya orta şiddette hastalığa sahiptir (6). Primer patolojinin foliküler oklüzyon olduğu düşünülmektedir. Hastaların yaklaşık %40'unda aile öyküsü vardır. Genetik olarak yatkın bireylerde, tetikleyici faktörler ile hastalık aktif hale gelir. Hastalık, başta obezite ve metabolik sendrom olmak üzere, spondiloartrit, otoinflamatuvar hastalıklar ve bazı otoimmün hastalıklar ile ilişkili olabilmektedir (7, 8). HS ve sistemik hastalıklar arasındaki bağlantı, ortak genetik, çevresel faktörlere veya inflamatuvar yollara bağlanabilir. Bu retrospektif çalışmanın amacı; HS ile çeşitli romatizmal hastalıkların eşlik edebileceğini ve HS tanısı ile izlenen hastalarda romatolojik yakınmalar olduğunda tetkik edilerek ayırıcı tanı yapılması gerektiği vurgulamaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya Ocak 2017-Aralık 2018 tarihleri arasında İç Hastalıkları-Romatoloji Bilim Dalında tanısı konulan 11 hasta dahil edildi. HS'li hastalar ile ilgili verilere, hasta dosyaları ve tıbbi kayıtlar geriye dönük incelenerek ulaşıldı. Hastaların yaşı, cinsiyeti, özgeçmiş, yerleşim yeri ve tipi, semptom ve komorbidite varlığı, muhtemel etiyolojik faktörler, laboratuvar bulguları ve tedavi seçenekleri kaydedildi.

BULGULAR

HS tanısı alan 11 hastanın 10'u erkek, biri kadındı. Hastaların ortalama yaşı 40,9 idi. (min 22-maks 57). Tutulum olarak aksiller –meme %65 (Resim 1) ile en sık görülen tipti, %30 foliküler, %5 gluteal tip tespit edildi. Eşlik eden romatolojik hastalıklar açısından değerlendirildiğinde hastalarda, üç ankilozan spondilit, bir ülseratif kolite bağlı enteropatik artrit, üç Behçet hastalığı, bir Ailevi Akdeniz



Resim 1: Hidradenitis süpürativa tanılı hastanın aksiller bölgede sinüs ve hipertrofik skar görünümü.

Ateşi, bir juvenil romatoid artrit, bir gut ve bir SAPHO sendromu (sinovit, akne, püstüloz, hiperostoz ve osteit) tanıları mevcuttu. Hastaların yaklaşık yarısında sigara öyküsü mevcuttu. Obezite ve hiperlipidemi mevcut olan iki hastanın biri gut, diğeri SAPHO sendromu tanısıyla takip edilen hastalardı. Dört spondiloartrit olgumuzun üçünde HLA-B27 pozitif, hepsinde aksiyal tutulum mevcuttu ve tedavi olarak ikisi anti tümör nekrozis faktör (TNF) blokerleri, diğeri ikisi nonsteroid anti-inflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) ve modifiye edici antiromatizmal ilaçlar (DMARD) tedavileri almaktaydı. Üç Behçet hastamızın hepsinde HLA B-51 pozitif, cilt ve eklem tutulumu dışında sistemik tutulum mevcut değildi. Yapılan laboratuvar tetkiklerinde akut faz reaktanlarında artış ve lökositoz saptanmadı. Hastalardan sadece Behçet tanısı olan bir olgu ciddi HS nedeniyle infliksimab tedavisi almaktaydı, diğeri ise lokal ve sistemik antibiyotik tedavisi alan hafif orta düzey hastalığa sahip olgulardı (Tablo 1).

TARTIŞMA

HS, geleneksel olarak ter bezlerinin bir hastalığı olarak görülse de, şu anki anlayış genetik olarak duyarlı bireylerde tekrarlayan mekanik stres nedeniyle oluşan foliküler epitel bozukluğudur. HS patogenezinde düzensiz immünitinin primer rolü olduğu ortaya konulmuştur (9). Birçok çalışma, lezyonlu deride interlökin (IL) -1 beta, TNF, IL-17 ve IL-10 pro ve anti-inflamatuvar sitokinlerin yüksek seviyelerini göstermiştir (10). İnflamasyona katkıda bulunan faktörler arasında hastanın genotip ve sigara içme durumu, obezite, adipokin düzensizliği ve insülin / glukoz düzensizliği bulunur (11). HS'li hastalarda mikrobiyomun da önemi giderek artmaktadır. Bazı otörler postpubertal ve premenopozal başlangıç paterni, premenstrüel ve postpartum dönemde alevlenme olması nedeniyle hormonların etkisi üzerinde durmuşlardır. Özellikle androjen içeren ilaçların HS'yi kötüleştirdiği görülmüş ve HS tedavisinde antiandrojenik ilaçlara yer verilmiştir (12). Sigara

Tablo 1. Hidradenitis süpürativa hastalarının özellikleri

	n (olgu sayısı)
Toplam hasta sayısı	11
Yaş ortalaması(yıl)	40,9 (en küçük 22 en büyük 57)
Cinsiyet	
Kadın	1
Erkek	10
Eşlik eden romatizmal hastalıklar	
Spondiloartropati	4
Ankilozan spondilit	3
Ülseratif kolite bağlı spondiloartropati	1
HLAB27 pozitifliği	3
Aksiyel tutulum	4
DMARD tedavisi	2
Anti –TNF tedavisi	2
Behçet	3
HLA51 pozitifliği	3
Ailevi Akdeniz Ateşi	1
JRA	1
SAPHO sendromu	1
Gut	1
Metabolik sendrom varlığı	2
Sigara öyküsü	5
Tutulum özelliği	
Aksiller –meme	7
Foliküler	3
Gluteal	1
HS kliniği ve tedavisi	
Hafif-orta hastalık bulgusu (Lokal ve sistemik antiyotik tedavi)	10
Ciddi hastalık bulgusu (İnflksimab tedavisi almaktadır)	1

ile epidermal hiperplazi ve inflamasyonun uyarılması sonucu HS riski artmaktadır (13). Obezite, HS'de daha sık görülür büyük olasılıkla intertriginöz ciltte artmış mekanik strese bağlı hastalığı kötüleştirebilir, ancak vücut kitle indeksi ile HS şiddeti arasındaki korelasyon tartışmalıdır. Artan kanıtlar, sağlıklı kontrollere kıyasla, HS hastalarında artmış sistemik inflamatuvar yükün sonucu, insülin direnci, dislipidemi, endotel disfonksiyonu ve ateroskleroz gelişimi

mine katkıda bulunan faktörlerin daha yüksek prevalans oranlarını göstermektedir (14). Literatürde sık görülen metabolik sendrom ile HS birlikteliğinin aksine, çalışmamızda, gut ve SAPHO sendromu tanısı ile takipli olan iki hasta dışında hiperlipidemi, obesite ve hiperglisemi tesbit edilmedi. Gut tanısı olan olgumuzda metabolik sendrom ve kronik böbrek yetmezliği mevcuttu. Hastaların yaklaşık yarısında sigara öyküsü mevcuttu. HS ile birlikte ortaya çıkan sistemik bulgular, HS'nin sistemik bir hastalık olup olmadığı sorusunu gündeme getirmektedir. Literatürde bazı romatizmal hastalıkların HS ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (15). Son zamanlarda Spondiloartrit (SpA), HS hastalarında genel popülasyona göre daha yaygın olduğu, prevalansın %2,3 ile %28,2 arasında olduğu bildirilmiştir (16). TNF-a yolağı ve IL -23 / IL-17 eksenini hem aksiyal SpA hem de HS'nin patogenezinde rol oynamaktadır. Her iki hastalığın da önemli bir kısmı TNF- α inhibitör tedavilerine yanıt verir. Ayrıca, sigara kullanımı ve obezite, HS'e benzer şekilde aksiyal SpA için de hastalık aktivasyonu açısından risk faktörü olarak rol oynamaktadırlar (16, 17). SpA olgularımızın hepsinde aksiyal tutulum mevcuttu. Hastaların vücut kitle indeksleri normaldi fakat yarısında sigara içme öyküsü mevcuttu. Bir spondiloartrit olgumuza ülseratif kolit eşlik ediyordu. İnflamatuvar barsak hastalıklarında (İBH), HS'nin genel popülasyondan dokuz kat daha yaygın olduğu gösterilmiştir. HS'li hastalarda anti-TNF-alfa ile Crohn tedavisinin, HS'nin şiddetini azalttığı ve böylece ortak bir yol olabileceği gösterilmiştir (7). Son zamanlarda HS ile ilişkili, FMF, PASH (PG, akne ve HS) ve PAPASH (piyojenikartrit, PG, akne ve HS) sendromları da dahil olmak üzere inflamasyondaki spesifik genetik mutasyonların neden olduğu otoinflamatuvar sendromlar, literatürde bildirilmiştir (18). İmmüno-lojik olarak, IL-1 β ve TNF- α 'nın lezyon ve perilesiyonel HS deride upregüle edildiği, inflamazom aktivatörleri olarak bilinen DAMP moleküllerinin, S100A8 ve S100A9 ve NLRP3 inflamazomlarının, HS'nin lezyon epidermisinde aktive olduğu bulundu (19). Üstelik, FMF gibi, HS de IL-1 antagonisti anakinraya karşı duyarlıdır (20). PASH ve PAPASH yakın zamanda, otoinflamatuvar yoldaki MEFV geninin ürünü ile etkileşime giren prolin- serin-treonin fosfataz-etkileşimli protein 1 (PSTPIP1)'i kodlayan genetik değişiklikler ile ilişkilendirilmiştir (21, 22). Laboratuvar bulgularında artmış inflamasyon belirteçleri ve tekrarlayan ateş, şiddetli akne, PG ve / veya artrit ile birlikte olan daha şiddetli bir HS fenotipi ile karakterize edilir. SAPHO; sinovit, akne, püstüloz, hiperostoz ve osteitin kombinasyonunun kısaltmasıdır ve nadir görülen bir hastalıktır. SAPHO sendromuna HS eşlik ediyorsa, daha ciddi eklem hastalığına sahip olabileceği düşünülmektedir (23). Bizim SAPHO sendromlu olgumuza da eroziv eklem bulgularına eşlik ediyordu ayrıca obesite ve sigara öyküsü de mevcuttu. Behçet Hastalığı ile HS birlikteliği, ilk olarak 2007'de Şahin ve ark. tarafından bildirildi. İkinci bildirilen makale ise Behçet Hastalığı ve psöriasis hastalığı

olan HS olgusu idi ve her üç hastalığa da etkili olan ustekinumab ile başarılı bir şekilde tedavi elde edildi (24,25). Bir Behçet olgumuz ciddi HS nedeniyle infliximab tedavisi almaktaydı. BDH nadiren HS ile ilişkilendirilmiştir. Literatür incelendiğinde BDH'lar arasında en fazla Sjögren Sendromu, nadiren SLE olguları ile HS birlikteliği, bildirilmiştir (26). Bizim olgularımız arasında 10 yaşında JRA tanısı alan ve takibimizde olan bir hasta dışında, BDH ve HS birlikteliği saptamadık. HS'nin bilinmeyen etyolojisi, tekrarlayan doğası, değişkenlik gösteren klinik seyir ve hastalık şiddeti, etkili hastalık yönetimini zorlaştırmaktadır. HS tedavisi, adjuvan tedavi (örneğin ağrı yönetimi, sigarayı bırakma, kilo verme, süperenfeksiyonların tedavisi, hijyen uygulamaları, topikal yara pansumanları) topikal ve sistemik ajanlar(örn.antibiyotikler, antiinflamatuvar ajanlar, immünmodülatörler, biyolojik ilaç tedavileri) ve eksizyonel ve lazer cerrahisi gibi cerrahi müdahalelerdir (27). Tedavi seçimi, lezyonların sayısına, tipine, dağılımına ve anatomik yerine, ayrıca ilişkili risk faktörleri veya eşlik eden hastalıklara göre belirlenir. Birkaç sitokin (TNF-a, IL-1, IL-17 ve IL-23) HS patogenezinde rol oynar ve blokajları rasyonel terapötik bir yaklaşım olarak görülür (28,29). Son yıllarda, HS'de tanımlanan spesifik hedeflenebilir inflamatuvar yolakların inhibe edilmesini hedefleyen HS yönetimi için yeni faz II ve III denemeleri ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, MABp1 (bermekimab), CJM112, bimekizumab, guselkumab, sekukinumab ve IFX-1 dahil olmak üzere birçok yeni biyolojik ajan araştırılmaktadır (30). Erken tanı ve tedavi, HS'nin komplikasyonlarını önlemek ve hastalarda yaşam kalitesini artırmak için esastır. Bu nedenle, ilişkili klinik özellikler (örneğin, morfoloji, topografi ve hastalık seyri), risk faktörleri (sigara, obezite ve aile öyküsü) ve olası komorbid koşullar hakkındaki farkındalığı arttırmak önem taşımaktadır.

Çalışmanın kısıtlılıkları: Çalışmanın tek merkezde az sayıda hastayla gerçekleşmesidir.

SONUÇ

HS'nin, kardiyovasküler olaylar, obezite, metabolik sendrom, depresyon, otoimmün ve otoinflamatuvar hastalıklar gibi birçok komorbidite ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada HS'nin farklı romatolojik hastalıklara eşlik edebileceğini ve bu birlikteliğin önemini vurgulanmıştır.

Etik Komite Onayı: Retrospektif çalışma olduğundan etik komite onayı alınmamıştır.

Bilgilendirilmiş Onam: Retrospektif bir çalışma olduğundan bilgilendirilmiş onam alınmamıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- D.T., M.L., S.G., S.Y.;

Veri Toplama- D.T., M.L., S.G.; Veri Analizi/Yorumlama- D.T., M.L., S.G.; Yazı Taslağı- Ö.N.E., M.A., Ö.F.T.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- Ö.N.E., M.A., Ö.F.T.; Son Onay ve Sorumluluk- D.T., M.L., S.G., S.Y.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was not received due to the retrospective nature of the study.

Informed Consent: Informed consent was not received due to the retrospective nature of the study.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study- D.T., M.L., S.G., S.Y.; Data Acquisition- D.T., M.L., S.G.; Data Analysis/Interpretation- D.T., M.L., S.G.; Drafting Manuscript- D.T., M.L., S.G., S.Y.; Critical Revision of Manuscript- D.T., M.L., S.G.; Final Approval and Accountability- D.T., M.L., S.G., S.Y.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: Authors declared no financial support.

KAYNAKLAR

1. Sellheyer K, Krahl D. "Hidradenitis suppurativa" is acne inversa! An appeal to (finally) abandon a misnomer. *Int J Dermatol* 2005;44(7):535-40. [CrossRef]
2. Jemec GB, Kimball AB. Hidradenitis suppurativa: epidemiology and scope of the problem. *J Am Acad Dermatol* 2015;73:4-7. [CrossRef]
3. Molina-Leyva A, Cuenca-Barrales C. Adolescent-Onset Hidradenitis Suppurativa: Prevalence, Risk Factors and Disease Features. *Dermatology* 2019;235(1):45-50. [CrossRef]
4. Revuz JE, Jemec GB. Diagnosing hidradenitis suppurativa. *Dermatol Clin* 2016;34(1):1-5. [CrossRef]
5. Canoui-Poitaine F, Le Thuaut A, Revuz JE, Viallette C, Gabison G, Poli F, et al. Identification of three hidradenitis suppurativa phenotypes: latent class analysis of a cross-sectional study. *J Invest Dermatol* 2013;133(6):1506-11. [CrossRef]
6. Vinkel C, Thomsen SF. Hidradenitis Suppurativa: Causes, Features, and Current Treatments. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2018;11(10):17-23.
7. Pescitelli L, Ricceri F, Prignano F. Hidradenitis suppurativa and associated diseases. *G Ital Dermatol Venereol* 2018;153(3 Suppl 2):8-17. [CrossRef]
8. Chiricozzi A, Giovanardi G, Caposiena Caro DR, Iannone M, De Simone C, Cannizzaro MV, et al. Characterization of comorbid conditions burdening hidradenitis suppurativa: a multicentric observational study. *G Ital Dermatol Venereol* 2018 Oct 3. [CrossRef]
9. Tricarico PM, Boniotti M, Genovese G, Zouboulis CC, Marzano AV, Crovella S. An integrated approach to unravel Hidradenitis Suppurativa etiopathogenesis. *Front Immunol* 2019;10:892. [CrossRef]

