

### ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

#### Comparison of Uric Acid High Density Lipoprotein Cholesterol Ratio and Serum Uric Acid Levels on Coronary Colleteral Circulation in Patients with Chronic Total Occlusion

*Kronik Total Oklüzyonu Olan Hastalarda Ürik Asit Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein Kolesterol Oranı ve Serum Ürik Asit Düzeylerinin Koroner Kollateral Dolaşım Üzerinde Karşılaştırılması*

#### A Study on the Feasibility and Repeatability of Fetal Basilar Artery Doppler Measurements Between 11 and 13+6 Weeks of Gestation

*11-13+6 Gebelik Haftaları Arasında Fetal Baziler Arter Doppler Ölçümlerinin Uygulanabilirliği Ve Tekrarlanabilirliği Üzerine Bir Çalışma*

#### Hedeflenmiş Radyonüklit Tedavilerde Çalışan Radyasyon Görevlilerinin Uzun Dönem Absorbe Radyasyon Dozlarının Belirlenmesi ve Değerlendirilmesi

*Determination and Evaluation of Long-Term Absorbed Radiation Doses of Radiation Workers Working in Targeted Radionuclide Therapies*

#### Sarkom Patogenezinde Etkili Olabilecek Yeni Aday Genlerin Araştırılması

*Investigation of New Candidate Genes in the Pathogenesis of Sarcomas*

#### Nötrofil/Lenfosit Oranı Prediyabetik Hastalarda İnsülin Direnci Tahmininde Homa-1r İndeksine Alternatif Bir Belirteç Olabilir Mi?: Bir Retrospektif Çalışma

*Could the Neutrophil/Lymphocyte Ratio be an Alternative Marker for the Prediction of Insulin Resistance in Prediabetic Patients?: A Retrospective Study*

#### Clinical Course of Covid-19 Patients Under Mesenchymal Stem Cell Therapy

*Mesenkimal Kök Hücre Tedavisi Uygulanan Covid-19 Hastalarının Seyri*

#### Diş Hekimliğinde Servikal Lenf Nodlarının Ultrasonografi İle Değerlendirilmesi: Retrospektif Çalışma

*Evaluation of Cervical Lymph Nodes in Dentistry by Ultrasonography: A Retrospective Study*

#### Retrospective Lateral Sefalometric Analysis of Patients Using Mandible Advancement Devices in the Treatment of Obstructive Sleep Apnea Syndrome

*Obstrüktif Uyku Apne Tedavisinde Mandibulayı Önde Konumlandıran Aparey Yapılan Hastalarda Retrospektif Lateral Sefalometrik İnceleme*

#### Hek 293 Hücrelerine Farklı Doz ve Sürelerde Uygulanan Klorpirifos ve Tannik Asitin Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin Araştırılması

*Investigation of the Effects of Chlorpyrifos and Tannic Acid Applied to Hek 293 Cells in Different Doses and Times on Cell Vitality*

#### Regulation of the Cxcl10 Expression and Investigation of the Relationships of the Cxcl10 Dna Sequence Variation and Disease Cxcl10 Ekspresyonunun Düzenlenmesi ve Cxcl10 Dna Dizi Varyasyonu ve Hastalık İlişkilerinin İncelenmesi

#### Streptococcus Milleri Grup (Smg) Bakterilerinin Biyokimyasal ve Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması

*Identification of Streptococcus Milleri Group (Smg) Bacteria By Biochemical and Molecular Methods*

#### The Protective Effects of Tetrandrine Against to Histological, Spermatological and Oxidative Damage Induced by Aroclor 1254 on the Male Rats Reproductive System

*Erkek Sıçanlarda Aroklor 1254'ün Neden Olduğu Reprodüktif Hasara Karşı Tetrandrinin Koruyucu Etkilerinin Araştırılması*

#### Deregulated Expressions of MYC Alter The Expressions of tRNAs in Breast Cancer Cells

*MYC Meme Kanseri Hücrelerinde tRNA'ların İfadesini Regüle Eder*

#### Evaluation of Maxillary and Mandibular Right and Left Side Tooth Size Discrepancies in Average and High Bolton Groups

*Normal ve Yüksek Bolton Gruplarında Maksiller ve Mandibular Sağ ve Sol Diş Boyut Farklarının Değerlendirilmesi*

#### Kompozit Yüzeye Farklı Pürüzlendirme Yöntemleri ile Yapıştırılan Metal Braketlerin Makaslama Bağlanma Dayanımlarının Değerlendirilmesi

*Evaluation of the Shear Bond Strength of Metal Brackets to the Composite Surface With Different Roughening Methods*

#### Psikotraumatojik Açından Öfkeyi Yordayan Şema Alanlarının İncelenmesi

*An Investigation Of Schema Domains Predicting Anger From A Psychotraumatological Perspective*

### **Dizinler / Indexing and Abstracting**

ULAKBİM TR Dizin

CAB Abstracts

CABI Global Health

CABI Nutrition and Food Sciences

EBSCO CINAHL Ultimate

EBSCO Central & Eastern European Academic Source

ASOS Index

DOAJ



# SABIAD

SAĞLIK BİLİMLERİNDE İLERİ ARAŞTIRMALAR DERGİSİ  
JOURNAL OF ADVANCED RESEARCH IN HEALTH SCIENCES

Şubat/February 2023, Cilt/Volume 6, Sayı/Issue 1

e-ISSN:2651-4060

## Sahibi / Owner

Prof. Dr. Zeynep KARAKAŞ

İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye  
Istanbul University, Institute of Graduate Studies in Health Sciences, Istanbul, Turkey

## Sorumlu Yazı İşleri Müdürü / Responsible Manager

Prof. Dr. Zeynep KARAKAŞ

İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye  
Istanbul University, Institute of Graduate Studies in Health Sciences, Istanbul, Turkey

## Yazışma Adresi / Correspondence Address

İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,  
Bozdoğan Kemerli Cad. No: 4 Vezneciler Hamamı Sk.  
Vezneciler, Fatih 34126 İstanbul, Türkiye  
Telefon / Phone: +90 (212) 440 00 00 (14131)  
Faks / Fax: +90 (212) 414 30 16  
E-mail: sabiad@istanbul.edu.tr  
<https://dergipark.org.tr/sabiad>  
<http://iupress.istanbul.edu.tr/tr/journal/jarhs/home>

## Yayıncı / Publisher

İstanbul Üniversitesi Yayınevi / Istanbul University Press  
İstanbul Üniversitesi Merkez Kampüsü, 34452 Beyazıt,  
Fatih / İstanbul, Türkiye  
Telefon / Phone: +90 (212) 440 00 00

## Kapak fotoğrafı / Cover photo

Prof.Dr. İbrahim Halil KALELİOĞLU

---

Dergide yer alan yazılardan ve aktarılan görüşlerden yazarlar sorumludur.  
*Authors bear responsibility for the content of their published articles.*

Yayın dili Türkçe ve İngilizce'dir.  
*The publication languages of the journal are Turkish and English.*

Şubat, Haziran ve Ekim aylarında, yılda üç sayı olarak yayımlanan uluslararası, hakemli, açık erişimli ve bilimsel bir dergidir.  
*This is a scholarly, international, peer-reviewed and open-access journal published triannually in February, June and October.*

---

Yayın türü / Publication Type: Yaygın süreli / Periodical

---

## DERGİ YAZI KURULU / EDITORIAL MANAGEMENT BOARD

### Baş Editör / Editor-in-Chief

Prof. Dr. Zeynep KARAKAŞ, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye - [zkarakas@istanbul.edu.tr](mailto:zkarakas@istanbul.edu.tr); [zeynepkar@hotmail.com](mailto:zeynepkar@hotmail.com)

### Baş Editör Yardımcıları / Co-Editors-in-Chief

Prof. Fatma SAVRAN OĞUZ, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye - [oguzsf@istanbul.edu.tr](mailto:oguzsf@istanbul.edu.tr)

Doç. Dr. Nurcan ORHAN, İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine, İstanbul, Türkiye - [norhan@istanbul.edu.tr](mailto:norhan@istanbul.edu.tr)

### Editör Yardımcıları / Associate Editors

Prof. Dr. Merva SOLUK TEKKEŞİN, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye - [msoluk@istanbul.edu.tr](mailto:msoluk@istanbul.edu.tr)

Prof. Ayşe Evrim BAYRAK, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye - [ebayrak@istanbul.edu.tr](mailto:ebayrak@istanbul.edu.tr)

Doç. Dr. Meryem Sedef ERDAL, İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, İstanbul, Türkiye - [serdal@istanbul.edu.tr](mailto:serdal@istanbul.edu.tr)

### Alan Editörleri / Section Editors

Prof. Dr. Merva SOLUK TEKKEŞİN, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye - [msoluk@istanbul.edu.tr](mailto:msoluk@istanbul.edu.tr)

Prof. Dr. Ayşe Evrim BAYRAK, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye - [ebayrak@istanbul.edu.tr](mailto:ebayrak@istanbul.edu.tr)

Prof. Dr. Ayşe Emel ÖNAL, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Türkiye - [onale@istanbul.edu.tr](mailto:onale@istanbul.edu.tr)

Prof. Mehmet Tevfik DORAK, Kingston Üniversitesi, London, United-Kingdom - [mtd3053@gmail.com](mailto:mtd3053@gmail.com)

Doç. Dr. Meryem Sedef ERDAL, İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, İstanbul, Türkiye - [serdal@istanbul.edu.tr](mailto:serdal@istanbul.edu.tr)

Öğr. Gör. Dr. Ebru KARPUZOĞLU, University of Georgia, Athens, United States - [ekarpuzo@gmail.com](mailto:ekarpuzo@gmail.com)

### İstatistik Editörü / Statistics Editor

Doç. Dr. Eray YURTSEVEN, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye - [eyurt@istanbul.edu.tr](mailto:eyurt@istanbul.edu.tr)

### Bilimsel Sekreteryaya / Scientific Secretariat

Uzm. Dr. Yasin YILMAZ, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye - [dryasinyilmaz@gmail.com](mailto:dryasinyilmaz@gmail.com)

### Tanıtım Yöneticisi / Publicity Manager

Doç. Dr. Ayşe Evrim BAYRAK, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye - [ebayrak@istanbul.edu.tr](mailto:ebayrak@istanbul.edu.tr)

Uzm. Dr. Yasin YILMAZ, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Türkiye - [dryasinyilmaz@gmail.com](mailto:dryasinyilmaz@gmail.com)

Sevda MUTLU, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye - [smutlu@istanbul.edu.tr](mailto:smutlu@istanbul.edu.tr)

Birgül TAŞTEMİR, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Dekanlığı Yayıncılık Birimi Şefi, İstanbul, Türkiye - [birgul@istanbul.edu.tr](mailto:birgul@istanbul.edu.tr)

Pınar SIĞAK, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye - [pınar.kacan@istanbul.edu.tr](mailto:pınar.kacan@istanbul.edu.tr)

### Editöryal Asistanlar / Editorial Assistants

Birgül TAŞTEMİR, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Dekanlığı Yayıncılık Birimi Şefi, İstanbul, Türkiye - [birgul@istanbul.edu.tr](mailto:birgul@istanbul.edu.tr)

Araş. Gör. Dr. Safiye ÖZKAN SARILI, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye - [sozkan76@istanbul.edu.tr](mailto:sozkan76@istanbul.edu.tr)

### Dil Editörleri / Language Editors

Elizabeth Mary EARL, İstanbul Üniversitesi, Yabancı Diller Yüksek Okulu, İstanbul, Türkiye - [elizabeth.earl@istanbul.edu.tr](mailto:elizabeth.earl@istanbul.edu.tr)

Alan James NEWSON, İstanbul Üniversitesi, Yabancı Diller Yüksek Okulu, İstanbul, Türkiye - [alan.newson@istanbul.edu.tr](mailto:alan.newson@istanbul.edu.tr)



## YAYIN KURULU / EDITORIAL BOARD

- Prof. Dr. Alper BARAN, İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa, Veteriner Fakültesi, İstanbul, Türkiye  
Prof. Dr. Mustafa DEMİR, İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye  
Prof. Dr. Tamer DEMİRALP, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye  
Prof. Dr. Günnur DENİZ, İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İstanbul, Türkiye  
Prof. Mehmet Tevfik DORAK, Kingston Üniversitesi, London, United-Kingdom  
Prof. Dr. Melek Nihal ESİN, İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa, Florence Nightingale Hemşirelik Fakültesi, İstanbul, Türkiye  
Prof. Dr. Ahmet GÜL, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul Türkiye  
Prof. Dr. Godoberto GUEVARA-ROJAS, University of Applied Sciences, Viyana, Avusturya  
Prof. Dr. Christine HAUSKELLER, Exeter Üniversitesi, Sosyoloji ve Felsefe Bölümü, Exeter, İngiltere  
Prof. Dr. Amid ISMAİL, Temple University, School of Dentistry, Philadelphia, ABD  
Prof. Dr. Alev Akdoğan KAYMAZ, İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa, Veteriner Fakültesi, İstanbul, Türkiye  
Prof. Dr. Ahmet KIZIR, İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, İstanbul, Türkiye  
Prof. Dr. Eitan MİJİRİTSKY, Tel Aviv Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Tel Aviv, İsrail  
Prof. Dr. Fuat ODUNCU, Münih Ludwig Maximillian Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Münih, Almanya  
Prof. Dr. Vedat ONAR, İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa, Veteriner Fakültesi, İstanbul, Türkiye  
Prof. Dr. Özen Doğan ONUR, İstanbul Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, İstanbul, Türkiye  
Prof. Dr. Sacide PEHLİVAN, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul Türkiye  
Prof. Dr. Hans-Martin SASS, Georgetown University, GU The Kennedy Institute of Ethics, Washington, ABD – Bochum Almanya  
Prof. Dr. Emine Akalın URUŞAK, İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, İstanbul, Türkiye  
Prof. Dr. T. Mesud YELBUZ, King Abdulaziz Cardiac Center, Riyad, S. Arabistan  
Prof. Dr. Eray YURTSEVEN, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye  
Doç. Dr. Eda Yılmaz ALARÇİN, İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa, Sağlık Bilimleri Fakültesi, İstanbul, Türkiye  
Doç. Dr. Fatemah BAHADORİ, Bezmialem Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, İstanbul, Türkiye

## Onursal Editör / Honorary Editor

Prof. Dr. İlhan İLKILIÇ, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye - [ilhan.ilkilic@istanbul.edu.tr](mailto:ilhan.ilkilic@istanbul.edu.tr)

## **Editörden**

Ülkemizin yaşadığı Deprem nedeniyle ülkemizin başı sağ olsun, hayatını kaybedenlere rahmet, yaralananlara acil şifa diliyorum. Zorluklarla baş edebilmek için çalışmaya devam...

Sevgili okurlarımız, bu günleri de atlatacağız.

Dergimizin Şubat 2023 sayısında 5'i temel bilim, 11'i klinik olmak üzere 16 araştırma makalesi ile karşınızdayız. Bu sayıda ayrıca Mezenkimal Kök Hücre Tedavisi uygulanan Covid-19 hastalarının seyri (Sağlık Bakanlığı verileri) de yer almakta.

İstanbul Üniversitesi süreli yayınlarından biri olan ve Şubat, Haziran, Ekim olmak üzere yılda üç kez, uluslararası standartlarda yayınlanan Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi 2018 yılında yayın hayatına başlamış olup 2021 yılı itibarı ile Ulusal ve uluslararası indekslerde yer almaktadır. Sağlık alanında geniş bir yelpazede hizmet veren dergimiz SCI'ye girmeyi hedeflemektedir. Bu kapsamda Haziran 2023'den itibaren dergimize sadece İngilizce yayınlar kabul edilecektir.

Araştırmalarınızı bekliyoruz, sizlerle güçleneceğiz, katkıda bulunan bilim insanlarına sonsuz teşekkürler, saygılarımızla.

**Prof. Dr. Zeynep Karakaş**

Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi Editörü

### **From the Editor**

We are deeply saddened by the shocking earthquake we experienced. I wish our country's condolences, mercy to those who lost their lives, and a speedy recovery to those who were injured. Keep working to cope with the difficulties, our dear readers, we will get through these days too.

There are 16 research articles, 5 of which are basic science and 11 are clinical, in the February 2023 issue of our journal. This issue also includes the course of Covid-19 patients who received Mesenchymal Stem Cell Therapy (Ministry of Health data).

The Journal of Advanced Studies in Health Sciences, which is one of the periodicals of Istanbul University and published triannually in February, June and October, in international standards, started its publication life in 2018 and is included in national and international indexes as of 2021. Our journal, which provides a wide range of services in the field of health, aims to enter SCI. In this context, only publications in English will be accepted to our journal as of June 2023.

We are waiting for your research, we will be stronger with you, thank you to the scientists who contributed, with our respect.

**Prof. Dr. Zeynep Karakaş**

## İÇİNDEKİLER / CONTENTS

Comparison of Uric Acid High Density Lipoprotein Cholesterol Ratio and Serum Uric Acid Levels on Coronary Collateral Circulation in Patients with Chronic Total Occlusion .....	1
<i>Kronik Total Oklüzyonu Olan Hastalarda Ürik Asit Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein Kolesterol Oranı ve Serum Ürik Asit Düzeylerinin Koroner Kollateral Dolaşım Üzerinde Karşılaştırılması</i>	
Derya Baykız, Zeynep Gizem Demirtakan, Elif Ayduk Gövdeli, Samim Emet, Ali Elitok	
A Study on the Feasibility and Repeatability of Fetal Basilar Artery Doppler Measurements Between 11 and 13+6 Weeks of Gestation .....	10
<i>11-13+6 Gebelik Haftaları Arasında Fetal Baziler Arter Doppler Ölçümlerinin Uygulanabilirliği Ve Tekrarlanabilirliği Üzerine Bir Çalışma</i>	
Tuğba Saraç Sivriköz, Selen Gürsoy Erzincan, Gürcan Türkyılmaz, Nihat Demirkol, Recep Has, İbrahim Halil Kalelioğlu	
Hedeflenmiş Radyonüklit Tedavilerde Çalışan Radyasyon Görevlilerinin Uzun Dönem Absorbe Radyasyon Dozlarının Belirlenmesi ve Değerlendirilmesi.....	17
<i>Determination and Evaluation of Long-Term Absorbed Radiation Doses of Radiation Workers Working in Targeted Radionuclide Therapies</i>	
Nazenin İpek Işıkçı, Mustafa Demir	
Sarkom Patogenezinde Etkili Olabilecek Yeni Aday Genlerin Araştırılması .....	23
<i>Investigation of New Candidate Genes in the Pathogenesis of Sarcomas</i>	
Demet Akdeniz Ödemiş, Rejin Kebudi, Fazilet Yıldız Özdenoğlu, Betül Çelik, Şeref Buğra Tunçer, Seda Kılıç Erciyas, Özge Şükrüoğlu Erdoğan, Sema Büyükkapı Bay, Hülya Yazıcı	
Nötrofil/Lenfosit Oranı Prediyabetik Hastalarda İnsülin Direnci Tahmininde Homa-1r İndeksine Alternatif Bir Belirteç Olabilir mi?: Bir Retrospektif Çalışma .....	33
<i>Could the Neutrophil/Lymphocyte Ratio be an Alternative Marker for the Prediction of Insulin Resistance in Prediabetic Patients?: A Retrospective Study</i>	
Durmuş Ayan, Kader Zeybek Aydoğan, Tevfik Balcı, Esmâ Özmen, Umut Karabay	
Clinical Course of Covid-19 Patients Under Mesenchymal Stem Cell Therapy.....	40
<i>Mesenkimal Kök Hücre Tedavisi Uygulanan Covid-19 Hastalarının Seyri</i>	
Hayri Canbaz, Hikmet Can Çubukçu, Ahmet Demir, Fatih Kacıroğlu, Seher Taş, Alpay Tuncar, Mehmet Ferit Fedai, Murat Gülşen, Atilla Beştemir	
Diş Hekimliğinde Servikal Lenf Nodlarının Ultrasonografi İle Değerlendirilmesi: Retrospektif Çalışma .....	46
<i>Evaluation of Cervical Lymph Nodes in Dentistry by Ultrasonography: A Retrospective Study</i>	
Ahmet Faruk Ertürk, İlknur Özcan	
Retrospective Lateral Sefalometric Analysis of Patients Using Mandible Advancement Devices in the Treatment of Obstructive Sleep Apnea Syndrome.....	50
<i>Obstrüktif Uyku Apne Tedavisinde Mandibulayı Önde Konumlandıran Aparent Yapılan Hastalarda Retrospektif Lateral Sefalometrik İnceleme</i>	
Almira Ada Diken Türksayar, Ali Can Bulut	
HEK 293 Hücrelerine Farklı Doz ve Sürelerde Uygulanan Klorpirifos ve Tannik Asitin Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin Araştırılması.....	56
<i>Investigation of the Effects of Chlorpyrifos and Tannic Acid Applied to Hek 293 Cells in Different Doses and Times on Cell Vitality</i>	
Sevil Erol, Bahar Öztürk Kurt, Bircan Dinç, Semra Özdemir	

## İÇİNDEKİLER / CONTENTS

<b>Regulation of the CXCL10 Expression and Investigation of the Relationships of the CXCL10 DNA Sequence Variation and Disease .....</b>	<b>64</b>
<i>CXCL10 Ekspresyonunun Düzenlenmesi ve CXCL10 DNA Dizi Varyasyonu ve Hastalık İlişkilerinin İncelenmesi</i>	
Hayriye Şentürk Çiftçi, Süleyman Rüştü Oğuz, Ekin Ece Gürer, Demet Kıvanç İzgi, Meltem Savran Karadeniz	
<b>Streptococcus Milleri Grup (Smg) Bakterilerinin Biyokimyasal ve Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması.....</b>	<b>73</b>
<i>Identification of Streptococcus Milleri Group (Smg) Bacteria By Biochemical and Molecular Methods</i>	
Gülşen Günel, Bülent Gürler	
<b>The Protective Effects of Tetrandrine Against to Histological, Spermatological and Oxidative Damage Induced by Aroclor 1254 on the Male Rats Reproductive System .....</b>	<b>80</b>
<i>Erkek Sıçanlarda Aroclor 1254'ün Neden Olduğu Reprodüktif Hasara Karşı Tetrandrinin Koruyucu Etkilerinin Araştırılması</i>	
Feride Özdemir, Aslı Çetin Taşlıdere, Osman Çiftçi, Muhterem Aydın, Neşe Başak Türkmen	
<b>Deregulated Expressions of Myc Alter The Expressions of tRNAs in Breast Cancer Cells.....</b>	<b>88</b>
<i>MYC Meme Kanseri Hücrelerinde tRNA'ların İfadesini Regüle Eder</i>	
Pervin Elvan Tokgün, Onur Tokgün	
<b>Evaluation of Maxillary and Mandibular Right and Left Side Tooth Size Discrepancies in Average and High Bolton Groups.....</b>	<b>96</b>
<i>Normal ve Yüksek Bolton Gruplarında Maksiller ve Mandibular Sağ ve Sol Diş Boyut Farklarının Değerlendirilmesi</i>	
Feyza Hacıağaoğlu Akkız, Evren Öztaş	
<b>Kompozit Yüzeğe Farklı Pürüzlendirme Yöntemleri ile Yapıştırılan Metal Braketlerin Makaslama Bağlanma Dayanımlarının Değerlendirilmesi.....</b>	<b>102</b>
<i>Evaluation of the Shear Bond Strength of Metal Brackets to the Composite Surface With Different Roughening Methods</i>	
Muhammet Furkan Vatan, S. Evren Öztaş	
<b>Psikotravmatolojik Açından Öfkeyi Yordayan Şema Alanlarının İncelenmesi .....</b>	<b>108</b>
<i>An Investigation Of Schema Domains Predicting Anger From A Psychotraumatological Perspective</i>	
Merve Erdoğdu, Şennur Kışlak	

# COMPARISON OF URIC ASID HIGH DENSITY LIPOPROTEIN CHOLESTEROL RATIO AND SERUM URIC ASID LEVELS ON CORONARY COLLETERAL CIRCULATION IN PATIENTS WITH CHRONIC TOTAL OCCLUSION

## KRONİK TOTAL OKLÜZYONU OLAN HASTALARDA ÜRİK ASİT YÜKSEK YOĞUNLUKLU LİPOPROTEİN KOLESTEROL ORANI VE SERUM ÜRİK ASİT DÜZEYLERİNİN KORONER KOLLATERAL DOLAŞIM ÜZERİNDE KARŞILAŞTIRILMASI

Derya BAYKIZ<sup>1</sup> , Zeynep Gizem DEMİRTAKAN<sup>1</sup> , Elif AYDUK GÖVDELi<sup>1</sup> , Samim EMET<sup>1</sup> ,  
Ali ELİTOK<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Department of Cardiology, Istanbul, Türkiye

ORCID ID: D.B. 0000-0003-0666-6631; Z.G.D. 0000-0003-2401-3837; E.A.G. 0000-0002-6595-4812; S.E. 0000-0002-2806-4335; A.E. 0000-0002-0786-5096

**Citation/Atf:** Baykiz D, Demirtakan ZG, Ayduk Govdeli E, Emet S, Elitok A. Comparison of uric acid to high-density lipoprotein cholesterol ratio and uric acid on coronary collateral circulation in patients with chronic total occlusion. Journal of Advanced Research in Health Sciences 2023;6(1):1-9. <https://doi.org/10.26650/JARHS2022-1041198>. <https://doi.org/10.26650/JARHS2023-1199242>

### ABSTRACT

**Objective:** Coronary collateral circulation (CCC) plays a significant role in cardiovascular prognosis, and well-developed CCC improves survival. The aim of this study was to investigate whether the serum uric acid to high-density lipoprotein cholesterol ratio (UA/HDL-C) is associated with coronary collateral development.

**Materials and Methods:** This retrospective study enrolled 111 patients with stable coronary artery disease and at least one chronic total occlusion (CTO) at invasive coronary angiography. Blood samples were obtained from all patients before the angiography procedure. The collateral degree was determined according to the Rentrop scoring system. Patients were classified into a poor CCC group (Rentrop grades 0-1, n=47) or a good CCC group (Rentrop grades 2-3, n=64). The UA/HDL-C ratios were compared between the two groups.

**Results:** The UA/HDL-C ratios were significantly higher in patients with poor CCC compared with the patients with good CCC (0.18 [0.06-0.49] vs 0.14 [0.05-0.31], respectively; p<0.001). In correlation analysis, the CCC was significantly negatively correlated with UA/HDL-C and UA levels (r=-0.333, p<0.001; r=-0.502, p<0.001, respectively). According to the ROC analysis, a cut-off value of > 0.17 for the UA/HDL-C ratio predicted poor collateral development with 54.3% sensitivity and 79.3% specificity (AUC=0.711, 95% CI 0.617-0.794, p<0.001). In multivariate regression analysis, serum UA was found to be an independent predictor of poor collateral development (OR=2.818, p=0.022).

**Conclusion:** The present study showed that although the UA/HDL-C ratio may be associated with poor collateral development, serum UA levels seem to be a better predictor of poor CCC than UA/HDL-C ratios in patients with CTO.

**Keywords:** Chronic total occlusion, coronary collateral circulation, uric acid, high-density lipoprotein cholesterol

### Öz

**Amaç:** Koroner kollateral dolaşım (KKD) kardiyovasküler prognoz üzerinde önemli bir rol oynar ve iyi gelişmiş KKD surviyi iyileştirir. Bu çalışmanın amacı, serum ürik asit ve yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterol oranının (ÜA/HDL-K) koroner kollateral gelişimi ile ilişkili olup olmadığını araştırmaktır.

**Gereç ve Yöntem:** Bu retrospektif çalışmaya stabil koroner arter hastalığı ve invaziv koroner anjiyografide en az bir kronik total oklüzyonu (KTO) olan 111 hasta dahil edildi. Anjiyografi işlemi öncesi tüm hastalardan kan örnekleri alındı. Kollateral derecesi Rentrop sınıflamasına göre belirlendi. Hastalar kötü KKD grubu (Rentrop derece 0-1, n=47) veya iyi KKD grubu (Rentrop derece 2-3, n=64) olarak sınıflandırıldı. ÜA/HDL-K oranları iki grup arasında karşılaştırıldı.

**Bulgular:** ÜA/HDL-K oranları, kötü KKD'si olan hastalarda, iyi KKD'si olan hastalarla karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha yüksekti (0,18 [0,06-0,49] vs 0,14 [0,05-0,31], sırasıyla; p<0,001). Korelasyon analizinde, KKD, ÜA/HDL-K ve ÜA seviyeleri ile anlamlı bir negatif korelasyon gösterdi (r=-0,333, p<0,001; r=-0,502, p<0,001, sırasıyla). ROC analizinde, ÜA/HDL-K oranı için > 0,17'lik bir kesme değeri, %54,3 duyarlılık ve %79,3 özgüllük ile zayıf kollateral gelişimini öngördü (AUC=0,711, 95% CI 0,617-0,794, p<0,001). Çok değişkenli regresyon analizinde, serum ÜA kötü kollateral gelişiminin bağımsız bir prediktörü olarak bulundu (OR=2,818, p=0,022).

**Sonuç:** Bu çalışma göstermiştir ki, ÜA/HDL-K oranı zayıf kollateral gelişimi ile ilişkili olabilir de, serum ÜA seviyeleri, KTO'lu hastalarda ÜA/HDL-K oranlarından kötü KKD'nin daha iyi bir öngördürücüsü olarak görünmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Kronik total oklüzyon, koroner kollateral dolaşım, ürik asit, yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterol

Corresponding Author/Sorumlu Yazar: Derya BAYKIZ E-mail: derya.baykiz@hotmail.com

Submitted/Başvuru: 04.11.2022 • Revision Requested/Revizyon Talebi: 04.11.2022 • Last Revision Received/Son Revizyon: 25.11.2022

• Accepted/Kabul: 28.11.2022 • Published Online/Online Yayın: 09.02.2023



This work is licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

## INTRODUCTION

Cardiovascular disease (CVD) constitutes an important cause of cardiac mortality in developed countries. Atherosclerosis in the large arteries contributes to the increased burden of CVD (1). Inflammation and lipid accumulation are major prominent factors in the progression of atherosclerosis.

Coronary collateral circulation (CCC) has been considered an adaptive mechanism for myocardial ischemia to provide adequate tissue perfusion (1,2). However, the grade of collateral development can show differences between patients having a coronary artery disease (CAD). Well-developed CCC may improve major adverse cardiovascular events and consequently cardiac mortality, and it plays a preventive role against myocardial infarction, ventricular failure and fatal arrhythmias (2). Various clinical parameters, including cardiac ischemia and endothelial dysfunction, and endogenous mediators, such as growth factors, oxidative stress, and inflammation are responsible for collateral development (2-3). Therefore, the identification of the potential risk factors related to the development of CCC has been an important research topic in the cardiovascular field. Although many related factors can influence the coronary collateral growth, the main causative mechanism is not yet clear.

Chronic inflammation causes vascular endothelial dysfunction in different ways. As an important mechanism, an increased generation of reactive oxygen species are induced by inflammation and oxidative stress reaction consequently triggers a course of endothelial dysfunction; however, a normal endothelial function with a normal vascular endothelium provides well-developed coronary collaterals (4). Consequently, an intact endothelium with a sufficient endothelial function is an indispensable factor of adequate collateral circulation, and vascular endothelial dysfunction has been identified as being an important part of the CCC formation (5).

Many studies have revealed that inflammatory processes prevent the development of collateral formation, affecting the endothelial function (1). Inflammatory cytokines, such as TNF-alpha and interleukin-6 (IL-6), have been revealed to be associated with poorly developed coronary collaterals. Moreover, C-reactive protein (CRP) levels are shown to be related with insufficient CCC development (2). Inflammatory white blood cells, such as monocytes, neutrophils, and lymphocytes significantly affect the development of the CCC (6).

Serum uric acid (UA) is a metabolic marker of the purine nucleotide metabolism. UA is endogenously synthesized in the liver, intestines, muscles, and vascular endothelium (7). Experimental studies have shown that elevated UA levels can induce inflammation in vascular endothelial cells as well as induce intracellular oxidative stress, consequently causing endothelial dysfunction (8). In clinical studies, serum UA levels have potentially been considered to be a useful indicative biomarker in predicting CVD, including heart failure, stable CAD, and acute coronary syndromes (8-9).

Dyslipidemia is another important risk factor of vascular endothelial dysfunction (10). Some studies have reported that the incidence of endothelial dysfunction is inversely correlated with high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) levels (11).

As indicated by previous studies, the relationship between coronary collateral development and its possible mechanisms needs to be clarified. Thus, the determination of the related mechanisms could improve prognosis, patients' treatment strategies, and clinical management.

In the present study, we aimed to evaluate the relationship between hyperuricemia, the UA/HDL-C ratio, and coronary collateral development in patients with chronic total occlusion (CTO). We hypothesized that the UA/HDL-C ratio may be associated with the development of CCC.

## MATERIALS AND METHODS

### Study population and design

This retrospective study was conducted at the Istanbul University School of Medicine. The research protocol was approved by Medical Research Ethics Committee of Istanbul University, Faculty of Medicine (Date:27.10.2022, Approval no: 1350712). All study procedures were applied according to the Declaration of Helsinki. Patients with stable CAD with documented CTO in one of the major coronary arteries who underwent an invasive coronary angiography (ICA) due to objective signs of ischemia in non-invasive stress tests between January 2018 and January 2022 were recruited from our institution.

After adjusting the exclusion criteria, overall 111 patients were recruited in the study. Patients with severe chronic inflammatory disease or autoimmune disease, infectious disease, hematological diseases, malignancy, severe chronic renal disease (estimated glomerular filtration rate < 30 mL/minute/1.73 m<sup>2</sup>) or chronic liver disease, and thyroid disorders and patients with acute coronary syndrome within the last month or a history of revascularization of percutaneous coronary intervention/coronary artery bypass grafts before a diagnostic ICA were excluded from the study.