10. Kelly G, Hughes R, McGarry T, van den Born M, Adamzik K, Fitzgerald R, et al. Dysregulated cytokine expression in lesional and nonlesional skin in hidradenitis suppurativa. *Br J Dermatol* 2015;173(6):1431-9. [\[CrossRef\]](#)
11. Miller IM, McAndrew RJ Hamzavi I. Prevalence, risk factors, and comorbidities of hidradenitis suppurativa. *Dermatol Clin* 2016;34(1):7-16. [\[CrossRef\]](#)
12. Nikolakis G, Kyrgidis A, Zouboulis CC. Is There a Role for Antiandrogen Therapy for Hidradenitis Suppurativa? A Systematic Review of Published Data. *Am J Clin Dermatol* 2019;20(4):503-13. [\[CrossRef\]](#)
13. Kelly G, Prens EP. Inflammatory mechanisms in hidradenitis suppurativa. *Dermatol Clin* 2016;34(1):51-8. [\[CrossRef\]](#)
14. Phan K, Charlton O, Smith SD. Hidradenitis suppurativa and metabolic syndrome-systematic review and adjusted meta-analysis. *Int J Dermatol*. 2019;58(10):1112-1117. [\[CrossRef\]](#)
15. Puig L, Ruiz de Morales JG, Dauden E, Andreu JL, Cervera R, Adán A, et al. Prevalence of ten Immune-mediated inflammatory diseases (IMID) in Spain. *Rev Esp Salud Publica*. 2019 Mar 25;93. pii: e201903013.
16. Rondags A, Arends S, Wink FR, Horváth B, Spooenberg A. High prevalence of hidradenitis suppurativa symptoms in axial spondyloarthritis patients: A possible new extra-articular manifestation. *Seminars in arthritis and rheumatism*. *Semin Arthritis Rheum* 2019;48(4):611-7. [\[CrossRef\]](#)
17. Fauconier M, Reguai Z, Barbe C, Colosio A, Eschard JP, Salmon JH, et al. Association between hidradenitis suppurativa and spondyloarthritis. *Joint Bone Spine* 2018;85(5):593-7. [\[CrossRef\]](#)
18. Hodak E, Atzmony L, Pavlovsky L, Comaneshter D, Cohen AD. Hidradenitis Suppurativa Is Associated with Familial Mediterranean Fever-A Population-Based Study. *J Invest Dermatol* 2017;137(9):2019-21. [\[CrossRef\]](#)
19. Lima AL, Karl I, Giner T, Poppe H, Schmidt M, Presser D, et al. Keratinocytes and neutrophils are important sources of proinflammatory molecules in hidradenitis suppurativa. *Br J Dermatol* 2016;174(3):514-21. [\[CrossRef\]](#)
20. Ben-Zvi I, Kukuy O, Giat E, Pras E, Feld O, Kivity S, et al. Anakinra for Colchicine-Resistant Familial Mediterranean Fever: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Arthritis Rheumatol* 2017;69(4):854-62. [\[CrossRef\]](#)
21. Gottlieb J, Madrange M, Gardair C, Sbidian E, Frazier A, Wolkenstein P, et al. PAPASH, Ps APASH and PASS autoinflammatory syndromes: Phenotypic heterogeneity, common biological signature and response to immunosuppressive regimens. *Br J Dermatol* 2019;181(4):866-9. [\[CrossRef\]](#)
22. Vinkel C, Thomsen S. Autoinflammatory syndromes associated with hidradenitis suppurativa and/or acne. *Int J Dermatol* 2017;56(8):811-8. [\[CrossRef\]](#)
23. Vekic DA, Woods J, Lin P, Cains GD. SAPHO syndrome associated with hidradenitis suppurativa and pyoderma gangrenosum successfully treated with adalimumab and methotrexate: a case report and review of the literature. *Int J Dermatol* 2018;57(1):10-8. [\[CrossRef\]](#)
24. Verma P, Chhabra N. A Comment on Rapid Progression of Hidradenitis Suppurativa in the Lower Leg of a Patient with Psoriasis Vulgaris. *Acta Derm Venereol* 2012;92(4):447. [\[CrossRef\]](#)
25. Sahin MT, Oztürkcan S, Türel-Ermertcan A, Yurtman-Havlucu D, Bilaç C. Behçet's disease associated with hidradenitis suppurativa. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2007;21(3):428-9. [\[CrossRef\]](#)
26. Ben David C, Bragazzi NL, Watad A, Sharif K, Whitby A, Amital H, et al. Hidradenitis suppurativa associated with systemic lupus erythematosus: A case report. *Medicine (Baltimore)* 2018;97(12):e0186. [\[CrossRef\]](#)
27. Alikhan A, Sayed C, Alavi A, Alhusayen R, Brasasard A, Burkhart C, et al. North American Clinical Management Guidelines for Hidradenitis Suppurativa: a Publication from the United States and Canadian Hidradenitis Suppurativa Foundations. Part I: Diagnosis, Evaluation, and the use of Complementary and Procedural Management. *J Am Acad Dermatol* 2019;81(1):76-90. [\[CrossRef\]](#)
28. Flood KS, Porter ML, Kimball AB. Biologic Treatment for Hidradenitis Suppurativa. *Am J Clin Dermatol* 2019;20(5):625-38. [\[CrossRef\]](#)
29. Oskardmay AN, Miles JA, Sayed CJ. Determining the Optimal Dose of Infliximab for Treatment of Hidradenitis Suppurativa. *J Am Acad Dermatol* 2019;81(3):702-8. [\[CrossRef\]](#)
30. Matusiak Ł, Jemec GB, Szepietowski JC. Pharmacological development in hidradenitis suppurativa. *Curr Opin Pharmacol* 2019;46:65-72. [\[CrossRef\]](#)

THE CLINICAL TRIALS LANDSCAPE IN TURKEY: AN EVALUATION OF THE ClinicalTrials.gov DATABASE

TÜRKİYE'DEKİ KLİNİK ARAŞTIRMA MANZARASI: BİR ClinicalTrials.gov VERİTABANI DEĞERLENDİRMESİ

Selçuk ŞEN¹ 

¹Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Department of Medical Pharmacology, Division of Clinical Pharmacology, Istanbul, Turkey

ORCID IDs of the authors: S.Ş. 0000-0001-7878-793X

Cite this article as: Sen S. The clinical trials landscape in Turkey: an evaluation of the ClinicalTrials.gov database. J Ist Faculty Med 2020;83(3):280-5. doi: 10.26650/IUITFD.2019.0053

ABSTRACT

Objective: Clinical trials are essential tools for improving scientific knowledge and public health. With this work, it is aimed to evaluate the clinical trials landscape in Turkey.

Method: To evaluate the landscape of clinical trials in Turkey, all clinical trials registered on or before the date of 20.06.2019 in the ClinicalTrials.gov database were used. The registered clinical trials were filtered by study type, study phase, funder type, current status of clinical trials, and location. In addition, the number of clinical trials in Turkey was compared with some countries which were selected based on population and number of trials.

Results: In Turkey, the total number of registered clinical trials was 3880. The majority of these trials (%79.4) were interventional studies. The majority of phase trials were phase III studies, of which the vast majority were sponsored by industry. The numbers of completed and currently participants recruiting trials were 2245 and 722, respectively. Not only in Turkey, but in all countries, the numbers of clinical trials with unknown status and phase studies without defined phases were higher in trials were not funded by industry. When the numbers of first registered clinical trials were evaluated between the years of 2009 and 2018, a considerable increase was seen. The number of clinical trials in Turkey was 5 or 6 fold less than in developed countries with a comparable population such as Germany, France, and United Kingdom.

Conclusion: With this work, it was shown that the number of clinical trials in Turkey is still not as expected. In order to take its rightful place in the world, Turkey should continue to make improvements, use its potential and increase awareness in the field of clinical trials.

Keywords: Clinical Trials, Turkey, Research

ÖZET

Amaç: Klinik araştırmalar bilimsel bilginin ve toplum sağlığının iyileştirilmesi için önemli araçlardır. Bu çalışma ile Türkiye'deki klinik araştırma manzarasının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Türkiye'deki klinik araştırma manzarasının değerlendirilmesi için 20.06.2019 tarihi ve öncesinde ClinicalTrials.gov veritabanına kayıt edilmiş tüm klinik araştırmalar kullanılmıştır. Kayıtlı klinik araştırmalar çalışma türü, çalışma fazı, destekleyici türü, çalışmanın şu anki durumu ve lokasyona göre filtrelenmiştir. Ek olarak, Türkiye'deki klinik araştırma sayısı, nüfus ve çalışma sayısına göre seçilen bazı ölkeler ile kıyaslanmıştır.

Bulgular: Türkiye'de toplam kayıtlı klinik araştırma sayısı 3880 idi. Bu araştırmaların çoğunluğu (%74,6) müdahaleli çalışmalardı. Faz çalışmalarının çoğunluğu faz III çalışmalardı ve bu çalışmaların büyük çoğunluğu endüstri tarafından finanse edilmiştir. Tamamlanan ve şu anda aktif olarak katılımcı alan çalışma sayısı sırasıyla 2245 ve 722 idi. Sadece Türkiye'de değil, tüm ölkelerde, durumu bilinmeyen klinik araştırma ve fazı tanımlanmamış faz çalışması sayıları endüstri tarafından desteklenmeyen araştırmalarda daha fazlaydı. Türkiye'de 2009 ve 2018 yılları arasında ilk kez kayıt edilen araştırma sayıları değerlendirildiğinde, gözle göröldü bir artış göröldü. Fransa, Almanya ve Birleşik Krallık gibi nüfusu yakın gelişmiş ölkeler ile kıyaslandığında, Türkiye'deki klinik araştırma sayısı 5 veya 6 kat daha azdı.

Sonuç: Bu çalışma ile Türkiye'deki klinik araştırma sayısının hala yeterli düzeyde olmadığı gösterildi. Küresel dünyada hak ettiği yeri alması için, Türkiye klinik araştırma alanında iyileştirmeler yapmaya, potansiyelini kullanmaya ve farkındalığı arttırmaya devam etmelidir.

Anahtar Kelimeler: Klinik Araştırmalar, Türkiye, Araştırma

Corresponding author/İletişim kurulacak yazar: slcsen@istanbul.edu.tr

Submitted/Başvuru: 16.07.2019 • Revision Requested/Revizyon Talebi: 22.08.2019 •

Last Revision Received/Son Revizyon: 11.10.2019 • Accepted/Kabul: 24.10.2019 • Published Online/Online Yayın: 20.11.2019

©Telif Hakkı 2020 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2020 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

INTRODUCTION

It is a fact that clinical trials are essential tools for improving scientific knowledge and public health. Well-designed clinical trials can be beneficial to all stakeholders, including patients, investigators, industry, and health authorities. Access to new treatment options before they are available in the market, new treatment options for the patients when standard therapy has not been beneficial, more frequent visits and medical care in clinical trials, can be counted as major benefits for the patients participating in clinical trials. As a remarkable example, the National Comprehensive Cancer Network has pointed out that patients with any cancer may have the best management for their disease in clinical trials (1, 2). In other respects, understanding the mechanism of the disease, development of new treatments, and improvement of the existing scientific knowledge are essential for the whole community. Since all research-related expenses are under the responsibility of the sponsors, clinical trials also have an impact on the economy of the countries.

With its geographical location, a population of more than 80 million, experienced researchers and moreover, a high number of treatment naïve patients, Turkey has a great potential to increase the number and quality of clinical trials. In recent years, Turkey has taken a major step in this promising field with the support of national health authorities, by declaring and updating the national regulations, which are in compliance with the international level (3, 4). For conducting clinical trials in Turkey, approval of the Ethics Committee and permission of Turkish Medicine and Medical Devices Agency should be obtained. The approval and permission procedures are very similar to other developed countries. Related regulations and guidelines can be found at the website of the Turkish Medicine and Medical Devices Agency (5).

In this present work, in order to figure out the clinical trials landscape in Turkey, the number of clinical trials, study type, study phase, sponsored type and all other relevant information, were evaluated using the ClinicalTrials.gov database (6), which is one of the most known and globally used databases for the registration of clinical trials. In addition, the number of clinical trials in Turkey was compared with other countries.

METHOD

To evaluate the landscape of clinical trials in Turkey, all registered clinical trials until the date of 20.06.2019 in the clinicaltrials.gov database (6) were used. Besides, first-registered (first -posted) number of clinical trials in Turkey between the years of 2009 and 2018 were analyzed. Registered clinical trials were filtered by funder type (industry or non-industry), study type (interventional or observational), study phase and status of clinical trials

(recruiting, enrolling, suspended, terminated, completed, unknown, etc.) and location.

The number of clinical trials in Turkey was compared with France, Germany, the United Kingdom, the Russian Federation, South Africa, Egypt, Argentina and Thailand. These countries were selected based on the population of the country and number of trials. In the field of clinical trials, France, Germany and the United Kingdom are the top three countries in Europe, and they have a population comparable with Turkey. The Russian Federation, South Africa, Egypt, Argentina, and Thailand are in different regions of the world, and in these countries, numbers of registered trials are comparable with Turkey. The Worldbank data (7) for the year of 2017 was used for the approximate population of the countries.

Statistical analyzes

The present work is a descriptive study. Therefore, a specific statistical test was not used. The findings were given as numbers and percentages.

RESULTS

In Turkey, the total number of registered clinical trials in the clinicaltrials.gov was 3880, and 1632 of these trials were sponsored by industry (ClinicalTrials.gov last accessed 21.06.2019). The number of interventional trials conducted with a drug or a biological agent or a device was 2494. According to the study type, the distribution was shown in figure 1. Besides, 23.6% of the clinical trials included the pediatric population (between birth and 17 of age).

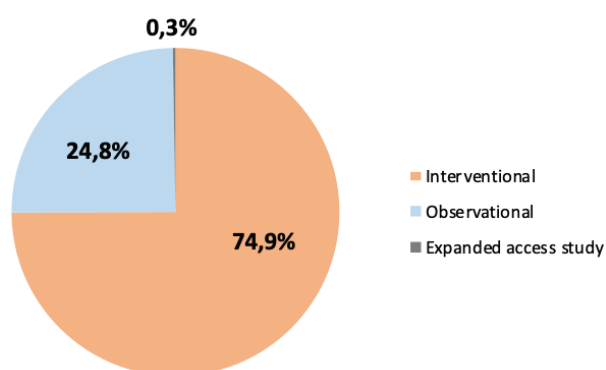


Figure 1: The study type of registered clinical trials in Turkey. The numbers of interventional, observational and expanded access studies (also called as compassionate use) were 2908 (74.9%), 962 (24.8%) and 10 (0.3%) respectively.

As a study site, Istanbul and Ankara were the first and second cities where the clinical trials were mostly conducted in Turkey (Figure 2).

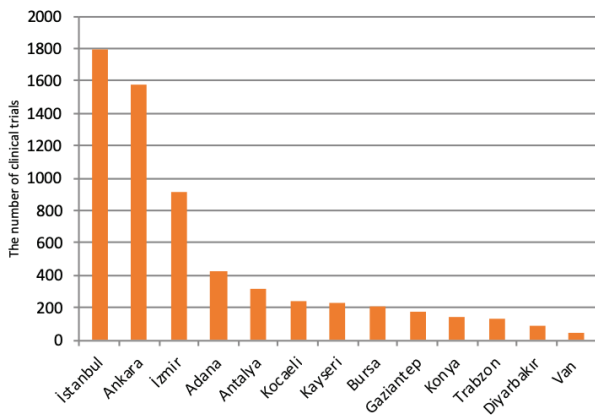


Figure 2: Locations of clinical trials in Turkey*.
 *A multicenter clinical trial can be conducted in multiple locations. Therefore the total number in this figure can seem higher than 3880 which was given above.

In the present work, the distribution of clinical phase studies was also evaluated. It was shown that the majority of these trials were phase III studies, of which the vast majority was sponsored by industry. On the other hand, the majority of non-industry sponsored clinical trials were phase IV. In addition, a high number of non-industry sponsored trials without defined phases (not applicable) was determined (Figure 3).

When the first-registered clinical trials were evaluated between the years of 2009 and 2018, an increase was seen in total and non-industry sponsored clinical trials in recent years, whereas, there was a stability in first-registered trials sponsored by industry (Figure 4).

Registered clinical trials were also evaluated according to recruitment status. Numbers of completed and recruiting trials were 2245 and 722, respectively. Additionally, 322 (8.3%) trials with unknown status were seen (Figure 5).

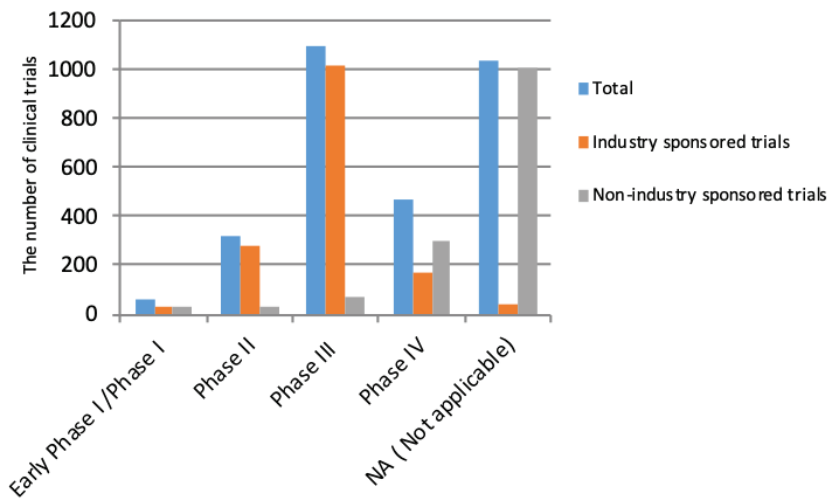


Figure 3: The distribution of clinical phase studies in Turkey.

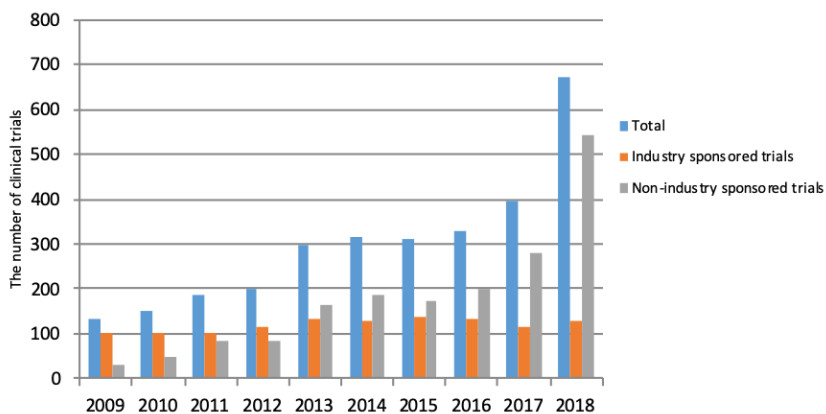


Figure 4: The number of first-registered clinical trials between the years of 2009 and 2018.

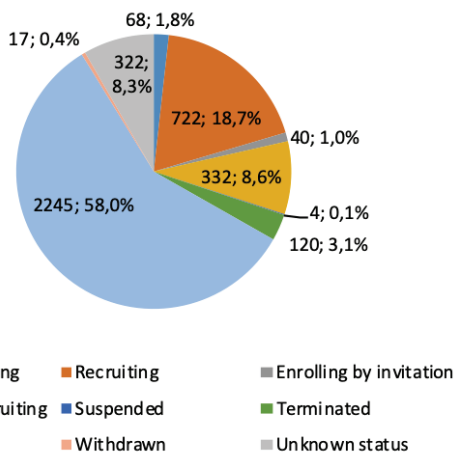


Figure 5: The status of clinical trials in Turkey. Results were given as number; percentage.

Status of clinical trials are defined by ClinicalTrials.gov as; "Not yet recruiting: The study has not started recruiting participants; Recruiting: The study is currently recruiting participants ; Enrolling by invitation: The study is selecting its participants from a population, or group of people, decided on by the researchers in advance. These studies

are not open to everyone who meets the eligibility criteria but only to people in that particular population, who are specifically invited to participate; Active, not recruiting: The study is ongoing, and participants are receiving an intervention or being examined, but potential participants are not currently being recruited or enrolled; Suspended: The study has stopped early but may start again; Terminated: The study has stopped early and will not start again. Participants are no longer being examined or treated; Completed: The study has ended normally, and participants are no longer being examined or treated (that is, the last participant's last visit has occurred); withdrawn: The study stopped early, before enrolling its first participant; Unknown: A study on ClinicalTrials.gov whose last known status was recruiting; not yet recruiting; or active, not recruiting but that has passed its completion date, and the status has not been last verified within the past 2 years" (6).

In regard to high number of clinical trials with unknown status, the numbers in other countries were evaluated, and a comparison was done between the industry and non-industry sponsored trials. It was demonstrated that in all countries, the numbers of clinical trials with unknown status were higher in non-industry sponsored clinical trials (Table 1).

Table 1: The number of clinical trials with unknown status.

	Total	Industry sponsored	Non-industry sponsored
Turkey	322	12	310
France	2133	241	1892
Germany	1354	353	1001
United Kingdom	1442	266	1176
Russian Federation	147	47	100
Egypt	427	15	412
South Africa	63	16	47
Argentina	67	21	46
Thailand	260	19	241

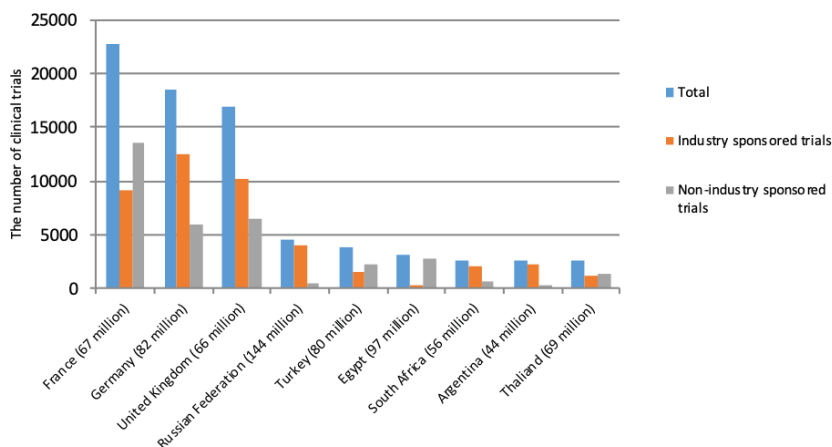


Figure 6: Comparison of clinical trials in Turkey with other countries. Countries were given as name and (approximate number of population).

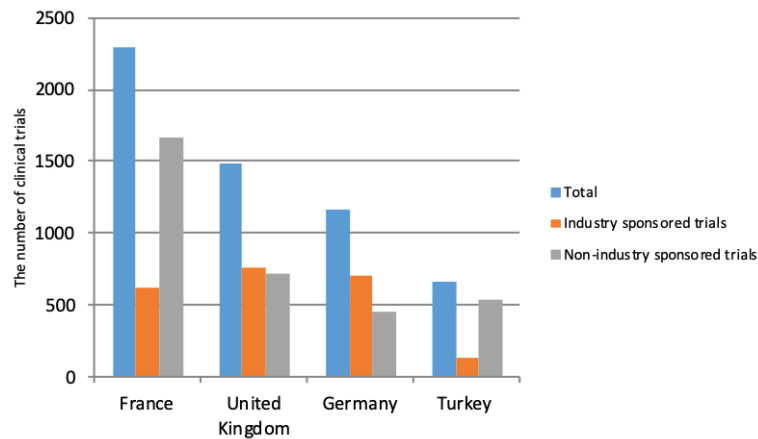


Figure 7: The number of first-registered clinical trials from 01.01.2018 to 31.12.2018 in Turkey, France, Germany and the United Kingdom.

The number of clinical trials in Turkey was less than France, Germany and United Kingdom. When the clinical trials landscape was compared with other countries which have an approximately similar number of clinical trials, the distribution of industry and non-industry sponsored clinical trials differed among the countries (Figure 6).

Number of first-registered non-industry sponsored clinical trials in Turkey was similar to the United Kingdom and a little higher than Germany, when only the year of 2018 was evaluated (Figure 7).

DISCUSSION

It is very well known that the vast majority of clinical trials are conducted in United States, Europe, and developed countries. Clinical trials are not only essential tools for improving the scientific knowledge and public health, but they are also beneficial to the countries' economy. From the beginning of the 20th century to the present, Turkey has passed several milestones to improve the legislative regulations of clinical research. For the time being, it can be concluded that the country's legislation and regulations on clinical research are in compliance with ICH-GCP guidelines and European Directives (3). In contrast to improvement in legislative regulations, the number of clinical trials is still not as expected, especially when compared with other developed countries. In the present study, it was also shown that the number of clinical trials in Turkey was 5 or 6 fold less than in developed countries with a comparable population, such as Germany, France and United Kingdom. These countries are the top three countries in Europe in the field of clinical trials. Therefore, it is concluded that Turkey can set a goal to reach these countries' level.

In other respects, location, economic and political issues may affect the number and distribution of clinical trials. For example, in Egypt, although the total number of trials was similar to Turkey, the vast majority of the trials were

non-industry sponsored. In Argentina, the Russian Federation, and South Africa the situation is just the opposite, where a vast majority were industry sponsored trials. In Thailand, it was almost equally distributed.

When the first registered clinical trials between the years of 2009 and 2018 were evaluated, the number of clinical trials in Turkey, especially the number of non-industry sponsored clinical trials, was increased considerably. As a remarkable finding, in the year 2018, the number of non-industry sponsored trials in Turkey was similar to the United Kingdom, and a little higher than Germany. In the third quarter of 2004, the International Committee of Medical Journals (ICMJE) declared that the registration of clinical trials is required as a prerequisite of publication (8). After the declaration of ICMJE, many scientific journals have started to ask for the registration of clinical trials as a requirement. The ClinicalTrials.gov database is one of the most known and easy-access databases to use for this purpose. This may explain the increase in non-industry sponsored clinical trials. Non-industry sponsored clinical trials can be defined as the trials which are funded by universities, organizations, national institutions, etc. The vast majority are academic and non-commercial studies. Probably, publication metrics may have effects on academicians' careers (9). However, this cannot be the single factor in this increase. Not only in Turkey, but also at the international level, the enhancement of the research culture and widespread use of the existing databases are the other main factors. In the last decade, although the total number of clinical trials in Turkey increased, there was stability in industry sponsored trials. It was not possible to figure out the reasons within the present work. The reasons should be deeply discussed by the relevant stakeholders.

Skepticism on scientific findings of the industry-driven clinical trials has mostly occurred due to the design and

the target of the study, which is generally defined by the industry's objective. On the other hand, the industry is controlled by health authorities tighter than academia, and tighter monitoring elicits higher data quality. Inherently, it puts the industry one step ahead of academia in the documentation and reporting process (10). In the present study, not only in Turkey, but in all countries, the number and proportion of clinical trials with unknown status and the number of interventional trials without defined phases were much higher in the non-industry arm. These findings can confirm that academic trials have much more missing information. However, it may be concluded that learning from each other has more benefits than seeing the limitations of both approaches only. The industry can get much more support from the academicians and benefit from their expertise for the study design and the protocol. On the other hand, the industry's expertise on documentation and reporting process can be beneficial to academia (9).

In this work, the clinical trials landscape of Turkey was illuminated in some measure. The main limitation of this work was that this evaluation could not be conducted by using national databases.

CONCLUSION

With this work, it was demonstrated that the number of clinical trials is still not as expected. Although there was a considerable increase in the total number of clinical trials in recent years, the number of industry sponsored clinical trials that have an economic impact on the country, was almost stationary. However, with its geographical location and other advantages, Turkey has a great potential to increase the number of clinical trials. In order to take its rightful place in the world, Turkey should continue to make improvements, use its potential and increase awareness in the field of clinical trials. In addition, it should be kept in mind that "number" does not mean everything. Ethics and quality should also be taken into consideration.

Acknowledgement: I would like to thank to Prof. Yağız Üresin for great support

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study- S.Ş.; Data Acquisition- S.Ş.; Data Analysis/Interpretation- S.Ş.; Drafting

Manuscript- S.Ş.; Critical Revision of Manuscript- S.Ş.; Final Approval and Accountability- S.Ş.

Conflict of Interest: Author declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: Author declared no financial support.

Teşekkür: Prof. Yağız Üresin'e büyük desteği için teşekkür ederim.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- S.Ş.; Veri Toplama- S.Ş.; Veri Analizi/Yorumlama- S.Ş.; Yazı Taslağı- S.Ş.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- S.Ş.; Son Onay ve Sorumluluk- S.Ş.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemiştir.

Finansal Destek: Yazar finansal destek beyan etmemiştir.

REFERENCES

1. Mhaskar R, Miladinovic B, Guterbock TM, Djulbegovic B. When are clinical trials beneficial for study patients and future patients? A factorial vignette-based survey of institutional review board members. *BMJ Open* 2016;6:e011150. [CrossRef]
2. Radich JP, Deininger M, Abboud CN, Altman JK, Berman E, Bhatia R, et al. Chronic myeloid leukemia, Version 1.2019, NCCN clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Cancer Netw* 2018;16:1108-35. [CrossRef]
3. Ilbars H, Kavakli K, Akan H, Irmak DK. Clinical Trials Journey of Turkey-Long and Thin Road. *J Clin Trials* 2015;5:211-5.
4. Ilbars H. Clinical Trials in Turkey. *Turkish Journal of Hematology* 2013;30(2):111-4. [CrossRef]
5. T.C. Ministry of Health Turkish Medicine and Medical Devices Agency. Available: www.titck.gov.tr. Accessed: 20 June 2019.
6. U.S. National Library of Medicine. Available: clinicaltrials.gov. Accessed: 21 June 2019.
7. The World Bank. Available: data.worldbank.org. Accessed: 21 June 2019.
8. Califf, RM, Zarin, DA, Kramer, JM, Sherman, RE, Aberle, LH, Tasneem, A. Characteristics of clinical trials registered in ClinicalTrials.gov, 2007-2010. *JAMA* 2012;307:1838-47. [CrossRef]
9. Laterre PF, François B. Strengths and limitations of industry vs. academic randomised controlled trials. *Clin Microbiol Infect* 2015;21:906-9. [CrossRef]
10. Heinemann L. Are all clinical studies sponsored by industry not valid? *J Diabetes Sci Technol* 2008;2:1161-3. [CrossRef]

BREASTMILK AND COVID-19

ANNE SÜTÜ VE COVID-19

Gülbin GÖKÇAY^{1,2} , Gonca KESKİNDEMİRCİ^{2,3} 

¹Istanbul University, Institute of Child Health, Department of Social Pediatrics, Istanbul, Turkey

²Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Department of Child Health and Diseases, Department of Social Pediatrics, Istanbul, Turkey

³Istanbul University, Institute of Health Sciences, Institute of Child Health, Social Pediatrics Doctoral Program, Istanbul, Turkey

ORCID IDs of the authors: G.G. 0000-0003-1042-0407; G.K. 0000-0003-1797-2802

Cite this article as: Gokcay G, Keskindemirci G. Breastmilk and Covid-19. J Ist Faculty Med 2020;83(3):286-90.
doi: 10.26650/IUITFD.2020.0025

ABSTRACT

After the New Corona Virus epidemic emerged in China at the beginning of December 2019, authorities announced the appearance of cases in our country in March 2020. This epidemic reminds us of the importance of preventive healthcare. Breast-feeding is very important for child health. The anti-infective and immunomodulatory properties of breast milk play an important role in protection against infections. Passive immunity is provided especially by the high secretory IgA concentration and other antipathogen factors in breastmilk. During emergency situations, protection and promotion of breastfeeding is very important. The COVID-19 pandemic is also an emergency situation, and it is recommended that mothers should continue breastfeeding or giving expressed milk by wearing a mask, and taking necessary hygiene measurements during this epidemic.

Keywords: COVID-19, breastfeeding, human milk

ÖZET

Aralık 2019 başında Çin’de ortaya çıkan Yeni Korona Virüs salgını Mart 2020 tarihinde ülkemizde görülmeye başlandıktan sonra koruyucu sağlık hizmetlerinin önemi bir kez daha ortaya çıkmıştır. Olağanüstü koşullarda sağlığın korunması ve sürdürülmesinde anne sütü ile beslenme çok önemlidir. Bu salgın da bir olağanüstü durumdur. Enfeksiyonlardan korunmada anne sütünün anti-infektif ve immunomodülatör etkisi öne çıkmaktadır. Anne sütü içeriğinde bulunan özellikle yüksek salgısal IgA ve diğer biyoaktif maddeler ile pasif doğal bağışıklık sağlanmaktadır. COVID-19 pandemisinin yaşandığı bu dönemde anne sütü ile beslenmenin sürdürülmesi ve desteklenmesi enfeksiyondan korunmak için gereklidir. Mevcut bilimsel verilere göre temas ya da enfeksiyon varlığında annenin maske takarak, gereken hijyen kurallarını sağlayarak emzirmeye ya da sağıarak anne sütü vermeye devam etmesi önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: COVID-19, emzirme, anne sütü

INTRODUCTION

The COVID-19 pandemic, first recognized in China in early December 2019 by an increasing awareness of clustering cases of pneumonia, made its debut in Turkey in March 2020. This, as expected, led to many questions being addressed to paediatricians, such as “How are we going to protect our infants and children from this disease?”, “What can we do to strengthen their immunity?” “Can I breast-feed if I am sick?”. In this paper, we will try to deal with questions related to breast feeding during an epidemic, especially with reference to COVID-19.

The epidemiology of the novel corona virus (SARS-CoV-2 OR 2019-nCoV) infection and clinical presentation

The COVID-19 or SARS-CoV-2 infection first appeared in China in December 2019. The majority of patients were noted to be between 30 and 79 years of age (1). Thanks to the intense measures for isolation and quarantine, the epidemic was brought under control in China after a period of 3 months, by which time, March 2020, the disease had emerged in several countries, including Turkey, and the World Health Organization (WHO), evaluating the findings, declared the situation to be a pandemic (2). It

Corresponding author/İletişim kurulacak yazar: drgulbin@gmail.com

Submitted/Başvuru: 23.03.2020 • **Accepted/Kabul:** 23.03.2020 • **Published Online/Online Yayın:** 23.03.2020

©Telif Hakkı 2020 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2020 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

was reported that by 10 March 2020, there were 110,000 infected cases and 4,000 deaths (2, 3). In an evaluation conducted in China on 72,314 cases, the proportion of cases younger than 10 years was found to be 1% (1). It was reported that the infection follows a milder course in children (1, 3). Contamination from human to human occurs by direct air contact. Clinical symptoms develop similar to any upper respiratory infection. The severity of the clinical state depends on the immune state of the patient. Infectivity starts a few days before the development of clinical symptoms. Breast milk has not been reported as a source of infection (4, 5). In an article from China early in February 2020, it was mentioned in a vague way that a mother who has tested positive or who was suspected of having COVID-19 should not breast feed her baby, but that she could breast feed if her test was negative (6). On the other hand, the paper did not report any findings which indicated infection via breast milk. Meanwhile, Chen et al (5) performed a postnatal study of the amniotic fluid, cord blood, breast milk and throat scraping on 6 of 9 pregnant women who had tested positive in their last trimester of pregnancy and found negative test results for SARS-CoV-2. Samples were not available in three of the mothers (5). These results indicate that there was no contagion by breast milk. Available data on these cases will increase in time. WHO as well as the Royal College of Paediatrics and Child Health have evaluated the available data on the properties of similar respiratory viruses and breast milk with relation to COVID-19 data and have concluded that there should be no concerns about breast feeding (4, 7).

As per WHO instructions for all emergency situations, in a COVID-19 epidemic, it is also important to implement the principles of preventive health care measures. Breast feeding and immunization procedures are at the top of the list among these measures (7). Due to the singular nutritional properties of human milk, alongside with its immunological, anti-infective and immunomodulator properties, promotion and protection of breast feeding during epidemics is of utmost importance (8, 9).

Immunoprotective properties of breast milk

There has been an abundance of scientific studies, published within the past five years, on the immunological properties of human milk and their effectiveness. The effectiveness of these properties increase with exclusive breast feeding in the first 6 months of life and during the course of breast feeding (9).

The protective components of breast milk show an interactive effect in an in vivo environment. However, it is best to consider these components in two groups, namely cellular and humoral. The cellular components of colostrum and breast milk are shown in Table 1. Active leucocytes are naturally present in human milk and their number decreases after the first months of life. The colostrum con-

Table 1: Cellular components of breast milk (9)

Leucocytes
Macrophages
Polymorphonuclear leucocytes
Lymphocytes
Stem cells

tains one million cells per mL. Breast milk contains both T and B lymphocytes, with T lymphocytes in the majority. While all immunoglobulin groups are present in human milk, secretory IgA is the major one. Secretory IgA promotes mucosal immunity and plays a primary role in protection from pathogenic microorganisms. Colostrum contains high concentrations of IgA, and with continued breast feeding, these levels persist in the first 12-24 months of life; the antipathogenic properties of IgA for some organisms even increase during this period (10). Secretory IgA provides a passive immunity for respiratory infections as well as for infections of the intestinal tract. It has been shown that breast-feeding leads to a decrease of 53% in infants presenting with upper respiratory infections and to a decrease of 27% in those presenting with diarrhea (11). Karabayir et al reported the case of an infant whose mother had clinical signs of varicella including presence of an active lesion on her breast as well as a positive Varicella Zoster Virüs (VZV) DNA finding in her milk, who had continued to be breast fed, but showed no signs or symptoms of chicken pox. The authors concluded that these results were due to the immunity provoked by the varicella infection in the mother and the transfer of the antibodies to the infant (12).

The nutritional levels of a person do not affect the immunoglobulin level of human milk. These levels are essentially similar in well-fed and in malnourished women (13). There are antibodies and some antipathogenic factors for certain viruses in breast milk as shown in Table 2. These antibodies are transferred to the infant and provide protection. A breast feeding mother who acquires an infection produces proteins which protect her and which also are transferred to her infant, thus protecting her infant from acquiring the infection. The same process applies practically to all viral infections. Also, several substances other than antibodies have a role in the antiviral properties of human milk.

Bioactive structures with important immunological properties are also present in human milk (Table 3). The bifidus factor promotes the growth of a probiotic microorganism, namely, of *Lactobacillus bifidus*, in the intestinal flora of the infant. *Lactobacillus bifidus* has protective immunological properties. It stimulates antibody production and enhances phagocytosis. Lysozyme is an antimicrobial sub-

Table 2: Immunologically and pharmacologically active components for some viral infections observed in breast milk (9)

Immunoglobulin/ antiviral factor	Viral infection	Immunoglobulin/ antiviral factor	Viral infection	
Secretory IgA	Enteroviruses	IgM, IgG	CMV	
	Poliovirus types 1,2,3		RSV	
	Some Coxsackievirus types		Rotavirus	
	Echovirus types 6 and 9		Rubella	
	Herpesvirus		Parvovirus B19	
	CMV		Herpes simplex	
	Herpes simplex virus		Herpes simplex	
	HIV		Coxsackievirus B4	
	RSV		CMV	
	Rubella		Rotavirus	
	Rotavirus		α-2 macroglobulin	Influenza
	Measles			Parainfluenza
	Norovirus		α-1 antitripsin	Rotavirus

Table 3: Some bioactive substances in breast milk (9)

Bifidus factor
Lysozyme
Lactoferrin
Interferon
Complement
Vitamin B12 binding protein
Glycans and oligosaccharides
Interleukins
Nucleotides

stance which is heat resistant and also acid resistant. In lactating mothers, lysozyme concentration in milk increases during the course of the 12th and 24th months of breastfeeding. Human milk also contains lactoferrin, which is an iron binding protein, a substance with an inhibitory action on the reproduction of viruses and of many pathogenic microorganisms in the intestines. Lactoferrin is resistant to proteolysis and has been reported to have anticancer properties (9). Interferon, a substance with marked antiviral properties, is produced by the natural killer cells and T cells present in human milk. Glycans and oligosaccharides, substances with complex carbohydrate structures, are reported to have antipathogenic, immunomodulator, antiinflammatory and prebiotic effects (14, 15).