The clinical characteristics of the patients, such as age, gender, history of hypertension, diabetes mellitus, smoking status, dyslipidemia, and other risk factors for CAD were evaluated. Data consisting of comorbidities, physical examination findings, transthoracic echocardiography, hematologic indices with complete blood counts (CBC), laboratory parameters, lipid profile, serum CRP, and UA levels were carefully reviewed and recorded from the hospital's electronic medical records. A fasting glucose level  $\geq 126$  mg/dL or taking any antidiabetic drugs identified the diagnosis of diabetes mellitus (DM). Patients with hypertension (HT) were described when their blood pressure  $\geq 140/90$  mm Hg at any time of measurements or taking any antihypertensive medications. Hyperlipidemia was identified as a total cholesterol (TC) level over 200 mg/dL, low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) above 130 mg/dL, triglyceride (TG) above 150 mg/dL, and HDL-C  $\leq 40$  mg/dL, as described (12).



All blood samples with biochemical and hematologic indices were obtained within 24 hours of admission prior to the ICA procedure. All CBC analyses were conducted using the LH780 Hematology Analyzer (Beckman Coulter, Inc., CA, USA), and routine biochemical tests were carried out using an automatic biochemical analyzer (Cobas 8000, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

The UA/HDL-C was calculated as the ratio of the serum UA level to HDL-C.

#### Coroner angiography analysis

The coronary angiography was carried out using the femoral standard Judkins' techniques. The coronary angiography films and the grade and presence of CCC were assessed by two independent experienced cardiologists who had no information about the patients' data and laboratory findings. Any disagreement in interpretation was resolved by another experienced cardiologist.

CTOs are defined as a complete occlusion in the coronary arteries resulting in an interruption of antegrade blood flow with a duration >3 months. When the presence of  $\geq 50\%$  of luminal stenosis with at least two major epicardial coronary arteries, the diagnosis of multivessel disease is made. The calculation of Gensini score consisting of the degree of luminal stenosis of coronary arteries and its stenosis score based on geographic structure was also performed for each patient by two independent experienced cardiologists (13).

The CCC grading was detected according to the Rentrop-Cohen scoring system: no filling of any coronary vessels indicated grade 0; filling of side branches via collateral vessels without a visualization of the epicardial coronary artery indicated grade 1; partial filling of the epicardial coronary artery by collateral vessels showed grade 2; and complete filling of the epicardial segment being perfused via the collateral vessels grade 3 (14).

Patients were classified into two groups according to the CCC grading. Patients who developed grade 0 or 1 collateral vessels indicated a poorly developed CCC group, while patients with grade 2 or 3 collateral vessels indicated a well-developed CCC group.

#### Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences 26.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). To analyze the normality of the variables, the Kolmogorov-Smirnov test was used. The continuous variables are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD), and the categorical data are expressed as percentages. The differences between the CCC groups were assessed by using the Chi-square test for the categorical variables. Comparisons between the two groups were made by using the Student's t-test or the Mann-Whitney U test according to the normality of distribution, as appropriate. The receiver operating characteristic (ROC) analysis was performed to detect the predictive value of the UA/HDL-C ratio on the development of poor CCC. The multivariate logistic

regression analysis was performed to identify the independent predictors of a poor development of CCC. The Pearson's or the Spearman's correlation test was used for determining the correlation between the UA/HDL-C ratio and the CCC. The results of the model were expressed as an odds ratio (OR), 95% CI, and p-values. Significance was considered at a two-sided  $p < 0.05$ .

#### RESULTS

After applying the exclusion criteria, a total of 111 patients with stable CAD and CTO were enrolled in our study. The average age of the study population was  $61.87 \pm 8.7$  years (83% male, 17% female). The information about clinical and angiographic characteristics of the study population are presented in Table 1. The poor CCC group (Rentrop 0 or 1) consisted of 47 patients, and 64 patients had well-developed CCC (Rentrop 2 or 3). No statistically significant difference was found with respect to age, gender, or treatment between the two groups ( $p > 0.05$ ). The frequencies of dyslipidemia, HT, DM, and smoking were also similar. The poorly developed and well-developed CCC groups included subjects with similar left ventricular ejection fraction, the number of diseased vessels, or the Gensini scores ( $p > 0.05$ ) (Table 1).

The laboratory findings are shown in Table 2. The serum UA and CRP levels were significantly increased in patients having poor CCC compared with the patients having good CCC ( $p < 0.001$ ,  $p = 0.02$ , respectively; Table 2). The serum UA/HDL-C levels were significantly higher in patients with poor CCC than those of well-developed CCC (0.18 [0.06-0.49] vs 0.14 [0.05-0.31], respectively;  $p < 0.001$ ) (Table 2, Figure 1). Other laboratory variables were similar between the two groups.

In the ROC curve analysis, a cut-off of 0.17 was identified as the predictive UA/HDL-C value for determining poorly developed CCC with a sensitivity of 54.3% and a specificity of 79.3 (AUC=0.711, 95% CI 0.617-0.794,  $p < 0.001$ ) (Table 3) (Figure 2A, 3). The ROC analysis also showed that a cut-off value of  $> 6.3$  for the UA levels predicted poor collateral development with a 61.7% sensitivity and 100% specificity (AUC=0.806, 95% CI 0.720-0.875,  $p < 0.001$ ) (Figure 2B, 3) (Table 3).

The determination of the possible risk factors for poor CCC was carried out by using a multivariate logistic regression analysis. Serum UA was an independent predictor of poor collateral growth (OR=2.818, 95% CI 1.164 to 6.819  $p = 0.022$ ; Table 4); however, UA/HDL-C was found to be an independent predictor of poor CCC based on the univariate regression analysis (OR=1.117, 95% CI 0.703 to 3.369  $p < 0.001$ ; Table 4).

The correlation analysis revealed a significant and moderate negative association between the CCC, UA/HDL-C ratio, UA, and CRP ( $r = -0.333$ ,  $p < 0.001$ ;  $r = -0.502$ ,  $p < 0.001$ ;  $r = -0.231$ ,  $p = 0.016$ , respectively) (Table 5).

#### DISCUSSION

In this study, we evaluated the relationship between coronary collateral development and the serum UA levels and UA/HDL-C



**Table 1:** Baseline clinical data, treatment and angiographic characteristics of the study population

Variable	Total patients (n=111)	Poor Collateral (n=47)	Good Collateral (n=64)	p-value
<b>Clinical characteristics</b>				
Age (years)	61.87±8.7	60.08±9.68	63.18±7.72	0.063
Gender Male n (%)	92 (82.9%)	39 (83.0%)	53 (82.8%)	1.000
Female n (%)	19 (17.1%)	8 (17.0%)	11 (17.2%)	
SBP (mmHg)	130 (100-174)	130 (110-160)	130 (100-174)	0.879
<b>Comorbidities</b>				
Hypertension n (%)	70 (65.4%)	28 (60.9%)	42 (68.9%)	0.545
Diabetes mellitus n (%)	42 (39.6%)	22 (47.8%)	20 (33.3%)	0.190
Smoking n (%)	68 (64.2%)	29 (63.0%)	39 (65.0%)	0.997
Dyslipidemia n (%)	66 (61.7%)	30 (65.2%)	36 (59.0%)	0.651
Carotid artery disease n (%)	12 (11.2%)	6 (13.0%)	6 (9.8%)	0.833
LVEF (%)	55 (35-77)	52 (35-77)	55 (35-75)	0.952
<b>Treatment</b>				
Antiplatelet n (%)	81 (78.6%)	34 (79.1%)	47 (78.3%)	1.000
Beta blockers n (%)	69 (67.0%)	30 (69.8%)	39 (65.0%)	0.674
CCB n (%)	24 (23.3%)	11 (25.6%)	13 (21.7%)	0.645
Statin n (%)	75 (72.8%)	33 (76.7%)	42 (70.0%)	0.593
ACEi/ARB n (%)	71 (68.9%)	32 (74.4%)	39 (65.0%)	0.422
<b>Number of diseased vessels</b>				
One vessel disease n (%)	25 (22.9%)	11 (23.9%)	14 (22.2%)	1.000
Two vessel disease n (%)	43 (39.4%)	15 (32.6%)	28 (44.4%)	0.294
Three vessel disease n (%)	41 (37.6%)	20 (43.5%)	21 (33.3%)	0.379
<b>Gensini Score</b>	55 (34 -138)	56 (34.5-138)	47.5 (34-120)	0.392

SBP: Systolic blood pressure, LVEF: Left ventricular ejection fraction, CCB: Calcium channel blocker, ACEi/ARB: Angiotensin converting enzyme inhibitor/ angiotensin receptor blocker

ratios in patients with stable CAD and CTO. We demonstrated that higher UA levels and UA/HDL-C ratios are associated with poor collateral development. The UA/HDL-C ratio was found to be significantly higher in the group with poor collateral development than in those with well-developed CCC. The UA/HDL-C ratio was significantly inversely associated with the degree of CCC. Moreover, values above 0.17 predicted poor CCC with a sensitivity of 54.3% and a specificity of 79.3%. Therefore, we suggest that the UA/HDL-C ratio could be a simple and reproducible parameter for routine use in clinical practice in the prediction of the grade of CCC.

UA is an end-product of the purine nucleotide metabolism, and it originates from endogenous and exogenous metabolism of the purine system. The majority of UA is eliminated through urination (8,15). UA is endogenously synthesized in the liver, intestines, muscles, and vascular endothelium (7). Experimental studies have shown that elevated UA levels can induce inflammation in vascular endothelial cells as well as

induce intracellular oxidative stress, consequently causing endothelial dysfunction (8,15).

Epidemiological studies have revealed that UA levels are positively correlated with CVD, including HT, DM, atherosclerosis, CAD, and heart failure (9,16). Based on a meta-analysis, it was shown that every 1 mg/dL increase in serum UA levels increases the risk of CAD and all-cause mortality by 20 % and 9 %, respectively (8). Moreover, serum UA levels were previously shown to be associated with greater coronary lipid plaques, which indicates UA as a possible surrogate indicator of vulnerable plaque in acute coronary syndromes (17). Borghi et al found that higher UA levels are linked with a higher 10-year CV death risk score (18). UA levels have also been propounded as a biomarker of CCC; however, the underlying molecular mechanisms remain unclear (8-9).

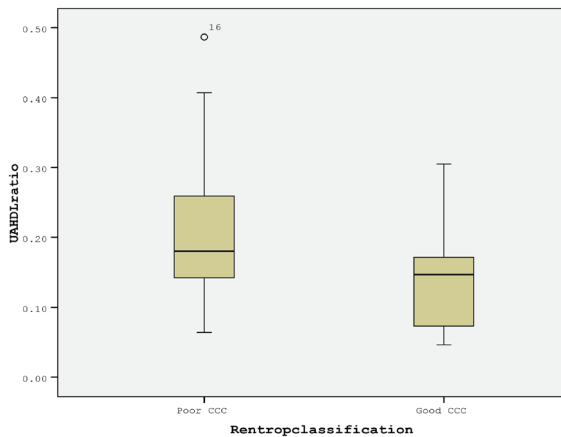
Various previous studies have indicated that high UA levels are associated with a reduction in nitric oxide (NO), endothelial

**Table 2:** Laboratory findings of the study population

Variable	Total patients (n=111)	Poor Collateral (n=47)	Good Collateral (n=64)	p-value
Fasting Glucose (mg/dL)	112 (76-304)	114 (79-304)	104 (76-285)	0.379
Creatinine (mg/dL)	0.99 (0.6-1.9)	1.0 (0.6-1.5)	0.9 (0.6-1.9)	0.652
eGFR (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )	79.77±18.76	79.59±17.89	79.91±19.55	0.930
Uric acid (mg/dL)	5.6 (2.3-14.6)	7.0 (3.5-14.6)	5.2 (2.3-6.3)	<0.001*
CRP (mg/L)	4.4 (0.3-39.2)	5.94 (0.3-28)	4.0 (0.4-39.2)	0.02*
Hgb (gr/dL)	13.45±2.32	13.37 ± 2.48	13.51 ± 2.23	0.818
Hematocrit (%)	40.99±5.77	41.11 ± 5.54	40.90 ± 6.01	0.893
WBC (10 <sup>3</sup> /μl)	8.87±2.02	8.63±2.09	9.04±1.97	0.314
Neutrophile (10 <sup>3</sup> /μl)	5.55±1.66	5.40±1.71	5.66±1.63	0.441
Lymphocyte (10 <sup>3</sup> /μl)	2.35±0.80	2.33±0.70	2.37±0.87	0.832
Monocyte (10 <sup>3</sup> /μl)	0.7 (0.4-1.7)	0.69 (0.4-1.0)	0.8 (0.4-1.7)	0.014*
Platelet (10 <sup>3</sup> /μl)	237.7±61.38	232.52±51.01	241.38±68.32	0.586
RDW (%)	14.2 (12.7-23.4)	13.9 (12.9-18.8)	14.4 (12.7-23.4)	0.141
MPV (fL)	8.75 (6.7-13.1)	8.6 (6.7-13.1)	8.8 (7.1-12.5)	0.887
Total cholesterol (mg/dL)	192.25±42.17	190.95±43.28	193.20±41.65	0.785
Triglyceride (mg/dL)	148 (63-443.5)	145.85 (63-435)	149.9 (63-443.5)	0.510
HDL-C (mg/dL)	37 (20-69)	37.5 (22-61)	36.8 (20-69)	0.859
LDL-C (mg/dL)	117.18±36.16	116.73±35.99	117.50±36.58	0.913
UA/HDL-C	0.15 (0.05-0.49)	0.18 (0.06-0.49)	0.14 (0.05-0.31)	<0.001*
TG/HDL-C	3.92 (1.05-15)	3.46 (1.51-15)	4.03 (1.05-11.25)	0.697
Lymphocyte/HDL-C	0.06 (0.01-0.17)	0.06 (0.02-0.17)	0.06 (0.01-0.13)	0.943
Monocyte/ HDL-C	0.017 (0.01-0.05)	0.016 (0.01-0.04)	0.02 (0.01-0.05)	0.127

GFR: Glomerular filtration rate, CRP: C-reactive protein, Hgb: Hemoglobin, WBC: White blood cell, RDW: Red cell distribution width, MPV: Mean platelet volume, HDL-C: High density lipoprotein-cholesterol, LDL-C: Low density lipoprotein-cholesterol, UA: Uric acid, TG: Triglyceride

\* p significance <0.05



**Figure 1:** Comparison of UA/HDL-C ratio according to Rentrop collateral classification

dysfunction, arterial stiffness, insulin resistance, metabolic syndrome, and inflammation (19-20). Hyperuricemia reduces the amount of NO released from the vascular endothelial cells

(15, 19, 20). UA also triggers the expression of proinflammatory cytokines, including CRP, which accelerate atherosclerosis (15,19).

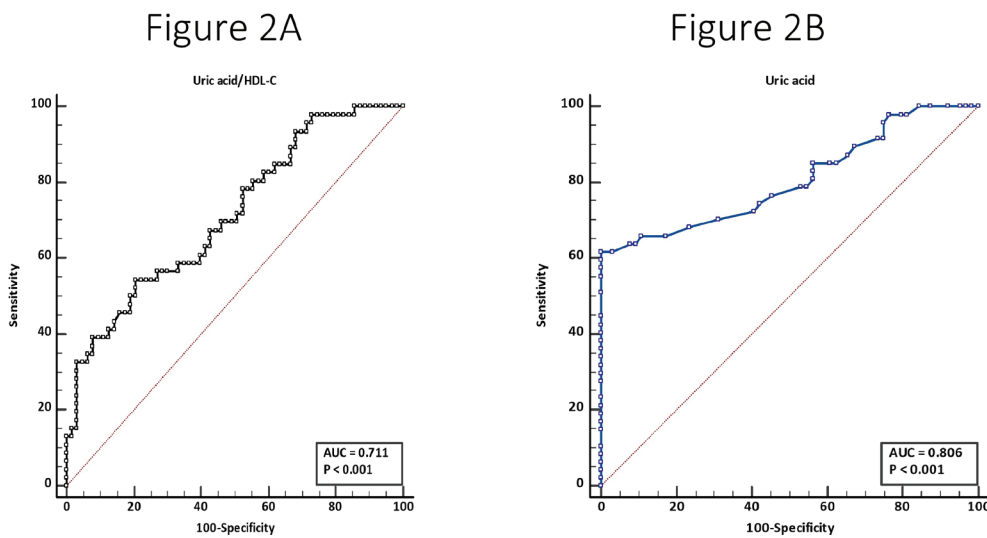
Myocardial ischemia due to partial coronary artery stenosis or complete total occlusion causes coronary collateral vessel formation which is established by the reproduction of endothelial and smooth muscle cells (21). When the pressure gradient increases in the CCC due to a stenosis in the epicardial coronary arteries, these vessels become visible on an angiography (3). Well-developed CCC has been shown to protect ventricular function, prevent heart failure and fatal arrhythmias, and improve survival (22). Previous studies have shown that patients with a poor CCC have an increased risk of mortality (2). Acute coronary syndromes with well-developed CCC have also been reported to be related to better improvements in myocardial perfusion and a less likely adverse cardiovascular events in the long-term (2,22). However, many related factors are responsible for the development of CCC. In addition to the severity of coronary stenosis, HT, DM, smoking status, exercise, oxidative stress, vascular endothelial dysfunction, and inflammation can affect the development of CCC (22-23). In addition, endogenous

**Table 3:** ROC analysis for poor coronary collateral development

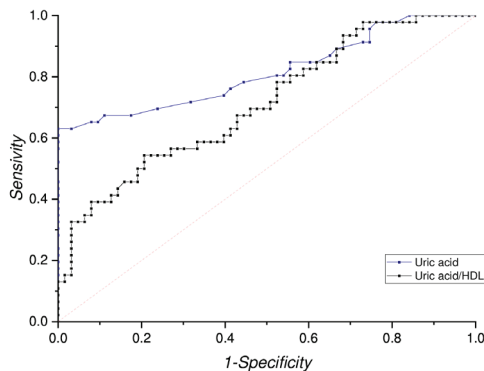
	AUC	95%CI	Sensitivity (%)	Specificity (%)	p-value
<b>UA/HDL-C &gt; 0.17</b>	0.711	0.617 - 0.794	54.35	79.37	<0.001*
TG/HDL-C ≤ 3.35	0.522	0.424 - 0.619	50.00	68.25	0.705
Lymphocyte/HDL-C > 0.05	0.504	0.405 - 0.603	61.36	45.90	0.944
Monocyte/HDL-C ≤ 0.01	0.619	0.481 - 0.745	33.33	93.94	0.119
<b>Uric acid &gt; 6.3 mg/dL</b>	0.806	0.720 - 0.875	61.70	100.00	<0.001*
<b>CRP &gt; 5.46 mg/L</b>	0.632	0.533 - 0.723	56.52	70.49	0.016*

CRP: C-reactive protein, UA: Uric acid, HDL-C: High density lipoprotein-cholesterol, TG: Triglyceride, ROC: Receiver operating characteristic, AUC: Area under the curve

\* p significance <0.05



**Figure 2: A)** The receiver operating characteristics (ROC) curve analysis of UA/HDL-C ratio for prediction of poor coronary collateral, **B)** ROC curve analysis of uric acid for prediction of poor coronary collateral



**Figure 3:** ROC curve analysis of UA/HDL-C ratio with uric acid for prediction of poor coronary collateral

mediators, such as the vascular endothelial growth factor, NO, and proinflammatory cytokines, are involved in the collateral development (3). Higher CRP concentrations have been reported

to inhibit the synthesis of NO and angiogenesis, which can result in impaired collateral development (1,3,24).

The relationship between serum UA levels and collateral formation has been demonstrated by previous studies. Kasapkara et al found that serum UA levels are significantly higher in patients with poor CCC with acute coronary syndrome (25). Again, Uysal et al revealed high levels of UA to be an independent predictor of poor CCC in stable CAD patients (26).

Consistent with these results, higher serum UA levels were found to be an independent predictor of poor collateral development in our study, and a cut-off value above 6.3 mg/dL predicted poor CCC.

Dyslipidemia is another important risk factor for vascular endothelial dysfunction, inflammation, and atherosclerotic process (10, 27). Various studies have shown the relationship between elevated LDL-C and decreased HDL-C levels in many CVDs (28). In addition, some previous studies have reported

**Table 4:** Regression analysis of predictive factors for poor collateral development

Variables	Analysis Univariate			Multivariate Analysis		
	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p
Age	0.959	0.447-2.708	0.066	1.000	0.917-1.092	0.993
Gender	0.988	0.274-1.335	0.982			
HT	0.956	0.703-3.369	0.824			
DM	1.833	0.993-1.011	0.132			
HL	1.302	1.685-3.626	0.514			
Smoking	0.919	0.991-1.103	0.835			
Uric acid	2.472	0.674-1.538	<0.001*	2.818	1.164-6.819	0.022*
CRP	1.046	0.990-1.008	0.100	1.031	0.937-1.134	0.536
Monocyte	0.037	0.955-1.025	0.023*	0.018	0.001-0.591	0.024*
Total cholesterol	0.999	0.266-3.798	0.783			
Triglyceride	1.001	0.417-1.248	0.820			
HDL-C	0.989	0.447-2.708	0.551			
LDL-C	0.999	0.274-1.335	0.912			
UA/HDL-C	1.117	0.703-3.369	<0.001*	0.981	0.834-1.154	0.818
TG/HDL-C	1.027	0.993-1.011	0.708			
Lymphocyte/HDL ratio	1.005	1.685-3.626	0.994			
Monocyte/HDL ratio	0.721	0.991-1.103	0.242			

HT: Hypertension, DM: Diabetes mellitus, HL: Hyperlipidemia, CRP: C reactive protein, HDL-C: High density lipoproteincholesterol, LDL-C: Low density lipoprotein-cholesterol, UA: Uric acid, TG: Triglyceride  
\* p significance <0.05

that HDL-C levels are inversely associated with the endothelial dysfunction (11).

High serum UA and low HDL-C concentrations are found to be linked with an increased risk of CVD as well as cardiac mortality in the general public (29). UA/HDL-C ratio, a novel index, was also investigated in type 2 DM patients (30). In this study, Kocak et al demonstrated that the UA/HDL-C ratio is a strong predictor of metabolic syndrome, and it has a higher sensitivity than serum UA and HDL-C levels alone (30). Therefore, lower serum HDL-C values and higher UA values may have a synergistic effect on the cardiovascular system.

In our study, the UA/HDL-C ratio was significantly higher in patients with poor CCC than those of well-developed CCC. Moreover, CCC was significantly inversely correlated with the UA/HDL-C ratio. Our study results are in line with study of Aydın et al (20). Similar to our findings, they showed a relationship between high UA/HDL-C ratios and a low collateral index. Based on the ROC analysis, Aydın et al found a cut-off value of 0.18, similar to our results, to predict poor CCC. However, the serum UA levels were found to be an independent predictor of low-grade CCC, whereas the UA/HDL-C ratio was not in the multivariate regression analysis. This finding may be explained by the small number of study population.

In addition, the TG/HDL-C ratio, a novel atherogenic dyslipidemia index, has been shown to be a better indicator of metabolic

**Table 5:** Correlations between Rentrop classification and laboratory parameters

Variable	r	p
Uric acid (mg/dL)	-0.502	<0.001*
CRP (mg/L)	-0.231	0.016*
UA/HDL-C	-0.333	<0.001*
TG/HDL-C	0.06	0.489
Lymphocyte/HDL-C	-0.03	0.731
Monocyte/ HDL-C	0.207	0.123

CRP: C-reactive protein, UA: Uric acid, HDL-C: High density lipoprotein-cholesterol, TG: Triglyceride  
\* p significance <0.05

syndrome and CAD than other lipid profiles (27). The TG/HDL-C ratio was considered an inflammatory marker in regulating endothelial function and collateral circulation. In a recent study by Liu et al, the TG/HDL-C ratio was found to be significantly associated with poor CCC (10). Again, the TG/HDL-C ratio was reported to have an impact on the IL-6 levels in patients with metabolic syndrome (10). Contrary to their results, we showed no significant association between the TG/HDL-C ratio and the grade of CCC.

In addition, inflammatory white blood cells, such as monocytes, neutrophils, and lymphocytes, also play an important role in the development of CCC (6). As described, monocytes have a

key role in the development of atherosclerosis as a predictor of future coronary events (31). Moreover, circulating monocytes constitute inflammatory and prothrombotic states. Many studies have shown that high monocyte counts and low HDL-C levels may be associated with inflammation (31). The monocyte/HDL-C ratio was also reported to be a novel defined prognostic marker in several CVDs (32). For the first time, we assessed a possible relationship of the monocyte/HDL-C ratio with the grade of CCC in patients with CTO; however, we could not show significant associations between the monocyte/HDL-C ratio and collateral circulation. Therefore, we can speculate that the UA/HDL-C ratio could be a more sensitive marker than the others in predicting collateral development in patients with CTO.

It is well known that the severity of coronary stenosis constitutes a powerful independent determinant for the development of CCC (33). In our study however, the number of diseased vessels or the Gensini scores were similar between the two groups. Therefore, we suggest that a possible interference of the coronary stenosis on the formation of CCC could be ruled out based on our study. Furthermore, no differences were found among patients in potential confounding factors, such as HT, DM, and dyslipidemia. Therefore, we consider that the strength of our study results may have been increased by this way.

According to our study results, although UA/HDL-C ratio may be associated with collateral development, serum UA levels seem to be more sensitive than UA/HDL-C ratios in predicting poor development of CCC. It is hard to draw definite conclusions due to the small number of the study cohort and its retrospective nature; nevertheless, we can suggest that the UA/HDL-C ratio could be offered as a simple and easily measurable biomarker in predicting poorly developed CCC, and therefore the use of this novel index could provide improvements in patients' clinical management and in treatment strategies.

#### Study limitations

There are several limitations of this study. First, this was a retrospective, single-center, cross-sectional study, and it is limited by the relatively small sample size. Second, it is compelling to make a comment on the cause-effect relationship of the UA/HDL-C ratio and poorly developed CCC due to the cross-sectional plan of the present study. Third, because of the retrospective design of the study, we could not predict whether correcting serum UA and HDL-C levels via related treatment and consequently a decreased UA/HDL-C ratio could improve poorly developed CCC. Finally, it is known that diabetes or insulin resistance, and metabolic syndrome affect serum UA and HDL-C levels. Therefore, if the UA/HDL-C ratio was only studied in patients with diabetes or insulin resistance, the UA/HDL-C ratio might be a better biochemical indicator than serum UA alone. Prospective multicenter studies with a larger study population should be designed to provide more evidence.

#### CONCLUSION

The present study suggests that high serum UA and UA/HDL-C levels could be associated with a poor development of CCC.

Although, the UA/HDL-C ratios are not better than uric acid values to predict poor CCC, the use of this simple biomarker could still be considered in clinical practice and could provide insights for clinicians to predict collateral development in patients with CTO. Nevertheless, further multicenter prospective studies with larger populations are needed to validate our findings.

**Ethics Committee Approval:** This study was approved by Istanbul Faculty of Medicine Clinical Research Ethics Committee (Date: 27.10.2022, No: 1350712).

**Peer Review:** Externally peer-reviewed.

**Author Contributions:** Conception/Design of Study- D.B., S.E., A.E.; Data Acquisition- D.B., Z.G.D., S.E.; Data Analysis/Interpretation- D.B., E.A.G., S.E., A.E.; Drafting Manuscript- D.B., Z.G.D., E.A.G.; Critical Revision of Manuscript- D.B., S.E., A.E., Z.G.D.; Final Approval and Accountability- S.E., A.E., D.B.; Material and Technical Support- E.A.G, Z.G.D.; Supervision- S.E., A.E.

**Conflict of Interest:** The authors have no conflict of interest to declare.

**Financial Disclosure:** Authors declared no financial support.

#### REFERENCES

1. Kalkan M, Sahin M, Kalkan A, Guler A, Tas M, Bulut M, et al. The relationship between the neutrophil-lymphocyte ratio and the coronary collateral circulation in patients with chronic total occlusion. *Perfusion* 2014;29(4):360-6.
2. Kurtul A, Duran M. The correlation between lymphocyte/monocyte ratio and coronary collateral circulation in stable coronary artery disease patients. *Biomark Med* 2017;11(1):43-52.
3. Nacar AB, Erayman A, Kurt M, Buyukkaya E, Karakas MF, Akcay AB, et al. The relationship between coronary collateral circulation and neutrophil/lymphocyte ratio in patients with coronary chronic total occlusion. *Med Princ Pract* 2015;24(1):65-9.
4. Hein TW, Singh U, Vasquez-Vivar J, Devaraj S, Kuo L, Jialal I. Human C-reactive protein induces endothelial dysfunction and uncoupling of eNOS in vivo. *Atherosclerosis* 2009;206(1):61-8.
5. Teixeira BC, Lopes AL, Macedo RCO, Correa CS, Ramis TR, Ribeiro JL, et al. Inflammatory markers, endothelial function and cardiovascular risk. *J Vasc Bras* 2014;13:108-15.
6. Hakimzadeh N, Verberne HJ, Siebes M, Piek JJ. The future of collateral artery research. *Curr Cardiol Rev* 2014;10(1):73-86.
7. El Ridi R, Tallima H. Physiological functions and pathogenic potential of uric acid: A review. *J Adv Res* 2017;8(5):487-93.
8. Saito Y, Tanaka A, Node K, Kobayashi Y. Uric acid and cardiovascular disease: A clinical review. *J Cardiol* 2021;78(1):51-7.
9. Yu W, Cheng JD. Uric Acid and Cardiovascular Disease: An Update From Molecular Mechanism to Clinical Perspective. *Front Pharmacol* 2020;11:582680.
10. Liu GY, Meng XX, Zhang Z. Triglyceride to HDL-cholesterol ratio as an independent risk factor for the poor development of coronary collateral circulation in elderly patients with ST-segment elevation myocardial infarction and acute total occlusion.

- Medicine (Baltimore) 2018;97(39):e12587. doi: 10.1097/MD.00000000000012587
11. Monette JS, Hutchins PM, Ronsein GE, Wimberger J, Irwin AD, Tang C, et al. Patients with coronary endothelial dysfunction have impaired cholesterol efflux capacity and reduced HDL particle concentration. *Circ Res* 2016;119(1):83-90.
  12. Catapano AL, Graham I, De Backer G, Wiklund O, Chapman MJ, Drexel H, et al. 2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias. *Eur Heart J* 2016;37(39):2999-3058.
  13. Gensini GG. A more meaningful scoring system for determining the severity of coronary heart disease. *Am J Cardiol* 1983;51(3):606.
  14. Rentrop KP, Cohen M, Blanke H, Phillips RA. Changes in collateral channel filling immediately after controlled coronary artery occlusion by an angioplasty balloon in human subjects. *J Am Coll Cardiol* 1985;5(3):587-92.
  15. Sharaf El Din UAA, Salem MM, Abdulazim DO. Uric acid in the pathogenesis of metabolic, renal, and cardiovascular diseases: A review. *J Adv Res* 2017;8(5):537-48.
  16. Mandurino-Mirizzi A, Crimi G, Raineri C, Pica S, Ruffinazzi M, Gianni U, et al. Elevated serum uric acid affects myocardial reperfusion and infarct size in patients with ST-segment elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 2018;19(5):240-6.
  17. Katsiki N, Dimitriadis GD, Mikhailidis DP. Serum uric acid and diabetes: from pathophysiology to cardiovascular disease. *Curr Pharm Des* 2021;27(16):1941-51.
  18. Borghi C, Rodriguez-Artalejo F, De Backer G, Dallongeville J, Medina J, Nuevo J, et al. Serum uric acid levels are associated with cardiovascular risk score: A post hoc analysis of the EURIKA study. *Int J Cardiol* 2018;253:167-73.
  19. Wang Y, Zhang XY, Gao WH, Du MF, Chu C, Wang D, et al. Association of uric acid in serum and urine with arterial stiffness: Hanzhong Adolescent Hypertension Study. *Dis Markers* 2020;2020:1638515.
  20. Aydın C, Emlék N. The relationship between uric acid to high-density lipoprotein cholesterol ratio and collateral index in patients with chronic total occlusion. *Kardiologija* 2021;61(9):61-5.
  21. Schaper W, Sharma HS, Quinkler W, Markert T, Wünsch M, Schaper J. Molecular biologic concepts of coronary anastomoses. *J Am Coll Cardiol* 1990;15(3):513-8.
  22. Chen X, Lin Y, Tian L, Wang Z. Correlation between ischemia-modified albumin level and coronary collateral circulation. *BMC Cardiovasc Disord* 2020;20(1):326.
  23. Akbuga K, Ferik O K, Yayla KG, Aslan T, Eren M, Karanfil M, et al. Prognostic nutritional index as a new prediction tool for coronary collateral development. *Acta Cardiol Sin* 2022;38(1):21-6.
  24. Acar G, Kalkan ME, Avci A, Alizade E, Tabakci MM, Toprak C, et al. The relation of platelet-lymphocyte ratio and coronary collateral circulation in patients with stable angina pectoris and chronic total occlusion. *Clin Appl Thromb Hemost* 2015;21(5):462-8.
  25. Kasapkara HA, Topsakal R, Yarlioglu M, Yarlioglu G, Dogdu O, Ardic I, et al. Effects of serum uric acid levels on coronary collateral circulation in patients with non-ST elevation acute coronary syndrome. *Coron Artery Dis* 2012;23(7):421-5.
  26. Uysal OK, Sahin DY, Duran M, Turkoglu C, Yildirim A, Elbasan Z, et al. Association between uric acid and coronary collateral circulation in patients with stable coronary artery disease. *Angiology* 2014;65(3):227-31.
  27. Wan GX, Xia WB, Ji LH, Qin HL, Zhang YG. Triglyceride to high density lipoprotein cholesterol ratio may serve as a useful predictor of major adverse coronary event in female revascularized ST-elevation myocardial infarction. *Clin Chim Acta* 2018;485:166-72.
  28. Lüscher TF, Tanner FC, Noll G. Lipids and endothelial function: effects of lipid-lowering and other therapeutic interventions. *Curr Opin Lipidol* 1996;7(4):234-40.
  29. Liu R, Peng Y, Wu H, Diao X, Ye H, Huang X, et al. Uric acid to high-density lipoprotein cholesterol ratio predicts cardiovascular mortality in patients on peritoneal dialysis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2021;31(2):561-9.
  30. Kocak MZ, Aktas G, Erkus E, Sincer I, Atak B, Duman T. Serum uric acid to HDL-cholesterol ratio is a strong predictor of metabolic syndrome in type 2 diabetes mellitus. *Rev Assoc Med Bras (1992)* 2019;65(1):9-15.
  31. Ganjali S, Gotto AM, Jr., Ruscica M, Atkin SL, Butler AE, Banach M, et al. Monocyte-to-HDL-cholesterol ratio as a prognostic marker in cardiovascular diseases. *J Cell Physiol* 2018;233(12):9237-46.
  32. Jiang M, Yang J, Zou H, Li M, Sun W, Kong X. Monocyte-to-high-density lipoprotein-cholesterol ratio (MHR) and the risk of all-cause and cardiovascular mortality: a nationwide cohort study in the United States. *Lipids Health Dis* 2022;21(1):30.
  33. Pohl T, Seiler C, Billinger M, Herren E, Wustmann K, Mehta H, et al. Frequency distribution of collateral flow and factors influencing collateral channel development. Functional collateral channel measurement in 450 patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2001;38(7):1872-8.