Breast feeding protects the mother from many diseases and also has a balancing effect on her mental health

(8, 9). In the course of breast feeding, oxytocin increases in human blood. This hormone is reported to have a protective effect from depression and its pacifying effect on the mother's psyche has been observed (9). Thus, this hormone enhances the resistance of the mother to adverse conditions such as epidemics.

Considering the protective qualities of breast milk and of lactation in human health, the importance of continuation of breast feeding in epidemics and other extraordinary conditions cannot be overstressed. In addition to its singular nutritional qualities and its protective effect from diseases, human milk is the most hygienic as well as the most natural and low cost food for the infant.

At present, reports from the Chinese experience constitute our most important source of epidemiological data on COVID-19 infection. The infection is known to spread by respiratory secretions. Infection via breast milk has not been reported (4, 5, 16, 17). In the light of the experience gained from similar viral infections such as SARS, in infants whose mothers are infected with SARS-CoV-2 or are suspected to have this infection, continuation of breastfeeding is reported to be the most suitable approach (16, 17).

Principles related to breast feeding during the COVID-19 epidemic

WHO advocates exclusive breast feeding for all infants in the first 6 months of life and the continuation of breast feeding with complementary feedings until the infant is at least two years old. The importance of continuation of breast feeding during emergencies such as epidemics is also stressed (18). Many scientific sources have stressed

the importance of breast feeding during this COVID-19 epidemic (4, 7, 16, 17). The recommendations of these scientific organizations and of WHO are summarized below:

Breast feeding should not be discontinued during epidemics: Mothers who are thinking of ending breast feeding should postpone this decision. Thus the infant will continue to receive the immunologic components present in human milk.

It should not be forgotten that depriving the infant from being breast fed for reasons such as a positive test result in the mother, will expose him/her to great risks. Such an infant will be deprived of preventive proteins produced actively by the mother through exposure to COVID-19, which are also transmitted to her milk, and also of immunity related substances naturally present in human milk (Tables 1, 2, 3), and thus the infant will be at risk of contracting COVID-19 and all infectious diseases.

Breast feeding should not be discontinued due to the mother's contact with a person with a diagnosis of COVID-19 infection: In such a situation the measures listed below should be taken and breast feeding continued:

1. The mother should use a mask while breast feeding or while expressing her milk,
2. Before feeding her baby, the mother should wash her hands in an effective way (washing for about 20 seconds all areas covering the ventral, dorsal and interdigital surfaces of the hands, the palms and areas extending to the wrists, followed by rinsing and drying with a towel used only once). Rings and bracelets need to be taken off as they will hinder effective hand washing,
3. The room should be ventilated at frequent intervals,
4. All clothing should be washed using detergents, at water temperatures of 60-90°C,
5. The mother should consume plenty of liquids, be on a balanced diet and get enough sleep.

A breast feeding mother receiving treatment at home should not be separated from her infant: WHO and many international scientific organizations advise that in this situation, the infant and the mother should not be separated and that breast feeding should be continued along with observation of hygienic measures (4, 7, 16, 17, 19).

WHO's suggestions for the home care of patients with mild symptoms can be summarized as follows: Educating the patient and the household on the provision of hygienic measures, including measures to prevent contagion. To this end, the patient should be isolated in a well ventilated environment, her mobility in the house should be limited, her room should not be shared by other household members and if this is not possible, they

should remain at a distance of at least one meter from the patient. Breast feeding should be continued, but the mother is advised to wear a mask and pay attention to hand hygiene during contact with her infant. Other WHO recommendations include the limitation of numbers of care givers, attention to hand hygiene following contact with the patient or her belongings, and if possible, the use of alcohol based hand disinfectants (19).

Measures to ensure breast feeding in infants whose COVID-19 (+) mothers are hospitalized: The decision to isolate mothers from their infants should be left to the hospital team. However, if the team decides to leave the COVID-19 (+) mother and her baby in the same room, the mother should be advised not to kiss her baby and to adhere strictly to hygienic rules. The distance between the baby's cradle and the mother's bed should be at least two meters apart (16, 17). If there is a need for the mother and infant to be separated temporarily, the infant should continue to receive expressed breast milk. It is preferable that instead of a bottle, the infant be fed by spoon or cup. Hygienic measures, including the use of disinfectants containing 60-95% alcohol, need to be observed during the collection of breast milk. At this stage, the safety of the drugs given to the mother from the perspective of breast feeding should also be checked from official sources and scientific publications (20, 21).

CONCLUSION

In the light of existing scientific data, we can conclude that contact with or infection from COVID-19 should not lead to cessation of breast feeding. In view of the infant's health, the continuation of breast feeding and application of routine immunization procedures are of utmost importance.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study- G.G., G.K.; Drafting Manuscript- G.G., G.K.; Critical Revision of Manuscript- G.G., G.K.; Final Approval and Accountability- G.G., G.K; Supervision- G.G., G.K.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: Authors declared no financial support.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım-G.G., G.K.; Yazı Taslağı- G.G., G.K.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- G.G., G.K.; Son Onay ve Sorumluluk- G.G., G.K; Süpervizyon- G.G., G.K.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

REFERENCES

1. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA*, 2020 February 24 (online). [CrossRef]
2. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. Erişim: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>. Son Erişim: 20.3.2020.
3. Lu X, Zhang L, Du H, Zhang J, Li YY, Qu J, et al. SARS-CoV-2 infection in children [published online ahead of print, 2020 Mar 18]. *N Engl J Med*. 2020;10.1056/NEJMc2005073. [CrossRef]
4. Royal College of Paediatrics and Child Health. COVID-19-guidance for paediatric services. RCPCH. London. Erişim: <https://www.rcpch.ac.uk/sites/default/files/generated-pdf/document/COVID-19---guidance-for-paediatric-services.pdf>. Son erişim: 20.3.2020
5. Chen H, Guo J, Wan, C, Luo F, Yu X. Zhang,W, et al. Clinical characteristics and intrauterine vertical transmission potential of COVID-19 infection in nine pregnant women: a retrospective review of medical records. *The Lancet* 2020; 395(10226):809-15. [CrossRef]
6. Wang L, Shi Y, Xiao T, Fu J, Feng X, Mu D, et al. Chinese expert consensus on the perinatal and neonatal management for the prevention and control of the 2019 novel coronavirus infection. *Ann Transl Med* 2020;8(3):47. [CrossRef]
7. World Health Organization Q&A on COVID-19, pregnancy, childbirth and breastfeeding. World Health Organization. Geneva Erişim: <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/q-a-on-covid-19-pregnancy-childbirth-and-breastfeeding>. Son erişim: 20.3.2020
8. Gökçay G, Keskindemirci G. Anne sütünün önemi. Telatar B, editör. *Aile Hekimliğinde Anne Sütünün Anne ve Bebek Sağlığı Açısından Önemi*. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2019. p.1-7.
9. Lawrence RA, Lawrence RM. *Breastfeeding: A Guide for the Medical Profession*. Eighth Edition, Philadelphia: Elsevier Yayınları 2016. p.146-193.
10. Goldman AS, Goldblum RM, Graza C. Immunologic components in human milk during the second year of lactation. *Acta Paediatr Scand* 1983;72:461-2. [CrossRef]
11. Quigley MA, Kelly YJ, Sacker A. Breastfeeding and hospitalization for diarrheal and respiratory infection in the United Kingdom Millennium Cohort Study. *Pediatrics* 2007;119(4):e837-e842. [CrossRef]
12. Karabayir N, Yaşa B, Gökçay G. Chickenpox infection during lactation. *Breastfeed Med* 2015;10(1):71-2. [CrossRef]
13. Reddy V, Bhaskaram C, Raghuramula N, Jagadeesan V. Antimicrobial factors in human milk. *Acta Paediatr Scand* 1977;66:229-32. [CrossRef]
14. Morrow AL, Ruiz-Palacios GM, Altaye M, Jiang X, Guerrero ML, Meinen-Derr JK, et al. Human milk oligosaccharides are associated with protection against diarrhea in breast-fed infants. *J Pediatr* 2004;145(3):297-303. [CrossRef]
15. Andreas N J, Kampmann B, Le-Doare KM. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Hum Dev* 2015;91(11):629-35. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2015.08.013. Epub 2015 Sep 12. [CrossRef]
16. Academy of Breastfeeding Medicine Statement On Coronavirus 2019 (COVID-19). Academy of Breastfeeding Medicine. Erişim: <https://www.bfmed.org/abm-statement-coronavirus>. Son erişim: 20.03.2020.
17. Center for Disease Control. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/prepare/pregnancy-breastfeeding.html>. Son erişim: 21.03.2020.
18. World Health Organization, Guiding principles for feeding infants and young children during emergencies. 2004, Geneva WHO/NHD/99.10
19. World Health Organization. Home care for patients with COVID-19 presenting with mild symptoms and management of their contacts: interim guidance, 17 March 2020 (No. WHO/nCov/IPC/HomeCare/2020.3).
20. Drugs and Lactation Database (LactMed) Erişim: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK501922/> Son erişim: 20.3.2020.
21. Jones W. *Breastfeeding and Medication*. 2013 Routledge London. [CrossRef]

SİNYAL AMPLİFİKASYON TEKNİKLERİ VE TANISAL VİROLOJİDEKİ UYGULAMALARI

SIGNAL AMPLIFICATION TECHNIQUES AND APPLICATIONS IN DIAGNOSTIC VIROLOGY

Fatih ŞAHİNER¹ , Ramazan GÜMRAL¹ 

¹Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

ORCID IDs of the authors: F.Ş. 0000-0002-3488-0339; R.G. 0000-0002-2303-8234

Cite this article as: Sahiner F, Gumral R. Signal amplification techniques and applications in diagnostic virology. J Ist Faculty Med 2020;83(3):291-301. doi: 10.26650/IUITFD.2019.0077

ÖZET

Tanısıl virolojide PCR dışı moleküler araçlar arasında ilk sırada sinyal amplifikasyon yöntemleri yer almaktadır. Sinyal amplifikasyon testlerinde klinik örneklerdeki hedef DNA veya RNA'nın doğrudan kopyalanması yerine, bu moleküllerden elde edilen sinyallerin yükseltilmesi ve ölçülmesi amaçlanır. Bu özellikleri ile sinyal amplifikasyon yöntemleri incelenecek örnekler, kullanılan gereçler veya çalışma ortamının amplifiye ürünlerle kontamine olması bakımından risk taşımazlar. HIV-1, HCV ve HPV nükleik asitlerinin saptanması ve kantitasyonu ve HPV genotip analizi için onaylı sinyal amplifikasyon testleri ticari olarak kullanıma sunulmuştur. İlk olarak 1990'lı yılların başlarında kullanılmaya başlanan ve farklı çalışma prensipleri ve özel tasarımlara sahip olan sinyal amplifikasyon testleri günümüzde real-time PCR, rolling circle yöntemi, luminex xMAP, DNA biyosensör teknolojisi ve dizi analizi gibi yeni tanısal tekniklerle kombine edilerek viral etkenlerin saptanması, genotiplendirilmesi, multipleks analizleri ve bilinmeyen yeni virüslerin keşfedilmesinde kullanılmaktadır. Onaylı sinyal amplifikasyon testleri yeni geliştirilen test tasarımları için standart kontrol yöntemleri olarak da kullanılmaktadır. Bu derlemede sinyal amplifikasyon temelli testlerin çalışma prensipleri ve tanısal virolojideki kullanımları detaylı olarak ele alınmış ve diğer platformlardaki kullanımlarına dair örnekler sunulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Dalı DNA, Hibrid yakalama, İnvader

ABSTRACT

Signal amplification methods are the most preferred non-PCR molecular tools in diagnostic virology. The aim of signal amplification tests is to amplify and measure the signals obtained from the target DNA or RNA in clinical samples, instead of directly copying these molecules. With these characteristics, signal amplification methods do not pose any risk of contamination of the test samples, laboratory devices or working environment with amplified products. Approved signal amplification tests have been commercially available for detection and quantitation of HIV-1, HCV and HPV nucleic acids, as well as genotyping analysis of HPV. Signal amplification tests were first used in the early 1990s and have different working principles and special designs. These tests are now combined with new diagnostic techniques such as real-time PCR, the rolling circle method, luminex xMAP, DNA biosensor technology and sequence analysis, in the detection and genotyping of viral agents, multiplex analysis and the discovery of new and unknown viruses. In addition, approved signal amplification tests are used as the standard control methods for newly developed test designs. In this review, the working principles of signal amplification-based tests and their use in diagnostic virology are discussed in detail and examples of their use in other platforms are presented.

Keywords: Branched DNA, Hybrid capture, Invader

İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: fsvirol@gmail.com

Başvuru/Submitted: 11.09.2019 • **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 04.10.2019 •

Son Revizyon/Last Revision Received: 05.10.2019 • **Kabul/Accepted:** 10.10.2019 • **Online Yayın/Published Online:** 21.11.2019

©Telif Hakkı 2020 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2020 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

GİRİŞ

Enfeksiyonlar veya genetik hastalıklarla ilişkili nükleik asitler klinik materyallerde çoğu kez düşük kopya sayılarında bulunurlar (1). Bu hastalıkların tanısı ve takibi için ya da herhangi bir numunedeki nükleik asit varlığının saptanması ve kantitasyonu için amplifikasyon temelli yaklaşımlara gereksinim duyulur (1-3). Amplifikasyon yaklaşımları çalışma prensiplerine göre genel olarak üç farklı grupta incelenir; (i) doğrudan hedef nükleik asitlerin çoğaltıldığı yöntemler, (ii) hedef nükleik asitlere bağlanan problemlerin amplifiye edildiği yaklaşımlar ve (iii) hedef nükleik asitlerden üretilen sinyallerin amplifiye edilmesine dayalı teknikler (1, 4). Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), loop-mediated amplifikasyon (LAMP), nükleik asit sekans bazlı amplifikasyon (NASBA) ve transkripsiyon aracılı amplifikasyon (TMA) teknikleri nükleik asit sekanslarının kopyalarını çoğaltmada kullanılan hedef amplifikasyon yöntemlerinden en yaygın kullanılanlarıdır (5, 6). Ligaz zincir reaksiyonu (LCR), Qb replikaz ve strand displacement amplifikasyon (SDA) teknikleri ise spesifik olarak hedef nükleik asit sekanslarına bağlanan problemlerin kopyalanması prensibiyle çalışan prob amplifikasyon yöntemleridir (1, 5, 7). Sinyal amplifikasyon tekniklerinde ise hedef nükleik asitlerin veya spesifik problemlerin çoğaltılması yerine, her bir hedef nükleik asitlerin sekansından üretilen sinyalin yükseltilmesi hedeflenir (1, 5). Bu amaçla ilk olarak nükleik asitlerin özgün problemlerle hibridizasyonu gerçekleştirilir ve sonrasında bu komplekslerden elde edilen sinyalin derecesi artırılır (1).

Literatürde tanımlanmış olan sinyal amplifikasyon tekniklerinin en önemlileri; dallı DNA (bDNA; dallanmış DNA veya branched DNA), döngüsel prob (CP; cycling probe), hibrid yakalama (HC; hybrid capture), Invader yöntemi ve tiramid sinyal amplifikasyonu (TSA) teknikleridir (Tablo 1)

(1, 8). Son yıllarda bu tekniklere nanopartiküllerin kullanıldığı yeni sinyal amplifikasyon yöntemleri de eklenmiştir (9). Klinik örneklerde HIV (*human immunodeficiency virus*), HBV (*hepatitis B virus*), HCV (*hepatitis C virus*), CMV (*human cytomegalovirus*) ve HPV (*human papillomavirus*) varlığının saptanması ve kantitasyonu için geliştirilmiş ve ticari olarak kullanıma sunulmuş çeşitli sinyal amplifikasyon testleri bulunmaktadır (1). Sinyal amplifikasyon yaklaşımı ayrıca, mRNA kantitasyonu, bakteriyel antibiyotik direnç genlerinin gösterilmesi ve genetik hastalıkların tanısı (faktör V Leiden, kistik fibrozis ve Tay-Sachs tanısı, tek nükleotit polimorfizmlerinin saptanması) için de kullanılmıştır (1).

Günümüzde viral nükleik asitlerin amplifikasyonu ve kantitasyonunda geniş dinamik aralıkları ve üstün saptama duyarlılıkları ile real-time PCR temelli testler rutin viroloji laboratuvarlarında en sık kullanılan testler haline gelmiştir (2). FDA (Food and Drug Administration, ABD) onaylı viral yük testlerin önemli bir bölümü yine real-time PCR temelli testler iken, onay alan diğer testler arasında TMA ve NASBA gibi izotermal amplifikasyon yöntemleri ve ayrıca bDNA, HC ve Invader gibi sinyal amplifikasyon testleri bulunmaktadır (10, 11). HPV, HIV-1 ve HCV tanısı için geliştirilmiş FDA onaylı sinyal amplifikasyon testleri belirli avantajlarıyla rutin tanıda tercih edilebildiği gibi, yeni geliştirilen tanı tarama testleri için karşılaştırmalı analizlerde standart kontrol testleri olarak da kullanılmaktadırlar (11, 12).

Branched (Dallı) DNA tekniği

Bu yöntem hedef nükleik asitlerin immobilize edilmesi ve takiben çok sayıda dallı ve işaretli problemler ile ardışık veya simultane hibridizasyonu sonrasında üretilen sinyalin ölçülmesi prensibi ile çalışır (8). Test genel olarak tamam-

Tablo 1: Sinyal amplifikasyon tekniklerine genel bakış (1,4,11).

Teknikler	Teorik amplifikasyon	Ticari formlar	Uygulamalar alanları
Dallı DNA (Branched DNA)	11.564 kat	Chiron, Bayer Healthcare Diagnostics Division (ABD).	HIV-1, HBV, HCV ve CMV viral yüklerinin saptanması; sitokin mRNA kantitasyonu; HIV-1 ve HPV'nin <i>in situ</i> saptanması.
Döngüsel prob (Cycling Probe)	Birbirinden farklı büyütmeler	ID Biomedical (Canada), Excimus Biotech (ABD)	Bakterilerde antibiyotik direnci saptanması; Mycobacterium tuberculosis'de direkt tekrarların karakterizasyonu. PCR ile kombine edildiği uygulamalar var.
Hibrit Yakalama (Hybrid Capture)	3000 kat	Digene Corporation (ABD)	HBV ve CMV viral yük kantitasyonu; HPV, Neisseria gonorrhoeae ve Chlamydia trachomatis saptanması.
Invader	10 ⁶ -10 ⁷ kat	Third Wave Technologies (ABD)	Genetik hastalıkların tanısı; SNP* analizi; HPV tanısı, HPV genotip tayini.
Tiramid Sinyal Amplifikasyonu	500-1000 kat	Molecular Probes (ABD)	HPV, HIV, 16S ribozomal RNA ve antimikrobiyal direnç genlerinin saptanması.

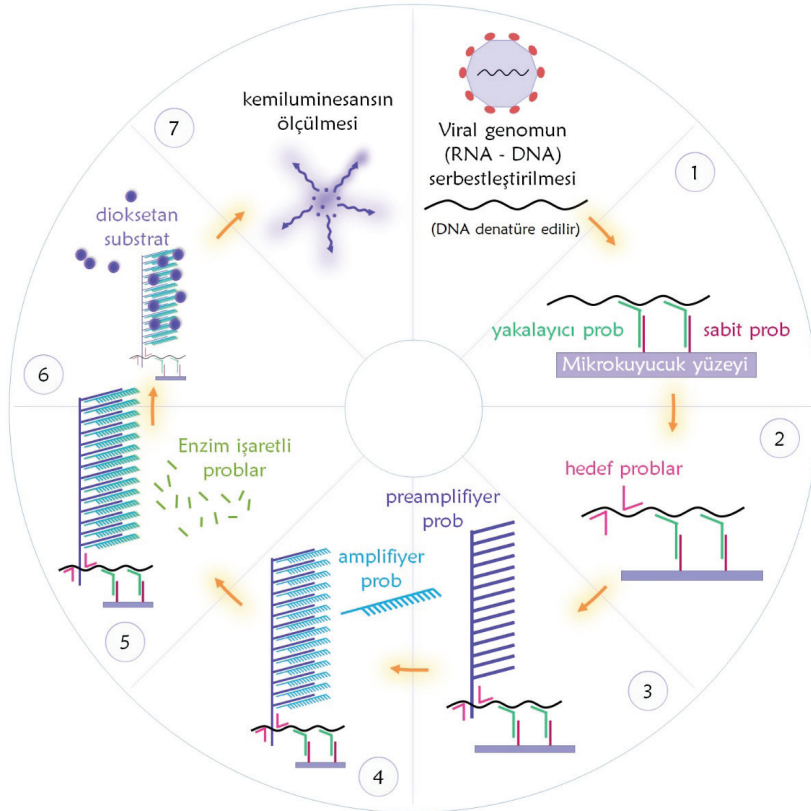
*SNP; single nucleotide polymorphism (tek nükleotid polimorfizmi)

lanması 2 gün sürebilen 7 basamaktan oluşur (Şekil 1) (1, 8). HIV-1, HBV, HCV ve CMV viral yüklerinin saptanması, mRNA kantitasyonu, HIV-1 ve HPV'nin *in-situ* saptanması için tasarlanmış bDNA testleri bulunmaktadır (1, 5, 13). Termal döngü cihazlarına gereksinim duyulmaması, düşük kontaminasyon olasılığı, herhangi bir enzime gerek duyulmaması ve kantitasyona uygun olması gibi avantajlara sahip olan bDNA testlerinin en önemli dezavantajları ise saptama duyarlılıklarının PCR temelli yöntemlere kıyasla daha düşük olması ve test süresinin uzunluğudur (1, 5, 14). Bununla beraber yeni nesil testlerin duyarlılıkları artırılmış, HIV-1 için plazmada 50-75 kopya/ml saptama duyarlılığı değerine ulaşılmıştır (1).

bDNA tekniği amplifikasyon basamakları

Birinci basamak: Nükleik asitlerin mikrokuyucuk yüzeyine sabitlendiği basamaktır. İlk olarak viral partiküllerden, hücrelerden veya fikse edilmiş dokulardan hedef nükleik asitler (DNA veya RNA) serbestleştirilir ve nükleik asit içeren numuneler bu biyolojik materyallerdeki RNaz ve DNaz'ların inaktive edilmesi için proteinaz K ve deterjanlarla muameleye tabi tutulur. Araştırılmak istenilen hedefe bakılmaksızın tüm bDNA testlerinde sabit prob olarak aynı oligonükleotitler kullanılır. Sabit problemlerin serbest uçları yakalayıcı (capture) problemlerin bağlanmasına uygun olarak dizayn edilmiştir. Yakalayıcı problemler ise bir uçları

sabit problemlere diğer uçları da hedef nükleik asitlerde yer alan spesifik sekanslara komplementer diziler içerecek şekilde tasarlanmıştır. Yakalayıcı problemler doğrudan sabit problemlere bağlı olarak bulunabileceği gibi solüsyon içerisinde serbest olarak da bulunabilirler. Nükleik asitlerin daha iyi sabitlenebilmesi için bu problemler bir hedef nükleik asidin birden çok bölgesine bağlanabilecek çeşitlilikte tasarlanırlar. İkinci basamak: Hedef (target) problemlerin mikrokuyucuk yüzeyine sabitlenen nükleik asitlerle hibridize olduğu basamaktır. Yakalayıcı problemlere benzer olarak hedef problemler de bir hedef nükleik asidin birden çok bölgesine hibridize olabilecek şekilde tasarlanırlar. Hedef nükleik asitlerdeki korunmuş bölgeler ne kadar fazla sayıda hedef prob tasarlamaya uygunsa test sonunda elde edilmesi beklenen teorik sinyal artışı o kadar yüksek olacaktır. Üçüncü basamak: Preamplicasyon prob hibridizasyon basamağıdır. Bir gecelik inkübasyon sonrası hibridize olmamış target problemlerin, lizis reaktiflerinin ve hücresel debrisin ortamdan uzaklaştırılması için mikrokuyucuklar yıkanır ve kuyucuklara her biri 14 adet tekrarlayıcı sekans içeren preamplicasyon prob karışımı eklenir. Her bir preamplicasyon problemin nükleik asit-prob kompleksine bağlanabilmesi için iki adet hedef proba aynı anda bağlanması gerekmektedir. Bu tasarım spesifik olmayan hibridizasyonları minimize etmek için geliştirilmiştir. Dördüncü basamak: Amplifikasyon prob hibridizasyon basamağıdır. Amplifikasyon problemler



Şekil 1: Örnek bir bDNA testinde reaksiyon basamakları.

preamplifiyer problemlerle hibridize olarak nükleik asit-prob kompleksine bağlanırlar. Böylece sinyal amplifikasyon multimeri ya da bDNA kompleksleri olarak adlandırılan yapılar oluşur. Her amplifiyer üzerinde enzim işaretli problemlerin bağlanması için çok sayıda bağlantı bölgesi bulunur. Beşinci basamak: Hibridize olmamış amplifiyer problemler uzaklaştırıldıktan sonra numunelere enzim işaretli problemler olarak adlandırılan alkalin fosfat-modifiye oligomerler eklenir ve bu problemlerin amplifiyer problemler üzerindeki tekrarlayan sekanslar ile hibridize olması sağlanır. Altıncı basamak: Hibridize olmayan işaretli problemler uzaklaştırıldıktan sonra ortama eklenen dioksetan substrat, işaretli probdaki alkalin fosfat ile kimyasal reaksiyona girerek kemilüminesan sinyal üretimine neden olur. Test sonunda elde edilen sinyal miktarı hedef nükleik asit miktarı ile lineer olarak ilişkilidir. Yedinci basamak: Bu basamakta üretilen kemilüminesan sinyal bir fotomultiplier tüp aracılığıyla ölçülür ve elde edilen sinyal eğrisi miktarı bilinen bir örneğe ait sinyal eğrisi ile karşılaştırılır ve rölatif ışık üniteleri (RLU) belirlenerek numunedeki hedef nükleik asit miktarının kantitatif analizi yapılır (1, 5, 8).

Birinci nesil bDNA testleri 1990'ların başlarında Chiron (ABD) tarafından geliştirilmiştir. Günümüzde üçüncü nesil teknoloji kullanılarak üretilen testlerde prob dizaynı geliştirilmiş ve duyarlılık artışı sağlanmıştır (8). Preamplifiyer problemler iki hedef proba bağlanacak şekilde dizayn edilmiş ve böylece nonspesifik bağlanmalarla ilişkili arka plan sinyalleri azaltılmıştır. Ayrıca izositozin (Iso5MeC) ve izoguanozin (IsoG) gibi doğal olmayan izomerik bazlar içeren ve hedef nükleik asitlere ya da bDNA kompleksinin diğer ünitelerine (hedef problemler, preamplifiyerler, amplifiyerler ve işaretli problemler) bağlanmayan spesifik problemler dizayn edilmiştir (8). Ayrıca hedef dışı nükleik asitlerle nonspesifik bağlanma olasılığı azaldığı için testin sensitivite ve spesifitesi artarken sinyal/arka plan kirliliği oranı 30 kat kadar arttırılmıştır (15). Uzun problemlerin nükleik asitlere daha stabil olarak bağlanacağı düşünülerek her biri 30 nükleotit uzunluğunda çoklu yakalayıcı ve hedef problemler da dizayn edilmiş ve denenmiştir, ancak uzun problemlerin yanlış eşleşmelere neden olabildiği görülmüştür (1). Yanlış eşleşmelerin önüne geçilmesinde uygun prob tasarımı önemli olup, bDNA testlerinde prob dizaynı için geliştirilen bir yazılım programı da bulunmaktadır (16).

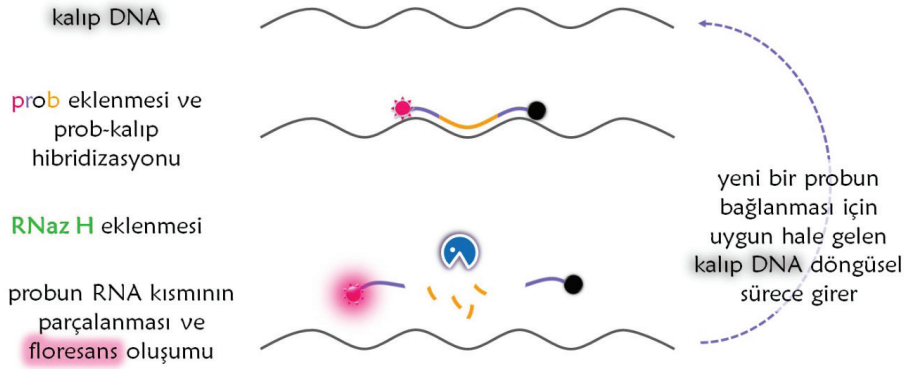
Üçüncü nesil bDNA testlerinden Versant HIV-1 RNA 3.0 (Siemens Healthcare, ABD) ve Versant HCV RNA 3.0 (Siemens Healthcare, ABD) FDA tarafından onay almıştır (2). Versant HIV-1 RNA 3.0 testinde teorik olarak 11.564 kat artmış sinyal (59 preamplifiyer molekül × her preamplifiyer molekülde amplifiyer problemler için 14 bölge × her amplifiyer molekülde işaretli problemler için 14 bölge) elde edilir ve testin saptama duyarlılığı 50-75 kopya/ml değerine ulaşır (1). Versant HCV RNA 3.0 ve Versant HBV 3.0 testlerinde ise teorik olarak sırasıyla 2352 ve 7448 kat sinyal artışı beklenir ve her iki testin saptama duyarlılıkları sırasıyla 615 IU/

ml ve 3300 kopya/ml'dir. Bu testler için beklenen teorik amplifikasyonun HIV-1 testine göre daha düşük olmasının nedeni hedef nükleik asitler içerisindeki iyi korunmuş sekanslardan üretilebilen hedef prob sayısının HIV-1 ile kıyaslandığında göreceli olarak daha az olmasıdır (1, 2). Bir çalışmada PCR ve Versant HCV RNA 3.0 yöntemlerinin HCV genotipleri (genotip 1-5) için kantitasyon kapasiteleri değerlendirilmiş ve bDNA yönteminin genotip 1, 2 ve 3 için daha düşük kantitasyon değeri verdiği tespit edilmiştir (17). Bir diğer ticari test olan Quantiplex CMV 2.0 kantitatif bDNA testinin saptama duyarlılığı 900 kopya/10⁶ lökosit iken, testin yürütülmesi için çok sayıda lökosit elde edilmesinin gerekmesi ve testin 24 saatte tamamlanabilmesi gibi dezavantajları bulunmaktadır (1, 14, 18). Bilinen ticari testler dışında bDNA testlerinin yeni tekniklerle kombine edildiği tanınal uygulamalar da denenmiştir. Bir araştırmada H5 ve H7 alt tipi avian influenza suşlarının saptanması ve eşzamanlı tanımlanması için bDNA sinyal amplifikasyon teknolojisinin süspansiyon platformdaki etkinliği incelenmiştir (19). bDNA ve luminex xMAP teknolojisinin kombine edildiği multipleks testler (QuantiGene Plex assay; Affymetrix, Fremont, CA) ayrıca gen ekspresyonu çalışmalarında da kullanılmıştır (20, 21).

Döngüsel prob (Cycling Probe, CP) tekniği

CP tekniği bir izotermal lineer sinyal amplifikasyon reaksiyonudur (1). Bu testte tek zincirli hedef DNA molekülü sentetik olarak üretilen ve hedef DNA ile spesifik komplementer sekans içeren bir adet kimerik DNA-RNA-DNA probu ile hibridize edilir (1). Kimerik probdaki RNA kısmının ideal uzunluğunun hedef DNA molekülündeki 4 baz ile tam komplementer 4 pürin rezidüsü içerecek şekilde olduğu gösterilmiştir (22). Bu tekniğin bazı uygulamalarında DNA-RNA-DNA probundaki DNA parçalarından biri florofor ile işaretlenir ve diğer DNA parçası florofora yakınlığı nedeniyle florofordan yayılan ışığı (bütünlüğü bozulmamış bir probda) absorbe eden bir quencher içerir. Ortama RNaz H ilave edildiğinde hedef DNA ile hibridize durumdaki probun RNA kısmı bu enzim tarafından parçalanır ve probun diğer iki parçası (DNA kısımları) hedef DNA'dan ayrılır ve böylece hedef DNA bir sonraki kimerik prob ile hibridize olmaya hazır hale gelir (1). Bu arada her hedef DNA'dan sabit sıcaklıkta lineer olarak çoğalan DNA fragmanları oluşturulur (Şekil 2). Hedef nükleik asitlerin varlığı bu DNA parçalarının jel elektroforezinde yürütülmesi ile veya bir immünoassay (lateral-flow strip) testi ile saptanabilir (1).

Yöntem bakteriyel genomik sekansların saptanması, *Staphylococcus aureus* metisilin direncinin ve çoklu ilaç direncinin gösterilmesi, enterokoklarda vankomisin direncinin saptanması (vanA ve vanB genleri) ve *Mycobacterium tuberculosis* direkt tekrarların karakterizasyonu için kullanılmıştır (1). ID Biomedical (Canada) ve Excimus Biotech (ABD) firmaları tarafından ticari testler de üretilmiştir (1). Bu teknik ayrıca PCR gibi real-time hedef amplifikasyon sistemlerinde veya rolling circle yöntemi gibi



Şekil 2: Döngüsel prob testinin reaksiyon prensibi.

prob amplifikasyon sistemlerinde amplifikasyon ürünü birikimini saptamak üzere modifiye edilmiştir (1). Human herpesvirus 6A ve B saptanması için geliştirilen CP temelli real-time PCR testi bunun bir örneğidir (23). CP real-time PCR tekniği vahşi-tip varicella-zoster virus (VZV) ve Oka aşı kökenlerinin birbirinden ayırt edilmesi ve kantitasyonu için de kullanılmıştır (24). CP real-time PCR tekniği ile dizi analizi yönteminin kombine edildiği bir çalışmada ise NS5A inhibitörlerine dirençli HCV varyantlarının saptanması ve kantitasyonu başarılı bir şekilde test edilmiştir (25). Aynı yöntem amantadin ve oseltamivir dirençli influenza suşlarının saptanmasında ve tiplendirilmesinde de kullanılmıştır (26, 27). RCA (random-primed rolling circle amplification) tekniği ve elde edilen ürünlerin dizi analizi yaklaşımı ise yeni polyomavirus türlerinin keşfedilmesinde kullanılmıştır (28).

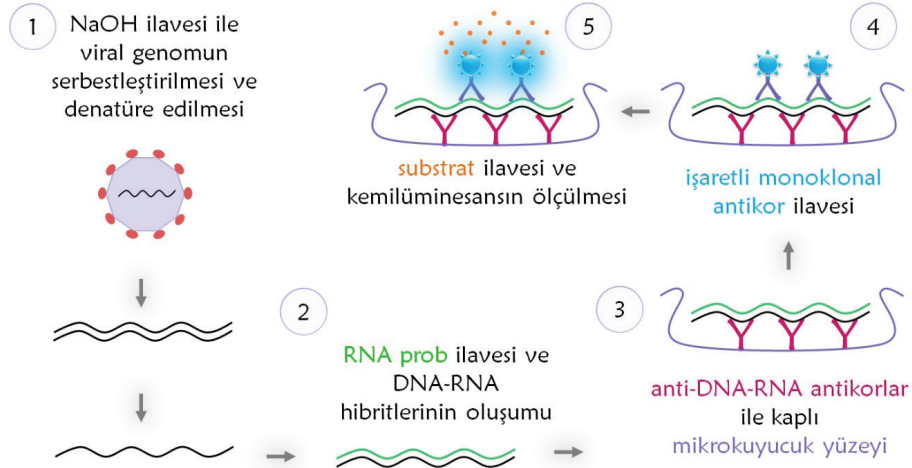
Hibrit yakalama (hybrid capture, HC) tekniği

HC sistemi RNA: DNA hibridlerinin poliklonal antikorlar ile yakalanması ve oluşan komplekse bağlanan işaretli monoklonal antikorlarla kemilüminesan sinyal üretilmesi prensibi ile çalışan bir yöntemdir (8). HC testinin numune hazırlama basamağının kolay olması sayesinde numunelerin işlenmesi ve test edilmesi hızlı ve verimli olarak yapılabilmektedir. Tüm süreç yaklaşık üç buçuk saat sürmekte ve aynı gün içerisinde sonuç alınabilmektedir (8). Testin metodolojisi DNA hedefleri tespit etmek için bir RNA probun kullanıldığı beş sıralı basamak içerir (Şekil 3). Bu yöntemle RNA hedefler tespit edilmek istendiğinde ise DNA proplar kullanılır (8). Teorik olarak 3000 kat amplifikasyon sağlayan HC sistemi (Digene Corporation, ABD), HBV ve CMV viral yüklerinin tespiti, HPV tanısı, *Neisseria gonorrhoeae* ve *Chlamydia trachomatis* varlığının gösterilmesi için kullanılmıştır (1, 11, 14).