# A STUDY ON THE FEASIBILITY AND REPEATABILITY OF FETAL BASILAR ARTERY DOPPLER MEASUREMENTS BETWEEN 11 AND 13+6 WEEKS OF GESTATION

## 11-13+6 GEBELİK HAFTALARI ARASINDA FETAL BAZİLER ARTER DOPPLER ÖLÇÜMLERİNİN UYGULANABİLİRLİĞİ VE TEKRARLANABİLİRLİĞİ ÜZERİNE BİR ÇALIŞMA

Tuğba SARAÇ SİVRİKOZ<sup>1</sup> , Selen GÜRSOY ERZİNCAN<sup>2</sup> , Gürcan TÜRKİYILMAZ<sup>3</sup> , Nihat DEMİRKOL<sup>1</sup> , Recep HAS<sup>1</sup> , İbrahim Halil KALELİOĞLU<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology Istanbul, Türkiye

<sup>2</sup>Bakirkoy Dr Sadi Konuk Training and Research Hospital, Department of Obstetrics and Gynecology Istanbul, Türkiye

<sup>3</sup>Van Lokman Hekim Hospital, Department of Obstetrics and Gynecology, Van, Türkiye

ORCID ID: T.S.S. 0000-0001-5482-9429; S.G.E. 0000-0003-1764-0285; G.T. 0000-0002-5514-0233; N.D. 0000-0001-6605-8166; R.H. 0000-0002-1372-8506; İ.H.K. 0000-0003-1349-2561

**Citation/Atf:** Sarac Sivrikoz T, Gursoy Erzincan S, Turkyilmaz G, Demirkol N, Has R, Kalelioglu IH. A study on the feasibility and repeatability of fetal basilar artery Doppler measurements between 11 and 13+6 weeks of gestation. Journal of Advanced Research in Health Sciences 2023;6(1):10-16. <https://doi.org/10.26650/JARHS2023-1202942>

### ABSTRACT

**Objective:** The fetal basilar artery Doppler (BA-D) measurements could be an easier alternative method to middle cerebral artery Doppler at the first trimester for the prediction of early fetal anemia. Our aim is to test its feasibility and construct reference ranges of BA-D at the first trimester

**Materials and Methods:** The study was analyzed retrospectively by using a transabdominal Doppler ultrasound which measured the fetuses at a crown-rump length (CRL) ranging from 45 to 81mm in 145 singleton pregnancies at the first trimester. The BA was imaged in the midsagittal plane, the pulse Doppler was placed just caudal to the anterior echogenic line of the brainstem, and the insonation angle was kept below 30°. The pulsatility index (PI) and peak systolic velocity (PSV) were also measured.

**Results:** A total of 138 out of the 145 fetuses were included. The mean CRL was 60.5±10.6 mm (range: 45-81mm). The mean nuchal translucency (NT) was 1.51±0.46 mm. The PI and PSV varied significantly, with the gestational age, CRL, NT, biparietal diameter ( $p < 0.05$ ), and regression models being constructed for each variable. The 5<sup>th</sup>, 50<sup>th</sup>, and 95<sup>th</sup> percentiles for the BA PI and PSV Doppler measurements at each gestational week were determined. Intraclass correlation coefficient for the BA PI and PSV measurements were 0.792 (95% CI=0.661-0.876;  $p < 0.01$ ) and 0.457 (95% CI=0.208-0.650;  $p < 0.01$ ), respectively.

**Conclusion:** The BA PI and PSV values were determined during the first trimester sonography of healthy fetuses. Intraobserver reproducibility is acceptable for BA and should be supported by new studies for its use in the diagnosis of early fetal anemia.

**Keywords:** Basilar artery, Doppler ultrasound, first trimester ultrasound, peak systolic velocity, pulsatility index

### ÖZ

**Amaç:** Fetal baziler arter Doppler (BA-D) ölçümleri, erken fetal anemi tahmini için ilk trimesterde orta serebral arter Doppleri'ne daha kolay bir alternatif olabilir. Amacımız, ilk trimesterde BA-D'nin fizibilitesini test etmek ve referans aralıklarını oluşturmaktır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışma retrospektif olarak planlanmış olup, ilk üç ayda trans abdominal Doppler ultrasonda baş-popo mesafesi (BPM) 45 ile 81 mm arasında ölçülen 145 tekil gebelik dahil edildi. BA midsagittal düzlemde görüntülenerek, puls Doppler beyin sapının ön ekojenik hattının hemen kaudale yerleştirilmiş ve insonasyon açısı 30°'nin altında tutulmuştur. Pulsatilite indeksi (PI) ve pik sistolik hız (PSH) ölçüldü.

**Bulgular:** 138 fetüs kriterlere uygun idi. Ortalama BPM 60.5±10,6 mm (aralık:45-81 mm), ortalama ense saydamlığı (ES) 1.51±0.46 mm'di. PI ve PSH; gebelik yaşı, BPM, ES, biparietal çap ile değişiklik göstermiş, her gebelik için regresyon modelleri oluşturulmuştur ( $p < 0.05$ ). Her gebelik haftasında BA PI ve PSH Doppler ölçümleri için 5.50. ve 95. persentiller belirlendi. BA PI ve PSH ölçümleri için korelasyon katsayısı sırasıyla 0.792 (%95 GA=0.661-0.876;  $p < 0.01$ ) ve 0.457 (%95 GA=0.208-0.650;  $p < 0.01$ ) idi.

**Sonuç:** BA PI ve PSV değerleri sağlıklı fetüsler birinci trimester sonografisi sırasında belirlenmiştir. Gözlemci içi tekrarlanabilirlik BA için kabul edilebilir olup erken fetal anemi tanısında kullanılması için yeni çalışmalarla desteklenmelidir.

**Anahtar Kelimeler:** Baziler arter, Doppler ultrason, ilk üçay sonografisi, pik sistolik hız, pulsatilite indeksi

**Corresponding Author/Sorumlu Yazar:** Tuğba SARAÇ SİVRİKOZ E-mail: tugbasrc@gmail.com

**Submitted/Başvuru:** 11.11.2022 • **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 10.12.2022 • **Last Revision Received/Son Revizyon:** 13.12.2022

• **Accepted/Kabul:** 19.12.2022 • **Published Online/Online Yayın:** 28.02.2023



This work is licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

## INTRODUCTION

Fetal anemia frequently occurs either secondary to Rh alloimmunization or parvovirus B19 infection and can be seen in early gestation, even if hydrops has not been developed yet (1-6). Especially in the history of Rh alloimmunization, if there is a pregnancy loss or hydrops due to fetal anemia before 20 weeks of gestation, there should be an earlier following up of the current pregnancy. Since a subsequent pregnancy will be at risk for anemia development, early screening would be appropriate and reasonable, starting approximately four to six weeks before the week of the previous pregnancy loss (7). Most studies address the evaluation of middle cerebral artery (MCA) by ultrasound to identify fetal anemia as a noninvasive screening tool (8-10). The measurement of peak systolic velocity (PSV) of MCA is currently necessary to diagnose fetal anemia. Therefore, nomograms of the MCA PSV and MCA pulsatility index (PI) for each week of gestational age starting from 11 weeks of gestation have been constructed (11-13).

In this respect, other cerebral arteries as internal carotid arteries (ICAs) and anterior cerebral artery (ACA) could also be used (6, 8, 9). While the examination of these arteries may be reasonable, the detection and measurement of each side can be more complicated and take more time due to fetal movement, size, and technical limitations. Moreover, the section and angle which are used to measure the MCA PSV or PI in the first trimester are not included in standard cranial ultrasonography plans. Sonographic evaluation of the fetal head in the midsagittal plane is an integral part of first trimester ultrasonography and is a familiar plan for sonographers. Hence, we suggest that the evaluation of the basilar artery (BA) may be an alternative path to MCA in the first trimester. Therefore, we aim to evaluate the feasibility and repeatability of the BA Doppler analysis of healthy fetuses and to establish normal reference values of BA Doppler indices at between 11 and 14 weeks of gestation.

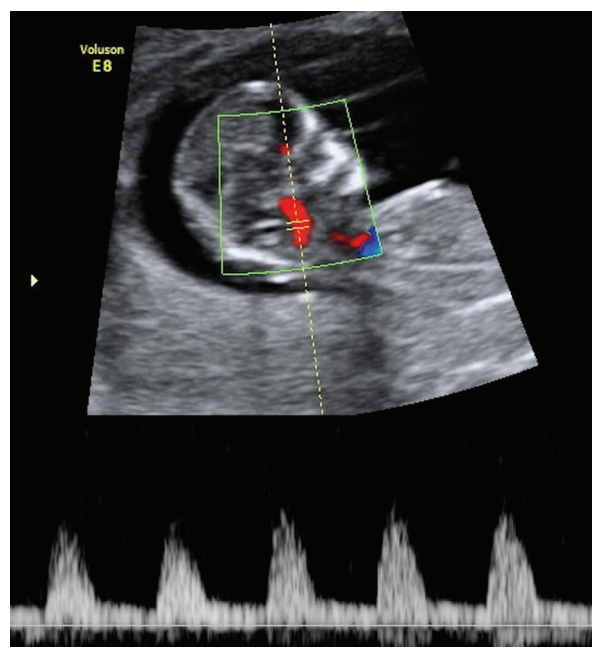
## MATERIALS and METHODS

The current study was performed between January 2019 and May 2020 in a private clinic. The BA Doppler flow measurements were performed on 145 consecutive patients admitted in a setting of first-trimester combined-screening tests for chromosomal abnormalities. The study was based on the principles of the Declaration of Helsinki. All patients gave informed consent to participate in the study prior to ultrasonographic examinations. This study was undertaken with the Institutional Review Board's approval (Number:1356719).

The inclusion criteria were singleton healthy pregnancies, crown-rump length (CRL) between 45 and 81mm, and the absence of fetal structural and chromosomal abnormalities at 11-13+6 weeks of gestation. Fetuses with any structural and/or chromosomal abnormalities, in utero fetal demise, those loss to follow-up, and abnormal fetal outcomes (such as intrauterine growth restriction) were excluded from the analysis. Ultrasonographic screenings and examinations for BA had been performed transabdominally using a 5-MHz curvilinear probe

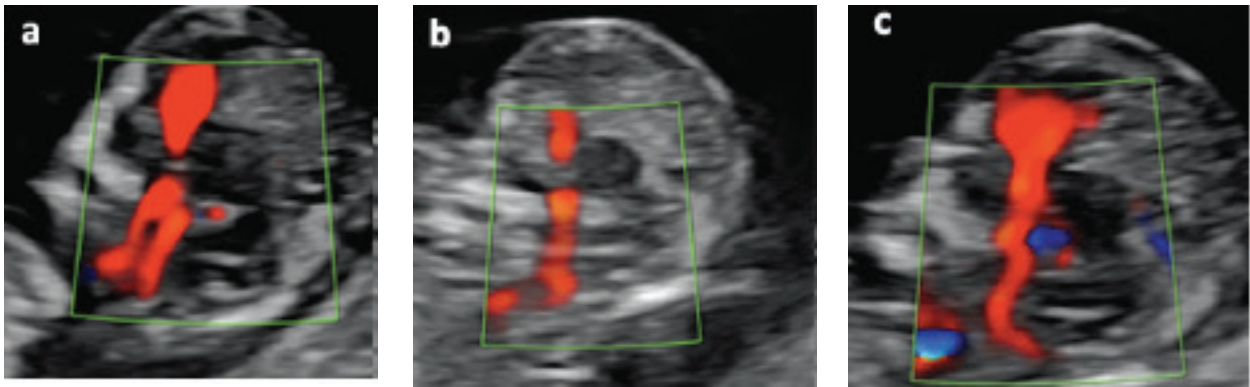
(Voluson E8, General Electrics Healthcare Technologies, Zipf, Austria) by only one author (I.H.K.) in all cases.

The BA Doppler measurements were performed as a part of first trimester chromosomal screening and anomaly scan. All pregnancies were followed-up and the perinatal outcomes were made available. To obtain a BA trace, we used the technique described for intracranial translucency by Chaoui et al. (14). The exact midsagittal plane of the fetal face was obtained, and the image was magnified until the fetal head and upper thorax occupied the whole screen. Following the visualization of the lines of brainstem, a color Doppler ultrasound was used to obtain the BA waveform. During the first trimester ultrasound scan, at a slightly parasagittal and oblique plane, three main arteries can be demonstrated. Distal to the level of the maxilla, there are two main cerebral arteries – posteriorly, the BA and anteriorly, one of the ICAs. In proximal continuation of these two arteries, cranial to the level of the maxilla, ACA can be detected. The ICA runs vertically upwards towards the base of the skull and travels closer to the maxilla, whereas the BA rises up from the groove just in front of the pons and travels closer and perpendicular to the echogenic lines of the brainstem, running towards the back of the fetal head. Therefore, in a slightly oblique plane, distal to the level of the maxilla, both arteries-anteriorly, ICA and posteriorly, BA – can be visualized. However, for the Doppler analysis of BA, we have avoided this oblique plane, and obtained the correct midsagittal plane. Only the BA and a portion of the ACA were identified in the correct midsagittal plane, and a gate of pulse Doppler was placed just caudal to the anterior echogenic line of brainstem using a color Doppler ultrasound (Figure 1). Figure 2c shows the incorrect,



**Figure 1:** Transabdominal insonation of the basilar artery (BA) at the first trimester. The BA was identified along the sagittal plane anterior to the brainstem using color Doppler ultrasound.





**Figure 2:** Approach to imaging of the basilar artery (BA) on color Doppler **a)** Incorrect plane; the internal carotid artery (ICA) is also seen in this plane anterior to the BA. Proximally, the anterior cerebral artery (ACA) is also seen, **b)** Suboptimal plane which shows the course of BA and a part of ACA. This plane is suboptimal because the borders of brainstem are not clear, **c)** The ideal plane which shows the BA, ACA, and the anterior and posterior borders of the brainstem. The BA was identified optimally in this correct midsagittal plane where ICA was not visualized. Measurements were obtained at the anterior line of the brainstem

suboptimal, and optimal planes to image the BA on a color Doppler ultrasound.

While measuring the BA PI and BA PSV, the insonation angle was kept between 0-30°. The pulse repetition frequency values were kept between 7 and 18 kHz. Mechanic and thermal indices below 1 were maintained, minimizing the examination time with color and the pulse wave Doppler to less than two minutes (15-17). All Doppler measurements were performed in the absence of fetal movements while the fetus was facing up, with the neck in neutral position, neither hyperextended nor hyperflexed. In order to calculate intraobserver repeatability, the measurements were performed two times in the first 50 consecutive fetuses.

The maternal characteristics as age (years), body mass index (BMI) (kg/m<sup>2</sup>), number of pregnancies, parity, gestational age (GA) at ultrasound examination, CRL, biparietal diameter (BPD), and nuchal translucency (NT) were expressed by mean±standard deviation (SD) and ranges. The intraobserver repeatability was expressed as the intraclass correlation coefficient (ICC). The sample size was calculated according to the study conducted by Bellera et al. for uniform gestational age distribution to produce a 90% confidence interval for the 95% BA PI or PSV reference limit, with a relative margin of error of 17% when compared with the 95% reference range (the alpha error was taken as 0.1 instead of 0.05) (18).

## RESULTS

This study included 145 singleton pregnancies. BA waveforms were technically non-acceptable in five cases; and in two cases, fetal structural anomalies were detected during follow-up. One of these cases had agenesis of corpus callosum, the other case had a congenital diaphragmatic hernia; both of them went to termination of the pregnancy. Therefore, seven cases were

excluded and a total of 138 fetuses were included in the final analysis. The visualization and evaluation of the BA Doppler indices were available in 96.5% (140/145) of cases at the time of NT measurement. The distribution of pregnancies in each GA was as following: 11-11+6 weeks:44, 12-12+6 weeks:44, and 13-13+6 weeks:50.

The mean ± SD and ranges of age (years), BMI (kg/m<sup>2</sup>), number of pregnancies, parity, GA at ultrasound scan (weeks), CRL (mm), BPD (mm), and NT (mm) were: 31.67±4.98 (20-39), 24.18±3.45 (17.01 -35.12), 2±1 (1-8), 0.5±0.7 (0-3), 60.54±10.66 (45-81), 19.67±2.73 (15-25), and 1.51±0.46 (0.8-2.9), respectively. The average GA at delivery was 37.8±2.71 weeks and the average birth weight was (±SD) was 3076±550g. The BA PI and PSV varied significantly with gestational age, CRL, and biparietal diameter (p<0.05) (Table 1).

Linear regression analyses were the best fit curves as follows: BA PI measurement = 2.8-0.106×GA (weeks) (R<sup>2</sup>=0.274), and for BA PSV measurement=4.785+0.991×GA (weeks) (R<sup>2</sup>=0.205). The BA PI decreased significantly with GA, CRL, BPD, and NT (p<0.05), whereas the BA PSV was found to increase significantly with GA, CRL, BPD, and NT (p<0.05). Table 2 shows the 5<sup>th</sup>, 50<sup>th</sup>, and 95<sup>th</sup> percentiles for the BA PI and PSV measurements at each GA. Figure 3 shows the scatterplot for the BA PI measurement as a function of GA (weeks). Figure 4 shows the scatterplot for the BA PSV measurement as a function of GA (weeks). Figures 5 and 6 show the distribution of the percentiles of the BA PI and PSV values according to GA, respectively. The ICC for the BA PI and PSV measurements were 0.792 (95% CI=0.661-0.876; p<0.01) and 0.457 (95% CI=0.208-0.650; p<0.01), respectively. The intraobserver repeatability was found to be acceptable for BA PI and PSV measurements.

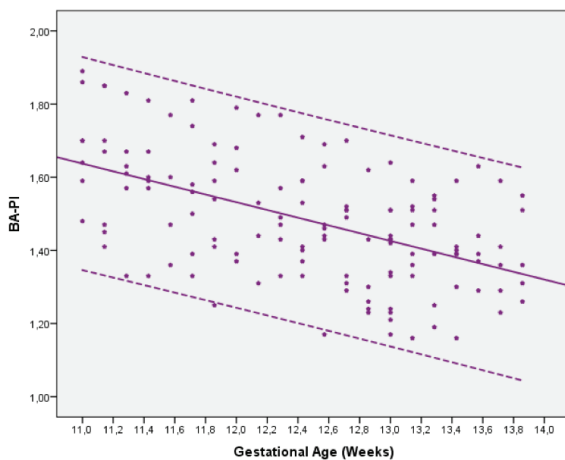
**Table 1:** Evaluation of the relationship between maternal age, crown-rump length (CRL in millimeters), biparietal diameter (BPD in millimeters), nuchal translucency (NT in millimeters) measurements, and fetal basilar artery pulsatility index (PI) and peak systolic velocity (PSV) measurements

	Basilar Artery PI		Basilar Artery PSV	
	r	p	r	p
Maternal age (years)	-0.053 <sup>a</sup>	<b>0.537</b>	0.087 <sup>a</sup>	<b>0.312</b>
Gestational age	-0.501 <sup>b</sup>	<b>0.001**</b>	0.409 <sup>b</sup>	<b>0.001**</b>
CRL (mm)	-0.498 <sup>b</sup>	<b>0.001**</b>	0.406 <sup>b</sup>	<b>0.001**</b>
BPD (mm)	-0.481 <sup>b</sup>	<b>0.001**</b>	0.398 <sup>b</sup>	<b>0.001**</b>

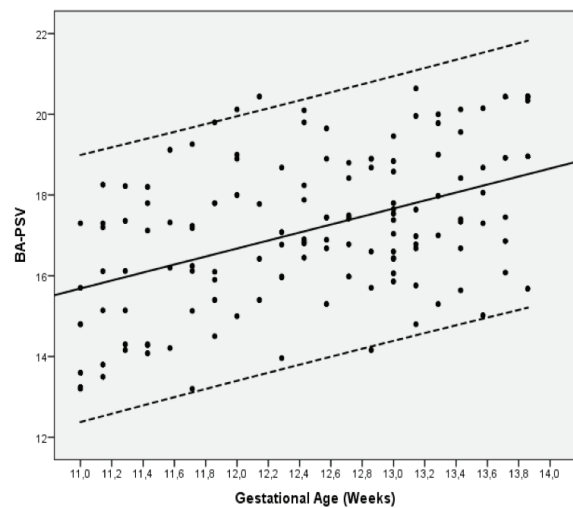
<sup>a</sup>: Pearson correlation coefficient, <sup>b</sup>: Spearman's correlation coefficient, \*p<0.05, \*\*p<0.01

**Table 2:** Nomogram of the Basilar Artery (BA) pulsatility index (PI) and peak systolic velocity (PSV) values at the 5<sup>th</sup>, 50<sup>th</sup>, and 95<sup>th</sup> percentile for each gestational age

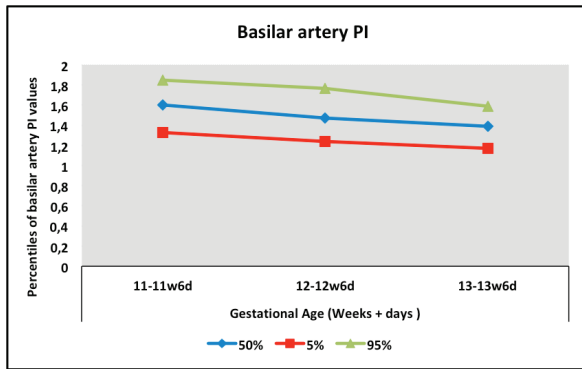
		Basilar Artery PI					
		n	Min-Max	Mean±SD	Per 5%	Per 50%	Per 95%
Gestational age (weeks+ days)	11-11 w 6 d	44	1.25-1.89	1.59±0.16	1.33	1.60	1.85
	12-12 w 6 d	44	1.17-1.79	1.48±0.16	1.24	1.47	1.77
	13-13 w 6 d	50	1.16-1.64	1.40±0.13	1.17	1.39	1.59
		Basilar Artery PSV					
		n	Min-Max	Mean±SD	Per 5%	Per 50%	Per 95%
Gestational age (weeks+ days)	11-11 w 6 d	44	13.20- 19.80	15.99±1.80	13.24	16.11	19.12
	12-12 w 6 d	44	13.96-20.44	17.1±1.57	15.00	17.43	20.10
	13-13 w 6 d	50	14.80-20.64	17.86±1.64	15.30	17.59	20.44



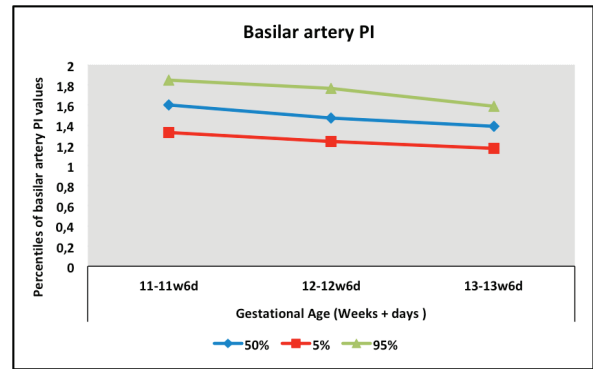
**Figure 3:** Reference values for the pulsatility index (PI) of basilar artery (BA) in first-trimester healthy fetuses (mean, 5<sup>th</sup>, and 95<sup>th</sup> percentiles)



**Figure 4:** Reference values for the peak systolic velocity (PSV) of the basilar artery (BA) in first-trimester healthy fetuses (mean, 5<sup>th</sup>, and 95<sup>th</sup> percentiles)



**Figure 5:** The distribution of the percentiles of the basilar artery (BA) pulsatility index (PI) values according to gestational age



**Figure 6:** The distribution of the percentiles of basilar artery (BA) peak systolic velocity (PSV) values according to gestational age

## DISCUSSION

Although the vertebrobasilar circulation is known to be developed by nine weeks of gestation, the literature regarding the posterior cerebral circulation is very limited, especially in the first trimester (19-20). In 1996, Pooh and Aono used a transvaginal approach to demonstrate the fetal brain by using power Doppler technique (19). Their study showed clear images of fetal vertebral arteries, the BA, and posterior cerebral arteries in the coronal plane at 12 weeks of gestation. In another study, Danon et al. evaluated fetal cerebral vasculature by using a high-definition Doppler with three-dimensional ultrasound volume data sets in 25 patients between 12.3 and 36.3 weeks of gestation (20). However, in this study, only two patients were evaluated in the first trimester, whereas the rest were in the second or third trimester. Although their study did not provide a detailed information about patients' characteristics in whom BA was identified, it was reported that the visualization rate of BA at midsagittal plane was approximately 88%. In the current study, the visualization and evaluation of the BA indices were feasible in 96.5% of cases, despite being in the first trimester. The mean value of maternal BMI in our study group was in the normal weight range (24.18 kg/m<sup>2</sup>), therefore we could not find any impact of maternal BMI on BA Doppler indices' measurement.

In the current study, we established the reference values for BA PI and PSV Doppler measurements between 11 and 13+6 weeks of gestation. It was found that the BA PSV increases as the weeks progressed. This finding is similar to the previous study conducted by Qureshi (21). They demonstrated the feasibility of visualizing and measuring the flow velocities of BA in 18 fetuses with a GA ranging from 19 weeks to 38 weeks and an increase in BA PSV according to GA. The fact that the study groups are quite small and heterogeneous, as well as the fact that they and cover the second and third trimesters, constitutes important differences from our study. However, the results of both studies indicate that the BA PSV appears to increase slightly within weeks of the first trimester

and continues to increase at a higher rate as pregnancy progresses.

It is known that MCA Doppler indices have a major effect on the early non-invasive assessment of fetuses at risk for fetal anemia after 15 weeks of gestation (22). An evaluation of the MCA Doppler indices should be obtained in the axial view of the fetal head and measured with an insonation angle close to zero in order to obtain 100% accuracy. It is also suggested that MCA PSV may accurately predict fetal anemia in the first half of the pregnancy (11-13). However, in the first trimester, it may be difficult to keep the angle close to zero technically, especially before 14 weeks of gestation. With the experience of the NT measurement, in the same sonographic plane, our findings support that BA Doppler evaluation appears to be easier and more practical compare to first-trimester MCA Doppler assessment. In addition, Tongsong et al. presented the distribution of MCA PSV measurement in the first half of pregnancy by weeks in their study (12). In this study, intraobserver variability was found to be 6.1% between 11-22 weeks of gestation, but it was not mentioned whether this result differed between the first trimester and early second trimester, nor how many of the patients were between 11-14 weeks. According to our results, the ICC for BA PI and PSV measurements were found to be 0.792 and 0.457, respectively, and their repeatability were found acceptable. We believe that BA Doppler evaluation may be an alternative method to discover fetal anemia before 14 weeks of gestation and needs further investigation to demonstrate its importance in terms of anemia prediction.

A small sample size and performance of BA Doppler indices' measurements by the same author are the main limitations' of the current study. Therefore, the interobserver variability and reproducibility were not assessed completely. The sample size was calculated relative to produce a 90% confidence interval (alpha error was taken as 0.1 instead of 0.05), as a pilot study was designed. Our study was designed in a prospective manner in a larger population compared to previous studies, which were involved BA insonation

in the first-trimester sonography (19-21). Nevertheless, the current results demonstrated an acceptable intraobserver repeatability for BA PI and PSV. The current study's design is clear and distinct compared to the methodologies of previous prenatal studies regarding the BA Doppler, where the evaluations are unclear.

In conclusion, the nomogram of the BA Doppler indices during first-trimester scanning was constructed in the current study. So far, this is the only study in which fetal BA Doppler evaluation and measurements on healthy fetuses were presented in first trimester sonography. These results should be confirmed with more studies. In addition, the reproducibility of the BA Doppler indices' at the first trimester to detect early fetal anemia should be established before using this method in clinical practice.

---

**Ethics Committee Approval:** This study was approved by Istanbul Faculty of Medicine Clinical Research Ethics Committee (Date: 21.10.2022, No: 19).

**Peer Review:** Externally peer-reviewed.

**Author Contributions:** Conception/Design of Study- T.S.S., İ.H.K.; Data Acquisition- İ.H.K., S.G.E, G.T., N.D.; Data Analysis/Interpretation- İ.H.K., R.H.; Drafting Manuscript- T.S.S., İ.H.K., S.G.E., G.T., N.D.; Critical Revision of Manuscript- İ.H.K., R.H.; Final Approval and Accountability- T.S.S., İ.H.K., R.H., S.G.E.; Material and Technical Support- G.T., N.D.; Supervision- İ.H.K., R.H.

**Conflict of Interest:** The authors have no conflict of interest to declare.

**Financial Disclosure:** The authors declared that this study has received no financial support.

## REFERENCES

1. Figueroa-Diesel H, Hernández-Andrade E, Acosta-Rojas R, Cabero L, Gratacos E. Doppler changes in the main fetal brain arteries at different stages of hemodynamic adaptation in severe intrauterine growth restriction. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2007;30(3):297-302.
2. Vollgraff Heidweiller-Schreurs CA, De Boer MA, Heymans MW, Schoonmade L, Bossuyt PMM, Mol BWJ, et al. Prognostic accuracy of cerebroplacental ratio and middle cerebral artery Doppler for adverse perinatal outcome: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2018;51(3):313-22.
3. Baschat AA, Gembruch U, Reiss I, Gortner L, Weiner CP, Harman CR. Relationship between arterial and venous Doppler and perinatal outcome in fetal growth restriction. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2000;16(5):407-13.
4. Prefumo F, Fichera A, Fratelli N, Sartori E. Fetal anemia: Diagnosis and management. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2019;58:2-14.
5. Abbasi N, Johnson JA, Ryan G. Fetal anemia. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2017;50(2):145-53.
6. Dubiel M, Gunnarsson GO, Gudmundsson S. Blood redistribution in the fetal brain during chronic hypoxia. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2002;20(2):117-21.
7. Kempe A, Rösing B, Berg C, Kamil D, Heep A, Gembruch U, et al. First-trimester treatment of fetal anemia secondary to parvovirus B19 infection. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2007;29(2):226-8.
8. Benavides-Serralde JA, Hernández-Andrade E, Figueroa-Diesel H, Oros D, Feria LA, Scheier M, et al. Reference values for Doppler parameters of anterior cerebral artery throughout gestation. *Gynecol Obstet Invest* 2010;69(1):33-9.
9. Benavides-Serralde JA, Hernández-Andrade E, Cruz-Martinez R, Cruz-Lemini M, Scheier M, Figueras F, et al. Doppler evaluation of the posterior cerebral artery in normally grown and growth-restricted fetuses. *Prenat Diagn* 2014;34(2):115-20.
10. Ciobanu A, Wright A, Syngelaki A, Wright D, Akolekar R, Nicolaides KH. Fetal Medicine Foundation reference ranges for umbilical artery and middle cerebral artery pulsatility index and cerebroplacental ratio. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2019;53(4):465-72.
11. Abu-Rustum RS, Ziade MF, Ghosn I, Helou N. Normogram of middle cerebral artery Doppler indexes and cerebroplacental ratio at 12 to 14 weeks in an unselected pregnancy population. *Am J Perinatol* 2019;36(2):155-60.
12. Tongsong T, Wanapirak C, Sirichotiyakul S, Tongprasert F, Srisupundit K. Middle cerebral artery peak systolic velocity of healthy fetuses in the first half of pregnancy. *J Ultrasound Med* 2007;26(8):1013-7.
13. Rujiwetpongstorn J, Phupong V. Doppler waveform indices of middle cerebral artery of normal fetuses in the first half of pregnancy in the Thai population. *Arch Gynecol Obstet* 2007;276(4):351-4.
14. Chaoui R, Benoit B, Mitkowska-Wozniak H, Heling KS, Nicolaides KH. Assessment of intracranial translucency (IT) in the detection of spina bifida at 11-13 week scan. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009;34(3):249-52.
15. Official Statement AIUM. As Low As Reasonably Achievable (ALARA) Principle. Approved 3/16/2008; Reapproved 4/2/2014. Available at: <http://www.aium.org/officialStatements/39>. Accessed June 5, 2018.
16. Official Statement AIUM. Statement on the Safe Use of Doppler Ultrasound During 11-14 week scans (or earlier in pregnancy). Approved 4/18/2011; Revised 3/21/2016, 10/30/2016. Available at: <http://www.aium.org/officialStatements/42>. Accessed June 5, 2018.
17. Salvesen K, Lees C, Abramowicz J, Brezinka C, Ter Haar G, Maršál K. ISUOG statement on the safe use of Doppler in the 11 to 13+6-week fetal ultrasound examination. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2011;37(6):628.
18. Bellera CA, Hanley JA. A method is presented to plan the required sample size when estimating regression-based reference limits. *J Clin Epidemiol* 2007;60(6):610-5.
19. Pooh RK, Aono T. Transvaginal power Doppler angiography of the fetal brain. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1996;8(6):417-21.
20. Danon E, Weisz B, Achiron R, Pretorius DH, Weissmann-Brenner A, Gindes L. Three-dimensional ultrasonographic depiction of fetal brain blood vessels. *Prenat Diagn* 2016;36(5):407-17.
21. Qureshi AI, Miran MS, Degenhardt J, Axt-Flidner R, Kohl T.