HC tekniği amplifikasyon basamakları

Birinci basamak: Hedef DNA'nın hücrelerden serbestleştirilmesi ve nükleik asitlerin denatüre edilmesi işlemlerinin yapıldığı basamaktır. Bu basamakta viral veya bakteriyel hedef DNA'ları hücrelerden serbestleştirmek ve hibridi-

zasyona uygun olan tek zincirli hale getirmek için numuneler bir denatüran ile muamele edilir. Bu amaçla kullanılan alkali bir madde olan sodyum hidroksit solüsyonu ile hem hücreler parçalanır hem de DNA kimyasal olarak denatüre edilir (1, 8). İkinci basamak: Tek zincirli hedef DNA'ların tek zincirli RNA proplar ile hibridize olduğu basamaktır. Numune bir kaba transfer edilir ve çözeltiye hedef DNA sekansı ile komplementer RNA proplar ilave edilerek inkübe edilir ve çift-zincirli RNA:DNA hibridleri oluşur. RNA proplar tam genom (HPV için 8 kb ve HBV için 3,2 kb) veya kısmi genom uzunluğunda (CMV genomunun %17'sini içeren 4 prob) tasarlanabilmektedir (1). Üçüncü basamak: RNA:DNA hibridlerinin yakalanarak katı faz üzerine bağlanması basamağıdır. Bu adımda numuneler RNA:DNA hibridlerine spesifik olarak bağlanan yakalayıcı (capture) poliklonal anti-RNA-DNA hibrid antikorları ile kaplanmış olan ikinci bir kaba (mikrotitre kuyucuklara) transfer edilir. Böylece çoklu RNA:DNA hibridleri mikroplak yüzeyini kaplayan spesifik antikorlar tarafından yakalanır ve katı yüzeye bağlanır (1, 8, 29). Dördüncü basamak: Yakalama işleminden sonra mikrokuyucuklar yıkanır ve ortama yakalanmış DNA-RNA hibridlerine bağlanma özelliğine sahip konjuge enzim (alkalen fosfataz) işaretli monoklonal antikorlar ilave edilir ve karışım inkübe edilir. Alkalin fosfataz enzimi kemilüminesan substrat (Emerald II ve LumiPhos 530 gibi) varlığında sinyal amplifikasyonuna neden olan bir ışık üretir (1, 8). Her işaretli antikora birkaç alkalin fosfataz molekülü konjuge edilmiştir ve her yakalanan hibride birden fazla konjuge antikor bağlanır. Teorik olarak hedef genom başına en az 1000 antikor bağlanır ve her antikora 3 alkalin fosfataz bağlandığında 3000 kat görece sinyal amplifikasyonu üretilir. Beşinci basamak: Amplifiye kemilüminesan sinyalin bir luminometre ile ölçüldüğü son basamaktır (1, 8). Tüm bağlanmamış veya serbest bileşenleri uzaklaştırmak için mikroplak yıkanır. RNA:DNA hibridleri ile işaretli antikorlar kabin yüzeyine bağlı kalırlar. Kuyucuklara alkalin fosfataz ile parçalanabilen kemilüminesan dioksetan substrat ilave edilir. Bu substratın parçalanmasıyla ışık emisyonu oluşur ve bu emisyon bir luminometre ile saptanarak ölçülür.



Şekil 3: HC testinde temel reaksiyon basamakları.

HC tekniği HBV, HPV ve CMV tanıları için ayrıntılarıyla tanımlanmıştır (1, 11, 14). HPV tanısı için geliştirilen ilk ticari test 1995'de Digene tarafından kullanıma sunulan HC1 testidir (11). Sonraki yıllarda, mikrotitre plakları yerine tüplerde çalışılan ve sıvı bazlı servikal numunelerde yüksek riskli (HR) HPV tiplerinin saptanmasına olanak veren FDA onaylı yeni nesil testler (HC2) geliştirilmiştir (8, 11). HPV için tasarlanan HC2 yöntemi HPV L1 gen bölgesini hedefleyen nonradyoaktif bir sinyal amplifikasyon testidir (30). Düşük riskli (LR) beş HPV tipi [6, 11, 42, 43 ve 44] ve 13 adet HR-HPV tipine [16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 ve 68] ait iki prob kokteyli içerir. Bu test FDA tarafından onaylanan (1999 yılında) ilk HPV yardımcı tanı-tarama testidir (11).

HC2 sinyali bir luminometrede göreceli ışık birimlerinde (RLU) okunur. Pozitif kontrol numunesi olarak 1 pg/ml HPV tip 16 içeren bir tüp kullanılırken, test edilecek örnekler bu tüp ile karşılaştırılır. Test örneği RLU/kontrol (RLU / CO) oranları 1'den büyük olan test numuneleri pozitif olarak değerlendirilir (31). Bu kesim noktası 5000 genom eşdeğerdir ve yaygın HSIL prevalansının tespiti için optimum düzeyde duyarlılık ve özgüllük sağlaması nedeniyle tercih edilmiştir (30,31). HC2 saptama tarafından kaçırılması sadece HPV viral yükü çok düşük olduğunda muhtemeldir (31). HC2 klinik çalışmalarda dünya çapında yaygın olarak kullanılan ve sağlam ve tekrarlanabilir olduğu gösterilmiş olan bir tarama testidir (30). Diğer taraftan, HPV tanısında kullanılan HC2'nin bazı sınırlamaları bulunmaktadır. Bu yöntem HR ve LR grupları ayırt edebilirken spesifik HPV genotip identifikasyonuna izin vermez. Tespit sınırı yaklaşık 5000 genom eşit olduğundan PCR'a göre daha az duyarlıdır ve prob kokteylleri arasında çapraz reaktivite görülebilmektedir (30). NextGen (Qiagen) yönteminin çalışma prensibi HC2 testine benzerdir ve test profiline eklenen tip 66 ve 82 ile saptanabilen HR tip sayısı artırılmıştır (11, 32).

Tam kan örneklerinde çalışılan ve kantitatif veriler sunabilen HC CMV DNA (Digene) testinin ilk versiyonunda saptama duyarlılığı 5000 kopya/ml iken, ikinci versiyonunda bu değer 700 kopya/ml olacak şekilde geliştirilmiştir (14). Bu yöntemde hedef DNA'yı içeren örnekler, CMV genomunun yaklaşık olarak %17'sine denk gelen 40.000 bp uzunluğunda spesifik bir CMV RNA probu ile hibridize edilir (1,14). İşlemin hızı (6 saat) ve basit örnek işleme gibi avantajları yanında, kantitatif test için birçok kontrolün gerekli olması gibi dezavantajları da vardır (14). Günümüzde HBV, HCV ve HPV enfeksiyonlarının tanı ve takibinde saptama duyarlılıkları çok daha üstün olan (1-10 kopya/ml) ve aynı zamanda kantitatif sonuç verebilen tip-genotip spesifik moleküler tanı testleri tercih edilmektedir (6, 33, 34).

Invader tekniği

Invader yöntemi çalışma prensibi HC2 sisteminden tamamen farklı olan ve HC2'den daha güçlü amplifikasyon sağlayan (10^6 - 10^7 kat) bir sinyal amplifikasyon tekniğidir (11). Nükleik asitlerin hem saptanmasında hem de kantitasyonunda kullanılan bu yöntem tip spesifik hibridizasyon, hibridize problemlerin cleavase enzimi ile parçalanması ve oluşan floresansın ölçülmesi esasına göre çalışır (1). Third Wave Technologies (ABD) tarafından geliştirilen bu yöntem klinik pratikte faktör V Leiden, faktör II, ApoE saptanması, kistik fibrozis ve Tay-Sachs hastalıklarının tanısı, tek nükleotid değişikliklerinin (*single nucleotide polymorphism*, SNP) analizleri ve HPV, HCV, HBV ve HIV gibi viral etkenler de dahil olmak üzere spesifik nükleik asit kantitasyonu veya genotip tayini için de kullanılmıştır (1, 35-38).

Invader tekniği amplifikasyon basamakları

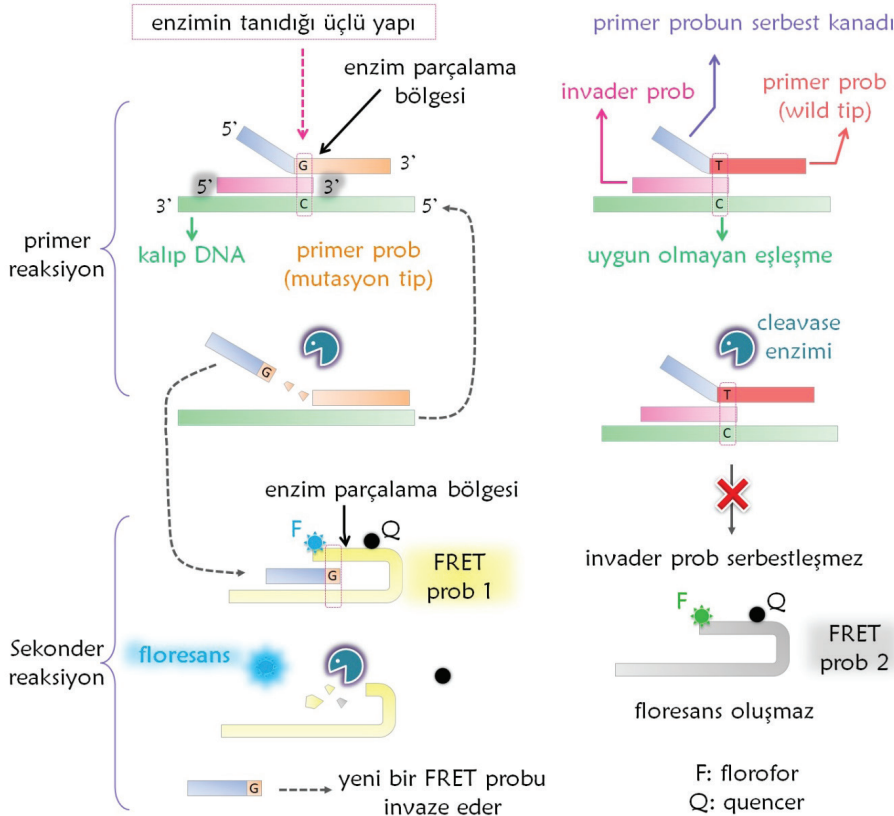
Invader yöntemi tek zincirli hedef DNA'nın iki farklı oligonükleotit ile hibridize edilmesine dayalıdır. Nükleik asitlerden elde edilen sinyal iki ayrı basamakta gerçek-

leşen simultane zincirleme reaksiyonlar ile amplifiye edilir. Birinci oligonükleotit olan primer prob 3' ucunda hedef spesifik bölge (target-specific region, TSR) içerir ve 5' ucunda hedefle hibridize olmayan bir kanat içerir. İkinci oligonükleotit olan invader prob ise primer probun 5' ucuna doğru uzanarak hedefe hibridize olur. Hatta invader probun 3' ucu primer probun 5' ucuyla bir bazlık olmak üzere üst üste çıkarılır. Yani adından da anlaşılacağı üzere invader prob primer prob-hedef hibridini invaze eder. Termofilik arkebakterilerden elde edilen cleavase enzimi invader prob, primer prob ve hedef DNA üçlü parçasını tanıyarak primer probu kanat bölümünün başlangıç noktasından üst üste çıkarılan tekli bazı da içermek üzere koparır. Böylece primer probun 5' ucundaki kanat TSR bölgesinden bir nükleotit de alarak serbest kalır. Serbest kalan bu flep (kanat + tek nükleotit) simultane gelişen sekonder reaksiyonlar için anahtar rol oynar. Bu flepler bir invader prob gibi hareket eder ve saç tokası şeklindeki FRET kasetler (hairpin FRET cassette) ile hibridize olurlar. Yani yeni oluşan bu flepler saç tokası FRET problemleri invaze ederler. Sağlam durumdaki FRET kaset bir floresan boya ve bu floresan boyadan yayılan emisyonu absorbe eden bir non-floresan quencher içerir. Primer reaksiyondaki aynı cleavase enzimi sekonder reaksiyonda oluşan yeni üçlü invader yapıyı da parçalar, böylece floresan boya ve

quencher birbirinden ayrılır ve floresan emisyon artarak ölçülebilir seviyeye gelir. Birinci ve ikinci reaksiyonlardaki parçalanma olayları simultane olarak gerçekleşir ve izotermaldir. Birinci reaksiyondaki parçalanma işleminden sonra primer prob yerinden ayrılır ve ikinci bir primer probun cleavage'ı için yer açılmış olur (Şekil 4). Tahmini olarak primer reaksiyonlarla dakikada 30-50 prob parçalanması olayı gerçekleşir. Bir saat sonunda yaklaşık olarak 10^3 kat amplifikasyon artışı sağlanır. Sekonder reaksiyonlarla ise 10^3 - 10^4 kat ilave amplifikasyon artışı elde edilir. Teorik olarak 10^6 - 10^7 kat sinyal artışı elde edilen bu testin saptama duyarlılığı 1000-10.000 kopya/ml aralığındadır (1).

Invader tekniği ile geliştirilen Invader ASRs (Hologic, ABD) sinyal amplifikasyon yöntemi HPV tanısında kullanılmaktadır. Bu metot L1 gen bölgesi dışında diğer gen bölgelerini de hedeflemektedir. Tip 82 dışındaki diğer 14 HR HPV tipini saptar ve 3 farklı prob kokteyli içerir (11, 39). "Cervista HR-HPV (Hologic)" ve "Cervista HPV-16/18 (Hologic)" testleri invader prensibi ile çalışan ve FDA onaylı ticari testlerdir (39, 40).

Invader yönteminde çeşitli küçük değişiklikler yapılarak RNA saptanması ve kantitasyonu da yapılabilmektedir. DNA hedeflerin saptanmasında kullanılan enzim RNA



Şekil 4: Invader yönteminde allel spesifik prob dizaynı ve farklı floresan boyaların kullanılması ile tek nükleotit farklılıklarının belirlenmesi.

üçlü yapılarını tanıyamadığı için RNA hedefleri araştıran uygulamalarda öbakteriyumlardan elde edilen farklı bir cleavase enzimi kullanılır. RNA hedefler için primer ve invader proplar dizayn edilirken mRNA'daki splice bağlantı bölgeleri göz önüne alınmalıdır, çünkü intron sekanslar içeren DNA'lara göre dizayn edilen oligolar cleavase enzimi tarafından tanınmayacaktır (1).

Tiramid sinyal amplifikasyon teknolojisi

TSA tekniği spesifik nükleik asitlerin veya proteinlerin saptanması ve lokalizasyonlarının belirlenmesine yönelik uygulamaları içerir. CARD (*catalyzed reporter deposition*) olarak da adlandırılır. Tiramid ile işaretli veya işaretli tiramidin bağlanabileceği özel bir parçası olan modifiye nükleik asit problemlerinden biri kullanılabilir. Bu problemler DNA veya RNA hedeflerle hibridize olmaya uygundurlar (genellikle *in situ* hibridizasyon gerçekleşir). Bu yöntem ortama *horseradish* peroksidaz ve hidrojen peroksit eklenince aktive olan tiramid (quinone benzeri yapı) formlarının komşu fenol grupları ile (esasen komşu proteinlerin tirozin rezidüleri ile) kovalen bağlar oluşturması esası üzerine çalışır. Sinyal oluşumu direkt veya tiramid ile konjuge edilmiş moleküller (biotin, trinitrofenol gibi haptenler veya florokromlar) aracılığı ile indirekt olarak elde edilebilir. Sinyal dar bir alanda sınırlandırıldığı için yoğunlaşır ve sensitivitesi *in situ* hibridizasyon tekniklerindeki geleneksel biyotin-avidin komplekslerine göre 500-1000 kat daha artırılmış olur (1). Yöntem HPV, HIV, 16S ribozomal RNA ve antimikrobiyal direnç genlerinin saptanması amacıyla kullanılmıştır (1).

TSA tekniği amplifikasyon basamakları

Horseradish peroksidaz modifiye streptavidin (HPMS) ile bağlı biyotin işaretli problemler kullanılarak lokalize sinyal üreten kompleksin büyüklüğü artırılabilir. Biotin modifiye tiramid moleküllerinin hedef üstünde birikimi ile oluşan ilk kompleks HPMS tarafından tanınan lokalize bir depozit vazifesini görür ve ilk kompleks üzerinde biriken HPMS'ler ayrı bir katman oluşturur. Son olarak ortama 3,3'

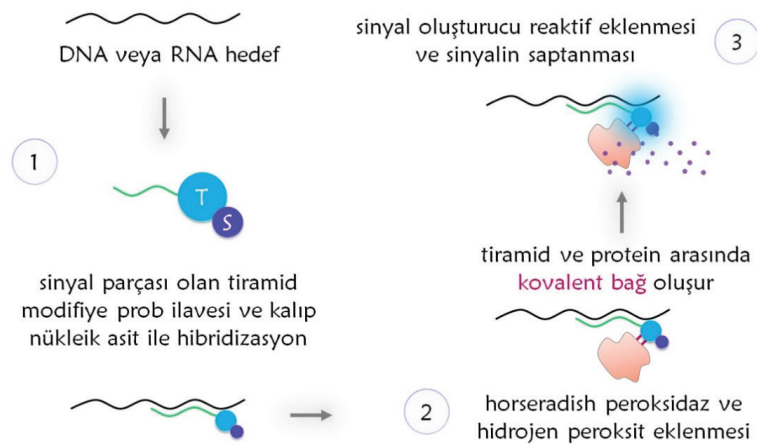
diaminobenzidin gibi bir substrat ilave edilince çözünmeyen kahverengi bir çökelti oluşur (Şekil 5). TSA yöntemi ile virüs veya diğer mikroorganizmaların hücre ve doku preparatlarındaki tek kopyalarının bile tespiti mümkün olabilir (1).

HPV DNA varlığını saptamak için tiramid temelli *in-situ* hibridizasyonun sinyal amplifikasyonuna dayalı bir yöntem geliştirilmiştir. Ancak saptama eşiği düşük olduğundan bu yöntem tutarlı sonuçlar elde etmede yetersiz kalmıştır. Sonuç olarak, sitolojistlerin ilgi duymasına rağmen, bu yöntem büyük ölçekli HPV tarama testleri için kabul görmemiştir (30). Literatürde HSV (*herpes simplex virus*), HHV-8 (human herpes virus-8; Kaposi sarkomu ilişkili herpesvirus) ve HIV enfeksiyonlarının tanısı için TSA yönteminin kullanıldığına dair veriler bulunmakla beraber, standardize edilmiş ticari formatta testleri bulunmamaktadır (41-43). RSV (*respiratory syncytial virus*) saptanması için tanımlanan bir immünojenetik sinyal amplifikasyonu testinde altın nanopartiküllerinin ve tiramid moleküllerinin kullanıldığı immüno-biyosensörler ile klasik ELISA testlerine göre önemli ölçüde duyarlılık artışı elde edildiği bildirilmiştir (44).

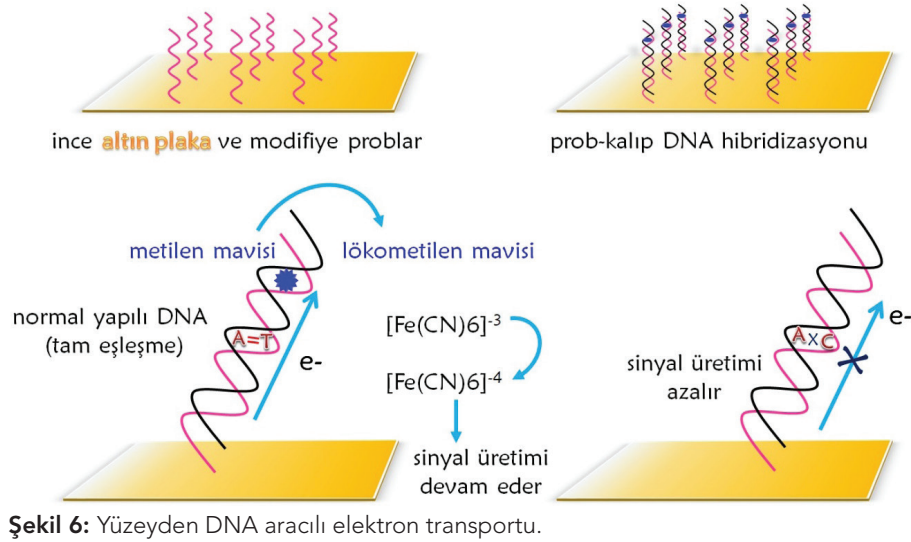
Diğer sinyal amplifikasyon teknikleri

Yukarıda açıklanan sinyal amplifikasyon tekniklerinin yanı sıra, bazen "doğrudan saptama teknikleri" olarak da adlandırılan ve nükleik asitleri saptamak için sinyal amplifikasyon tekniklerinde olduğu gibi sinyal birikimine dayalı olarak çalışan başka teknikler de vardır. Sinyal amplifikasyon tekniklerinin aksine, doğrudan saptama teknolojileri problemlerin hibridizasyonundan direkt sinyal üretir. Bu tekniklerde alkalin fosfat gibi enzimler kullanılarak sinyal birikiminin geliştirilmesi veya diğer sinyal artırıcı mekanizmalar kullanılmaz (1).

Doğrudan saptama tekniklerden biri ince bir altın plaka üzerine sabitlenen DNA dubleksleri arasından elektron transportu ve transportun elektrokimyasal olarak görüntülenmesi prensibine dayanmaktadır (1, 45, 46). Bu



Şekil 5: Tiramid sinyal amplifikasyonu.



Şekil 6: Yüzeysel DNA aracılı elektron transportu.

teknik yanlış eşleşmiş hibridleri Watson-Crick eşleşmeli hibridlerden mükemmel bir şekilde ayırmaktadır. 5' uçlarında tiyol ile sonlandırılmış alkil zincirleri türetilen modifiye DNA problemlerinin hedef DNA ile çözelti içerisinde hibridize olmasına izin verilir (1). İlk olarak hedef DNA ile komplementer sekanslara sahip tek zincirli modifiye DNA problemler sentezlenir ve altın plaka üzerine sabitlenir. Bu problemlerin uç kısımlarına oksido-redüksiyona ve ölçülebilir elektron akımına neden olan redox parçalar (metilen mavisi veya daunomisin) eklenir. Modifiye problemlerin solüsyonda bulunan hedef DNA molekülleri ile hibridizasyonu sonucunda çift-zincirli DNA formları oluşur (1, 45-47). Bu hibridler altın yüzey üzerinde tek tabakalı bir yapı halinde birikirler. Düzenli bir yapı oluşturan tek tabakalarda dubleksler yüzeye yaklaşık olarak 70° yönelmiştir (1). Metilen mavisi veya daunomisin DNA'ya çok güçlü olarak bağlanırlar ve normal yapılı DNA'dan geçen elektron akımına bağlı olarak indirgenirler (45). Örneğin, DNA dubleksleri arasından akan elektronlar interkale durumdaki metilen mavisini lökometilen mavisine indirger, bu durum solüsyondaki [Fe(CN)6]³⁻'ü (ferri-siyanür) [Fe(CN)6]⁴⁻'e indirger (1, 46). Ortamda ferri-siyanür var olduğu sürece bu elektrokatalitik döngü içinde elektron akışı devam eder. Prob ve hedef nükleik asit arasında bir baz uyumsuzluğu varsa ya da DNA hasarlı ise elektron akışı azalır. Otokatalitik döngünün uzun süre devam ettirilmesi sinyal artışı ile sonuçlanır (Şekil 6). Böylece tam eşleşen ve yanlış eşleşen DNA problemleri arasında daha fazla farklılaşma oluşur (1).

Bir başka umut verici teknoloji hedef nükleik asitlerin altın nanopartiküller ile modifiye edilmiş hedef spesifik oligonükleotitler ile hibridizasyonu ve sonrasında oluşan ışık saçılma rezonansının saptanması prensibine dayanır (1). Birkaç farklı prob-modifiye nanopartikülün hedef DNA'nın birbirine yakın bölgelerine bağlanması veya

çoklu hedeflere bağlanan nanopartiküllerin kompleks formlar oluşturması sayesinde nanopartiküller birbirlerine yakınlaşırlar ve saçılan ışığın renginde bir kayma ortaya çıkar (1). Altın nanopartiküllerinin kullanıldığı sinyal amplifikasyon yöntemlerin örnekleri HBV ve influenza gibi viral enfeksiyonlar için tanımlanmıştır (9, 48). Ayrıca, hairpin DNA biyosensörleri ve sinyal amplifikasyon tekniklerinin kombinasyonunun içeren yaklaşımların HCV, HIV ve HTLV-1 (*human T-lymphotropic virus-1*) gibi viral enfeksiyonların tanısında kullanılabilirliği ile ilgili çalışmalar da yapılmıştır (49, 50).

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- F.Ş., R.G.; Yazı Taslağı- F.Ş., R.G.; Son Onay ve Sorumluluk- F.Ş., R.G.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study- F.Ş., R.G.; Drafting Manuscript- F.Ş., R.G.; Final Approval and Accountability- F.Ş., R.G.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

KAYNAKLAR

1. Handricks DA, Comanor L. Signal Amplification-Based Techniques. In: Lorincz A, editor. Nucleic Acid Testing for Human Disease. New York: CRC/Taylor & Francis; 2006:19-64. [CrossRef]
2. Gullett JC, Nolte FS. Quantitative Nucleic Acid Amplification Methods for Viral Infections. Clin Chem 2015;61(1):72-8. [CrossRef]

3. Şahiner F, Gümrall R, Yıldızoğlu Ü, Babayigit MA, Durmaz A, Yiğit N, et al. Coexistence of Epstein-Barr virus and Parvovirus B19 in tonsillar tissue samples: Quantitative measurement by real-time PCR. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2014;78(8):1288-93. [CrossRef]
4. Nolte F, Wittwer C. Nucleic Acid Amplification Methods Overview. In: Persing D, Tenover F, Hayden R, Ieven M, Miller M, Nolte F, et al, editors. *Molecular Microbiology*. Washington, USA: ASM Press; 2016:3-18.
5. Niesters HGM, van Leeuwen WB. Quantitative Isothermal Molecular Amplification Techniques (Chapter 7). In: van Pelt-Verkuil E, van Leeuwen WB, Witt R, editors. *Molecular Diagnostics*. Singapore: Springer; 2019:321-37. [CrossRef]
6. Şahiner F, Şener K, Gümrall R, Yapar M, Dede M, Yiğit N, et al. Üç farklı real-time PCR testinin karşılaştırmalı sonuçları: MY09/11 primerleri çoklu enfeksiyonları kaçırıyor. *Gulhane Med J* 2014;56(2):65-70. [CrossRef]
7. Yan L, Zhou J, Zheng Y, Gamson AS, Roembke BT, Nakayama S, et al. Isothermal amplified detection of DNA and RNA. *Mol Biosyst* 2014;10(5):970-1003. [CrossRef]
8. Wang YF. Signal Amplification Techniques: bDNA, Hybrid Capture. In: Tang YW, Stratton CW, editors. *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. USA: Springer; 2006:228-42. [CrossRef]
9. Jin F, Li H, Xu D. Enzyme-free fluorescence microarray for determination of hepatitis B virus DNA based on silver nanoparticle aggregates-assisted signal amplification. *Anal Chim Acta* 2019;1077:297-304. [CrossRef]
10. Emmadi R, Boonyaratanakornkit JB, Selvarangan R, Shyamala V, Zimmer BL, Williams L, et al. Molecular methods and platforms for infectious diseases testing a review of FDA-approved and cleared assays. *J Mol Diagn* 2011;13(6):583-604. [CrossRef]
11. Şahiner F. Genital İnsan Papillomavirus Enfeksiyonlarının Moleküler Tanısında Karşılaşılan Sorunlar ve Yeni Gelişmeler. *Mikrobiyol Bul* 2014;48(4):689-706. [CrossRef]
12. van der Sluis RM, van Montfort T, Centlivre M, Schopman NC, Cornelissen M, Sanders RW, et al. Quantitation of HIV-1 DNA with a sensitive TaqMan assay that has broad subtype specificity. *J Virol Methods* 2013;187(1):94-102. [CrossRef]
13. Gokahmetoglu S, Deniz E, Ozbay I, Atalay AM. Comparison of branched DNA and real-time polymerase chain reaction methods in quantitation of hepatitis B virus DNA. *Saudi Med J* 2007;28(11):1750-1.
14. Boeckh M, Boivin G. Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. *Clin Microbiol Rev* 1998;11(3):533-54. [CrossRef]
15. Collins ML, Irvine B, Tyner D, et al. A branched DNA signal amplification assay for quantification of nucleic acid targets below 100 molecules/ml. *Nucleic Acids Res* 1997;25(15):2979-84. [CrossRef]
16. Bushnell S, Budde J, Catino T, et al. ProbeDesigner: for the design of probesets for branched DNA (bDNA) signal amplification assays. *Bioinformatics* 1999;15(5):348-55. [CrossRef]
17. Sarrazin C, Gärtner BC, Sizmann D, Babiell R, Mihm U, Hofmann WP, et al. Comparison of conventional PCR with real-time PCR and branched DNA-based assays for hepatitis C virus RNA quantification and clinical significance for genotypes 1 to 5. *J Clin Microbiol* 2006;44(3):729-37. [CrossRef]
18. Pellegrin I, Garrigue I, Binquet C, Chene G, Neau D, Bonot P, et al. Evaluation of new quantitative assays for diagnosis and monitoring of cytomegalovirus disease in human immunodeficiency virus-positive patients. *J Clin Microbiol* 1999;37(10):3124-32.
19. Cha W, Ma Y, Saif YM, Lee CW. Development of microsphere-based multiplex branched DNA assay for detection and differentiation of avian influenza virus strains. *J Clin Microbiol* 2010;48(7):2575-7. [CrossRef]
20. Davies J, Maqsoodi B, Yang W, Ma Y, Luo Y, McMaster G. P25-S Gene Expression Profiling from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues Using the QuantiGene Branched DNA Assay. *J Biomol Tech* 2007;18(1):9.
21. Zhang A, Pastor L, Nguyen Q, Luo Y, Yang W, Flagella M, et al. Small interfering RNA and gene expression analysis using a multiplex branched DNA assay without RNA purification. *J Biomol Screen*; 2005;10:549-56. [CrossRef]
22. Harvey JJ, Lee SP, Chan EK, et al. Characterization and applications of CataCleave probe in real-time detection assays. *Anal Biochem* 2004;333(2):246-55. [CrossRef]
23. Ihira M, Yamaki A, Kato Y, Higashimoto Y, Kawamura Y, Yoshikawa T. Cycling probe-based real-time PCR for the detection of Human herpesvirus 6A and B. *J Med Virol* 2016;88(9):1628-35. [CrossRef]
24. Ihira M, Higashimoto Y, Kawamura Y, Sugata K, Ohashi M, Asano Y, et al. Cycling probe technology to quantify and discriminate between wild-type varicella-zoster virus and Oka vaccine strains. *J Virol Methods* 2013;193(2):308-13. [CrossRef]
25. Uchida Y, Kouyama J, Naiki K, Sugawara K, Ando S, Nakao M, et al. Significance of variants associated with resistance to NS5A inhibitors in Japanese patients with genotype 1b hepatitis C virus infection as evaluated using cycling-probe real-time PCR combined with direct sequencing. *J Gastroenterol* 2016;51(3):260-70. [CrossRef]
26. Suzuki Y, Saito R, Zaraket H, Dapat C, Caperig-Dapat I, Suzuki H. Rapid and specific detection of amantadine-resistant influenza A viruses with a Ser31Asn mutation by the cycling probe method. *J Clin Microbiol* 2010;48(1):57-63. [CrossRef]
27. Suzuki Y, Saito R, Sato I, Zaraket H, Nishikawa M, Tamura T, et al. Identification of oseltamivir resistance among pandemic and seasonal influenza A (H1N1) viruses by an His275Tyr genotyping assay using the cycling probe method. *J Clin Microbiol* 2011;49(1):125-30. [CrossRef]
28. Us, D. New, newer, newest human polyomaviruses: how far?. *Mikrobiol Bul* 2013;47(2):362-81. [CrossRef]
29. HC2 High-Risk HPV DNA Test. Digene Catalog Number 5101-1296. Digene Corporation Gaithersburg, MD USA, 2002.
30. Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol* 2005;32(Suppl 1):S43-51. [CrossRef]
31. Gravitt PE, Viscidi RP. Measurement of Exposure to Human Papillomaviruses (Chapter 5). In: Rohan TE, Shah KV, editors. *Cervical Cancer: From Etiology to Prevention (Cancer Prevention-Cancer Causes)*. Boston: Kluwer Academic Publishers; 2004:119-41. [CrossRef]
32. Eder PS, Lou J, Huff J, Macioszek J. The next-generation Hybrid Capture High-Risk HPV DNA assay on a fully automated platform. *J Clin Virol* 2009;45(Suppl 1):S85-92. [CrossRef]

33. Maasoumy B, Vermehren J. Diagnostics in hepatitis C: The end of response-guided therapy? *J Hepatol* 2016;65(1 Suppl):S67-S81. [[CrossRef](#)]
34. Allice T, Cerutti F, Pittaluga F, Varetto S, Gabella S, Marzano A, et al. Comparison of the Cobas Ampliprep/Cobas TaqMan HBV Test versus the Cobas AmpliCor HBV monitor for HBV-DNA detection and quantification during antiviral therapy. *New Microbiol* 2008;31(1):27-35.
35. Tadokoro K, Yamaguchi T, Egashira T, Hara T. Quantitation of viral load by real-time PCR-monitoring Invader reaction. *J Virol Methods* 2009;155(2):182-6. [[CrossRef](#)]
36. Germer JJ, Majewski DW, Yung B, Mitchell PS, Yao JD. Evaluation of the invader assay for genotyping hepatitis C virus. *J Clin Microbiol* 2006;44(2):318-23. [[CrossRef](#)]
37. Wong DK, Yuen MF, Yuan H, Sum SS, Hui CK, Hall J, et al. Quantitation of covalently closed circular hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis B patients. *Hepatology* 2004;40(3):727-37. [[CrossRef](#)]
38. Constantine NT, Kabat W, Zhao RY. Update on the laboratory diagnosis and monitoring of HIV infection. *Cell Res* 2005;15(11-12):870-6. [[CrossRef](#)]
39. Stillman MJ, Day SP, Schutzbank TE. A comparative review of laboratory-developed tests utilizing Invader HPV analyte-specific reagents for the detection of high-risk human papillomavirus. *J Clin Virol* 2009;45(Suppl 1):S73-7. [[CrossRef](#)]
40. Poljak M, Kocjan BJ. Commercially available assays for multiplex detection of alpha human papillomaviruses. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010;8(10):1139-62. [[CrossRef](#)]
41. Garrigues HJ, Rubinchikova YE, Rose TM. KSHV cell attachment sites revealed by ultra sensitive tyramide signal amplification (TSA) localize to membrane microdomains that are up-regulated on mitotic cells. *Virology* 2014;452-453:75-85. [[CrossRef](#)]
42. Kotronias D, Kapranos N. Herpes simplex virus as a determinant risk factor for coronary artery atherosclerosis and myocardial infarction. *In Vivo* 2005;19(2):351-7.
43. Strappe PM, Wang TH, McKenzie CA, Lowrie S, Simmonds P, Bell JE. Enhancement of immunohistochemical detection of HIV-1 p24 antigen in brain by tyramide signal amplification. *J Virol Methods* 1997;67(1):103-12. [[CrossRef](#)]
44. Zhan L, Yang T, Li CM, Wu WB, Huang CZ. Sensitive immunosensor for respiratory syncytial virus based on dual signal amplification of gold nanoparticle layer-modified plates and catalyzed reporter deposition. *Sens Actuators B Chem* 2018;255(2):1291-7. [[CrossRef](#)]
45. Treadway CR, Michael GH, Jacqueline KB. Charge transport through a molecular π -stack: double helical DNA. *Chemical Physics* 2002;281(2-3):409-28. [[CrossRef](#)]
46. Gorodetsky AA, Buzzeo MC, Barton JK. DNA-mediated electrochemistry. *Bioconjug Chem* 2008;19(12):2285-96. [[CrossRef](#)]
47. Genereux JC, Barton JK. Mechanisms for DNA charge transport. *Chem Rev* 2010;110(3):1642-62. [[CrossRef](#)]
48. Karash S, Wang R, Kelso L, Lu H, Huang TJ, Li Y. Rapid detection of avian influenza virus H5N1 in chicken tracheal samples using an impedance aptasensor with gold nanoparticles for signal amplification. *J Virol Methods* 2016;236:147-56. [[CrossRef](#)]
49. Abolhasan R, Mehdizadeh A, Rashidi MR, Aghebati-Maleki L, Yousefi M. Application of hairpin DNA-based biosensors with various signal amplification strategies in clinical diagnosis. *Biosens Bioelectron* 2019;129:164-74. [[CrossRef](#)]
50. Lu M, Xu L, Zhang X, Xiao R, Wang Y. Ag(I)-coordinated hairpin DNA for homogenous electronic monitoring of hepatitis C virus accompanying isothermal cycling signal amplification strategy. *Biosens Bioelectron* 2015;73:195-201. [[CrossRef](#)]

TEK TARAFLI İZOLE KONJENİTAL ALT LATERAL KIKIRDAK TOTAL YOKLUĞU OLGUSU

CONGENITAL UNILATERAL ISOLATED TOTAL ABSENCE OF LEFT LOWER LATERAL CARTILAGE

Melihcan SEZGİÇ¹ , Perçin KARAKOL¹ 

¹Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Bağcılar Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ORCID IDs of the authors: M.S. 0000-0002-8213-8526; P.K. 0000-0003-0068-2139

Cite this article as: Sezgic M, Karakol P. Congenital unilateral isolated total absence of left lower lateral cartilage. J Ist Faculty Med 2020;83(3):302-6. doi: 10.26650/IUITFD.2019.0071

ÖZET

Burun kıkırdaklarının izole konjenital anomalileri oldukça ender görülen bir durumdur ve etiyojisi hala tam olarak anlaşılamamıştır. Alt lateral kıkırdağın konjenital defektlerinin genelde fonksiyonel sorunlar veya major kozmetik sorunlar ile birlikte görüldüğü belirtilse de, bazen asemptomatik ve rastlantısal olarak da karşımıza çıkabilmektedir. Birbirlerine olan üstünlükleri kesin olarak bilinmemekle birlikte, defektin otojen kıkırdak greftleri ya da allojenik greftler ile rekonstrüksiyonu için bir çok yöntem daha önce belirtilmiştir. Rinoplasti operasyonunda, düzgün intraoperatif planlama ile bu tip olgularda da tatminkar sonuçlara ulaşılabilmektedir. Bu makalede; kozmetik talepleri ile rinoplasti amacıyla kliniğimize başvuran, fonksiyonel herhangi bir şikayeti olmayan, tek taraflı izole konjenital alt lateral kıkırdak total yokluğu olgusunu ve otojen kıkırdak greft ile rekonstrüksiyonunu sunmayı amaçladık.