Transabdominal insonation of fetal basilar artery: a feasibility study. J Neuroimaging 2016;26(2):180-3.

22. Mari G, Adrignolo A, Abuhamad AZ, Pirhonen J, Jones DC,

Ludomirsky A, et al. Diagnosis of fetal anemia with Doppler ultrasound in the pregnancy complicated by maternal blood group immunization. Ultrasound Obstet Gynecol 1995;5(6):400-5.

# HEDEFLENMİŞ RADYONÜKLİT TEDAVİLERDE ÇALIŞAN RADYASYON GÖREVLİLERİNİN UZUN DÖNEM ABSORBE RADYASYON DOZLARININ BELİRLENMESİ VE DEĞERLENDİRİLMESİ

## DETERMINATION AND EVALUATION OF LONG-TERM ABSORBED RADIATION DOSES OF RADIATION WORKERS WORKING IN TARGETED RADIONUCLIDE THERAPIES

Nazenin İPEK IŞIKCI<sup>1</sup> , Mustafa DEMİR<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Nişantaşı Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Bilgisayar Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup>İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Nükleer Tıp Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ORCID ID: N.İ.İ 0000-0003-2337-2598; M.D. 0000-0002-9813-1628

**Atf/Citation:** Ipek Isicki N, Demir M. Hedeflenmiş radyonüklit tedavilerde çalışan radyasyon görevlilerinin uzun dönem absorbe radyasyon dozlarının belirlenmesi ve değerlendirilmesi. Journal of Advanced Research in Health Sciences 2023;6(1):17-22. <https://doi.org/10.26650/JARHS2023-1170216>

### ÖZ

**Amaç:** Nükleer tıpta radyonüklit tedavilerde çalışan radyasyon görevlilerinin uzun dönemde maruz kaldığı radyasyon dozlarının belirlenmesi ve rutin olarak yapılan her bir tedavi prosedürünün bu dozlara katkısının belirlenmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** 6 yıl boyunca rutin olarak İyot-131 (131I) tedavisi, (Lutesyum-177 (177Lu) tedavisi, Yitrium-90 (90Y) mikrosfer tedavisi ve 131I MIBG (Meta-İyodobenzilguanidin) tedavisi uygulayan doktor, hemşire, sağlık fizikçisi, radyofarmasist ve temizlik personelinin kişisel dozimetri kayıtları geriye dönük olarak incelendi. Aynı dönemde gerçekleştirilmiş olan tedavi sayıları ve bu tedavilerde görevli olanlar belirlendi. Bu bilgilerden radyasyon görevlilerinin tedavilerdeki absorbe radyasyon dozları ile prosedür başına doz değerleri çıkarıldı.

**Bulgular:** Yıllık ortalama radyasyon dozları en yüksek radyofarmasistlerde 2185±1839 µSv bulundu. Hemşirelerde 786±943 µSv, sağlık fizikçilerinde 753±706 µSv, doktorlarda 626±741 µSv ve temizlik görevlisi personellerde 961±1099 µSv olarak hesaplandı. Prosedür başına hesaplanan ortalama doz değerleri en yüksek doktorlarda 129±208 µSv olarak bulundu. Hemşirelerde 122±187 µSv, sağlık fizikçilerinde 76±122 µSv, radyofarmasistlerde 76±52 µSv, temizlik görevlisi personellerde 42±64 µSv bulundu.

**Sonuç:** Radyofarmasötiklerin hazırlanması sırasında, hastaya uygulanması sırasında ve hastanın tedavi servisinde yattığı süre boyunca doz aşımı olmaması, belirlenen radyasyon dozlarının izin verilen güvenli değerlerde olduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Absorbe doz, personel dozları, radyonüklit tedavi, 131I tedavisi, 177Lu tedavisi

### ABSTRACT

**Objective:** It is aimed to determine the radiation doses to which radiation workers working in radionuclide treatments in nuclear medicine are exposed in the long term and to determine the contribution of each routine treatment procedure to these doses.

**Materials and Methods:** The personal dosimetry records of doctors, nurses, health physicists, radiopharmacists, and cleaning staff, who routinely applied 131I treatment, 177Lu treatment, 90Y microsphere treatment, and 131I MIBG treatments were retrospectively analyzed for 6 years. The number of treatments performed in the same period and the persons assigned to these treatments were determined. Absorbed radiation doses of radiation workers in treatments and dose values per procedure were deduced from this information.

**Results:** The highest average annual radiation dose was found to be 2185±1839 µSv in radiopharmacists. It was calculated as 786±943 µSv in nurses, 753±706 µSv in health physicists, 626±741 µSv in doctors and 961±1099 µSv in cleaning staff. The mean dose values calculated per procedure were found to be 129±208 µSv in the highest physicians. It was found 122±187 µSv in nurses, 76±122 µSv in health physicists, 76±52 µSv in radiopharmacists, and 42±64 µSv in cleaning staff.

**Conclusion:** It was demonstrated that the annual radiation doses were within the permissible safe values and there was no excessive radiation exposure during radiopharmaceuticals preparation, administration to patients, and during the patients' stay in the therapy unit.

**Keywords:** Absorbed dose, staff doses, radionuclide therapy, 131I therapy, 177Lu therapy

**Sorumlu Yazar/Corresponding Author:** Nazenin İPEK IŞIKCI E-mail: [nazenin.ipek@nisantasi.edu.tr](mailto:nazenin.ipek@nisantasi.edu.tr)

**Başvuru/Submitted:** 02.09.2022 • **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 29.11.2022 • **Son Revizyon/Last Revision Received:** 30.11.2022 •

**Kabul/Accepted:** 01.12.2022 • **Online Yayın/Published Online:** 14.02.2023



This work is licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License



## GİRİŞ

Nükleer Tıpta uygulanan ve önemi giderek artan Hedeflenmiş Radyonüklit Tedavi (HRT) bazı kanser hastalarında yüz güldürücü sonuçlar doğurmaktadır. Bu uygulamalardan birisi tiroit hastalıklarında radyoiyot (<sup>131</sup>I) uygulamasıdır. Tiroit kanserlerinin ve hipertiroidin tedavisinde kurumumuzun yaklaşık 60 yıllık başarılı bir geçmişi vardır. <sup>131</sup>I 20. yüzyılın ortalarında ilk defa hipertiroidi tedavisi amacıyla kullanılmış, o günden sonra da hipertiroidi ve diferansiye tiroit kanseri hastalarında teranostik olarak kullanılmaktadır (1). <sup>131</sup>I radyoizotopunun maksimum beta enerjisi 606 keV, gama enerjisi 364 keV olup tiroit hastalıklarında iyi bir teranostiktir. Son yıllarda kullanımı giderek yaygınlaşan Yttrium 90 (<sup>90</sup>Y) radyomikroküre tedavisi (radyoembolizasyon, selektif intraarteriyel radyomikroküre tedavisi) karaciğer tümörlerinin lokal tedavisinde önemli bir adım olmuştur. <sup>90</sup>Y radyonükliti ortalama enerjisi 930 keV maksimum enerjisi 2284 keV olan monoenerjistik beta salınımı yapar. İleri evre primer ve metastatik karaciğer tümörlerinin tedavisindeki palyatif etkisi klinik çalışmalarda tanımlanmış olan bu tedavinin, kişiselleştirilmiş güncel uygulamaları özellikle primer karaciğer tümörlerinin erken ve intermediate evrede tedavisine de alternatif oluşturmaktadır (2,3). Kastrasyona dirençli prostat kanserlerinin tedavisinde Lutecium-177 prostat spesifik membran antijeni (<sup>177</sup>Lu PSMA) kullanımı günden güne artmaktadır. <sup>177</sup>Lu radyoizotopunun maksimum beta enerjisi 497 keV, gama enerjileri 113 ve 208 keV olup iyi bir teranostiktir. <sup>177</sup>Lu PSMA tedavisi sistemik bir internal tedavi uygulaması olmasının avantajıyla belirgin ağrı palyasyonu da sağlamaktadır (4). <sup>177</sup>Lu radyonüklitin bir başka başarılı uygulama alanı da nöroendokrin tümör tedavisidir. Peptid radyonüklit reseptör tedavisi (PRRT) 20 yılı aşan bir süredir ileri evre nöroendokrin tümörlerin sistemik tedavisinde kullanılmaktadır. Bu radyofarmasötikte hedef olarak somatostatin reseptörleri, taşıyıcı olarak ise somatostatin analogları kullanılır. En yaygın kullanılan radyoaktif ajanlardan birisi Octreotate (DOTA-0-Tyr3-Octreotate, DOTATATE)'dir.

HRT'de radyofarmasötikler üç ana başlık altında gösterilmektedir. Birincisi: radyonüklitin uygun fiziksel özellikleri, ikincisi: radyasyonla etkileşen hücre duyarlılığı, üçüncüsü: herhangi bir radyonükliti tümöre taşıyan molekül, yani biyolojik ajandır. Dolayısıyla günümüz modern nükleer tıbbi, bu üç özelliği birleştiren multidisipliner bir bilimdir. Dozimetriye dayalı tedavi, radyonüklit tedavisi ve terapötik aktivite belirlemede daha fazla doğruluk ve özgünlük için genellikle sağlık fizikçisi tarafından gerçekleştirilir. Hücrelerin radyosensitivitesi ile ilgili aktivite yönetiminden hekimler ve hemşireler sorumludur. Biyoaktif ajanların özelliklerinin belirlenmesi ve etiketlenmesi radyofarmasötik departmanına özeldir (5).

Radyasyon ile yapılan uygulamalarda çalışanların güvenliği için kişisel doz ölçümünün yapılması gerekmektedir. Uluslararası Radyasyon Korunması Komisyonu tarafından radyasyon ile çalışan personellerin yıllık efektif doz limitleri için ardışık 5 yılın ortalamasının 20 mSv'den fazla olamayacağı, parmak dozlarının ise en fazla 500 mSv olabileceği bildirilmiştir. Ayrıca radyasyon görevlilerinin çalışma alanlarındaki doz hızı 10  $\mu$ Sv<sup>-1</sup> değeri geçmemelidir (6).

Radyasyondan korunmada en yaygın optimizasyon kuralı ALARA (As Low As Reasonably Achievable) ilkesidir. Nükleer tıp için de uygulanması gereken bu ilke radyasyon ile yapılan çalışmalarda mümkün olan en az dozun alınmasını önermektedir.

Çalışmamızda, HRT uygulamalarında çalışan radyasyon görevlilerinin maruz kaldığı radyasyon dozlarının ve rutin olarak yapılan her bir işlemin bu dozlara ne kadar katkısının olduğunu belirlemek amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Etik Kurul izni alındıktan sonra retrospektif olarak Nükleer Tıp Anabilim Dalında yapıldı. (Etik Kurul Tarih: 22.02.2022, No: 32). Çalışmada İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Nükleer Tıp Anabilim Dalında rutin olarak yapılmakta olan <sup>131</sup>I ile tiroit kanseri ve hipertiroidi tedavisi, <sup>177</sup>Lu DOTATATE ile nöroendokrin tümör tedavisi, <sup>177</sup>Lu PSMA ile prostat tümör tedavisi, <sup>90</sup>Y mikroküre karaciğer tümör tedavisi ve <sup>131</sup>I MIBG tedavilerinde Optik Uyarmalı Lüminesans (OSL) dozimetreler ile kaydedilen absorbe radyasyon dozları retrospektif olarak incelendi. Çalışmanın yapıldığı denetimli alanlarda 13 doktor, 5 hemşire, 4 sağlık fizikçisi, 3 radyofarmasist ve 3 temizlik görevlisi olmak üzere toplam 28 sağlık çalışanı görev yaptı. Hipertiroidi tedavilerinde sağlık fizikçileri ve doktorlar görev aldı. Tiroit kanseri tedavilerinde doktorlar, hemşireler, sağlık fizikçileri görev aldı. <sup>177</sup>Lu tedavilerinde doktorlar, hemşireler, radyofarmasistler ve sağlık fizikçileri görev aldı. <sup>90</sup>Y tedavilerinde doktorlar, hemşireler, radyofarmasistler ve sağlık fizikçileri görev aldı. <sup>131</sup>I MIBG tedavilerinde doktorlar, hemşireler, sağlık fizikçileri görev aldı. Radyofarmasistler radyofarmasötiklerin hazırlanmasından ve kalite kontrolünden, doktor ve hemşireler radyofarmasötiklerin uygulamasından, sağlık fizikçileri radyasyon korunmasından ve doz hızlarının ölçülmesinden sorumlu oldular. Temizlik personelleri gerekli durumlarda hastanın nakledilmesi ve radyoaktif atıkların temizlenmesinden sorumlu oldular. 2016-2021 dönemlerini kapsayan 6 yıllık süreçte personel dozimetre kayıtları retrospektif olarak değerlendirildi.

2017-2021 yıllarına ait rutin HRT uygulanan tetkik sayıları ayrı ayrı belirlendi. Belirlenen tetkikler tedavi çeşidine göre gruplandırıldı. Bu çalışmaya dâhil edilen toplam 4864 olan tetkik sayısının 2906 tanesi radyoiyot (tiroid c.a) tedavisine, 637'si hipertiroidi tedavisine, 945'i nöroendokrin tümör tedavisine, 327'si karaciğer tümör tedavisine ve 49 tedavi ise <sup>131</sup>I MIBG tedavisine aittir. Tedavilerde kullanılan aktivite miktarları; <sup>131</sup>I tiroit kanseri tedavisi için 30-300 mCi (1110-11100 MBq); hipertiroidi tedavisi için 6-25 mCi (222-925 MBq); <sup>90</sup>Y mikroküre karaciğer kanser tedavisi için 35-80 mCi (1295-2960 MBq) ve <sup>177</sup>Lu DOTATATE Nöroendokrin tümör tedavisi ve <sup>177</sup>Lu PSMA Prostat kanseri tedavisi için 100-200 mCi (3700-7400 MBq) olarak belirlendi.

**İstatistiksel Yöntem:** Radyonüklit tedavilerde görevli beş meslek grubu üyelerine 6 yıl içinde ikişer aylık periyotlar ile toplam 642 kez dozimetre okuması yapıldı. Dozimetre okuma değerleri arasındaki istatistiksel anlamlılık Mann-Whitney U testi ile belirlendi.

## BULGULAR

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Nükleer Tıp Ana-bilim Dalında görev yapan radyasyon görevlisi personeller için (13 doktor, 5 hemşire, 4 sağlık fizikçisi, 3 radyofarmasist, 3 temizlik görevlisi personeli) OSL dozimetreler ile ölçülen ve retrospektif olarak hesaplanan 5 yıllık radyasyon dozları Tablo 1'de verildi. Radyonüklit tedavi alanlarında rutin işlemler sırasında çalışanların aldığı yıllık ortalama radyasyon dozları en yüksek radyofarmasistlerde  $2185\pm 1839$   $\mu\text{Sv}$  olarak bulundu. Diğer görevlilerden hemşirelerde  $786\pm 943$   $\mu\text{Sv}$ , sağlık fizikçilerinde  $753\pm 706$   $\mu\text{Sv}$ , doktorlarda  $626\pm 741$   $\mu\text{Sv}$  ve temizlik görevlisi personellerde  $961\pm 1099$   $\mu\text{Sv}$  olarak hesaplandı (Şekil 1).

Yıllık tedavi sayıları incelendiğinde en fazla tedavi edilen grupta 131 tiroit kanseri hastaları, en düşük hasta sayısı ise 131 MIBG tedavisi grubuna aittir (Tablo 2). Prosedür başına hesaplanan ortalama doz değerleri en yüksek doktorlarda  $129\pm 208$   $\mu\text{Sv}$  ola-

rak bulundu. Hemşirelerde  $122\pm 187$   $\mu\text{Sv}$ , sağlık fizikçilerinde  $76\pm 122$   $\mu\text{Sv}$ , radyofarmasistlerde  $76\pm 52$   $\mu\text{Sv}$ , temizlik görevlisi personellerinde  $42\pm 64$   $\mu\text{Sv}$  bulundu (Tablo 3).

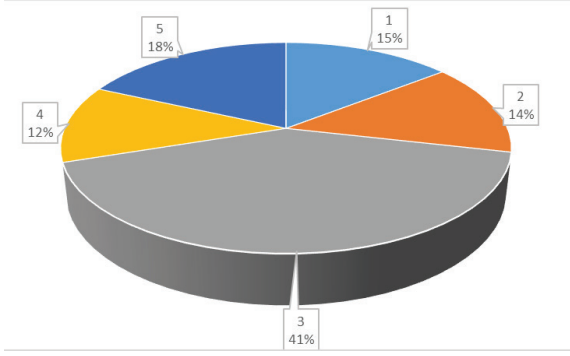
Çalışmamızın son kısmında radyofarmasistlerin, radyofarmasötiklerin hazırlanması sırasında kullandıkları termoluminesans (TLD) yüzük dozimetre kayıtlarından son 6 yıllık süreçteki parmak dozları hesaplandı (Tablo 4). 3 kişilik radyofarmasist grubu için bulunan ortalama parmak dozu  $63,487\pm 2$  olarak belirlendi.

Gruplar arasındaki istatistik değerlendirme Mann-Whitney U testi ile yapıldı. Beş grup ikiyeşerli şekilde karşılaştırıldığında sadece Hemşireler ile Doktorlar arasında anlamlı fark bulunmadı ( $p=0,1$ ). Benzer şekilde Sağlık Fizikçileri ile Radyofarmasistler arasında anlamlı fark bulunmadı ( $p=0,067$ ). Diğer gruplar ikiyeşerli eşleştirildiğinde; Hemşireler ile Sağlık Fizikçileri arasında  $p=0,0001$ , Hemşireler ile Temizlik Görevlileri arasında  $p=0,00001$ , Hemşireler ile Radyofarmasistler arasında

**Tablo 1:** Radyonüklit tedavilerde çalışan radyasyon görevlilerinin yıllık absorbe radyasyon dozları

Görevli no. Görevi	Ortalama yıllık dozlar ( $\mu\text{Sv}$ )						Ort. $\pm$ SD
	2021	2020	2019	2018	2017	2016	
1 Hemşire	20	1390	1720	143	151	180	600 $\pm$ 748
2 Hemşire	130	1390	1910	41	566	110	691 $\pm$ 783
3 Hemşire	-	1360	1510	156	48	80	631 $\pm$ 737
4 Hemşire	500	1520	2040	75	3	130	711 $\pm$ 861
5 Hemşire	-	-	-	-	656	3810	2233 $\pm$ 2230
6 Sağlık fizikçisi	-	1610	2050	505	26	140	866 $\pm$ 911
7 Sağlık fizikçisi	50	1540	760	-	-	-	783 $\pm$ 745
8 Sağlık fizikçisi	-	1480	1750	162	320	770	896 $\pm$ 699
9 Sağlık fizikçisi	210	1100	1570	70	75	120	524 $\pm$ 647
10 Radyofarmasist	70	3210	6360	4053	1290	1420	2730 $\pm$ 2281
11 Radyofarmasist	340	2550	3960	990	207	-	1610 $\pm$ 1604
12 Radyofarmasist	210	2950	4870	2320	1701	620	2110 $\pm$ 1695
13 Doktor	20	500	-	-	-	-	260 $\pm$ 346
14 Doktor	100	1980	600	-	-	-	890 $\pm$ 974
15 Doktor	70	570	-	-	-	-	320 $\pm$ 361
16 Doktor	-	-	-	147	190	-	169 $\pm$ 30
17 Doktor	-	-	-	-	240	70	155 $\pm$ 120
18 Doktor	-	380	2520	570	133	70	735 $\pm$ 1018
19 Doktor	80	1200	-	-	-	-	640 $\pm$ 792
20 Doktor	-	-	1130	332	100	130	423 $\pm$ 482
21 Doktor	150	1680	80	-	-	-	636 $\pm$ 904
22 Doktor	-	-	-	-	240	60	155 $\pm$ 120
23 Doktor	60	1180	1980	155	-	-	844 $\pm$ 912
24 Doktor	130	1900	1300	-	-	-	1117 $\pm$ 909
25 Doktor	120	1740	2170	38	250	-	864 $\pm$ 1011
26 Temizlik personeli	-	-	-	-	56	210	138 $\pm$ 116
27 Temizlik personeli	-	-	-	-	-	900	900 $\pm$ -
28 Temizlik personeli	430	1780	3070	270	-	-	1388 $\pm$ 1310





**Şekil 1:** Meslek gruplarının yıllık ortalama doz dağılımları. 1. Hemşire, 2. Sağlık Fizikçisi, 3. Radyofarmasist, 4. Doktor, 5. Temizlik Görevlisi

$p=0,0001$ , Sağlık Fizikçileri ile Doktorlar arasında  $p=0,0001$ , Sağlık Fizikçileri ile Temizlik Personelleri arasında  $p=0,001$ , Doktorlar ile Temizlik görevlileri arasında  $p=0,00001$ , Doktorlar ile Temizlik Görevlileri arasında  $p=0,00001$ , Temizlik Görevlileri ile Radyofarmasistler arasında  $p=0,001$  düzeyinde anlamlı fark bulundu.

**Tablo 3:** Tedavi başına ortalama absorbe dozlar ( $\mu\text{Sv}$ )

Tetkik Adı	Prosedür başına doz ( $\mu\text{Sv}$ )				
	Hemşire	Sağlık fizikçisi	Doktor	Temizlik görevlisi	Radyofarmasist
Radyoiyod(131I) (Tiroid C.a)	6,75	4,92	8,4	2,31	-
Radyoiyot (131I) Hipertiroidi	-	22,4	38,3	-	-
Nöroendokrin tümör, prostat tümör 177Lu DOTATATE ve PSMA	20,7	15,1	25,8	7,11	39,3
Karaciğer Tümör 90Y mikroküre	60,05	43,7	74,6	20,56	113,6
MIBG Tedavisi 131I MIBG	400,7	292	498	137,2	-
Ort. $\pm$ SD	122 $\pm$ 187	76 $\pm$ 122	129 $\pm$ 208	42 $\pm$ 64	76 $\pm$ 52

PSMA: Prostat spesifik membran antijeni, DOTATATE: DOTA(0),Tyr(3)]-octreotate, MIBG: Meta-iyodobenzylguanidinev

**Tablo 4:** Radyonüklit tedavilerde çalışan radyofarmasistlerin parmak dozları

Radyofarmasist No	Ortalama yıllık dozlar (mSv)						Ort. $\pm$ SD
	2021	2020	2019	2018	2017	2016	
1	1,44	26,710	146,110	165,286	16,756	10,690	61,165 $\pm$ 74
2	-	54,930	100,540	44,089	-	-	66,520 $\pm$ 30
3	5,660	41,040	141,960	101,536	66,167	20,290	62,776 $\pm$ 52

## TARTIŞMA

Uluslararası Radyasyon Korunması Komisyonu (ICRP) radyasyon çalışanlarının ardışık 5 yılda toplam 100 mSv, ortalama yılda en fazla 20 mSv radyasyon dozuna maruz kalabileceklerini bildirmiştir (7). Bununla birlikte Uluslararası Atom Enerjisi

**Tablo 2:** Tedavi sayılarının yıllık dağılımı

Tetkik Adı	2021	2020	2019	2018	2017	2016
Radyoiyod (131I) (Tiroid C.a)	150	390	562	568	751	485
Radyoiyot (131I) Hipertiroidi	48	76	150	139	119	105
Nöroendokrin tümör, prostat tümör 177Lu DOTATATE ve PSMA	64	132	122	225	244	158
Karaciğer Tümör 90Y mikroküre	33	78	57	45	59	55
MIBG Tedavisi 131I MIBG	1	4	2	12	22	8

L-177 DOTATATE: (177)Lu DOTA(0),Tyr(3)]-octreotate, L-177PSMA: Prostat spesifik membran antijeni, MIBG: Meta-iyodobenzylguanidin, PSMA: Prostat spesifik membran antijeni

Ajansı (IAEA) bir nükleer tıp merkezinde radyasyon çalışanları için ortalama yıllık dozun 3 ile 5 mSv arasında olmasını tavsiye etmektedir (8).

HRT de kullanılan radyonüklitlerin bozunumu sırasında salınan beta radyasyonunun doku içindeki penetrasyon mesafesi enerji-

sine göre değişmekle birlikte genellikle 1-3 mm kadardır. Vücut dışından ölçülen doz hızları 90Y için Frenleme Radyasyonundan (X-ışını) kaynaklanır. 131I ve 177Lu radyonüklitlerinde ise genellikle gama ışınlarından kaynaklanır.

Misdaq ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, Hiper-tiroidi tedavisi için 370-476 MBq 131I uygulanan hastalardan 1 m uzaklıkta doz hızlarının 15,87 ila 21  $\mu\text{Sv h}^{-1}$  arasında değiştiği gösterilmiştir (9). Lemoine ve ark. nükleer tıp bölümünde hiper-tiroidi tedavisinde uygulanan 397,7 $\pm$ 170 MBq ortalama aktivite alan hastalardan 1 m mesafede ölçülen doz hızı 13,9 $\pm$ 5,9  $\mu\text{Sv h}^{-1}$  olarak bildirilmiştir (10). Al-Mohammed ve ark. tiroit kanser tedavisi için 131I uygulanan 206 hastanın hastanede yattığı süre içinde personellere verilen ortalama radyasyon dozunun 1.2 mSv/yıl olduğunu bildirmişlerdir (11). Bilska HP ve ark. 19 yıllık retrospektif bir çalışmada 131I tedavilerinde çalışan hemşirelerin 4,2 mSv/yıl, radioiyot uygulayan doktorların 0,4 mSv/yıl radyasyon dozuna maruz kaldıklarını bildirmişlerdir (12).

Willegaignon ve ark. tüm vücut 131I-MIBG tedavi uygulamasında sağlık personeli tarafından alınan radyasyon dozlarını değerlendirmişlerdir (13). Değerlendirme sonucu 19 hekim tarafından alınan ortalama doz 43  $\pm$  51  $\mu\text{Sv}$  (aralık, 4-207  $\mu\text{Sv}$ ) olarak belirtilmiştir. Damle ve ark çalışmalarında, 177Lu etiketli bileşiklerin [DOTATATE/DOTANOC, PSMA617 ve EDTMP (ethylenediaminetetramethylene phosphonate)] manuel sentezi sırasında personele verilen radyasyon dozu seviyelerini izlemişlerdir (14). 177Lu-DOTATATE/NOC etiketlemesinin 0,023  $\pm$  0,01 mSv'lik en yüksek ortalama radyasyon dozunu, 177Lu-PSMA-617 0,01 $\pm$ 0,002 mSv'yi ve 177Lu-EDTMP etiketlemesinden gelen dozun en düşük 0,002 $\pm$  0,0006 mSv olduğunu gözlemlemişlerdir. Üç 177Lu bileşiği için genel ortalama radyasyon dozu 0,014 mSv olarak elde edilmiştir.

Lancelot ve arkadaşlarının yapmış oldukları 12 aylık prospektif çalışmada rutin olarak yapılan 50 adet 131I işaretli Lipiodol tedavisi, 10 adet radyosinovektomi seansı ve beş adet 153Sm etiketli EDTMP uygulamasında iki radyofarmasist, iki radyolog, iki romatolog, üç hemşire ve radyokoruma (CPR) konusunda yetkin bir kişi yer almıştır (15). 90Y radyosinovektomi seanslarında alınan dozları radyofarmasistler için 10,2 $\pm$ 15,8  $\mu\text{Sv}$ , hemşireler için 4,91 $\pm$ 3,7  $\mu\text{Sv}$  ve romatologlar için 21,6 $\pm$ 33,5  $\mu\text{Sv}$  olarak hesaplamışlardır. Lipiodol tedavisinde ise radyofarmasistler için 3,11 $\pm$ 2,9  $\mu\text{Sv}$ , hemşireler için 4,95 $\pm$ 6,0  $\mu\text{Sv}$  bulmuşlardır.

Bizim çalışmamızda 6 yıllık süreçteki ortalama dozlar; hemşirelerde 786 $\pm$ 942  $\mu\text{Sv}$ , sağlık fizikçilerinde 753 $\pm$ 706  $\mu\text{Sv}$ , doktorlarda 626 $\pm$ 741  $\mu\text{Sv}$ , radyofarmasistlerde 2185 $\pm$ 1839  $\mu\text{Sv}$  ve temizlik personellerinde 960 $\pm$ 1099  $\mu\text{Sv}$  bulundu. Bu çalışmada Doktorların tedavi başına 129 $\pm$ 208  $\mu\text{Sv}$  olarak hesaplanan absorbe ortalama doz değerinin diğer çalışanlara göre daha yüksek olduğu görüldü. Alınan dozun büyük çoğunluğunun MIBG 131I ve Y90 mikroküre tedavisi sırasında oluştuğu belirlendi.

Hemşirelere, doktorlar ve temizlik görevlilerinde yıllık ortalama radyasyon dozlarının standart sapmaları oldukça yüksek bulunmuştur. Bunun nedeni, bu görevlilerin tedavi servisinde aynı işi yapmalarından kaynaklanabilir. Şöyleki; 177Lu PSMA

tedavisinde görevli bir doktor ve hemşire başka bir zaman 90Y karaciğer tedavisinde çalışmakta olup hastadan gama ışını radyasyonuna maruz kalmamaktadır. Karaciğerdeki 90Y radyonüklidinin sadece beta radyasyonu olup bunlar da tümörden dışarı çıkamadığı için çalışan görevlilere nispeten düşük düzeylerde radyasyon dozu maruziyeti yapmaktadır. Bu durum görevlilerin sağlığının korunması açısından faydalı olmakla birlikte, bazı gruplarda heterojen doz dağılımına neden olmaktadır.

Bazı çalışmalarda, doz maruziyetlerinin genellikle, radyofarmasötik hazırlama ve enjeksiyon sırasında oluştuğu gösterilmiştir (16,17). Tedavi başına ortalama absorbe dozlar en yüksek MIBG tedavisinde (131I MIBG) 332 $\pm$ 134  $\mu\text{Sv}$  ve en düşük radyoiyot tedavisinde (tiroid c.a) 5,59 $\pm$ 2,26  $\mu\text{Sv}$  olarak belirlendi. Bu uygulamalardaki doz yüksekliği radyofarmasötiklerin manuel hazırlanmasına ve yakın mesafeden hastaya uygulamasına bağlı olmaktadır.

7,8 GBq 177Lu oktrotit peptitleri tedavisinin yapıldığı bir çalışmada; personelin yıllık ortalama doz maruziyeti araştırılmış hemşirenin 1480  $\mu\text{Sv}$ , doktorun 740  $\mu\text{Sv}$ , sağlık fizikçisinin 380  $\mu\text{Sv}$ , radyofarmasistin 2140  $\mu\text{Sv}$  doz aldıkları bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise 177Lu DOTATATE ve PSMA tedavisinde ortalama yıllık tüm mesleki maruziyet hemşirelerin 3250  $\mu\text{Sv}$ , doktorların 4051  $\mu\text{Sv}$ , sağlık fizikçilerinin 2371  $\mu\text{Sv}$ , radyofarmasistlerin 6170  $\mu\text{Sv}$  doz olarak hesaplanmıştır (18).

Bu çalışmada efektif dozlar incelendiğinde en düşük dozların radyoiyot tiroit kanseri tedavisi ve 177Lu DOTATATE nöroendokrin tümör tedavisi ile 177Lu PSMA prostat kanseri tedavisi uygulamalarında alındığı belirlenmiştir. Burada kullanılan mevcut radyoizotoplar saf  $\beta$ -emitteri olmayıp, bozunumda aynı zamanda gama radyasyonu salınımı da gerçekleşmektedir. 131I ve 177Lu radyonüklitlerinde kaynaktan ve hastadan çevreye salınan gama ışınlarının doz maruziyetini yükselttiği düşünülmektedir. Çalışanlar tarafından absorbe edilen ortalama dozlardan en yüksek dozların MIBG Tedavisi (131I MIBG) sırasında alındığı görülmektedir. 131I MIBG tedavisi sırasında hasta ile yakın temasta olunması doz maruziyetinin yüksek olmasına neden olabilmektedir.

90Y mikroküre tedavisi sırasında çalışanlar tarafından absorbe edilen radyasyon dozlarının oluşmasına beta ( $\beta$ ) ışınlarının hasta vücudundaki elementler ile etkileşmesi sonucu salınan ve enerjisi 55-285 keV olan Bremsstrahlung ışınları neden olmaktadır.

Pant ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, radyofarmasistlerin her iki el için 1 haftada biriken ortalama parmak dozunu hesaplamışlar ve bu değeri 6,5 $\pm$ 1,7 mSv olarak bulmuşlardır (19). Bizim çalışmamızda ise radyofarmasistler için haftalık kümülatif ortalama parmak dozu 1,3 mSv olarak elde edilmiştir.

Radyonüklit tedavide görevli meslek grupları arasındaki radyasyon dozu maruziyetinin anlamlılık değerlendirmesi sonucunda; hemşireler ile doktorların ve sağlık fizikçileri ile radyofarmasistlerin efektif dozları arasında anlamlı fark bulunmadı ( $p>0,5$ ). Bununla birlikte diğer gruplar ikiye ayrılarak karşılaştırıldığına

hepsinde anlamlı fark bulundu. Daha fazla doz maruziyeti olan meslek gruplarından hemşireler ile doktorların diğer meslek grupları ile aralarında anlamlı düzeyde doz maruziyeti farkı olduğu görülmüştür.

## SONUÇ

Sonuç olarak, bu çalışmada hedeflenmiş radyonüklit tedavilerde çalışan radyasyon görevlileri meslek gruplarına göre sınıflandırılmış, radyasyon dozları 6 yıllık süreçte incelenmiş olup yıllık ortalama ve prosedür başına ortalama dozlar hesaplanmıştır. Radyofarmasötiklerin hazırlanması sırasında, hastaya uygulanması sırasında ve hastanın tedavi servisinde yattığı süre boyunca doz aşımı olmadığı, radyasyon dozlarının IAEA tarafından önerilen güvenli değerlerde kaldığı tespit edilmiştir.

**Etik Komite Onayı:** Bu çalışma için etik komite onayı İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Tarih: 22.02.2022, No: 32).

**Yazar Katkıları:** Çalışma Konsepti/Tasarım- N.İ.İ.; Veri Toplama- N.İ.İ., M.D.; Veri Analizi/Yorumlama- N.İ.İ., M.D.; Yazı Taslağı- N.İ.İ., M.D.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- M.D.; Son Onay ve Sorumluluk- N.İ.İ., M.D.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir

**Finansal Destek:** Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

**Ethics Committee Approval:** This study was approved by Istanbul University-Cerrahpaşa Clinical Research Ethics Committee (Date: 22.02.2022, No: 32).

**Peer Review:** Externally peer-reviewed.

**Author Contributions:** Conception/Design of Study- N.İ.İ.; Data Acquisition- N.İ.İ., M.D.; Data Analysis/Interpretation- N.İ.İ., M.D.; Drafting Manuscript- N.İ.İ., M.D.; Critical Revision of Manuscript- M.D.; Final Approval and Accountability- N.İ.İ., M.D.

**Conflict of Interest:** Authors declared no conflict of interest.










**Financial Disclosure:** Authors declared no financial support.

## KAYNAKLAR

1. Wyszomirska A. Iodine-131 for therapy of thyroid diseases. physical and biological basis. Nucl Med Rev Cent East Eur 2012;15(2):120-3.
2. Devcic Z, Rosenberg J, Braat AJ, Techasith T, Banerjee A, Sze DY et al. The efficacy of hepatic 90Y resin radioembolization for metastatic neuroendocrine tumors: a meta-analysis. J Nucl Med 2014;55(9):1404-10.
3. Edeline J, Toucheffeu Y, Guiu B, Farge O, Tougeron D, Baumgaertner I et al. Radioembolization plus chemotherapy for first-line treatment of locally advanced intrahepatic cholangiocarcinoma: a phase 2 clinical trial. JAMA Oncol 2020;6(1):51-9.
4. Zang J, Fan X, Wang H, Liu Q, Wang J, Li H. et al. First-in-human study of 177LuEB-PSMA-617 in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2018;46(1):148-58.
5. Bayram T, Yılmaz AH, Demir M, Sonmez B. Radiation dose to technologists per nuclear medicine examination and estimation of annual dose. J Nucl Med Technol 2011;39(1):55-9.
6. IAEA Safety Series No. 63-Release of patients after radionuclide therapy; 2015. Available from: [https://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/pub1417\\_web.pdf](https://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/pub1417_web.pdf)
7. ICRP, 2007. The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP Publication 103. Ann. ICRP 37 (2-4).
8. IAEA Training Material on Radiation Protection in Nuclear Medicine. Dec, Part 5, Version; 2004.
9. Misdaq MA, Harrass H, Saikouk H, Matrane A. Dose to medical personnel. Health Phys 2020;118(2):129-35.
10. Lemoine J, Bourre JC, Giraud JY. Dosimétrie environnementale des patients à la suite de leur examen d'imagerie médicale. Radioprotect 2011;46(4):533-45.
11. Al-Mohammed HI, Sulieman A, Mayhoub FH, Salah H, Lagarde C, Alkhorayef M, Aldhebaib A. et al. Occupational exposure and radiobiological risk from thyroid radioiodine therapy in Saudi Arabia. Nature Portfolio 2021;11(1):145-57.
12. Bilska HP, Birkenfeld B, Gwarys A, Supińska A, Listewnik MH, Elbl B, et al. Occupational exposure at the Department of Nuclear Medicine as a work environment: A 19-year follow-up. Pol J Radiol 2011;76(2):18-21.
13. Willegaignon J, Paola Crema K, Oliveira NC. Pediatric 131I-MIBG Therapy for Neuroblastoma Whole-Body 131I-MIBG Clearance, Radiation Doses to Patients, Family Caregivers, Medical Staff, and Radiation Safety Measures. Clin Nucl Med 2018;43(8):572-8.
14. Arora G, Mishra R, Kumar P, Yadav M, Ballal S, Bal C, Damle NA. Estimation of Whole Body Radiation Exposure to Nuclear Medicine Personnel During Synthesis of 177Lutetium-labeled Radiopharmaceuticals. Indian J Nucl Med 2017;32(2):89-92.
15. Lancelot S, Guillet B, Sigrist S, Bourrelly M, Waultier S, Mundler O and Pisano P. Exposure of medical personnel to radiation during radionuclide therapy practices. Nucl Med Commun 2008;29(4):405-10.
16. Harding LK. Radiation safety in the nuclear medicine department: impact of the UK Ionising Radiations Regulations. Br J Radiol 1987;60(717):915-18.
17. Ho WO, Wong KK, Leung YL, Cheng KC, Ho FTH. Radiation Doses to Staff in a Nuclear Medicine Department. J HK Coll Radiol 2002;5:24-8.
18. Calais PJ, Turner JH. Radiation safety of outpatient 177Lu-octreotate radiopeptide therapy of neuroendocrine tumors, n Ann Nucl Med 2014;28(6):531-9.
19. Pant GS, Sharma SK, and Rath GK. Finger doses for staff handling radiopharmaceuticals in nuclear medicine. J Nucl Med Technol 2006;34(3):169-73.

# SARKOM PATOGENEZİNDE ETKİLİ OLABİLECEK YENİ ADAY GENLERİN ARAŞTIRILMASI

## INVESTIGATION OF NEW CANDIDATE GENES IN THE PATHOGENESIS OF SARCOMAS

Demet AKDENİZ ÖDEMiŞ<sup>1</sup> , Rejin KEBUDİ<sup>2</sup> , Fazilet YILDIZ ÖZDENOĞLU<sup>3</sup> , Betül ÇELİK<sup>1</sup> ,  
Şeref Buğra TUNÇER<sup>1</sup> , Seda KILIÇ ERCİYAS<sup>1</sup> , Özge ŞÜKRÜOĞLU ERDOĞAN<sup>1</sup> ,  
Sema BÜYÜKKAPU BAY<sup>2</sup> , Hülya YAZICI<sup>4</sup> 

<sup>1</sup>İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Kanser Genetiği Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup>İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Tıbbi Onkoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

<sup>3</sup>İstanbul Okan Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Programı, İstanbul, Türkiye

<sup>4</sup>İstanbul Arel Üniversitesi, Temel Tıp Bilimleri Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ORCID ID: D.A.Ö. 0000-0002-2271-8481; R.K. 2-0000-0003-4344-8174; F.Y.Ö. 3-0000-0003-3988-0036; B.Ç. 0000-0001-5877-8753; Ş.B.T. 0000-0001-8023-3223; S.K.E. 0000-0003-4417-4005; Ö.Ş.E. 7-0000-0002-0893-1251; S.B.B. 0000-0002-2539-4662; H.Y. 0000-0002-8919-0482

**Atf/Citation:** Akdeniz Odemis D, Kebudi R, Yildiz Ozdenoglu F, Celik B, Tuncer SB, Kilic Erciyas S, et al. Sarkom patogenezinde etkili olabilecek yeni aday genlerin araştırılması. Journal of Advanced Research in Health Sciences 2023;6(1):23-32. <https://doi.org/10.26650/JARHS2023-1152477>

### Öz

**Amaç:** Sarkomlar, yağ, kas, kan damarları, sinir, derin cilt dokuları ile fibröz dokular dahil olmak üzere kemiklerde ve yumuşak dokularda gelişen nadir kanserlerdir. Kişinin sarkom geliştirme riskini artırabilecek genetik yatkınlık, radyoterapi öyküsü ve kimyasal maruziyet gibi bazı faktörler olmasına rağmen, çoğu sarkomun bilinen bir nedeni yoktur ve günümüzde genetik temeli tam olarak aydınlatılmamıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Ailesinde çeşitli sarkom tanıları bulunan yüksek risk taşıdığı düşünülen 2 farklı ailede seçilmiş hastalarda hastalığın hangi gen ya da genler aracılığı ile geliştiğini belirlemek amacıyla tüm ekzom dizileme (WES) işlemi yapılmıştır.

**Bulgular:** Çalışma sonunda ilk ailede patojenik kaydı bulunan toplam 17 varyant tanımlanırken bu varyantlardan *KLKB1*, *IRGM*, *PRSS1*, *MBL2*, *PTPRJ*, *FGFR4* ve *SLC34A3* olmak üzere 7 farklı gene ait toplam 8 patojenik varyant çeşitli kanser riskleri ile ilişkilendirilmiştir. İkinci ailede ise *FGFR4*, *MBL2*, *MUTYH*, *NQO1* olmak üzere 4 farklı gene ait 4 patojenik varyant tanımlanmıştır.

**Sonuç:** Sarkom açısından yüksek risk taşıyan kişilerin incelenmesi ve hastalık ile ilişkili olabilecek genlerin bulunması ile gerek hastaların gerekse riskli aile bireylerinin takip protokolüne önemli katkılar sağlanmıştır. Ayrıca çıkan sonuçlar doğrultusunda ailelerde yapılmış risk analizi sonrası kanser yatkınlığı olan aile bireyleri seçilmiş ve erken tanı avantajı sağlanabilmesi için gerekli tetkik ve taramalar önerilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** sarkom, genetik, gen mutasyonu, tüm ekzom dizileme

### ABSTRACT

**Objective:** Sarcomas are rare cancers that develop in the bones and soft tissues, including fat, muscles, blood vessels, nerves, deep skin tissues, and fibrous tissues. Most sarcomas have no known cause although there are several factors that can increase a person's risk of developing sarcoma, such as genetic predisposition due to the family history, previous history of radiation therapy, chemical exposure, and long-term swelling. The causes and genetic basis of sarcomas are not fully elucidated.

**Materials and Methods:** Whole-exome sequencing (WES) was performed in patients selected from 2 different families, who were thought to be at high risk, with various sarcoma diagnoses in their families, to determine which gene or genes caused the disease.

**Results:** At the end of the study, a total of 17 variants with a pathogenic record in the first family were identified, while a total of 8 pathogenic variants belonging to 7 different genes, including *KLKB1*, *IRGM*, *PRSS1*, *MBL2*, *PTPRJ*, *FGFR4* and *SLC34A3*, were associated with various cancer risks. In the second family, 4 pathogenic variants belonging to 4 different genes, namely *FGFR4*, *MBL2*, *MUTYH*, and *NQO1*, have been identified.

**Conclusion:** The examination of people at high risk for sarcoma and the discovery of genes that may be associated with the disease made important contributions to the follow-up protocol of both patients and risky family members. In addition, according to the results obtained, family members with cancer predisposition were selected after the risk analysis made in the families, and the necessary tests and screenings were recommended in order to provide the advantage of early diagnosis.

**Keywords:** sarcoma, genetics, gene mutation, whole exome sequencing

**Sorumlu Yazar/Corresponding Author:** Hülya YAZICI E-mail: [hulyayazici67@gmail.com](mailto:hulyayazici67@gmail.com)

**Başvuru/Submitted:** 02.08.2022 • **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 05.08.2022 • **Son Revizyon/Last Revision Received:** 21.12.2022 • **Kabul/Accepted:** 16.12.2022 • **Online Yayın/Published Online:** 15.02.2023



This work is licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

## GİRİŞ

Kanser, yıllar içerisinde bir hücrede farklı genetik değişikliklerin birikmesinden kaynaklandığı bilinen habis bir hastalıktır. Bu değişiklikler, sonuçta diğer dokuları istila edebilen anormal hücre çoğalmasına ve klonal genişlemeye yol açar (1).

Tümör gelişimine neden olan çok sayıda gen tanımlanmıştır ve bu genler tümör baskılayıcı genler, proto-onkogenler ve genom stabilitesinde yer alan genler olmak üzere 3 farklı kategoride sınıflandırılmıştır. Tümör baskılayıcı genler hücre çoğalmasını kontrol eder, hücre döngüsünün ilerlemesini inhibe eder veya apoptozu indükler. Genellikle, genin tek bir fonksiyonel kopyası kanser gelişmesi için yeterlidir. Her iki allelin inaktivasyonu, kontrolsüz çoğalmaya izin verir ve böylece tümör gelişimine katkıda bulunur. Aksine, proto-onkogenler hücre çoğalmasını teşvik eder ve mutasyonlar sonucunda kalıcı olarak aktive olduklarında tümörün ilerlemesini sağlar. Bu durumda, tek bir alleldeki mutasyonlar kontrolsüz çoğalma için yeterlidir. DNA stabilitesine dahil olan genler, hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde doğrudan bir rol oynamaz, ancak bu genlerdeki disfonksiyon, artan mutasyon sayısına ve dolayısıyla tümör gelişim olasılığının artmasına katkıda bulunur (2).

Sarkomlar, yağ, kas, kan damarları, sinir, derin cilt dokuları ile fibröz dokular dahil olmak üzere kemiklerde ve yumuşak dokularda gelişen nadir kanserlerdir. Sarkomlar, vücutta nerede geliştiklerine bağlı olarak yumuşak doku veya kemik sarkomları olarak sınıflandırılır. Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsüne göre, ABD’de her yıl yaklaşık 12.000 yumuşak doku sarkomu vakası ve 900 kemik sarkomu vakası yeni tanı almaktadır (3). Kemik sarkomları çocuklarda daha sık görülürken yumuşak doku sarkomları yetişkinlerde daha sıktır (4-5). Bir kişinin sarkom geliştirme riskini arttıracak genetik yatkınlık, radyoterapi öyküsü, kimyasal maruziyet ve uzun süreli şişlik gibi bazı faktörler olmasına rağmen, çoğu sarkomun bilinen bir nedeni yoktur. Çocukluk çağı sarkomlarında son yapılan çalışmalarda vakaların yaklaşık %8,5’ünde predispozan bir gen bildirilmiştir (6). Ailesinde Von Recklinghausen hastalığı (nörofibromatoz), Gardner sendromu, Werner sendromu, tüberoskleroz, nevroid bazal hücreli karsinom sendromu, Li-Fraumeni sendromu veya retinoblastom gibi kalıtsal kanser sendromu öyküsü olan hastalarda sarkom gelişme riski çok daha yüksektir (5-7).

Kanser tanılı kişilerde yeni gen dizileme tekniklerinin uygulanması, tümörün moleküler temeli hakkındaki görüşümüzü genişletmemize olanak tanımaktadır. Geleneksel moleküler tekniklerin aksine, yeni nesil dizileme (NGS) gibi yüksek verimli teknikler, milyonlarca DNA parçasını, giderek azalan maliyetler ve daha kısa sürede dizileyebilir. Ayrıca tek bir testle farklı tipte genomik değişiklikler tespit edilebilir (8).

Aile hikâyesi incelendiğinde; sarkom tanıları mevcut ve yüksek riskli olarak tanımlanan ailelerde hastalığın hangi gen ya da genler aracılığı ile geliştiğini belirlemek amacıyla NGS teknolojisi kullanılarak tüm ekzom dizileme çalışması yapılmıştır. Çalışma içerisinde temel amacımız sarkom tanılı hastalarda kanser gelişimini etkileyebilecek aday genleri tanımlamaktır. Bu amaçla

osteosarkom tanılı ve akciğer metastazı olan çocuk hasta, yine osteosarkom ve fibrosarkom tanıları bulunan babası ile başka bir ailede yer alan retinoblastoma ve fibrosarkom tanılı çocuk hasta tüm ekzom dizileme ile incelenmiş ve bu ailelerde yüksek risk oluşturabilecek genler tespit edilmiştir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Hasta popülasyonunun oluşturulması

İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Klinik Onkoloji ABD, Pediatrik Hematoloji-Onkoloji birimine başvuran yüksek riskli kanser profiline sahip, genetik danışma sonrası seçilmiş osteosarkom tanısı almış çocuk hasta ile osteosarkom ve fibrosarkom tanılı babası ve retinoblastoma ve fibrosarkom tanıları mevcut olan başka bir çocuk hastaya ait periferik kanlar kullanılarak tüm ekzom dizileme (WES) analizleri yapılmıştır. Çalışmaya dahil edilen tüm hastalardan testi kabul ettiklerine dair hasta onamı alınmış ve bu çalışma İstanbul Üniversitesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (25.02.2020, 341). Çalışmaya dahil edilen hastalara ait tüm klinik bilgiler Tablo 1’de verilmiştir. Birinci (F1) ve ikinci (F2) ailelere ait aile ağacı Şekil1 ve Şekil 2’de yer almaktadır.

**Tablo 1:** Hastalara ait klinik bilgiler

Aile kodu	Hasta kodu	Cinsiyet	Tanımlar	Son durumu	Yakınlık durumu
F1	EW006	Kız	Osteosarkom (8 y)+ Akciğer metastazı (8 y)	Ex	Proband
F1	EW008	Erkek	Fibrosarkom (34 y)+ Osteosarkom (38 y)	Yaşıyor	Baba
F2	XR660	Erkek	Retinoblastoma (8 aylık)+ Fibrosarkom (11 y)	Ex	Proband

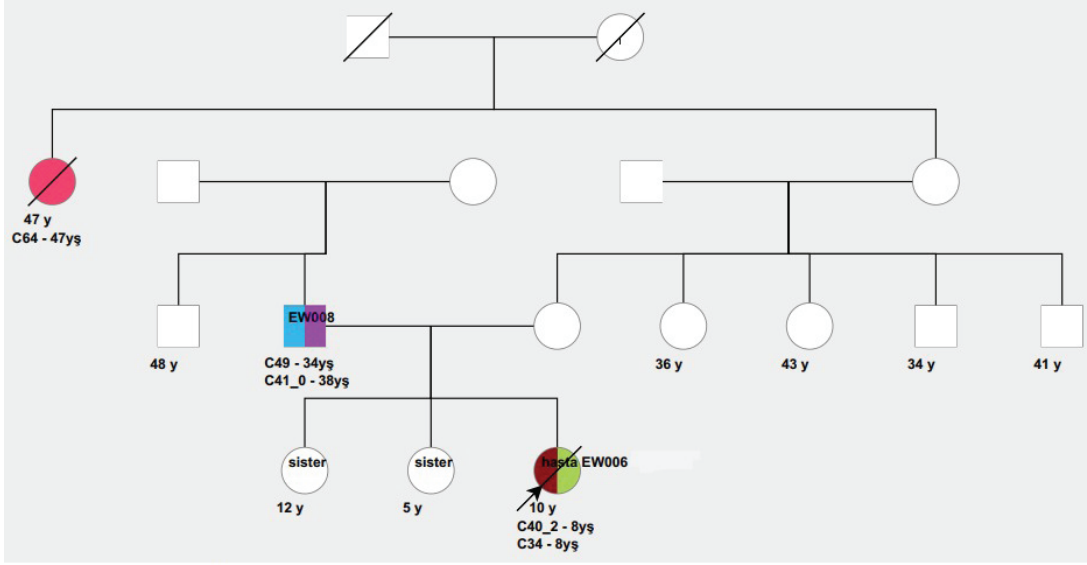
### DNA izolasyonu

Hastalardan onamlar alındıktan sonra EDTA’lı tüpe yaklaşık 10 mL periferik kanlar alındı ve Fikol (Sigma-Aldrich, Germany) yöntemi kullanılarak lenfosit hücreleri izole edildi. Kan örneklerinden elde edilen lenfositlerden QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Germany) kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda DNA izole edildi. Öncelikle genomik DNA Qubit florimetre (Life Technologies) ile ölçüldü ve sonra genomik DNA konsantrasyonu 10 mM pH 8,5 Tris-HCl kullanılarak 10 ng/µL olacak şekilde ayarlandı. Tekrar fluorometrik ölçüm yapılarak ve aynı tampon çözelti ile konsantrasyonu 5 ng/µL olacak şekilde yeniden ayarlandı ve 50 ng’ı dizilemede kullanılmak üzere hazır hale getirildi. Elde edilen genomik DNA örnekleri Tüm Ekzom Dizileme işlemi gerçekleştirilene kadar -80°C derin dondurucuda ya da Azot tanklarında saklandı.

### Tüm ekzom dizileme işlemi

WES, genomik kodlama bölgeleri ve ilgililenen diğer bölgelerdeki baz eşleşmelerinin araştırılmasını sağlayan bir DNA dizileme stratejisidir. Genomun kodlanan kısmı, tüm genomun sadece % 1-2’sini kapsadığı için, bu yaklaşım, protein fonksiyonunu de-





Kısaltma

Açılım

C34 C34 - Bronş ve akciğer malign neoplazmi

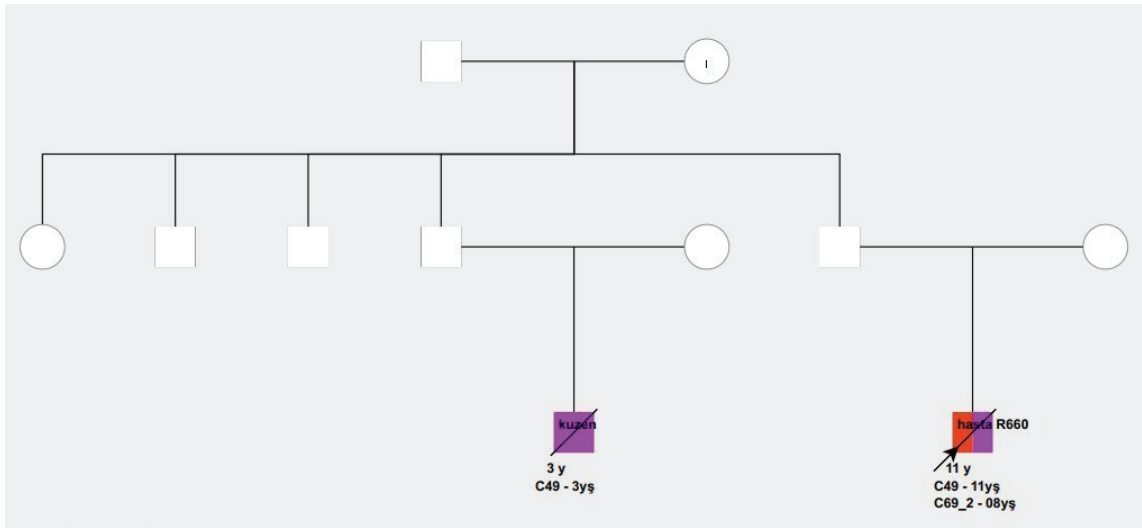
C40\_2 C40,2 - Alt ekstremitte uzun kemiklerinin malign neoplazmi

C41\_0 C41.0 - Kafa ve yüz kemikleri malign neoplazmi

C49 C49 - Bağ dokusu ve yumuşak doku diğer malign neoplazmi

C64 C64 - Böbrek malign neoplazmi, renal pelvis hariç

Şekil 1: F1 ailesine ait aile ağacının şematik gösterimi



Kısaltma Açılım

C49 C49 - Bağ dokusu ve yumuşak doku diğer malign neoplazmi

C69\_2 C69.2 - Retina malign neoplazmi

Şekil 2: F2 ailesine ait aile ağacının şematik gösterimi

ğıştirebilecek DNA değişikliklerini tespit etmek için, tüm genom sekansına kıyasla daha uygun maliyetli bir strateji olduğu için tercih edilmektedir. Her ne kadar araştırma topluluğu genomun kodlamayan bölgelerinde sekans değişikliklerinin fonksiyonel etkilerini ortaya koyuyor ve tanımlıyor olsa da WES, hem keşif araştırması hem de hassas tıp uygulamaları için değerli bilgiler sağlayan bir testtir (9). Tüm Ekzom Dizileme işlemi GenoXome\_MGISEq G-400 Platformunda gerçekleştirildi. Panel protokolüne göre; DNA kalite tayini yapıldıktan sonra DNA fragmente edildi. Daha sonra bu fragmente DNA'ya ligasyon işlemi ile beraber adaptörler bağlandı. Dizileme kalitesinin optimum düzeyde olabilmesi için pürifikasyon ile non-spesifik DNA uzaklaştırıldı. Ardından amplifiye DNA elde edebilmek için 10 döngülük bir PCR işlemi ile işaretli kütüphane çoğaltıldı. Zenginleştirilmiş kütüphane cihaza koyulmadan önce "Flow Cell"e yüklendi ve örnekle yüklü "Flow Cell" dizileme işlemi için HiSeq cihazına yerleştirildi.

### Veri analizi

Cihazdan elde edilen BCL formatındaki ham veri öncelikle VCF dosya formatına dönüştürüldü. Çıkan ham data sonuçlar VarAFT (<https://varaft.eu/>) ve VariED (<http://varied.cgm.ntu.edu.tw/>) gibi bilgisayar programları aracılığı ile filtre ve kalite kontrol skorlarına göre incelendi ve ardından gen bölgelerinde var olduğu görülen genomik değişiklikler değerlendirildi. Varyant Etki Prediktörü (VEP), transkript sonuçlarının anotasyonu için merkezi bir kaynaktır. VEP, NCBI Referans Dizisi Veritabanı (RefSeq) gibi veritabanlarını ve Polimorfizm Fenotipleme (PolyPhen) ve SIFT gibi algoritmaları da kullanmaktadır. Bilinen hastalık ilişkisi ile ilgili bilgi, Kanserde Somatik Mutasyonlar Kataloğu'ndan (COSMIC), ClinVar veri tabanından ve Online İnsan Mendel Kalıtım (OMIM) kataloğundan elde edildi. dbSNP, Ensembl 1000 Genom Projesi ve Ekzom Varyant Sunucusu gibi kaynaklar bir popülasyon içindeki varyantların oluşumu ve frekansları hakkında bilgi sağlamaktadır. Bu işlemlerin sonunda varyantların ilgili tüm veri tabanlarında ve algoritmalarda belirtilen açıklamaları elde edilmiş oldu. Anotasyon işlemine tabi tutulan varyantların fenotip ile ilişkilerini belirleyebilmek için çeşitli filtreleme seçenekleri ayrıca kullanıldı. Özellikle ClinVar patojenik kaydı bulunan varyantlar detaylı incelemeye alındı. Daha önce literatürde ya da veritabanlarında rapor edilmemiş varyantlar novel aday varyant olarak tanımlandı. Çalışmada elde edilen varyantlar >Q30 okuma kalitesi ve >50 güven skoru dikkate alınarak değerlendirildi. Çıkan patojenik varyantlara göre her kişi için detaylı bir genetik rapor klinik veriler eşliğinde hazırlandı.

### BULGULAR

Çalışma sonunda F1 ailesinde patojenik kaydı bulunan toplam 17 varyant saptanmıştır. Bu varyantlardan *KLKB1*, *IRGM*, *PRSS1*, *MBL2*, *PTPRJ*, *FGFR4* ve *SLC34A3* olmak üzere 7 farklı gene ait toplam 8 patojenik varyant yapılan detaylı veri tabanı analizleri ile değerlendirilmiş ve çeşitli kanser riskleri ile ilişkilendirilmiştir. Tanımlanmış gen varyantlarının ClinVar veri tabanı kayıtları incelendiğinde; prekallikrein eksikliği, iltihaplı bağırsak hastalığı (Crohn hastalığı), kalıtsal pankreatit, mannoz bağlayıcı protein eksikliği, kolon karsinomu, kanser ilerlemesi ve tümör hücre

motilitesi, otozomal resesif hipofosfatemik kemik hastalığı gibi hastalıklar ile ilişkili olduğu görülmüştür. F1 ailesinde saptanmış patojenik gen mutasyonları ve veri tabanı kayıtları Tablo 2'de verilmiştir.

Çalışma sonunda F2 ailesinde patojenik kaydı bulunan toplam 8 varyant saptanmıştır. Bu varyantlardan *FGFR4*, *MBL2*, *MUTYH*, *NQO1* olmak üzere 4 farklı gene ait 4 patojenik varyant çeşitli kanser riskleri ile ilişkilendirilmiştir. Tanımlanmış gen varyantlarının ClinVar veri tabanı kayıtları incelendiğinde; kanser ilerlemesi ve tümör hücre motilitesi, mannoz bağlayıcı protein eksikliği, kolon karsinomu, akciğer kanseri, meme kanseri ve lösemi gibi hastalıklar ile ilişkili olduğu görülmüştür. F2 ailesinde saptanmış patojenik gen mutasyonları ve veri tabanı kayıtları Tablo 3'de verilmiştir.

### TARTIŞMA

Çalışma sonucunda EW006,EW008 kodlu kişilerde *KLKB1* (*NM\_000892*) geninin 5. ekzonunda heterozigot formasyonda *c.428G>A*, *p.(Ser143Asn)* varyantına rastlanmıştır. ClinVar veri tabanında Prekallikrein eksikliği ile ilişkilendirilmiştir. *KLKB1*, plazma Kallikrein enzimi, Kininojen'deki Lys-Arg ve Arg-Ser bağlarını keserek bradikinin salgılar ve kan pıhtılaşması, fibrinliz, hemostaz ve inflamatuvar yanıt ile ilgili işlevlere sahiptir (10). Çeşitli veri bankalarında *KLKB1* (*NM\_000892*), *Exon5*, *HET*, *c.428G>A*, *p.(Ser143Asn)* varyantının Prekallikrein eksikliği ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (11). *KLKB1* geninin kanser ile ilişkisi araştırıldığında, akciğer kanseri hücrelerinde demetile edici ajan 5-Azasitidin ile tedavi edildiğinde ekspresyonunun arttığı ve bu nedenle bir tümör baskılayıcı gen olarak işlev görebileceği belirtilmiştir (12). Prostat kanserini tespit etmek ve kanser ölümlerini azaltmak için bir biyobelirteç olarak kullanılan PSA, *KLKB1* geninden kopyalanan bir protein ürünüdür ve prostatın epitel hücreleri tarafından salgılanır (13). Ailede kanser tanılı çocuk hasta ve babasında bu varyantın ortak olarak görülmüş olması kanser gelişimi ile ilişkili olabileceğini düşündürmekle birlikte; *KLKB1* (*NM\_000892*), *Exon5*, *HET*, *c.428G>A*, *p.(Ser143Asn)* varyantının klinik etkisinin net olarak anlaşılabilmesi için daha geniş hasta ve kontrol grubunda ek çalışmalar yapılmasına ihtiyaç vardır.