Anahtar Kelimeler: Alt lateral kıkırdak, Konjenital, Rinoplasti

ABSTRACT

Congenital isolated anomalies of nasal cartilages are very rare and the etiology is still not fully understood. Although congenital defects of the lower lateral cartilage are usually associated with functional or major cosmetic problems, they may also occasionally be presented as asymptomatic and incidental. Although their superiority to each other is not well known, several methods have previously been described for reconstruction of the defect with autologous cartilage grafts or allogenic grafts. With proper intraoperative planning, satisfactory results can be achieved in rhinoplasty operation in such cases. In this article we aimed to present a case of congenital unilateral isolated total lower lateral cartilage absence in a patient without any functional complaints and the reconstruction of it with autogenous cartilage graft.

Keywords: Congenital, Lower lateral cartilage, Rhinoplasty

GİRİŞ

Preoperatif planlama, rinoplastinin bekli de en önemli basamağı olup, daha önceden geçirilmiş travma hikayesi, rinoplasti öyküsü veya burunda var olan doğumsal herhangi bir anomali, ameliyat başarısını etkileyen birçok faktörden biridir. Burunun konjenital anomalileri oldukça nadir olmakla birlikte 20.000 ila 40.000 canlı doğumda bir görülmektedir (1). Embriyolojik süreçte insan burnunun çok fazla gelişimsel aşamadan geçmesi, bu konjenital anoma-

lilerin farklı tiplerde karşımıza çıkmasına neden olmaktadır (2). Komplet nazal kemik yokluğu, komplet septal kıkırdak yokluğu gibi major anomaliler hayatın erken dönemlerinde görsel olarak kolayca fark edilip nazal valv açısının daralmasına bağlı fonksiyonel sorunlarla daha öncelikli olarak karşımıza çıkarken, mikroftalmi, tek taraflı yüz atrofisi gibi başka doğumsal anomalilere de eşlik edebilmektedir. Cilt defekti olmayan tek taraflı izole kıkırdak yokluğu gibi minör anomaliler ise, bazen hiçbir bulgu vermeden tesadüfi olarak kozmetik cerrahi sırasında tanı almaktadırlar.

İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: mlh_s@yahoo.com

Başvuru/Submitted: 29.08.2019 • **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 24.10.2019 •

Son Revizyon/Last Revision Received: 31.10.2019 • **Kabul/Accepted:** 16.12.2019 • **Online Yayın/Published Online:** 27.02.2020

©Telif Hakkı 2020 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2020 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

Bu çalışmada amacımız, sadece estetik amaçla rinoplasti operasyonu için başvuran bir hastada asemptomatik olarak karşımıza çıkan izole sol alt lateral kıkırdak aplazisi olgu sunumu olup, süreç yönetimi ile ilgili fikir vermektir.

OLGU SUNUMU

50 yaşında, bilinen sistemik bir hastalığı olmayan, kadın hasta belirgin dorsal nazal hump şikayeti ve burun estetiği talebiyle kliniğe başvurdu (Resim 1). Hastanın özgeçmişinde daha önceden geçirilmiş bir nazal cerrahi yada travma öyküsü mevcut değildi, ailesinde anomali öyküsü yoktu. Hastanın nefes almada güçlük ve burun tıkanıklığı gibi herhangi bir fonksiyonel şikayeti yoktu. Hastanın yapılan fizik muayenesinde dorsal nazal hump, burun ucunda hafif sola deviasyon, nazal septumda hafif sağ deviasyon, nostrillerde asimetri görüldü. Hastada herhangi bir

valf yetmezliği bulgusu görülmedi, cottle işareti negatifti. Hastanın maksiler ve mandibular kemik yapısı normal görünümdeydi.

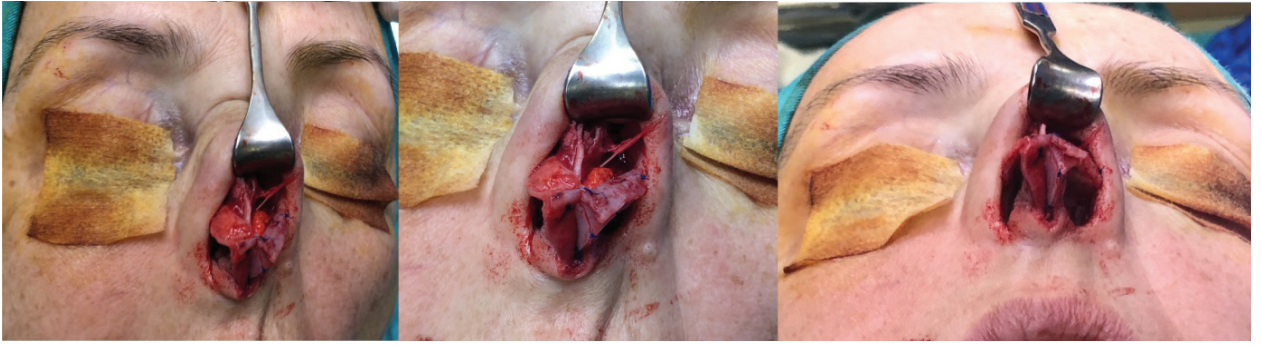
Hastanın onamı alındıktan sonra, mevcut bulgularıyla dorsal nazal hump reduksiyonu ve tip cerrahisi yapılması hedeflenerek açık rinoplasti operasyonu planlandı. Yapılan Goodman insizyonunu takiben, rinoplasti flebi kaldırıldığında sol alt lateral kıkırdığın total olarak (medial ve lateral crus) mevcut olmadığı görüldü (Resim 2). Septoplasti diseksiyonları eklenerek, septal mukoza eleve edilip septumdan alt lateral kıkırdak rekonstrüksiyonu için yeterli miktarda kıkırdak greft alındı. Septumun düz kısmı alt lateral kıkırdığın kolumellar segmenti için, eğri kısmı ise orta ve lateral krus rekonstrüksiyonu için kullanıldı. Kıkırdaklar simetriyi sağlayacak şekilde birbirine sütüre edildi (Resim 3). Hastaya ilave olarak başka bir greft kul-



Resim 1: Hastanın preoperatif fotoğrafları.



Resim 2: Sol alt lateral kıkırdak yokluğunun intraoperatif görünümü.



Resim 3: Kıkırdak greftler kullanılarak yapılan rekonstrüksiyon sonrası görünüm.



Resim 4: Hastanın postoperatif 5. ay fotoğrafları.

lanılmadı. Hump redüksiyonu, nazal osteotomiler ve rutin rinoplasti prosedürlerini takiben, nihai fonksiyonel ve estetik sonuç sağlandıktan sonra operasyona son verildi. Hastanın postoperatif dönemde ek bir şikayeti olmaması üzerine ertesi gün taburcu edildi. Hastanın yapılan 1. ay, 3. ay ve 5. ay kontrollerinde hafif bir nostril asimetrisi dışında başka bir deformite ile karşılaşmadı ve hastanın operasyon sonucundan memnun olduğu gözlemlendi (Resim 4).

TARTIŞMA

Burunun konjenital anomalileri, arhinia gibi total agenezilerden, burnun izole bir kısmının aplazisine kadar değişen spektrumda karşımıza çıkabilirler. Losee ve ark. (1) yaptığı çalışmada burnun konjenital anomalilerini 4 ana başlığa ayırmış ve "hipoplazi ve atrofi" den oluşan 1. tip'i, en sık görülen tip (%62) olarak belirtmiştir. Hipoplazik anomalilerinin, orofasiyal yarıklar ile birlikte olmadan görülmesi oldukça nadirdir (3). Hatta burnun izole hipoplazik anomalilerinin aslında bir orofasiyal yarıklık taşıyıcılığı durumu olabileceği belirtilmiştir (4). Bilen ve ark. ise konjenital

olar kıkırdak defekti olgularının neredeyse tamamının tek taraflı ve ilave bir cilt defekti ile beraber görüldüğünü belirtmişlerdir (5).

Daha önce literatürde alt lateral kıkırdağın parsiyel yokluğu ile ilgili yayınların (6, 7) mevcut olmasının yanı sıra, alt lateral kıkırdağın total aplazisi ile ilgili az sayıda yayın da mevcuttur (8-11). Fakat, bildirilen bu vakaların tamamında hasta, valf yetmezliği ve fonksiyonel şikayetler nedeniyle başvuru yapmıştır. İzole tek taraflı alt lateral kıkırdağ aplazisinin, nazal pasaj engeli olmadan izole halde görüldüğü herhangi bir yayın, literatürde mevcut değildir. Diğer çalışmalardan farklı olarak, kliniğimize gelen bu hasta, burunda tıkanıklık ve nefes alamama şikayeti olmadan, tamamen estetik amaçlı operasyon istemi ile tarafımıza başvurmuştur.

Alt lateral kıkırdağın embriyolojik olarak karmaşık gelişimsel aşamalarından dolayı, burnun aplazik ve hipoplazik anomalilerinin çoğunun mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır (12). Lateral nazal çıkıntılar, üst lateral kıkırdakların ve alt lateral kıkırdakların lateral krusunun gelişimini

sağlarken, alt lateral kıkırdakların medial krusları ve septumun kaudal 1/2'si medial nazal çıkıntından köken almaktadır (1). Bu bilgilerin ışığında, lateral ve medial çıkıntılarının gestasyonel 10. haftadaki füzyonundan önce veya sonra hücrel penetrasyonu ve kıkırdak oluşumunu etkileyecek herhangi bir durumun (teratojenler, vasküler olaylar, lokal bası ...vb.) bu tablonun oluşumuna neden olabileceği düşünülmektedir (8).

Patogenezi tam olarak anlaşılmadığı ve çok ender gözüktüğü için izole alt lateral kıkırdak aplazisi veya hipoplazisi olgularında net bir tedavi yaklaşımı bulunmamaktadır. Daha önce septum cerrahisi geçirmemiş olgularda, literatüre göre parsiyel veya total aplazi fark etmeksizin, rekonstrüksiyon için sıklıkla septal kıkırdak yeterli olmaktadır (7, 9, 11, 13). Yeterli kıkırdak dokusu olmayan veya daha fazla kıkırdak grefti gerektiren olgularda auriküler kıkırdak grefti ile de rekonstrüksiyon planlanabilmektedir (6, 10, 14). Buna ek olarak kostal kıkırdak veya allojenik materyaller de bir rekonstrüksiyon yöntemi olarak düşünülebilir. Bu olguda rekonstrüksiyon için septal kıkırdak grefti kullanıldı. Septumdan, yeterli miktarda septal kıkırdak grefti alındıktan sonra kıkırdak greftinin tabana komşu ve sağa deviyeye olan kısmı; mevcut olan eğiminden dolayı orta krus ve lateral krus geçişinin kurvatürünü daha iyi sağlayacağı düşünülerek bu bölgenin rekonstrüksiyonu için kullanıldı. Alt lateral kıkırdağın kolumellar segmentinin rekonstrüksiyonu için ise septumun düz kısmı kullanılıp bu segmentler birbirine sütüre edildi. Daha önceki yayınlarda bunu destekleyecek bir bulgu olmasa da, hafif-orta septal deviasyonu olan hastaların, septumdan alınan deviyeye olan kıkırdak greftlerinin alar bölge rekonstrüksiyonu için kullanışlı olduğunu söyleyebiliriz.

Sonuç olarak burnun konjenital kıkırdak anomalileri oldukça nadir görülen bir durum olmakla birlikte, burun içindeki bir kıkırdak yapının izole olarak yokluğu daha da nadir görülen bir durumdur. Literatürde sınırlı sayıda belirtilen konjenital alt lateral kıkırdak aplazili olgular, genellikle nazal valf yetmezliği gibi fonksiyonel sorunlar veya major kozmetik sorunlar ile hekime başvurabiliyor iken, bu olguda olduğu gibi asemptomatik olarak kalıp, rinoplasti operasyonunda tesadüfi olarak da karşımıza çıkabilmektedir. Rinoplasti tüm aşamalarında cerrahi ekip için zorlayıcı ama uygun planlama ile başarılı sonuçlara ulaşılabilir bir ameliyattır. Alt lateral kıkırdak defektleri tedavisinde izlenecek yol konusunda kesin bir fikir birliği mevcut değildir fakat, otolog kıkırdak greftleri kullanılarak tatminkar fonksiyonel ve estetik sonuçlar elde edilebileceğini düşünmekteyiz.

Bilgilendirilmiş Onam: Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- M.S.; Veri Toplama- M.S.; Veri Analizi/Yorumlama- P.K.; Yazı Taslağı- M.S.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi-P.K.; Son Onay ve Sorumluluk- M.S., P.K.; Malzeme ve Teknik Destek- P.K.; Süpervizyon- M.S.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

Informed Consent: Written consent was obtained from the participants.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study- M.S.; Data Acquisition- M.S.; Data Analysis/Interpretation-P.K.; Drafting Manuscript- M.S.; Critical Revision of Manuscript-P.K.; Final Approval and Accountability- M.S., P.K.; Technical or Material Support-P.K.; Supervision- M.S.

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: Authors declared no financial support.

KAYNAKLAR

1. Losee JE, Kirschner RE, Whitaker LA, Bartlett SP. Congenital nasal anomalies: a classification scheme. *Plast Reconstr Surg* 2004;113(2):676-89. [CrossRef]
2. Nagasao T, Nakajima T, Hikosaka M, Kasai S, Miyamoto J. A rare case of congenital unilateral hypoplasia of the nose. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2009;62(9):e305-8. [CrossRef]
3. Funamura JL, Tollefson TT. Congenital Anomalies of the Nose. *Facial Plast Surg* 2016;32(2):133-41. [CrossRef]
4. Tollefson TT, Humphrey CD, Larrabee WF Jr, Adelson RT, Karimi K, Kriet JD. The spectrum of isolated congenital nasal deformities resembling the cleft lip nasal morphology. *Arch Facial Plast Surg* 2011;13(3):152-60. [CrossRef]
5. Bilen B, Kilinc H. A congenital isolated alar cleft. *J Craniofac Surg* 2006;17:602-4. [CrossRef]
6. Barutca SA, Öreroğlu AR, Uşçetin I, Kutlu N. Isolated congenital partial absence of the left lower lateral nasal cartilage: case report. *Ann Plast Surg* 2011;67(6):662-4. [CrossRef]
7. Taş S. Isolated Congenital Partial Absence of the Lateral Crural Cartilage. *J Craniofac Surg* 2015;26(7):2231-2. [CrossRef]
8. Adelson RT, Karimi K, Herrero N. Isolated congenital absence of the left lower lateral cartilage. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2008;138(6):793-4. [CrossRef]
9. Temiz G, Yeşiloğlu N, Sarici M, Filinte GT. Congenital isolated aplasia of lower lateral cartilage and reconstruction using dorsal hump material. *J Craniofac Surg* 2014;25(5):e411-3. [CrossRef]
10. Temel M, Gunal E, Kahraman SS. Reconstruction of Congenital Isolated Alar Defect Using Mutaf Triangular Closure Technique in Pediatric Patients. *J Craniofac Surg* 2016;27(4):1087-9. [CrossRef]
11. Bora A, Kurt Özkaya N, Durmuş K, Altuntaş EE. Tek taraflı izole nonsendromik alar kartilaj yokluğu olgunun literatür eşliğinde değerlendirilmesi. *ENTcase* 2019;5(1):37-42.

12. Bilkay U, Tokat C, Ozek C. Reconstruction of congenital absent columella. J Craniofac Surg 2004;15(1):60-3. [\[CrossRef\]](#)
13. Lee JS, Lee KH, Shin SY, Kim SW, Cho JS. Anatomical anomalies of alar cartilage. Plast Reconstr Surg 2012;130(3):495e-7e. [\[CrossRef\]](#)
14. Coban YK, Dogan A, Erbatur S. Isolated congenital hypoplasia of nasal lower lateral cartilages and its correction with helical rim and conchal cartilage composite grafts. Cleft Palate Craniofac J 2012;49(4):e42-5. [\[CrossRef\]](#)