Çalışma kapsamında EW006,EW008 kodlu kişilerde *IRGM* (*NM\_001145805*) geninin 2. ekzonunda heterozigot formasyonda *c.313C>T*, *p.(Leu105Leu)* varyantına rastlanmıştır. ClinVar veri tabanında İltihaplı Bağırsak Hastalığı (Crohn hastalığı) (CD) ile ilişkilendirilmiştir. Crohn hastalığı (CD), kronik iltihaplı bağırsak hastalığının yaygın bir şeklidir. *IRGM* (*NM\_001145805*), *Exon2*, *HET*, *c.313C>T*, *p.(Leu105Leu)* ile ilgili genetik kanıtlar, CD patogeneğinde erken bağışıklık tepkisinde, özellikle doğuştan gelen bağışıklık yollarında ve hücre içi bakterilerin işlenmesinde kusurlar olduğunu gösterir. Yapılan *IRGM* ekspresyon analizleri ile kolon, ince bağırsak ve periferik kan lökositleri dahil olmak üzere birçok dokuda transkripsiyon gösterdiği belirtilmiştir (14). İnsan genomunda yer alan üç IRG gen ailesinden (*IRGC*, *IRGQ* ve *IRGM*) yalnızca bağışıklıkla ilgili guanozin trifosfataz ailesine mensup olan *IRGM* geni fonksiyonel bir IRG'yi kodlar (15). Bağışıklıkla ilişkili guanozin trifosfataz, otofajinin ilerlemesini dü-

**Tablo 2:** F1 ailesinde saptanmış patojenik gen mutasyonları ve veri tabanı kayıtları

Vakalar	Mutasyon	ClinVar_ilişkili hastalıklar	dbSNP	Minör allel frekansı(MAF)
EW006,EW008	<i>KLKB1</i> (NM_000892), Exon5, HET, c.428G>A, p.(Ser143Asn)	Prekallikrein Eksikliği	rs3733402	G=0.395/783
EW006,EW008	<i>IRGM</i> (NM_001145805), Exon2, HET, c.313C>T, p.(Leu105Leu)	İltihaplı Bağırsak Hastalığı (Crohn hastalığı)	rs10065172	T=0.304/462
EW008	<i>PRSS1</i> (NM_002769), Exon2, HET, c.86A>T, p.(Asn29Ile)	Kalıtıl Pankreatit	rs111033566	-
EW006,EW008	<i>PRSS1</i> (NM_002769), Exon2, HET, c.161A>G, p.(Asn54Ser)	Kalıtıl Pankreatit	rs144422014	-
EW006	<i>MBL2</i> (NM_000242), Exon1, HET, c.154C>T, p.(Arg52Cys)	Mannoz bağlayıcı protein eksikliği	rs5030737	A=0.027/4
EW006,EW008	<i>PTPRJ</i> (NM_001098503), Exon5, HET, c.827A>C, p.(Gln276Pro)	Kolon Karsinomu	rs1566734	C=0.190/181
EW006,EW008	<i>FGFR4</i> (NM_001354984), Exon9, HET, c.1162G>A, p.(Gly388Arg)	Kanser İlerlemesi ve Tümör Hücre Motilitesi	rs351855	A=0.300/449
EW006,EW008	<i>SLC34A3</i> (NM_001177316), Exon7, HET, c.756G>A, p.(Gln252=)	Otozomal Resesif Hipofosfatemik Kemik Hastalığı	rs121918239	A=0.002/0

**Tablo 3:** F2 ailesinde saptanmış patojenik gen mutasyonları ve veri tabanı kayıtları

Vakalar	Mutasyon	ClinVar_ilişkili hastalıklar	dbSNP	Minör allel frekansı(MAF)
XR660	<i>FGFR4</i> (NM_002011.4), Exon9, HET, c.1162G>A (p.Gly388Arg)	Kanser İlerlemesi ve Tümör Hücre Motilitesi	rs351855	A=0.300/449
XR660	<i>MBL2</i> (NM_000242.2), Exon1, HET, c.161G>A (p.Gly54Asp)	Mannoz bağlayıcı protein eksikliği	rs1800450	T=0.122/75
XR660	<i>MUTYH</i> (NM_001128425.1), Exon12, HET, c.1171C>T (p.Gln391Ter)	Kolon karsinomu	rs587783057	-
XR660	<i>NQO1</i> (NM_000903.2), Exon6, HET, c.559C>T (p.Pro187Ser)	Akciğer kanseri, Meme kanseri, Lösemi	rs1800566	A=0.289/418



zenleyerek patojenlere karşı savunmada kritik öneme sahiptir (16). Otofaji, terminal degradasyon ve geri dönüşüm için hücre içi bileşenlerin sağlanmasında önemli bir rol oynayan "otodijestif" bir süreçtir (17). Bu süreç, doğuştan gelen ve adaptif bağışıklığın çeşitli yönleriyle ilişkilendirilmiştir ve otofajik yoldaki anormallikler, romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus (SLE) ve multipl skleroz gibi çok sayıda otoimmün hastalıkta rol oynamıştır (18). *IRGM*, otofajide önemli bir rol oynar. *IRGM* genetik polimorfizmlerinin birçok türde inflamatuvar ve otoimmün hastalıkla ilişkili olduğu doğrulanmıştır. Ayrıca *IRGM* (*NM\_001145805*), *Exon2*, *HET*, *c.313C>T*, *p.(Leu105Leu)* varyantının Otoimmün tiroid hastalığı (AITD) ile ilişkili olduğu da bilinmektedir (19). Son araştırmalar, otofajinin tümörjenezde kritik rol oynayabileceğini öne sürdü. Bağışıklık ile ilgili GTPaz ailesi M (*IRGM*), iltihaplanma ve enfeksiyonlar üzerine otofajiye katkısı nedeniyle vurgulanan bir insan proteindir. Çalışmalar, *IRGM*'nin birkaç kanserin gelişiminde rol oynadığını göstermiştir. Bir çalışma, *IRGM*'deki genetik polimorfizmlerin mide kanserine yakınlıkla ilişkili olduğunu bildirmiştir (20). Başka bir çalışmada ise mide kanseri dokularında *IRGM*'nin upregülasyonu ve *IRGM* seviyesi ile kanser evreleri arasında pozitif bir korelasyon olduğu belirtilmiş ve *IRGM* geninin mide kanserinin patogenezinde rol oynayabileceği ve hastalığın ilerlemesini yansıtabileceği vurgulanmıştır (21). Tüm bu bilgiler dahilinde aileye ait klinik bilgiler değerlendirildiğinde; osteosarkom tanılı çocuk hasta ve babasında gen varyantı ile ilişkili tanımlanmış bir kanser olmamakla birlikte kanser tanılı 2 bireyde de bu varyantın ortak görülmüş olması dikkat çekicidir. *IRGM* (*NM\_001145805*), *Exon2*, *HET*, *c.313C>T*, *p.(Leu105Leu)* varyantının kanser oluşum sürecine ne düzeyde katkı sağladığının anlaşılabilmesi için ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

EW008 kodlu kişide *PRSS1* (*NM\_002769*) geninin 2. ekzonunda heterozigot formasyonda *c.86A>T*, *p.(Asn29Ile)* varyantına; EW006,EW008 kodlu kişilerde ise *PRSS1* (*NM\_002769*) geninin 2. ekzonunda heterozigot formasyonda *c.161A>G*, *p.(Asn54Ser)* varyantına rastlanmıştır. ClinVar veri tabanında hem *PRSS1* (*NM\_002769*), *Exon2*, *HET*, *c.86A>T*, *p.(Asn29Ile)* hem de *PRSS1* (*NM\_002769*), *Exon2*, *HET*, *c.161A>G*, *p.(Asn54Ser)* varyantı Kalıtsal pankreatitis ile ilişkilidir. Kalıtsal pankreatitis (HP), pankreatit ve pankreas kanseri riskinin bir ailede nesilden nesile aktarılabilirdiği genetik bir hastalıktır. HP ile en sık ilişkilendirilen gen *PRSS1* genidir. *PRSS1* genindeki mutasyonlar kişide artmış pankreatit ve pankreas kanseri riski oluşturur (22). *PRSS1* (*NM\_002769*), *Exon2*, *HET*, *c.86A>T*, *p.(Asn29Ile)* varyantı sadece babada görülmüştür ama agresif bir tümörü bulunan çocuğunda bu varyanta rastlanılmamıştır. *PRSS1* (*NM\_002769*), *Exon2*, *HET*, *c.161A>G*, *p.(Asn54Ser)* varyantı ise hem hasta çocuk hem de babasında ortak olarak görülmüştür. Aile hikayesi değerlendirildiğinde; ailede pankreas kanser tanılı hiçkimse olmadığı görülmektedir. *PRSS1* (*NM\_002769*), *Exon2*, *HET*, *c.86A>T*, *p.(Asn29Ile)* ve *PRSS1* (*NM\_002769*), *Exon2*, *HET*, *c.161A>G*, *p.(Asn54Ser)* varyantlarının kanser gelişim sürecindeki etkisinin anlaşılabilmesi için ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

EW006 kodlu kişide *MBL2* (*NM\_000242.2*) geninin 1. ekzonunda heterozigot formasyonda *c.154C>T*, *p.(Arg52Cys)* varyan-

ta XR660 kodlu kişide ise *MBL2* (*NM\_000242.2*) geninin 1. ekzonunda heterozigot formasyonda *c.161G>A*, *p.(Gly54Asp)* varyantına rastlanmıştır. *MBL2* (*NM\_000242*), *Exon1*, *HET*, *c.154C>T*, *p.(Arg52Cys)* ve *MBL2* (*NM\_000242.2*), *Exon1*, *HET*, *c.161G>A* (*p.Gly54Asp*) varyantları ClinVar veri tabanında Mannoza bağlayıcı protein eksikliği ile ilişkilidir. Mannoza bağlayıcı lektin eksikliği, bağışıklık sistemini etkileyen bir durumdur. Bu rahatsızlığa sahip kişilerin kanlarında mannoza bağlayıcı lektin adı verilen bir bağışıklık sistemi protein seviyelerinde eksiklik vardır. Bu eksikliğin, etkilenen bireyleri tekrarlayan enfeksiyonlara yatkın hale getirip getirmediği net değildir. Mannoza bağlayıcı lektin eksikliği olan kişiler, üst solunum yolu ve diğer vücut sistemlerinde enfeksiyonlar geliştirebilir. Bu rahatsızlığa sahip kişiler ayrıca zatürre ve menenjit gibi daha ciddi enfeksiyonlara da yakalanabilir. Enfeksiyonun türüne bağlı olarak, enfeksiyonların neden olduğu semptomların sıklığı ve şiddeti değişir. Mannoza bağlayıcı lektin eksikliği olan bebekler ve küçük çocuklar, etkilenen yetişkinlere göre enfeksiyonlara daha duyarlı görünmektedir, ancak yetişkinler de tekrarlayan enfeksiyonlar geliştirebilir (23). Ek olarak, kemoterapi gören veya bağışıklık sistemini baskılayan ilaçlar alan etkilenen kişiler özellikle enfeksiyonlara yatkındır. MBL eksikliği olan kişilerde sepsis ve kemoterapi ile ilişkili enfeksiyonlara karşı artan bir duyarlılık gösterilmiştir (24). Mannoza bağlayıcı lektin Kompleman yolunda anahtar bir aktivatör olan bir gendir. Kompleman yolunun son zamanlarda onkogenezinde rol oynadığı tespit edilmiştir (25). MBL genindeki genetik polimorfizmler, meme kanseri, mide kanseri, kolon kanseri ve rahim ağzı kanseri dahil birkaç kanser riski ile ilişkilendirilmiştir (26-28). Bu çalışmalarda, *MBL2* polimorfizmlerinin daha düşük serum seviyeleri ile sonuçlandırıldığı ve yüksek kanser riski ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Aksine, akciğer kanseri üzerine yapılan bir çalışmada, *MBL2* gen polimorfizmlerine bağlı düşük serum MBL seviyelerinin sağkalım üzerine olumlu etkiler yarattığı bildirilmiştir (29). *MBL2* geni ve kolon kanser sağkalımı ile ilgili yapılmış bir diğer çalışmada ise hiçbir ilişki bildirilmemiştir (30). Sarkom oluşum riski ile *MBL2* gen varyantları arasında nasıl bir ilişki olduğunun anlaşılabilmesi için ek çalışmalara ihtiyaç vardır. MBL geninin onkogenezindeki etkileri göz önünde alındığında bu gen varyantlarını taşıyan kişilerin özellikle meme kanseri, mide kanseri, kolon kanseri gibi bazı kanserlere karşı klinik takibi önerilir. Ancak varyantları taşıyan iki kişinin de erken yaşta kansere bağlı ölümleri sebebiyle bu süreç takibi yapılamamaktadır.

EW006,EW008 kodlu kişilerde *PTPRJ* (*NM\_001098503*) geninin 5. ekzonunda heterozigot formasyonda *c.827A>C*, *p.(Gln276Pro)* varyantına rastlanmıştır. ClinVar veri tabanında Kolon karsinomu ile ilişkilendirilmiştir. HGMD veri bankasında ise tiroit kanser riski ile ilişkisi gösterilmiştir. *PTPRJ*, kansere yatkınlık geni için iyi bir adaydır. Hücre büyümesinin engellenmesi, göç ve anjiyogenez dahil olmak üzere tümör baskılanması konusunda işlevsel rollere sahiptir (31). *PTPRJ* ayrıca insan kolorektal kanser gelişiminde de bir rol oynuyor gibi görünüyor (32). *PTPRJ*, diğer kanser türleri için de aday bir tümör baskılayıcı gendir. *PTPRJ*'yi barındıran lokus olan 11p11 kaybı, akciğer tümörlerinin %50'sinde, meme tümörlerinin %78'inde ve tiroit anaplastik karsinomlarının %38'inde görülür (31, 33, 34). Bu

bilgiler ışığında; ailede kanser tanılı her iki kişide bu varyantın görülmesi varyantın patojenik etkisi konusunda dikkat çekicidir. *PTPRJ* (NM\_001098503), *Exon5*, *HET*, c.827A>C, p.(Gln276Pro) varyantının kanser oluşum riski açısından etkisinin net olarak anlaşılabilmesi için ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

EW006,EW008, XR660 kodlu kişilerde *FGFR4* (NM\_001354984) geninin 9. ekzonunda heterozigot formasyonda c.1162G>A, p.(Gly388Arg) varyantına rastlanmıştır. Clinvar veri tabanında kanser ilerlemesi ve tümör hücre motilitesi ile ilişkilendirilmiştir. *FGFR4* geni, fibroblast büyüme faktör (FGF) ailesinin bir üyesidir. Fibroblast büyüme faktörleri için hücre yüzey reseptörü olarak davranır ve hücre proliferasyonu, farklılaşma, doku tamiri, invazyon, yağ metabolizmasının düzenlenmesi, safra asiti biyosentezi, glikoz alımı, D vitamini metabolizması ve fosfat dengesi gibi birçok mekanizmada rol oynamaktadır (35). Bange ve ark. 2002 yılında; *FGFR4* genindeki c.1162G>A (p.Gly388Arg) varyantının ve *FGFR4* ekspresyonundaki artışın meme ve kolon kanser gelişimi ile ilişkili olduğunu vurgulamışlardır. Ayrıca lenf nodu metastazı ve artmış TNM evresi ile istatistiksel olarak ilişkili olduğunu belirtmişler ve böylece kanser progresyonunu tetiklediğini göstermişlerdir (36). Leung ve ark. 1994 yılında yapmış oldukları çalışmada; *FGFR4* ekspresyonunun pankreatik kanserler ile ilişkili olduğunu vurgulamışlardır (37). Bange ve ark. 2002 yılında; kanser progresyonu ve tümör hücre motilitesinin *FGFR4* genindeki c.1162G>A (p.Gly388Arg) değişikliği ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (36). Wang ve ark. 2004 yılındaki çalışmalarında; prostat kanserinin başlaması ve progresyonunda *FGFR4* genindeki bu varyantın etkili olduğunu belirtmişlerdir (38). Brito ve ark. 2010 yılında yaptıkları çalışmada; *FGFR4* genindeki bu varyantın Cushing hastalığında marker olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir (39). Onkogenik transformasyon aktivitesi ile de bilinen bir gen olan *FGFR4* genindeki c.1162G>A (p.Gly388Arg) varyantının ileri evre retinoblastomlu hastalarda klinik gelişimi tahmin etmek ve hastalığın evresini değerlendirmek için aday bir gen olduğu bildirilmiştir (35, 40). Bu bilgiler ışığında değerlendirildiğinde; *FGFR4* (NM\_001354984), *Exon9*, *HET*, c.1162G>A, p.(Gly388Arg) varyantının her iki ailede sarkom tanılı tüm kişilerde görülmüş olması patojenik etkisi konusunda ek çalışmalar yapılması gerektiğini göstermektedir.

EW006,EW008 kodlu kişilerde *SLC34A3* (NM\_001177316) geninin 7. ekzonunda heterozigot formasyonda, c.756G>A (p.Gln252=) varyantına rastlanmıştır. Clinvar veri tabanında Otozomal Resesif Hipofosfatemik Kemik Hastalığı ile ilişkilendirilmiştir. HGMD veri bankasında Kalıtsal Hiperkalsiüriyel hipofosfatemik raşitizm (HHRH) hastalığı ile ilişkili olarak hastalık yapıcı mutasyon olarak veri bankalarında kayıtlıdır. HHRH, hipofosfatemi ve raşitizm/osteomalazi ile karakterize, serum 1,25-dihidroksivitamin D [1,25-(OH)(2)D] ile hiperkalsiüriye neden olan nadir bir metabolik bozukluktur. Ek olarak, HHRH'li bireyler sıklıkla kemik ağrısı, kas zayıflığı ve büyüme geriliği yaşarlar (41). Osteosarkom (OS), tanıları bulunan EW006,EW008 kodlu hastalarda *SLC34A3* (NM\_001177316), *Exon7*, *HET*, c.756G>A, p.(Gln252=) varyantına rastlanmış olması hastalık oluşumunda etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Osteosarkom düşük sağkalımlı olan

ve kötü prognozlu bir kemik neoplazmidir. Saldırgan doğası ve metastatik potansiyeli ile bilinir. Birkaç çalışma, 1,25-Dihidroksivitamin D (1,25(OH)2D)'nin kemiğin büyümesinde ve farklılaşmasında kritik bir rolü olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, 1,25(OH)2D'nin osteosarkom hücrelerinin progresyonu ve istilası üzerindeki rolü hakkında bilgi çok azdır. Tahbazlahafi ve ark. yapmış oldukları bir çalışmada OS hastalarında serum 1,25-dihidroksivitamin D 'nin farklı konsantrasyonlarının OS hücrelerinin çoğalması ve ilerlemesi üzerindeki etkisini analiz etmişler ve hastalığın yoğunluğunu azaltabilen ve prognozu iyileştirebilen 1,25(OH)2D'nin etkili dozlarını doğrulamışlardır. Çalışma sonucunda; 1,25(OH)2D'nin etkili dozlarının OS hücre hattının agresif potansiyelini azaltabileceğini öne sürmüşlerdir (42). Bununla birlikte, daha fazla araştırma ve klinik çalışmaya ihtiyaç vardır. Ichikawa ve ark. yapmış oldukları çalışmada sodyum-fosfat kotransporter tip IIc'yi kodlayan *SLC34A3* genindeki mutasyonların HHRH oluşumundan sorumlu olup olmadığını araştırmışlardır. Çalışma sonucunda, *SLC34A3* genindeki mutasyonların HHRH'nin ortaya çıkmasından sorumlu olduğu doğrulanmış ve genin, intragenik homolog dizilerin varlığından dolayı delesyonlara özellikle duyarlı olabileceği öne sürülmüştür (43). Ayrıca Hureau ve ark. yapmış oldukları bir çalışmada *SLC34A3* (NM\_001177316), *Exon7*, *HET*, c.756G>A, p.(Gln252=) varyantının yetişkinlerde ailesel hiperkalsemi hipokalsiüri gelişiminde etkili olduğunu göstermişlerdir (44). Hiperkalsemili hastalarda, özellikle hiperkalsemili aile üyeleri varsa veya endokrin pankreas, tiroid, hipofiz, adrenal bez veya çene kemiği tümörüne sahipse genetik bir bozukluktan şüphelenilmeli ve tüm hiperkalsemi formları, paratiroid hormonunun (PTH) serum düzeyine göre yorumlanmalıdır. Genetik formlar bu nedenle bir paratiroid bezi bozukluğu ile ilişkili veya ilişkiz olarak sınıflandırılır. Hiperkalsemiye rağmen PTH düzeyi yükseldiğinde veya baskılanmadığında, genetik bir nedene bağlı ailede hiperkalsemi öyküsü olduğunu düşündüren bulgular arasında hasta veya aile üyelerinde sendromik belirtiler, paratiroid kanseri (ameliyattan önce şüphelenilen veya paratiroidektomi sırasında doğrulanan), çoklu veya tekrarlayan paratiroid tümörleri, ailede primer hiperparatiroidizm öyküsü ve 50 yaşından önce primer hipertiroidizm başlangıcı gibi durumlar sayılabilir. Aile bireylerinde tanımlanmış bir hiperkalsemi durumu söz konusu olmamakla birlikte *SLC34A3* (NM\_001177316), *Exon7*, *HET*, c.756G>A, p.(Gln252=) varyantının hastalık oluşumundaki etkisinin anlaşılabilmesi için ek çalışmalara gerek duyulmaktadır.

Çalışmamızda XR660 kodlu hastada *MUTYH* (NM\_001128425.1) geninin 12 ekzonunda heterozigot formasyonda, c.1171C>T (p.Gln391Ter) varyantına rastlanmıştır. *MUTYH* geni oksidatif DNA hasar tamirinde rol alan MYH glikosilaz adı verilen bir enzimin üretilmesinde görevlidir. Bu enzim, hücre bölünmesine hazırlık aşamasında DNA kopyalanırken (DNA replikasyonu) yapılan hataları düzeltir. Normal hücresel aktiviteler sırasında, guanin bazen oksijen tarafından değiştirilir ve sitozin yerine adenin ile eşleşmesine neden olur. MYH glikosilaz bu hatayı düzelterek DNA'da mutasyon birikimini ve tümör oluşumunu engeller. Bu tip tamirat, baz eksizyon tamiri olarak bilinir. *MUTYH* genindeki mutasyonlar ailesel adenomatöz polipozis'in (MYH-ilişkili polipozis) otozomal resesif formu ile ilişkilidir (45).

Bu mutasyonu taşıyan kişinin ilerki yıllarda kolon kanser gelişim riski bulunmaktadır. Ancak mutasyon taşıyıcısı kişi erken yaşta kaybedildiğinden bu süreç değerlendirilememiştir.

Çalışmamızda XR660 kodlu kişide *NQO1* (*NM\_000903.2*) geninin 6. ekzonunda heterozigot formasyonda c.559C>T, p.(Pro187Ser) patojenik varyantına rastlanmıştır. *NQO1* geni NAD(P)H dehidrogenaz (kinon) ailesinin bir üyesidir ve sitoplazmik 2-elektron redüktazı kodlar. Bu FAD-bağlayıcı protein homodimerler oluşturur ve kinonları hidrokinoonlara indirger. Bu proteinin enzimatik aktivitesi, radikaller üreten kinonların bir elektron indirgemelerini engeller. Bu yolla hücreleri oksidatif hasardan korur. Bu nedenle antikanser enzimi olarak adlandırılır. Karsinogenezdeki koruyucu rolüne ek olarak *NQO1* geni antitümör tedavide ilaç metabolize eden enzim görevi de görür. Bu gendeki mutasyonlar, tardif diskinezi (TD), benzene maruz kaldıktan sonra hematotoksisite riskinde artış ve çeşitli kanser türlerine yatkınlık ile ilişkilendirilmiştir (46-47). Bu proteinin değişmiş ifadesi akciğer, mesane, meme, hepatoselüler karsinom, akut miyeloid lösemi (AML), kolorektal kanser, gastrointestinal kanserler gibi birçok tümörde görülmüştür ve ayrıca Alzheimer hastalığı ile ilişkilendirilmiştir (48-50). Chao ve ark. 2006 yılında *NQO1* genindeki c.559C>T (p.Pro187Ser) varyantının enzimatik aktiviteyi azaltarak akciğer kanser riskini arttırdığını belirtmişlerdir. Ayrıca bu varyantın mesane ve kolorektal kanserine yatkınlığa da sebep olduğunu vurgulamışlardır (49). Bu mutasyonu taşıyan kişinin ilerki yıllarda akciğer, mesane, meme, hepatoselüler karsinom, akut miyeloid lösemi (AML), kolorektal kanser, gastrointestinal kanserler gibi birçok kanser gelişim riski bulunmaktadır. Ancak mutasyon taşıyıcısı kişi erken yaşta öldüğünden bu süreç değerlendirilememiştir.

Tüm yapılan araştırmalar sonucunda tespit edilen aday varyantlar göz önünde bulundurularak hazırlanan klinik rapor sonrası sarkom tanılı hastalar ve diğer aile bireyleri karşı karşıya kalabilecekleri riskler konusunda uyarıldı ve bu riskleri minimum düzeye indirebilmek için klinik takip ve tarama önerileri sunuldu. Bu kapsamda riskli aile bireylerinde rutin aralıklarla klinik fizik muayene eğer şüpheli bir belirtiye rastlanırsa da çeşitli görüntüleme teknikleri ile takibi önerildi. Ancak ailelerde yer alan çocuk hastalar erken yaşta kaybedilmiş olduğundan takip ve kontrolleri yapılamadı. Saptanmış olan aday varyantların hastalık oluşum sürecinde ne yönde patojenik etki yaratacakları ancak gelecekte yapılacak olan daha geniş hasta grubu ve sağlıklı kontrollerin bulunduğu çalışmalarla anlaşılabilir.

**Teşekkür:** Yazarlar Türk Pediatrik Onkoloji Grubu'na (TPOG) teşekkürlerini sunar.

**Etik Komite Onayı:** Bu çalışma için etik komite onayı İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Tarih: 25.02.2020, No: 341).

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Çalışma Konsepti/Tasarım- D.A.Ö., R.K., H.Y.; Veri Toplama- D.A.Ö., R.K., F.Y.Ö., Ş.B.T., S.K.E., Ö.Ş.E., S.B.B., H.Y.; Veri Analizi/

Yorumlama- D.A.Ö., R.K., F.Y.Ö., B.Ç., H.Y.; Yazı Taslağı- D.A.Ö., R.K., F.Y.Ö., B.Ç., H.Y.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- D.A.Ö., R.K., F.Y.Ö., B.Ç., Ş.B.T., S.K.E., Ö.Ş.E., S.B.B., H.Y.; Son Onay ve Sorumluluk- D.A.Ö., R.K., F.Y.Ö., B.Ç., Ş.B.T., S.K.E., Ö.Ş.E., S.B.B., H.Y.; Malzeme ve Teknik Destek- D.A.Ö., R.K., F.Y.Ö., B.Ç., Ş.B.T., S.K.E., Ö.Ş.E., S.B.B., H.Y.; Süpervizyon D.A.Ö., R.K., F.Y.Ö., B.Ç., Ş.B.T., S.K.E., Ö.Ş.E., S.B.B., H.Y.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

**Finansal Destek:** Bu çalışma Türk Pediatrik Onkoloji Grubu'nun (TPOG) araştırma bursu ile desteklenmiştir.

**Acknowledgements:** Authors would like to thank Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG).

**Ethics Committee Approval:** This study was approved by Istanbul Faculty of Medicine Clinical Research Ethics Committee (Date: 25.02.2020, No: 341).

**Peer Review:** Externally peer-reviewed.

**Author Contributions:** Conception/Design of Study- D.A.Ö., R.K., H.Y.; Data Acquisition- D.A.Ö., R.K., F.Y.Ö., Ş.B.T., S.K.E., Ö.Ş.E., S.B.B., H.Y.; Data Analysis/Interpretation- D.A.Ö., R.K., F.Y.Ö., B.Ç., H.Y.; Drafting Manuscript- D.A.Ö., R.K., F.Y.Ö., B.Ç., H.Y.; Critical Revision of Manuscript- D.A.Ö., R.K., F.Y.Ö., B.Ç., Ş.B.T., S.K.E., Ö.Ş.E., S.B.B., H.Y.; Final Approval and Accountability- D.A.Ö., R.K., F.Y.Ö., B.Ç., Ş.B.T., S.K.E., Ö.Ş.E., S.B.B., H.Y.; Material and Technical Support- D.A.Ö., F.Y.Ö.; Supervision- H.Y., R.K., D.A.Ö.

**Conflict of Interest:** Authors declared no conflict of interest.

**Financial Disclosure:** This study was supported by Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG)'s research grant.

## KAYNAKLAR

1. Carrasco Salas P, Lapunzina P, Perez-Martinez A. Genetic predisposition to childhood cancer. *An Pediatr (Barc)* 2017;87(3):125-7.
2. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 2004;10(8):789-99.
3. Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA. International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages and elderly persons. *Int J Cancer* 2009;125(1): 229-34.
4. Savage, SA and L Mirabello, Using epidemiology and genomics to understand osteosarcoma etiology. *Sarcoma* 2011;2011:548151.
5. Rickel K, Fang F, Tao J. Molecular genetics of osteosarcoma. *Bone* 2017;102:69-79.
6. Brodeur GM, Nichols KE, Plon SE, Schiffman JD, Malkin D. Pediatric Cancer Predisposition and Surveillance: An Overview, and a Tribute to Alfred G. Knudson Jr. *Clin Cancer Res* 2017;23(11):e1-e5.
7. Czarnecka AM, Synoradzki K, Firliej W, Bartnik E, Sobczuk P, Fiedorowicz M et al. Molecular Biology of Osteosarcoma. *Cancers (Basel)* 2020;12(8):2130.
8. Stoppa-Lyonnet D, Houdayer C. New generation sequencing in medical genetics. *Med Sci (Paris)* 2012;28(2):123-4.
9. Liang WS, Stephenson K, Adkins J, Christofferson A, Helland A,



- Cuyugan L, et al. Whole Exome Library Construction for Next Generation Sequencing. *Methods Mol Biol* 2018;1706:163-74.
10. Chung DW, Fujikawa K, McMullen BA, Davie EW. Human plasma prekallikrein, a zymogen to a serine protease that contains four tandem repeats. *Biochemistry* 1986; 25(9):2410-7.
  11. Barco S, Sollfrank S, Trincherio A, Adenaueuer A, Abolghasemi H, Conti L et al. Severe plasma prekallikrein deficiency: Clinical characteristics, novel KLKB1 mutations, and estimated prevalence. *J Thromb Haemost* 2020;18(7):1598-617.
  12. Wong J, Sia YY, Misso NL, Aggarwal S, Ng A, Bhoola KD. Effects of the demethylating agent, 5-azacytidine, on expression of the kallikrein-kinin genes in carcinoma cells of the lung and pleura. *Patholog Res Int* 2011;2011:167046.
  13. Hasegawa T, Lewis H, Esquela-Kerscher A. Chapter 12 - The Role of Noncoding RNAs in Prostate Cancer, in *Translating MicroRNAs to the Clinic*, J. Laurence, Editor. Academic Press: Boston, 2017.p.329-69.
  14. Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, Tremelling M, Anderson CA, Fisher SA et al. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet* 2007;39(7):830-2.
  15. Song JH, Kim SY, Chung KS, Moon CM, Kim SW, Kim EY et al. Association between genetic variants in the IRGM gene and tuberculosis in a Korean population. *Infection* 2014;42(4):655-60.
  16. Singh SB, Davis AS, Taylor GA, Deretic V. Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science* 2006;313(5792):1438-41.
  17. Crotzer VL, Blum JS. Autophagy and adaptive immunity. *Immunology* 2010;131(1):9-17.
  18. Virgin HW, Levine B. Autophagy genes in immunity. *Nat Immunol* 2009;10(5):461-70.
  19. Yao QM, Zhu YF, Wang W, Song ZY, Shao XQ, Li L et al. Polymorphisms in Autophagy-Related Gene IRGM Are Associated with Susceptibility to Autoimmune Thyroid Diseases. *Biomed Res Int* 2018;2018:7959707.
  20. Burada F, Plantinga TS, Ioana M, Rosentul D, Angelescu C, Joosten LA et al. IRGM gene polymorphisms and risk of gastric cancer. *J Dig Dis* 2012;13(7):360-5.
  21. Song Z, Guo C, Zhu L, Shen P, Wang H, Guo C et al. Elevated expression of immunity-related GTPase family M in gastric cancer. *Tumour Biol* 2015;36(7):5591-6.
  22. Zou WB, Tang XY, Zhou DZ, Qian YY, Hu LH, Yu FF et al. SPINK1, PRSS1, CTSC, and CFTR genotypes influence disease onset and clinical outcomes in chronic pancreatitis. *Clin Transl Gastroenterol* 2018;9(11):204.
  23. Bouwman LH, Roep BO, Roos A. Mannose-binding lectin: clinical implications for infection, transplantation, and autoimmunity. *Hum Immunol* 2006;67(4-5):247-56.
  24. Peterslund NA, Koch C, Jensenius JC, Thiel S. Association between deficiency of mannose-binding lectin and severe infections after chemotherapy. *Lancet* 2001;358(9282):637-8.
  25. Rutkowski MJ, Sughrue ME, Kane AJ, Mills SA, Parsa AT. Cancer and the complement cascade. *Mol Cancer Res* 2010;8(11):1453-65.
  26. Bernig, T, Boersma BJ, Howe TM, Welch R, Yadavalli S, Staats B et al. The mannose-binding lectin (MBL2) haplotype and breast cancer: an association study in African-American and Caucasian women. *Carcinogenesis* 2007;28(4):828-36.
  27. Baccarelli A, Hou L, Chen J, Lissowska J, El-Omar EM, Grillo P et al. Mannose-binding lectin-2 genetic variation and stomach cancer risk. *Int J Cancer* 2006;119(8):1970-5.
  28. Zanetti KA, Haznadar M, Welsh JA, Robles AI, Ryan BM, McClary AC et al. 3'-UTR and functional secretor haplotypes in mannose-binding lectin 2 are associated with increased colon cancer risk in African Americans. *Cancer Res* 2012;72(6):1467-77.
  29. Pine SR, Mechanic LE, Ambs S, Bowman ED, Chanock SJ, Loffredo C et al. Lung cancer survival and functional polymorphisms in MBL2, an innate-immunity gene. *J Natl Cancer Inst* 2007;99(18):1401-9.
  30. Ytting H, Christensen IJ, Steffensen R, Alsner J, Thiel S, Jensenius JC et al. Mannan-binding lectin (MBL) and MBL-associated serine protease 2 (MASP-2) genotypes in colorectal cancer. *Scand J Immunol* 2011;73(2):122-7.
  31. Toland AE, Rozek LS, Presswala S, Rennert G, Gruber SB. PTPRJ haplotypes and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17(10):2782-5.
  32. Ruivenkamp CA, van Wezel T, Zanon C, Stassen AP, Vlcek C, Csikos T et al. Ptprij is a candidate for the mouse colon-cancer susceptibility locus Scc1 and is frequently deleted in human cancers. *Nat Genet* 2002;31(3):295-300.
  33. Iuliano R, Le Pera I, Cristofaro C, Baudi F, Arturi F, Pallante P et al. The tyrosine phosphatase PTPRJ/DEP-1 genotype affects thyroid carcinogenesis. *Oncogene* 2004;23(52):8432-8.
  34. Lesueur F, Pharoah PD, Laing S, Ahmed S, Jordan C, Smith PL et al. Allelic association of the human homologue of the mouse modifier Ptprij with breast cancer. *Hum Mol Genet* 2005;14(16):2349-56.
  35. Akdeniz Odemis D, Tuncer SB, Adamnejad Ghafour A, Jabbarli K, Gider Y, Celik B et al. FGFR4 c.1162G > A (p.Gly388Arg) polymorphism analysis in Turkish patients with retinoblastoma. *J Oncol* 2020;2020:9401038.
  36. Bange J, Prechtel D, Cheburkin Y, Specht K, Harbeck N, Schmitt M et al. Cancer progression and tumor cell motility are associated with the FGFR4 Arg(388) allele. *Cancer Res* 2002;62(3):840-7.
  37. Leung HY, Gullick WJ, Lemoine NR. Expression and functional activity of fibroblast growth factors and their receptors in human pancreatic cancer. *Int J Cancer* 1994;59(5): 667-75.
  38. Wang J, Stockton DW, Ittmann M. The fibroblast growth factor receptor-4 Arg388 allele is associated with prostate cancer initiation and progression. *Clin Cancer Res* 2004;10(18 Pt 1):6169-78.
  39. Brito LP, Lerario AM, Bronstein MD, Soares IC, Mendonca BB, Fragoso MC. Influence of the fibroblast growth factor receptor 4 expression and the G388R functional polymorphism on Cushing's disease outcome. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95(10):E271-9. doi: 10.1210/jc.2010-0047.
  40. Akdeniz D, Tuncer SB, Kebudi R, Celik B, Kuru G, Kilic S et al. Investigation of new candidate genes in retinoblastoma using the TruSight One "clinical exome" gene panel. *Mol Genet Genomic Med* 2019;7(8):e785. doi: 10.1002/mgg3.785
  41. Tieder M, Modai D, Samuel R, Arie R, Halabe A, Bab I et al. Hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria. *N Engl J Med* 1985;312(10):611-7.
  42. Tahbazlahafi B, Paknejad M, Khaghani S, Sadegh-Nejadi S, Khalili E. Vitamin D Represses the Aggressive Potential of Osteosarcoma. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2021;21(7):1312-8.
  43. Ichikawa S, Sorenson AH, Imel EA, Friedman NE, Gertner JM,

- Econs MJ. Intronic deletions in the SLC34A3 gene cause hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(10):4022-7.
44. Hureaux, M, E Ashton, K Dahan, P Houillier, A Blanchard, C Cormier, et al., High-throughput sequencing contributes to the diagnosis of tubulopathies and familial hypercalcemia hypocalciuria in adults. *Kidney Int* 2019;96(6):1408-16.
45. Ali M, Kim H, Cleary S, Cupples C, Gallinger S, Bristow R. Characterization of mutant MUTYH proteins associated with familial colorectal cancer. *Gastroenterology* 2008;135(2):499-507.
46. Zai CC, AK Tiwari, V Basile, V de Luca, DJ Muller, AN Voineskos, et al., Oxidative stress in tardive dyskinesia: genetic association study and meta-analysis of NADPH quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and Superoxide dismutase 2 (SOD2, MnSOD) genes. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2010;34(1):50-6.
47. Smith MT. Benzene NQO1 and genetic susceptibility to cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(14):7624-6.
48. Chhetri J, AE King, and N Gueven, Alzheimer's Disease and NQO1: Is there a Link? *Curr Alzheimer Res* 2018;15(1):56-66.
49. Chao C, Zhang ZF, Berthiller J, Boffetta P, Hashibe M. NAD(P) H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) Pro187Ser polymorphism and the risk of lung, bladder, and colorectal cancers: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15(5): 979-87.
50. Valenzuela M, Glorieux C, Stockis J, Sid B, Sandoval JM, Felipe KB, et al., Retinoic acid synergizes ATO-mediated cytotoxicity by precluding Nrf2 activity in AML cells. *Br J Cancer* 2014;111(5):874-82.

# NÖTROFİL/LENFOSİT ORANI PREDİYABETİK HASTALARDA İNSÜLİN DİRENCİ TAHMİNİNDE HOMA-İR İNDEKSİNE ALTERNATİF BİR BELİRTEÇ OLABİLİR Mİ?: BİR RETROSPEKTİF ÇALIŞMA

## COULD THE NEUTROPHIL/LYMPHOCYTE RATIO BE AN ALTERNATIVE MARKER FOR THE PREDICTION OF INSULIN RESISTANCE IN PREDIABETIC PATIENTS?: A RETROSPECTIVE STUDY

Durmuş AYAN<sup>1</sup> , Kader ZEYBEK AYDOĞAN<sup>2</sup> , Tefrik BALCI<sup>1</sup> , Esmâ ÖZMEN<sup>3</sup> , Umut KARABAY<sup>4</sup> 

<sup>1</sup>Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyokimya, Niğde, Türkiye

<sup>2</sup>Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İç Hastalıkları, Niğde, Türkiye

<sup>3</sup>Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya, Niğde, Türkiye

<sup>4</sup>Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İç Hastalıkları, Ankara, Türkiye

ORCID ID: D.A. 0000-0003-2615-8474; K.Z.A. 0000-0001-6212-0444; T.B. 0000-0002-9331-9349; E.Ö. 0000-0003-3223-6854; U.K. 0000-0002-9632-360X

**Atf/Citation:** Nötrofil/Lenfosit oranı prediyabetik hastalarda insülin direnci tahmininde HOMA-İR indeksine alternatif bir belirteç olabilir mi?; bir retrospektif çalışma. Journal of Advanced Research in Health Sciences 2023;6(1):33-39. <https://doi.org/10.26650/JARHS2023-1183085>

### ÖZ

**Amaç:** Çalışmamızda prediyabet ve diyabet olmayan hastalarda HOMA-İR indeksi ile Trigliserid/Glukoz (TyG) indeksi, LDL-K/HDL-K oranını, Trigliserid/HDL-K oranını ve Nötrofil/ Lenfosit Oranını (NLO) bir biri ile karşılaştırmayı amaçladık.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmamıza Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesine 2019-2021 yılları arasında başvuran 18-75 yaş arasında 673'ü kadın 890'ü erkeklerden oluşan toplam 1433 hasta dahil edilmiştir. HOMA-İR indeksi, TyG indeksi, LDL-K/HDL-K oranı, Trigliserid/HDL-K oranı, NLO hesaplamaları analizi yapılan testler vasıtasıyla yapılmıştır.

**Bulgular:** Bulgularımıza göre diyabetik olmayan grupta Trigliserid/HDL-K oranının ve pre-diyabetik grupta NLO'nun rutinde kullanılan yöntem olan HOMA-İR indeksine göre hem de IR tahmininde kullanılan diğer indekslere göre duyarlılığı ve özgüllüğünün daha yüksek olduğu tespit edildi. Ayrıca diyabetik olmayan grupta Trigliserid/HDL-K oranı ile HOMA-İR indeksi arasında pozitif anlamlı bir korelasyon sonucuna ulaşılırken ( $r=0,219$ ;  $p<0,001$ ), pre-diyabetik grupta NLO ile HOMA-İR indeksi arasında anlamlı bir korelasyon sonucu bulunamadı ( $r=0,034$ ;  $p=0,290$ ).

**Sonuç:** Sonuç olarak, NLO pre-diyabetik hastalarda IR tahmininde HOMA-İR yerine alternatif bir parametre olabilir. Ancak bunun referans yöntem ile verifikasyonu yapılan prospektif çalışmalar ile doğrulanması gerektiği düşüncesindeyiz.

**Anahtar kelimeler:** Trigliserid/HDL-K oranı, TyG indeksi, HOMA-İR oranı, LDL-K/HDL-K oranı, NLO insülin resistansı, metabolik sendrom

### ABSTRACT

**Objective:** In our study, we aimed to compare Triglyceride/Glucose (TyG) index, LDL-C/HDL-C ratio, Triglyceride/HDL-C ratio, and Neutrophil/Lymphocyte Ratio (NLR) with the HOMA-IR index in non-diabetes and prediabetes.

**Material and methods:** A total of 1433 patients were included 673 women, and 890 men, aged between 18-75 years, applied to Niğde Ömer Halisdemir University Training and Research Hospital between 2019-2021 in our study. HOMA-IR index, TyG index, LDL-C/HDL-C ratio, Triglyceride/HDL-C ratio, and NLO values were calculated by means of the analyzed tests.

**Results:** According to our findings, the sensitivity and specificity of the Triglyceride/HDL-C ratio in the non-diabetic group and the NLR in the pre-diabetic group were higher than the routinely used method, the HOMA-IR index, as well as other indexes used in IR estimation. In addition, while a positive significant correlation was found between the Triglyceride/HDL-C ratio and the HOMA-IR index in the non-diabetic group ( $r=0.219$ ;  $p<0.001$ ), there was no significant correlation between NLR and HOMA-IR index in the pre-diabetic group ( $r=0.219$ ;  $p<0.001$ ),  $r=0.034$ ;  $p=0.290$ ).

**Conclusion:** NLR may be an alternative parameter to predict IR in pre-diabetic patients. However, we think that there is a need for prospective studies that are verified by the reference method.

**Keywords:** Triglyceride/HDL-C ratio, TyG index, HOMA-IR ratio, LDL-C/HDL-C ratio, NLO insulin resistance, metabolic syndrome

**Sorumlu Yazar/Corresponding Author:** Durmuş AYAN E-mail: [durmusayan@hotmail.com](mailto:durmusayan@hotmail.com)

**Başvuru/Submitted:** 01.10.2022 • **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 02.12.2022 • **Son Revizyon/Last Revision Received:** 03.12.2022 •

**Kabul/Accepted:** 16.12.2022 • **Online Yayın/Published Online:** 15.02.2023



This work is licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

## GİRİŞ

İnsülin rezistansı (IR) başta metabolik sendrom olmak üzere, tip 2 diyabet, iskelet kasına ile adipositlere glukoz girişini etkileyen insülin sinyali bozukluklarına yol açan ve bu patolojilerin gelişimini destekleyen bir durumdur (1). IR belirlemede çeşitli yöntemler kullanılsa da altın standart yöntem olarak hiperinsülinemik öglisemik klemp testi kabul edilmektedir. Ancak bu yöntemin pahalı, zaman alıcı ve kolay erişilebilir olmamasından dolayı klinik laboratuvarlarda daha pratik yöntemler tercih edilmektedir (2,3). Bunların başında HOMA-IR indeksi hesaplama yöntemi gelmektedir. HOMA-IR indeksi hesaplaması yapılırken açlık glukoz ve insülin seviyeleri kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemde HOMA-IR indeksi ile IR hesaplanırken bir takım güçlüklerle karşılaşmaktadır. Bunlardan ilki HOMA-IR indeksi hesaplamasında kullanılan serum insülin düzeylerinin ölçümü ile ilgili standardizasyonun henüz yeterli düzeyde olmayışı hem de insülin düzeylerinin biyolojik çeşitliliğinin (bireysel ve bireyler arası değişkenlik sırasıyla %21,1 ve %58,3) yüksek olmasıdır (4). Buna bağlı olarak HOMA-IR indeksi gibi insülin seviyeleri kullanılarak geliştirilmiş ve IR tahmininde doğrudan etkili olan formüllerinde standardizasyonunu etkilemiş olacaktır (4). Diğeri ise özellikle serum insülin testinin sağlık tüm laboratuvarlarda mevcut olan bir test olmayışı ve aynı zamanda insülin ölçüm yönteminin günlük pratik kullanım için yüksek maliyete sahip olmasıdır (5). Bu sebeplerden dolayı, kolay ulaşılabilir, güvenilir ve ucuz yöntemlere ihtiyaç olduğu gerçeği ortaya çıkmıştır. IR oluşmaya başladığında en çok etkilenen metabolizmalardan birisi lipid metabolizmasıdır. Özellikle lipid anormalliklerine yüksek trigliserid düzeyleri ve düşük HDL düzeyleri eşlik ederken, IR ile birlikte hepatik trigliserid lipaz aktivitesinin artması sonucunda HDL2 düzeyleri azalırken, kolesterol oranı yüksek olan HDL3 ve LDL düzeyleri artmaktadır. Lipoprotein Lipaz aktivitesinin azalması sonucu ise, HDL kolesterol düzeyleri azalırken, trigliserid düzeyleri artmaktadır. Bu bilgilerden yola çıkarak LDL-K/HDL-K, Trigliserid/HDL-K oranları daha önce IR hesaplama yöntemleri olarak kullanılmıştır (6, 7). Son dönemlerde ise, IR hem de kardiyovasküler hastalık riskini tespit etmek amacıyla daha ucuz bir yöntem olan trigliserid/glukoz (TyG) indeksi geliştirilmiştir (8, 9). Yapılan bir çalışma IR tespit etmede kullanılan ve altın standart olarak kabul edilen hiperinsülinemik öglisemik klemp testinin, HOMA-IR indeksi hesaplama yöntemine göre TyG ile daha iyi bir korelasyon gösterdiğini ortaya koymuştur (9).

IR'ye bağlı olarak pek çok metabolik hastalığın ortaya çıkması, bilim insanlarını IR üzerine odaklanmaya ve çalışmalar yapmaya yönlendirirse de IR karmaşık bir patogeneze sahiptir ve mekanizması halen tam olarak aydınlatılamamıştır. IR'nin pek çok hastalığa sebebiyet vermesinin yanı sıra günümüzde IR mekanizması inflamasyon ile de ilişkilendirilmiştir. Hatta NLO'nunsubklinikinflamasyonda yeni bir biyobelirteç olarak kabul görmesiyle son dönemlerde NLO ile IR de birbirleriyle ilişkilendirilmiştir (10, 11).

Bu bilgiler ışığında hastanemize başvurmuş pre-diyabet ve diyabet olmayan hastaların hem HOMA-IR indeksini hem de TyG indeksi, LDL-K/HDL-K oranı, Trigliserid/HDL-K oranını ve NLO'yi hesaplayıp bir biri ile kıyasladık.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız retrospektif bir çalışmadır. Çalışmamıza Niğde Ömer

Halisdemir Üniversitesi Eğitim ve Araştırma hastanesine 2019-2021 yılları arasında başvuran 18-75 yaş arasında 673'ü kadın 890'ü erkeklerden oluşan toplam 1433 hasta dahil edilmiştir.

Hastalar (Amerikan Diyabet Derneği) ADA kriterlerine göre HbA1c değerlerine göre diyabet olmayan (<%5,7) ve prediyabet olan ( $\geq$ 5.7%-6.4% (<6,5%)) olmak üzere iki gruba ayrıldı (12). Diyabet olmayan hastalar grup I (n=441), prediyabet (n=992) olan hastalar ise grup II olarak gruplandırıldı. Bu hastalardan aynı örnekten istemi yapılan ve sabah saatlerinde verilmiş kan numunesinden serum HDL, LDL, Trigliserid, insülin ve glukoz (plazma cut-off $\geq$ 126 serum cutoff $\geq$ 120; DM tanısı için düzeyleri ile tam kan numunelerinden hemogram ve HbA1c düzeyleri retrospektif olarak incelendi (12). Açlık serum glukoz, HDL, Trigliserid düzeyleri Cobas c701 (Roche) biyokimya analizöründe spektrofotometrik yöntem ile ölçülürken, açlık serum insülin düzeyleri Cobas e801 (Roche) hormon analizöründe elektrokemilüminesans yöntem ile ölçüldü. Tam kan sayımı XN-1000 (Sysmex) cihazında analiz edilirken, HbA1c düzeyleri Tosoh G8 cihazında HPLC yöntemi ile analiz edildi.

LDL-K düzeyleri modifiye edilmiş Friedewald yöntemi ile hesaplandı (13). Böylece trigliserid düzeyleri 1000 mg/dL ye kadar olan hastalarda oluşabilecek sapmanın önüne geçildi. HOMA-IR indeksi; (açlık glukoz  $\times$  açlık insülin)/405 formülüne göre hesaplandı ve cut-off değeri 2,5 olarak alındı. Buna göre HOMA-IR indeksi 2,5 ve üzeri olan hastalar IR yönünden pozitif olarak kabul edildi (14). TyG indeksi;  $\ln[(\text{açlık trigliserid (mg/dL)} \times \text{açlık glukoz (mg/dL)})/2]$  formülüne göre hesaplanırken, LDL-K/HDL-K;  $[(\text{fasting LDL (mg/dL)} \times \text{HDL (mg/dL)})]$ , Trigliserid/HDL-K;  $[(\text{açlık trigliserid (mg/dL)} \times \text{HDL (mg/dL)})]$ , NLO;  $[(\text{nötrofil} \times 10^3/\mu\text{L}) / (\text{Lenfosit} \times 10^3/\mu\text{L})]$  oranları direkt olarak sayısal değerler bir birine bölünerek hesaplandı.

Çalışmaya dâhil etme ve etmeme kriterleri:

- 18-75 yaş arasındaki hastalar
- Sabah 07:00-10:00 saatlerinde ve yaklaşık 8-10 saat açlığı takiben kan numunesi alınan hastalar
- Hikâyesinde ticari insülin kullanım olmayanlar (hastane kayıtları dikkate alınarak belirlendi)
- Ek olarak hastane tanı bilgilerine göre pankreatik bir hastalığı, karaciğer yetmezliği, akut enfeksiyon tanısı ve kronik hastalığı olmayan bireyler çalışmaya dâhil edilirken, yukarıdaki kriterleri karşılamayan bireyler ise çalışma dışı tutulmuştur.

Ayrıca insülin testi için standardizasyonunda yaşanan yetersizlikler sebebiyle CLSI-EP15A3 kriterlerine göre 5 gün 5 çalışma 5\*5 toplam 25 tekrar ile tekrarlanabilirlik ve laboratuvar içi CV'ler hesaplandı. Seviye 1 kontrol için (ortalama: 21,84 bulundu), katalog verisi 21,9 idi. Tekrarlanabilirlik CV: %1,1 bulundu (katalog verisi EP5A2 ye göre %3,2 idi). Laboratuvar içi CV: %2,39 bulundu (katalog verisi EP5A2 ye göre %4,2 idi). Seviye 2 kontrol için, tekrarlanabilirlik CV: %0,77 bulundu (katalog verisi %3,7 idi). Laboratuvar içi CV: %1,35 bulundu (katalog verisi %4,6 idi).

## BULGULAR

Hastalarımıza ait yaş ve değerlendirilen parametrelerin ortalama ve ortalamının standart hatası (standard error of mean, SEM) değerleri Tablo 1'de verilmiştir.



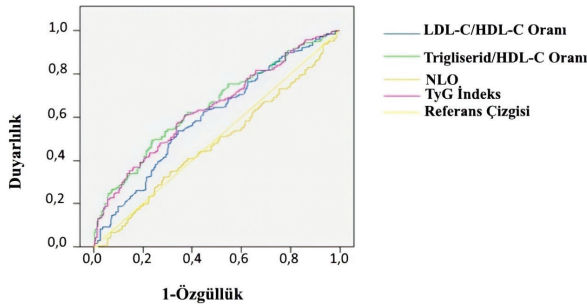
**Tablo 1:** Değerlendirilen parametrelerin ortalama ve standart sapma değerleri

Parametreler, unite	Diyabet olmayan (n=441) Grup I		Pre-diyabet (n=992) Grup II		p
	Ortalama	±SEM	Ortalama	±SEM	
Yaş (yıl)	37,5	0,57	43,6	0,26	<0,01
Açlık Glukoz mg/dL	87,7	0,29	101,3	0,27	<0,01
Açlık İnsülin	13,1	0,29	14,5	0,16	<0,01
HDL mg/dL	51,1	0,58	43,9	0,26	<0,01
Trigliserid mg/dL	127,7	3,56	123,1	2,52	0,225
LDL mg/dL	103,1	1,75	77,5	1,31	<0,01
HbA1c %	5,2	0,01	5,85	0,01	<0,01
Nötrofil X 10 <sup>3</sup> /uL	4,03	0,06	8,37	0,13	<0,01
Lenfosit X 10 <sup>3</sup> /uL	2,4	0,03	2,42	0,02	0,589
TyG indeksi	8,49	0,02	8,63	0,01	<0,01
HOMA-IR indeksi	2,19	0,06	3,65	0,04	<0,01
LDL-K/HDL-K oranı	2,14	0,04	1,75	0,03	<0,01
Trigliserid /HDL-K oranı	2,86	0,12	2,93	0,07	0,631
Nötrofil/Lenfosit Oranı (NLO)	1,82	0,05	4,68	0,19	<0,01
WBC X 10 <sup>3</sup> /uL	6,19	0,11	9,48	0,35	<0,01

HDL-K: Yüksek yoğunluklu lipoprotein- Kolesterol (High Density Lipoprotein- Cholesterol), LDL-K: düşük yoğunluklu lipoprotein- Kolesterol (Low Density Lipoprotein- Cholesterol), TyG: Trigliserid/Glukoz, WBC; beyaz kan hücresi (White Blood Cell).

Grup I'nin TyG indeksi, LDL-K/HDL-K oranı, Trigliserid/HDL-K oranı ve NLO değerlerine ait cut-off, sensitivite ve spesifite değerleri ROC analizi yapılarak belirlenmiştir (Şekil 1). Mevcut çalışmada retrospektif olarak taranan hastalarda IR belirlemek için rutinde kullanılan HOMA-IR indeksi için cut-off değeri 2,5 alındığında, TyG indeksi, LDL-K/HDL-K oranı, Trigliserid/HDL-K oranı ve NLO arasında en yüksek AUC (0,650) değeri Trigliserid/HDL-K oranına aittir. Ayrıca diyabet olmayan grubun (Grup I) Trigliserid/HDL-K oranına ait duyarlılık (%61) ve özgüllük (%61) değerleri diğer parametrelere göre daha yüksek bulunurken, cut-off değerimiz tüm popülasyon için 2,20 olarak belirlendi (Tablo 2).

**ROC EĞRİSİ**



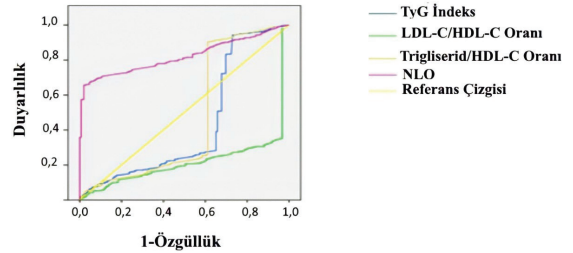
**Şekil 1:** Diyabetik olmayan hastalar için ROC eğrisi; TyG indeksi, LDL-K/HDL-K oranı, Trigliserid/HDL-C oranı ve NLO'ye karşı HOMA-IR indeksi

**Tablo 2:** Diyabetik olmayan hastalarda değerlendirilen parametrelerin AUC, Cutt-off (kesim noktası), duyarlılık ve özgüllük değerleri

Parametreler	AUC (95%)	Cutt-off	p	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)
TyG indeksi	0,641	8,48	<0,001	61	60
LDL-K/HDL-K oranı	0,601	1,97	<0,001	58	58
Trigliserid/HDL-K oranı	0,650	2,20	<0,001	61	61
NLO	0,481	1,61	0,481	49	49

TyG: Trigliserid/Glukoz, HDL-K: Yüksek yoğunluklu lipoprotein- Kolesterol (High Density Lipoprotein- Cholesterol), LDL-K: düşük yoğunluklu lipoprotein- Kolesterol (Low Density Lipoprotein- Cholesterol), NLO: Nötrofil/Lenfosit Oranı.

**ROC EĞRİSİ**



**Şekil 2:** Pre-diyabetik hastalar için ROC eğrişi; TgG indeksi, LDL-K/HDL-K oranı, Trigliserid/HDL-C oranı ve NLO'ye karşı HOMA-IR indeksi

Grup II'nin TyG indeksi, LDL-K/HDL-K oranı, Trigliserid/HDL-K oranı ve NLO değerlerine ait cut-off, duyarlılık ve özgüllük değerleri ROC analizi yapılarak belirlenmiştir (Şekil 2). Mevcut çalışmada retrospektif olarak taranan hastalarda IR belirlemek için rutinde kullanılan HOMA-IR indeksi için cut-off değeri 2,5 alındığında, TyG indeksi, LDL-K/HDL-K oranı, Trigliserid/HDL-K oranı ve NLO arasında en yüksek AUC (0,822) değeri NLO'ye aittir. Ayrıca pre-diyabet grubun (Grup II) NLO için duyarlılık (%74) ve özgüllük (%75) değerleri diğer parametrelere göre daha yüksek bulunurken, cut-off değerimiz tüm popülasyon için 2,04 olarak belirlendi (Tablo 3).

**Tablo 3:** Pre-diabetic hastalar (Grup II) için değerlendirilen parametrelerin AUC, Cut-off (kesim noktası), duyarlılık ve özgüllük Değerleri

Parametreler	AUC (95%)	Cutt-off	p	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)
TyG indeksi	0,431	8,52	0,006	39	35
LDL-K/HDL-K oranı	0,218	1,95	<0,001	27	27
Trigliserid/HDL-K oranı	0,466	2,28	0,176	26	39
NLO	0,822	2,04	<0,001	74	75

NLO: Nötrofil/Lenfosit oranı

Grup I'in korelasyon sonuçlarına göre; HOMA-IR indeksi ile, TyG indeksi, LDL-K/HDL-K oranı, Trigliserid/HDL-K oranı ve NLO arasında pozitif bir korelasyon tespit edildi (sırasıyla  $r=0,311$ ;  $p<0,001$ ,  $r=0,181$ ;  $p<0,001$ ,  $r=0,219$ ;  $p<0,001$ ,  $r=0,150$ ;  $p=0,002$ ).

Grup II'inkorelasyon sonuçlarına göre; HOMA-IR indeksi ile, TyG indeksi ve Trigliserid/HDL-K oranı arasında pozitif bir korelasyon tespit edilirken (sırasıyla  $r=0,287$ ;  $p<0,001$ ,  $r=0,340$ ;  $p<0,001$ ), LDL-K/HDL-K oranı ve NLO ile herhangi bir korelasyona rastlanmamıştır (sırasıyla  $r=-0,013$ ;  $p=0,672$ ,  $r=0,034$ ;  $p=0,290$ ).

Grup I'in HbA1c sonuçları ile Trigliserid/HDL-K ve TyG indeksi arasında pozitif anlamlı bir korelasyon tespit edilirken (sırasıyla  $r=0,121$ ;  $p<0,01$ ,  $r=0,153$ ;  $p<0,01$ ), NLO ve HOMA-IR indeksi ile HbA1c sonuçları arasında herhangi bir korelasyona rastlanmamıştır (sırasıyla  $r=-0,005$ ;  $p=0,910$ ,  $r=0,083$ ;  $p=0,082$ ).

Grup II'nin HbA1c sonuçları ile Trigliserid/HDL-K, TyG, ve

HOMA-IR arasında pozitif anlamlı bir korelasyon bulunurken (sırasıyla  $r=0,089$ ;  $p=0,005$ ,  $r=0,159$ ;  $p<0,01$ ,  $r=0,217$ ;  $p<0,01$ ) NLO ile HbA1c arasında negatif anlamlı bir korelasyon bulundu ( $r=-0,234$ ;  $p<0,01$ ).

Grup I ve Grup II'nin sonuçları dikkate alındığında; Grup I için duyarlılık ve özgüllük en yüksek Trigliserid/HDL-K oranı olarak tespit edilmiştir.

Farklı yaş dekatlarına göre yapılan istatistiksel değerlendirme neticesinde 30-39 dekatında kadınların NLO ortalaması, erkeklerin NLO ortalamasına göre istatistiksel anlamlı yüksek bulundu. 40-49 yaş dekatında ise erkeklerin NLO ortalaması, kadınların NLO ortalamasına göre istatistiksel olarak anlamlı yüksekti. Ayrıca 20-29, 50-59, 60-69 yaş dekatlarında erkekler ile kadınların NLO değerleri arasında anlamlı bir fark yoktu (Tablo 4).

## TARTIŞMA

Çalışmada retrospektif olarak elde edilen hasta sonuçlarından TyG indeksi, LDL-K/HDL-K oranı, Trigliserid/HDL-K oranı ve NLO ile rutinde insülin direnci tahmininde kullanılan HOMA-IR indeks değerleri hesaplanıp bir biri ile kıyaslandı. Elde ettiğimiz sonuçlara göre öne çıkan ilk bulgumuz, diyabeti olmayan hastalarda (Grup I) Trigliserid/HDL-K oranının, pre-diyabetik hastalarda ise NLO'ya ait AUROC, duyarlılık ve özgüllük değerinin istatistiksel olarak IR tahmininde kullanılan diğer indeks ve oranlara göre daha yüksek olmasıydı.

HOMA-IR indeksinde kullanılan serum insülin düzeyleri ilgili özellikle epidemiyolojik çalışmalarının sınırlı sayıda olması, standardizasyonunda yaşanan sorunlar ve birinci basamak gibi yalnızca basit testlere izin verilen her sağlık kurumunda analizinin yapılmaması IR tahmininde bu indeksin kullanılmasında sorun teşkil etmektedir (4, 5). Bu sebeple IR gibi hem metabolik sendrom hem de koroner kalp hastalığı, polikistik over sendromu (PCOS), karaciğer yağlanması gibi bir çok hastalıkta yarar sağlayan böyle bir tanıl durumun değerlendirilmesi için fiyat etkinliği ve standardizasyonu sağlanmış indekslerin kullanılması popüler hale gelmiştir. Trigliserid/HDL-K oranı ve IR arasındaki ilişkinin farklı etnik kökenler açısından incelendiği bazı çalışmalar, Trigliserid/HDL-K oranı ve IR arasında kuvvetli bir ilişki olduğunu savunurken, Sumner ve arkadaşları ise Trigliserid/HDL-K oranı ve IR arasında zayıf bir ilişki olduğunu savunmuşlardır (15-19). Metabolik sendrom IR ile ilişkili bir durumdur. Bu

**Tablo 4:** Kadın ve erkek arasında farklı yaş gruplarında NLO'nun karşılaştırılması

Grup	Sayı		Ortalama yaş (Yıl)		p değeri	NLO (medyan-IQR)/ ortalama± s.s.		
	K	E	K	E		K	E	p değeri
20-29	21 (%75)	7 (%25)	23,9	27,0	<0,01	1,91 (1,32-2,55)	1,75 (1,50-2,14)	0,693
30-39	56 (%40,9)	81 (%59,1)	35,3	36,8	<0,01	1,96±0,33	1,80±0,54	<0,01
40-49	85 (%12,9)	575 (%87,1)	43,9	42,2	<0,01	1,67±0,60	4,86±1,94	<0,01
50-59	63 (%68,4)	29 (%31,6)	54,3	52,9	<0,01	1,37 (1,15-1,84)	1,66 (1,30-1,88)	0,084
60-69	41 (%75,9)	13 (%24,1)	60,4	63,4	<0,01	1,54 (1,23-2,04)	1,70 (1,47-1,90)	0,491

NLO: Nötrofil/Lenfosit Oranı, K:kadın, E: erkek, IQR: Inter quartile range (inter kuartil aralık), SS: Standart sapma

yüzen metabolik sendrom ile ilişkili dislipidemiye karşımıza çıkan başta LDL-K/HDL-K oranı olmak üzere lipid oranlarındaki değişimlerde IR ile ilişkilendirilebilmektedir (20). Hatta farklı bir çalışmadan elde edilen veriler LDL-K/HDL-K oranının, pre-diyabet gelişimi için bağımsız risk faktörü olduğu bildirilmekle birlikte lipid düşürücü tedavinin pre-diyabet gelişim riskini azaltacağı vurgulanmıştır (21). Her ne kadar genel kanı LDL-K/HDL-K oranının, IR tahmininde yararlı olabileceği yönünde olsa da hem abdominal obezitesi bulunan tip 2 diyabetli hastalarda LDL-K/HDL-K oranının IR ile korelasyon göstermediği hem de metabolik sendromu olarak hastalarda HOMA-IR ile LDL-K/HDL-K korelasyon görülmediği tespit edilmiştir (22, 23).

Mevcut çalışmada diyabetik olmayan grup ve pre-diyabetik grupta Trigliserid/HDL-K oranı ile HOMA-IR indeksi arasında tespit ettiğimiz pozitif korelasyondan yola çıkarak Trigliserid/HDL-K oranı ve IR ilişkisinden bahsedebiliriz. Ayrıca diyabetik olmayan grupta ROC analizi ile elde edilen verilere gören yüksek AUROC, duyarlılık ve özgüllük değeri Trigliserid/HDL-K oranına aitti. Ancak lipid panelinin kullanıldığı diğer parametreler olan LDL-K/HDL-K oranı ile TyG indeksine ait AUROC, duyarlılık ve özgüllük değerlerinin Trigliserid/HDL-K oranına oldukça yakın olduğu görüldü. Değerler arasındaki bu derece yakınlığın, diyabetik olmayan grupta lipid panelindeki değişikliklerin IR tahmininde yararlı olabileceğini söyleyebiliriz.

NLO subklinik inflamasyonun belirteci olarak bilinmektedir ve IR mekanizması inflamasyon ile ilişkili olduğu için NLO'nin IR tahmininde yarar sağladığını savunan yayınlar bulunmaktadır (10, 24-25). NLO'nin obez hastalarda glukoz intoleransının erken tahminindeki yeri değerlendirilirken, NLO'nin sadece IR bulunan obez hastalarda yüksek olduğu bulunmuştur (24). Sağlıklı katılımcılar ile kıyaslandığında obez hastalarda NLO'nin daha yüksek bulunduğu çalışmada bu durumun aynı zamanda IR ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (25). Yeni tanı almış diyabetik hastalarda yüksek NLO değerlerinin IR ile önemli ölçüde ilişkili olabileceği savunulurken, NLO ölçümünün ucuz ve prediktif bir belirteç olduğu bildirilmiştir (10). Benzer bir yorum metabolik sendromlu hastalarda yapılan çalışmada ortaya konulmuş ve NLO'nin IR tahmininde önemli bir belirteç olduğu savunulmuştur (26). Aşırı kilolu ve obez çocuklarda yapılan çalışmada, artmış NLO değerlerinin IR varlığının göstergesi olabileceği bildirmiştir (27). Gestasyonel diyabet ve NLO ilişkisinin incelendiği araştırmada, yükselmiş NLO düzeylerinin gebelik sırasında hiperglisemik olan hastalarda klinik olarak olumsuz bir faktör olabileceği bildirilmiştir (28). Yapılan çalışmaların çoğu artmış NLO düzeylerinin tip 2 diyabetli hastalarda zayıf glisemik kontrol ile ilişkili olduğunu savunmuştur (29-31). Bunların yanı sıra Akin ve arkadaşları NLO'nin diyabetik hastaların takibinde kolay ölçülebilir, kan alma dışında girişimsel işlem gerektiremeyen, kolay ulaşılabilir ve maliyet etkinliği olan bir parametre olarak kullanılabileceği bildirmiştir (31). Çalışmaların aksine Mendes ve arkadaşları hiperglisemik hasta grubu ile normoglisemik hasta grubu arasında NLO düzeyleri açısından bir farka rastlamamıştır (32). Metabolik sendrom ve NLO ilişkisinin değerlendirildiği çalışmalar, NLO'nun artan düzeyleri ile birlikte metabolik sendrom risk artışının ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (33, 34). Düşük de-

receli bir inflasyon belirteci olan NLO'nin santral obezite ile ilişkili olduğunu savunan çalışma, diyabet insidansının ve şiddetinin NLR ile ilişkili olduğunu belirtmiştir. Ayrıca hipertansiyon ve hiperlipidemi durumunda daha yüksek NLR düzeylerinin oluştuğunu ve metabolik sendrom ile ilişkili olduğunu savunulmuştur (34). Mevcut çalışmada pre-diyabetik grupta NLO değerine ait AUROC, duyarlılık ve özgüllük değerleri istatistiksel olarak IR tahmininde kullanılan Trigliserid/HDL-K oranı ve LDL-K/HDL-K ile TyG indekslerine göre daha yüksek bulunmuştur.

NLO yaşa göre farklı dekatlarda değişiklik gösteren bir parametredir. Sağlıklı popülasyonda yapılan bir çalışma farklı dekatlarda NLO değerinin en yaşlı grupta (>70 yaş) en yüksek, en genç grupta (<20 yaş) en düşük değere sahip olduğunu bildirmiştir (35). Çalışmamızda 20-29, 50-59 ve 60-69 yaş dekatları arasında kadın ve erkek yaş grupları arasında NLO düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilemedi. Diğer gruplarda ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır. Ancak hastaneye başvuran ve çalışma dahil etme kriterlerine göre incelenen hastaların cinsiyet dağılımlarının homojen olmaması yaş dekatları ve cinsiyete göre değerlendirmeyi zorlaştırmaktadır. Bu nedenle homojen dağılım gösteren örneklemenin seçildiği çalışmaların yapılması ile daha doğru sonuçlar elde edilebileceği düşüncesindeyiz.

Ulusal Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması-II (TURDEP-II)'nin düzenlemiş olduğu rapor neticesine göre HbA1c'ye göre diyabet tanısı alan kişilerin, açlık plazma glukozu veya oral glukoz tolerans testi ile tanı alan kişilere göre metabolik açıdan [vücut ağırlığı, bel çevresi, lipid ve kan basıncı (KB) yönünden] daha olumsuz durumda olduklarını bildirilmiştir (36). Çalışmamızda, pre-diyabetik hasta grubunda HbA1c sonuçları ile Trigliserid/HDL-K oranı, TyG indeksi, HOMA-IR indeksi ve NLO arasında anlamlı korelasyon sonuçlarına ulaşılmıştır. Dolayısıyla, bu indeks ve oranlar kullanılarak IR tahmininin yanı sıra pre-diyabetik dönemde metabolik açıdan olumsuz durumlar hakkında bilgi edinilebilir.

## SONUÇ

Sonuç olarak, NLO'nin IR direnci tahmininde belirteç olarak kullanılması yararlı olabilir ancak rutinde hali hazırda IR tahmininde kullanılan HOMA-IR ile NLO arasında prediyabetik grupta anlamlı bir korelasyonun olmaması, NLO'yu kanıta ve çalışmaya ihtiyaç duyan zayıf bir parametre haline getirmektedir. Bu sebeple NLO'nin oranının IR tahminindeki rolünün daha iyi anlaşılabilmesi için, özellikle IR belirlemede altın standart olan hiperinsülinemik öglisemik klemp yöntemi ile validasyonu yapılmalıdır. Mevcut çalışmada elde edilen sonuçların hastalık gruplarına, yaş, cinsiyet ve popülasyonlara göre ayrılan prospektif çalışmalar ile desteklenmesi gerektiği düşüncesindeyiz.

## Çalışmanın sınırlamaları

Çalışmamız iyi bir şekilde tasarlanmasına rağmen bir takım sınırlamalar mevcuttu. Bunlardan birincisi hastalar retrospektif tarandığı için IR'ye neden temel mekanizmalardan olan oksidatif stress, inflamasyon, insülin reseptör mutasyonu gibi hücresel mekanizmalar hakkında bilgi edinilemedi. İkincisi çalışmanın

yine retrospektif olmasından dolayı lipid metabolizmasında önem arz eden antropometrik ölçüm sonuçlarına (BMI, bel çevresi, boyun çevresi, kilo ve boy) gibi sonuçlara ulaşamadık.

**Etik Komite Onayı:** Bu çalışma için etik komite onayı Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Rektörlüğü Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Tarih: 10.09.2022, No: E-95860085-050.02.04-248104).

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

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir

**Finansal Destek:** Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

**Ethics Committee Approval:** This study was approved by Niğde Ömer Halisdemir University Non-Invasive Clinical Research Ethics Committee (Date: 10.09.2022, No: E-95860085-050.02.04-248104).

**Peer Review:** Externally peer-reviewed.

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

**Conflict of Interest:** Authors declared no conflict of interest.

**Financial Disclosure:** Authors declared no financial support.

## KAYNAKLAR

1. Yaribeygi H, Farrokhi R F, Butler E A, Sahebkar A. Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms. *J Cell Physiol* 2019;234(6):8152-61.
2. Buchanan T A, Watanabe R M, Xiang A H. Limitations in surrogate measures of insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95(11):4874-6.
3. Thompson DS, Boyne MS, Osmond C, Ferguson TS, Tulloch-Reid MK, Wilks RJ, et al. Limitations of fasting indices in the measurement of insulin sensitivity in Afro-Caribbean adults. *BMC Res Notes* 2014;7(1):98.
4. Unger G, Benozzi F S, Perruza F, Pennacchiotti L G. Triglycerides and glucose index: A useful indicator of insulin resistance. *Endocrinol Nutr* 2014;61(10):533-40.
5. Kang B, Yang Y, Lee EY, Yang HK, Kim HS, Lim SY, et al. Triglycerides/ glucose index is a useful surrogate marker of insulin resistance among adolescents. *Int J Obes* 2017;41(5):789-92.
6. Roa Barrios M, Arata-Bellarbarba G, Valeri L, Velázquez-Maldonado


- E. Relationship between the triglyceride/high-density lipoprotein-cholesterol ratio, insulin resistance index and cardiometabolic risk factors in women with polycystic ovary syndrome. *Endocrinol Nutr* 2009;56(2):59-65.
7. Aslan Çin NN, Yardımcı H, Koç N, Uçaktürk SA, Akçil Ok M. Triglycerides/high-density lipoprotein cholesterol is a predictor similar to the triglyceride-glucose index for the diagnosis of metabolic syndrome using International Diabetes Federation criteria of insulin resistance in obese adolescents: a cross-sectional study. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2020;33(6):777-84.
8. Hong S, Han K, Park C-Y. The triglyceride glucose index is a simple and low-cost marker associated with atherosclerotic cardiovascular disease: a population-based study. *BMC Med* 2020;18(1):361.
9. Guerrero-Romero F, Simental-Mendía LE, González-Ortiz M, Martínez-Abundis E, Ramos-Zavala MaG, Hernández-González SO, et al. The product of triglycerides and glucose, a simple measure of insulin sensitivity. comparison with the euglycemic-hyperinsulinemic clamp. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95(7):3347-51.
10. Lou M, Luo P, Tang R, Peng Y, Yu S, Huang W, et al. Relationship between neutrophil-lymphocyte ratio and insulin resistance in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus patients. *BMC Endocr Disord* 2015;15:9.
11. Rodríguez-Rodríguez E, Salas-González MD, Ortega RM, López-Sobaler AM. Leukocytes and neutrophil-lymphocyte ratio as indicators of insulin resistance in overweight/obese school-children. *Front Nutr* 2021;8:811081.
12. American Diabetes Association; 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes 2021. *Diabetes Care* 2021;44 (Supplement\_1):15-33.
13. Chen Y, Zhang X, Pan B, Jin X, Yao H, Chen B, et al. A modified formula for calculating low-density lipoprotein cholesterol values. *Lipids Health Dis* 2010;9(1):52.
14. Kamon T, Kaneko H, Itoh H, Kiriya H, Koyama K, Fujiu K, et al. Association between insulin resistance and left ventricular diastolic dysfunction in non-diabetic general population. *Eur Heart J* 2020;41(Supplement\_2):3057.
15. Hirschler V, Maccallini G, Sanchez M, Gonzalez C, Molinari C. Association between triglyceride to HDL-C ratio and insulin resistance in indigenous Argentinean children. *Pediatr Diabetes* 2015;16(8):606-12.
16. Giannini C, Santoro N, Caprio S, Kim G, Lartaud D, Shaw M, et al. The triglyceride-to-HDL cholesterol ratio: association with insulin resistance in obese youths of different ethnic backgrounds. *Diabetes Care* 2011;34(8):1869-74.
17. Kang HT, Yoon JH, Kim JY, Ahn SK, Linton JA, Koh SB, et al. The association between the ratio of triglyceride to HDL-C and insulin resistance according to waist circumference in a rural Korean population. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2012;22(12):1054-60.
18. Yeh WC, Tsao YC, Li WC, Tzeng IS, Chen LS, Chen JY. Elevated triglyceride-to-HDL cholesterol ratio is an indicator for insulin resistance in middle-aged and elderly Taiwanese population: a cross-sectional study. *Lipids Health Dis* 2019;18(1):176.
19. Sumner AE, Finley KB, Genovese DJ, Criqui MH, Boston RC. Fasting triglyceride and the triglyceride-HDL cholesterol ratio are not markers of insulin resistance in African Americans. *Arch Intern Med* 2005;165(12):1395-400.

20. Kimm H, Lee SW, Lee HS, Shim KW, Cho CY, Yun JE, et al. Associations between lipid measures and metabolic syndrome, insulin resistance and adiponectin: usefulness of lipid ratios in Korean men and women. *Circ J* 2010;74(5):931-7
21. Kuang M, Peng N, Qiu J, Zhong Y, Zou Y, Sheng G. Association of LDL:HDL ratio with prediabetes risk: a longitudinal observational study based on Chinese adults. *Lipids Health Dis* 2022;21(1):44.
22. Novida H, Murtiwi S, Tjokroprawiro A, Pranoto A, Sutjahjo A, Soelistijo SA, et al. Are there any correlations between ratio LDL-C/HDL-C and lipoprotein (A) with insulin resistance in type 2 diabetes patients with abdominal obesity? *Diabetes Res Clin Pract* 2014;106(Supp1):S208.
23. Rahmayani R, Aman AK, Safril S. The association of insulin resistance and lipid profile ratio in metabolic syndrome. *Indones J Clin Path Med Labor* 2019;25(1):21-5.
24. Efendioğlu EM, Mustafa A. Neutrophil-to-lymphocyte ratio and insulin resistance relationship in obese individuals with normal and impaired glucose tolerance. *Exper Appl Med Sci* 2022;3(1):265-72.
25. Karakaya S, Altay M, Efe FK, Karadağ İ, Ünsal O, Bulur O, et al. The neutrophil-lymphocyte ratio and its relationship with insulin resistance in obesity. *Turk J Med. Sci* 2019;49(1):245-8.
26. Zafar U, Ali Z, Khaliq S, Lone KP. Correlation of insulin resistance with neutrophil to lymphocyte ratio and serum ferritin in male patients of metabolic syndrome. *J Pak Med Assoc* 2022;72(4):696-701.
27. Rodríguez-Rodríguez E, Salas-González MD, Ortega RM, López-Sobaler AM. Leukocytes and neutrophil-lymphocyte ratio as indicators of insulin resistance in overweight/obese school-children. *Frontiers Nut* 2022;8:811081.
28. Wang J, Zhu Q-W, Cheng X-Y, Sha C-X, Cui Y-B. Clinical significance of neutrophil-lymphocyte ratio and monocyte-lymphocyte ratio in women with hyperglycemia. *Postgraduate Med* 2020;132(8):702-8.
29. Sefil F, Ulutas KT, Dokuyucu R, Sumbul AT, Yengil E, Yagiz AE, et al. Investigation of neutrophil lymphocyte ratio and blood glucose regulation in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Int Med Res* 2014;42(2):581-8.
30. Hussain M, Babar MZM, Akhtar L, Hussain MS. Neutrophil lymphocyte ratio (NLR): A well assessment tool of glycemic control in type 2 diabetic patients. *Pak J Med Sci* 2017;33(6):1366-70.
31. Akin S, Aydin Z, Yilmaz G, Aliustaoglu M, Keskin O. Evaluation of the relationship between glycaemic regulation parameters and neutrophil-to-lymphocyte ratio in type 2 diabetic patients. *EMJ Diabet* 2019;7(1):91-6.
32. Mendes BB, Oliveira ACR, Alcântara KC. Comparison of the neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratios in normoglycemic and hyperglycemic subjects. *Einstein (Sao Paulo)* 2019;17(1):eAO4403.
33. Liu CC, Ko HJ, Liu WS, Hung CL, Hu KC, Yu LY, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as a predictive marker of metabolic syndrome. *Med (Baltimore)* 2019;98(43):e17537. doi: 10.1097/MD.00000000000017537.
34. Hashemi Moghanjoughi P, Neshat S, Rezaei A, Heshmat-Ghahdarjani K. Is the neutrophil-to-lymphocyte ratio an exceptional indicator for metabolic syndrome disease and outcomes? *Endocr Pract* 2022;28(3):342-8.
35. Li J, Chen Q, Luo X, Hong J, Pan K, Lin X, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio positively correlates to age in healthy population. *J Clin Lab Anal* 2015;29(6):437-43.
36. Satman I, Omer B, Tutuncu Y, Kalaca S, Gedik S, Dincçag N, et al. Twelve-year trends in the prevalence and risk factors of diabetes and prediabetes in Turkish adults. *Eur J Epidemiol* 2013;28(2):169-80.



# CLINICAL COURSE OF COVID-19 PATIENTS UNDER MESENCHYMAL STEM CELL THERAPY

## MEZENKİMAL KÖK HÜCRE TEDAVİSİ UYGULANAN COVID-19 HASTALARININ SEYRİ

Hayri CANBAZ<sup>1</sup> , Hikmet Can ÇUBUKÇU<sup>2</sup> , Ahmet DEMİR<sup>3</sup> , Fatih KACIROĞLU<sup>4</sup> , Seher TAŞ<sup>4</sup> ,  
Alpay TUNCAR<sup>5</sup> , Mehmet Ferit FEDAİ<sup>4</sup> , Murat GÜLŞEN<sup>6</sup> , Atilla BEŞTEMİR<sup>7</sup> 

<sup>1</sup>University of Yıldırım Beyazıt, Yenimahalle Training and Research Hospital, Department of Emergency Medicine, Ankara, Türkiye

<sup>2</sup>Ankara University Institute of Health Sciences, Stem Cell Institute, Ankara, Türkiye

<sup>3</sup>Muğla Sıtkı Koçman University Training and Research Hospital, Department of Emergency Medicine, Muğla, Türkiye

<sup>4</sup>Ministry of Health, General Directorate of Health Services, Head of Tissue and Organ Transplantation Department, Ankara, Türkiye

<sup>5</sup>University of Health Sciences Faculty of Medicine, Etlik City Hospital, Department of Emergency Medicine, Ankara, Türkiye

<sup>6</sup>University of Health Sciences Faculty of Medicine, Etlik City Hospital, Department of Pediatrics, Ankara, Türkiye

<sup>7</sup>University of Health Sciences Faculty of Medicine, Bakırköy Dr. Sadi Konuk Training and Research Hospital, Department of Emergency Medicine, İstanbul, Türkiye

**ORCID ID:** H.C. 0000-0001-6989-7854; H.C.Ç. 0000-0001-5321-9354; A.D. 0000-0001-6877-9047; F.K. 0000-0003-4628-673X; S.T. 0000-0002-1854-9283; A.T. 0000-0002-3889-819X; M.F.D. 0000-0003-2453-7729; M.G. 0000-0003-4494-9536; A.B. 0000-0003-0986-9039

**Citation/Atf:** Canbaz H, Cubukcu HC, Demir A, Kacioglu F, Tas S, Tuncar A, et al. Clinical course of COVID-19 patients under mesenchymal stem cell therapy. Journal of Advanced Research in Health Sciences 2023;6(1):40-45. <https://doi.org/10.26650/JARHS2023-1226757>

### ABSTRACT

**Objective:** Several countries have used mesenchymal stem cells (MSCs) in clinical trials for treating Coronavirus-19 (COVID-19) patients, considering their therapeutic effects through tissue repair and anti-inflammatory mechanisms. This study aimed to investigate the early effects of MSC application in COVID-19 pneumonia patients on clinical and inflammatory parameters and life expectancy.

**Material and Method:** We retrospectively analyzed 164 unvaccinated patients with COVID-19 pneumonia (all age groups) who had applied to the Republic of Türkiye, Ministry of Health, Department of Tissue, Organ Transplantation, and Dialysis Services and received the MSC application from March 1, 2020 to March 1, 2021.

**Results:** Using the Kaplan Mayer survival analysis, the cut-off age (which significantly increased the survival risk) was found to be 61 years. Females had a 1.56 times higher risk of death than males. Sixty-eight percent (113/164) of the patients had a comorbidity, which increased the risk of death by 1.58 times compared to those without any comorbidity. The presence of coronary artery disease increased the risk of death by 1.79 times. Further, the risk of death was 7 times higher in intubated patients than in those who were not (95% CI: 3.72–13.17). Unfortunately, 64% (106/164) of the patients died. Lastly, there was a statistically significant increase in the post-MSC treatment median Sequential Organ Failure Assessment Score (SOFA) score values at the time of application, on days 3, 7, 14, and until the end (discharge/exitus).

**Conclusion:** This study was conducted with unvaccinated patients and MSC treatment for COVID-19-related pneumonia is not adequately effective.

**Keywords:** Coronavirus, COVID-19, mesenchymal stem cell, mortality, survival

### ÖZ

**Giriş:** Birkaç ülke, doku onarımı ve anti-inflamatuar mekanizmalar yoluyla terapötik etkilerini göz önünde bulundurarak, Koronavirüs-19 (COVID-19) hastalarını tedavi etmek için klinik deneylerde mezenkimal kök hücreleri (MKH) kullanmıştır. Bu çalışma, COVID-19 pnömoni hastalarında MKH uygulamasının klinik ve inflamatuvar parametreler ve yaşam beklentisi üzerindeki erken etkilerini araştırmak amaçladı.

**Gereç ve Yöntem:** Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Doku, Organ Nakli ve Diyaliz Hizmetleri Daire Başkanlığı'na başvuran ve 1 Mart 2020 - 1 Mart 2021 tarihleri arasında MKH uygulaması için başvurusu olan COVID-19 pnömonisi (tüm yaş grupları) olan aşılınmamış 164 hastayı geriye dönük olarak inceledik.

**Bulgular:** Kaplan Mayer sağkalım analizi kullanılarak, kırılma yaşı (hayatta kalma riskini önemli ölçüde artıran) 61 yıl olarak bulundu. Kadınlar erkekler göre 1.56 kat daha fazla ölüm riskine sahipti. Hastaların %68'inde (113/164) komorbidite mevcuttu ve bu komorbiditesi olmayanlara göre ölüm riskini 1,58 kat artırıyordu. Koroner arter hastalığı varlığı ölüm riskini 1,79 kat artırdı. Ayrıca, entübe hastalarda entübe olmayanlara göre ölüm riski 7 kat daha yüksekti (%95 GA: 3.72-13.17). Maalesef hastaların %64'ü (106/164) öldü. Son olarak, MKH sonrası tedavi medyan Sıralı Organ Yetmezliği Değerlendirme Skoru (SOFA) değerlerinde uygulama sırasında, 3, 7, 14. günlerde ve sonuna kadar (taburcu/ölüm) istatistiksel olarak anlamlı bir artış oldu.

**Sonuç:** Bu çalışma aşılınmamış hastalarla yapılmıştır ve COVID-19 ile ilişkili pnömoni için MKH tedavisi yeterince etkili değildir.

**Anahtar Kelimeler:** Koronavirüs, COVID-19, mezenkimal kök hücre, mortalite, sağ kalım

**Corresponding Author/Sorumlu Yazar:** Hayri CANBAZ E-mail: [dr\\_endorfin@yahoo.com](mailto:dr_endorfin@yahoo.com)

**Submitted/Başvuru:** 02.01.2023 • **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 02.01.2023 • **Last Revision Received/Son Revizyon:** 10.01.2023

• **Accepted/Kabul:** 11.01.2023 • **Published Online/Online Yayın:** 16.02.2023



This work is licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License



## INTRODUCTION

Coronavirus-19 (COVID-19) was first identified in Wuhan, China in December 2019 and as it continued to mutate, it became a pandemic that spread globally. Initially, the disease led to extensive admissions to the emergency service with concomitantly high mortality rates, which overwhelmed the emergency clinic physicians as well as the patients and their relatives. Thus far, no COVID-19-specific drug is available for treating infected patients; meanwhile, drug, and vaccine studies have continued to look for definitive treatment (1). Different treatment strategies have been applied, especially in severe cases, but an absolute effective and safe treatment has not yet been found, and the search is ongoing due to the associated high mortality and morbidity (1).

Mesenchymal stem cells (MSCs) have reportedly strong immunomodulatory properties; accordingly, it is proposed that MSCs may be beneficial in mitigating or even preventing a cytokine storm (2). Essentially, MSCs exert a positive immunomodulatory effect and have differentiation properties (3). Most of them secrete cytokines by a paracrine effect or can cause immunomodulation by directly affecting the immune cells (4). and these effects are triggered via Toll Like Receptor (TLR) receptor activation (5,6). MSCs are powerful cells that have less immunogenicity and produce a variety of paracrine factors, including antimicrobial peptides, growth factors and anti-inflammatory proteins (6,7).

Studies conducted on MSCs over the last decade have boosted expectations for both patients and physicians regarding MSCs as a treatment modality (7). MSCs are obtained from different body tissues, with bone marrow, umbilical cord, placenta, and adipose tissue being the main sources (8,9). Bone marrow (BM)-derived MSCs are most commonly used in clinical trials; however, the number, differentiation potential, and maximum lifetime of MSCs in BM decrease as age increases (4,9,10). In recent years, oil-derived MSCs have gained significant attention due to the ease of obtaining and storing them in cell banks. (11).

In several experimental studies, intratracheally and intravenously administered BM-derived MSCs accelerated lung repair, restored alveolar fluid clearance, and improved arterial oxygenation (12-15). The aforementioned effects have ensured their extensive use in cell-centered therapeutic trials within preclinical and clinical research (12-15). The preclinical data for MSCs suggest that they are not only effective for acute lung injury caused by bacterial infections but also provide therapeutic benefits in acute traumatic lung injury (16). Although only a small proportion of MSCs were localized in the damaged lung, the administration of mouse BM-derived MSCs normalized the level of pro-inflammatory cytokines in a murine model of bleomycin-induced lung injury (17).

Many studies have demonstrated its reliability for graft versus host disease (GVHD), systemic lupus erythematosus (SLE),

and other immune-mediated inflammatory diseases (18,19). All possible therapeutic agents are being tested against COVID-19 disease, and MSC application has also been used within the scope of clinical trials and research projects in Türkiye. It is critical to know the treatments and practices used in emergency services (where the patients receive their first treatments), inpatient services, and even intensive care units. Ensuring appropriate communication between different doctors working in the emergency department, who are mostly prime responders to hospital admissions, will have a significant impact on treatment compliance.

Our study was conducted to evaluate the effects of MSC application in COVID-19 pneumonia in terms of the change in clinical and laboratory parameters, and life expectancy recorded in the data system of the Republic of Türkiye, Ministry of Health, Department of Tissue, Organ Transplantation, and Dialysis Services after the application.

## MATERIALS AND METHODS

### Study participants and design

Between March 2020 and March 2021, patients treated for COVID-19 pneumonia, to Universities or Training and Research Hospitals in Türkiye were retrospectively analyzed. The study started after the approval from ethics committee. Patients in all age groups who received permission to have MSC application from the Department of Tissue, Organ Transplantation and Dialysis Services were selected. All patients were unvaccinated against COVID-19.

### Patient selection:

COVID-19 patients who were diagnosed with reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and received treatment with a combination of Standard medical treatment and MSCs included in this study.

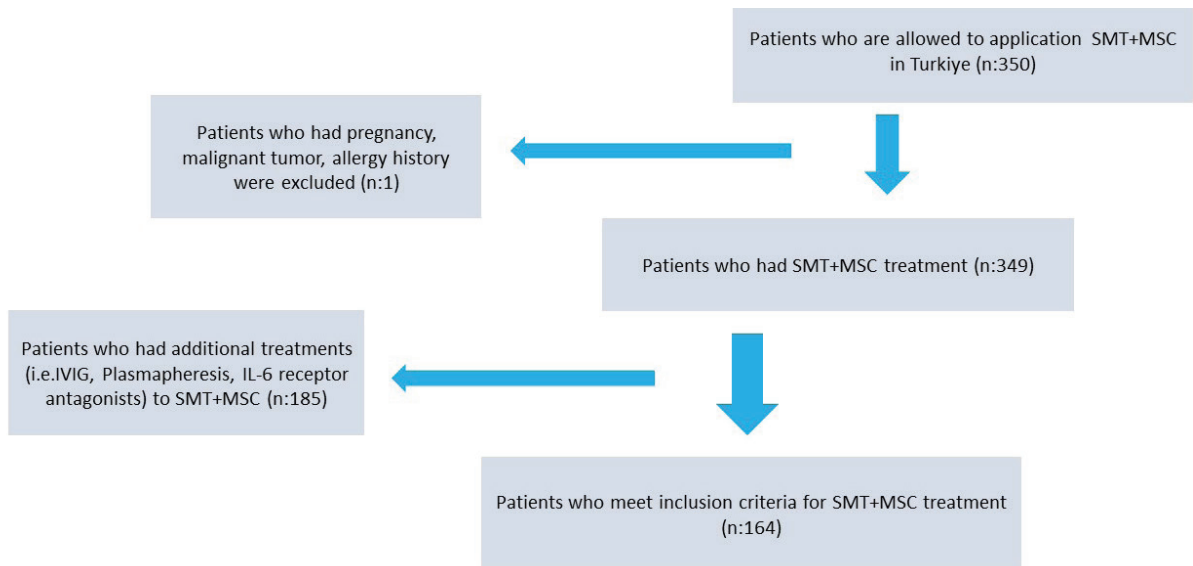
Patients given MSC treatment approval by the Department of Tissue, Organ Transplantation and Dialysis Services, according to the recommendations of the Turkish Ministry of Health's Science Committee.

Pregnancy, presence of malignant tumor, history of allergy, additional treatments (ie Intravenous Immunoglobulin, Plasmapheresis, IL-6 receptor antagonists) were determined as exclusion criteria. The flow chart of the patients to be included in the study is given in Figure 1.

### Applied treatments:

According to the Science Committee of the Turkish Ministry of Health, hydroxychloroquine and Favipiravir (loading dose of 1600 mg twice daily on 1st day and followed by 600 mg twice daily for 4 days) should be given to all COVID-19 patients with severe pneumonia or with persistent fever despite hydroxychloroquine therapy.

If there is no contraindication, 1x40 mg/day enoxaparin subcutaneous was started as prophylaxis in all patients. In the case of severe pneumonia, 2x40mg/day enoxaparin was



**Figure 1:** The flow chart of the patients who included in the study

used if the D-dimer level was above 1000 ng/mL, the body mass index was above 40 kg/m<sup>2</sup> and there was acute venous thromboembolism.

For MSC treatment, mesenchymal stem cells were prepared from umbilical cord or adipose tissue and 1x10<sup>6</sup> or 10x10<sup>6</sup> cells/kg was administered each time, intratracheally or intravenously once or twice during the course of treatment according to the decision of the intensive care director.

#### Data collection

Patient data regarding demographic information, clinical scores, laboratory (inflammatory parameters), 75-day mortality follow-up and length of hospital stay recorded with the Ministry of Health's information systems were scanned.

#### Statistical analysis

We determined the age cut point that significantly discriminating survival status of the study subjects using Kaplan Meier survival analysis, and then categorized patients' ages based on the cut point. Furthermore, the effect of age category, gender, and presence of comorbidities on patients' survival were assessed using Kaplan Meier Test.

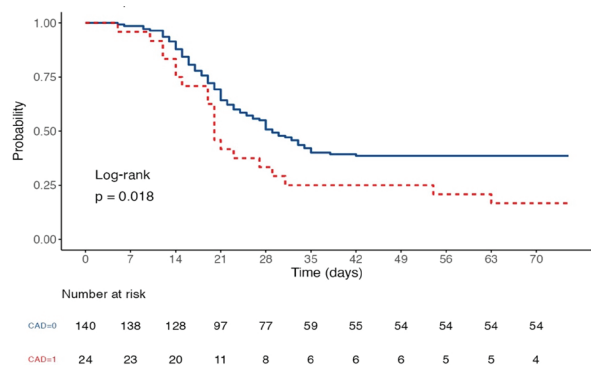
Sequential Organ Failure Assessment Score (SOFA) scores and C Reactive Protein (CRP) levels of patients at 3rd, 7th and 14th days after mesenchymal stem cell administration were compared using Friedman Test. Post hoc pairwise comparisons were conducted using Durbin-Conover Test. Results were considered statistically significant if the p value was less than 0.05. Jamovi version 1.6.18 was used for statistical analyses.

### RESULTS

164 patients were included in this study. The demographic and clinical information of our study patients is presented in Table

1. The mean age of male and female patients were compared. As per the Kaplan-Meier survival analysis, the cut-off age, which significantly increases the survival risk, was also 61 years. Furthermore, the risk of death was 1.72 times higher in individuals over the age of 61 years as compared to those over the age of 61 years (hazard ratio (HR) = 1.72, 95% confidence intervals, CI: 1.17–2.54; p=0.006) (Table 2). Female patients with COVID-19-related pneumonia had a 1.56 times greater risk of death (HR =1.56, 95% CI: 1.00–2.43) than males (median survival: 20.5 years vs. 29 years) (Table 2).

Sixty-eight percent of the patients (n=113) had a comorbid disease; among these, 46% (n=76) had hypertension, 32% (n = 54) had diabetes mellitus, 14% (n=24) had coronary artery disease, and 11% (n=18) suffered from chronic obstructive pulmonary disease (Table 1). The presence of comorbidity increased the risk of death 1.58 times (HR=1.58, 95% CI: 1.03–2.44; median survival: 25 vs. 34 days) (Table 2). The presence of coronary artery disease as a comorbid disease increased the risk of death 1.79 times (HR=1.79, 95% CI: 1.10–2.92; median survival: 20 vs. 29 days) (Table 2, Figure 2).



**Figure 2:** The correlation between Coronary Artery Disease (CAD) and survival as a result of Kaplan Meier survival analysis

**Table 1:** Demographic and clinical characteristics of COVID-19 pneumonia patients who underwent mesenchymal stem cell application

	Outcome	
	Death	Alive
Age, mean (SD)	62.7 (11.7)	58.6 (13)
Gender (Female/Male)	26/80	8/50
<b>Admission</b>		
Emergency service admission	67	31
External service transfer	11	6
Polyclinic admission	27	21
Number of comorbidities median (IQR)	1 (2)	1 (2)
<b>Comorbidity status</b>		
Hypertension	51	25
DM	40	14
COPD	13	5
CAD	20	4
Intubation	95	18
Duration of intubation, mean (SD)	12.7 (8.9)	24.5 (32.9)

DM: Diabetes mellitus, COPD: Chronic obstructive pulmonary disease, CAD: Coronary artery disease, SD: Standard deviation, IQR: Interquartile range.

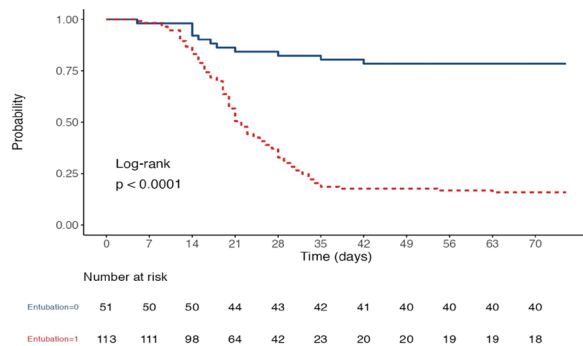
The median SOFA scores changed after MSC application—Day 0: 6, Day 3: 7, Day 7: 10, Day 14: 14.5, and endpoint: 24 (Table 3). The change in median values was analyzed using the Friedman test, and we obtained that the increase was statistically significant ( $p < 0.001$ ). Further analysis using the Durbin-Conover test revealed statistically significant correlations between

the time of administration (day 0) and 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup> and discharge days, between the 3<sup>rd</sup>, 14<sup>th</sup>, and discharge days, and between the 7<sup>th</sup> and discharge days ( $p < 0.05$ ) (Table 3).

After the MSC application, the baseline CRP concentrations were compared to those on the 3<sup>rd</sup>, 7<sup>th</sup>, and 14<sup>th</sup> days of application, and no statistically significant difference was observed.

Of the 164 patients, 60% ( $n=98$ ) had applied for MSC therapy from the emergency department, 29% ( $n=48$ ) from the outpatient clinic, and 11% ( $n=18$ ) from another hospital. No statistically significant correlation was detected between the place of applying for permission and mortality.

Lastly, 64% ( $n=106$ ) of our study patients died of COVID-19-related pneumonia (Table 1). The risk of death in intubated COVID-19 patients treated with MSC was found to be 7 times



**Figure 3:** The risk of death in intubated COVID-19 patients who underwent MSC application was 7 times higher than those who were not intubated

**Table 2:** Survival analysis of COVID-19 pneumonia patients undergoing mesenchymal stem cell administration

	Median Survival	Hazard Ratio (95% CI[d20][H21])	p value
<b>Age</b>			
Age for cutpoint 61 (high/low)	23	32	1.72 (1.17-2.54)
Gender (Female/Male)	20.5	29	1.56 (1.00-2.43)
<b>Admission</b>			
Emergency service admission (Yes/No)	28	29	1.16 (0.78-1.72)
External service transfer (Yes/No)	21	28	1.09 (0.58-2.03)
Polyclinic admission (Yes/No)	29	27.5	0.78 (0.50-1.20)
<b>Number of comorbidities</b>			
Comorbidity status (Yes/No)	25	34	1.58 (1.03-2.44)
Hypertension (Yes/No)	27	28	1.17 (0.80-1.72)
DM (Yes/No)	23.5	28.5	1.40 (0.95-2.08)
COPD (Yes/No)	17.5	28.5	1.56 (0.87-2.79)
CAD (Yes/No)	20	29	1.79 (1.10-2.92)
Entubation (Yes/No)	22	75(N/A)	7.00 (3.72-13.17)

DM: Diabetes mellitus, COPD: Chronic obstructive pulmonary disease, CAD: Coronary artery disease, SD: Standard deviation, IQR: Interquartile range; Results were considered statistically significant if the p value was less than 0.05.

**Table 3:** SOFA score changes after mesenchymal stem cell application

SOFA Score	Mean ± SD	Median (IQR)	Friedman Test p value	Kendall's W Effect size	Post-Hoc Pairwise Comparison (Durbin-Conover Test[d22][H23])			
					SOFA Score 0 day	SOFA Score 3rd day	SOFA Score 7th day	SOFA Score 14th day
<b>0 day</b>	6.45±3.44	6.00 (4.00)						
<b>3rd day</b>	8.39±6.30	7.00 (6.00)			0.247			
<b>7th day</b>	11.2±8.36	10.0 (12.5)	<0.001	0.131	0.021	0.247		
<b>14th day</b>	13.7±9.76	14.5 (20.5)			<0.001	0.006	0.110	
<b>Discharge day</b>	17.4±10.4	24.0 (21.0)			<0.001	<0.001	0.002	0.143

SD: Standard deviation, IQR: Interquartile range

higher than in the non-intubated patients (HR=7.00, 95% CI: 3.72–13.17; median survival: 22 days vs. > 75 days) (Table 2, Figure 3).

## DISCUSSION

In our study, the life expectancy of the 164 patients was found to be lower among the patients aged above 61 years and had a comorbid disease. The correlation analysis between gender and survival rates revealed that women lived for a shorter period of time, with greater mortality than men (76% vs. 61%). We did not detect any statistically significant difference between the CRP levels, which is an inflammation marker, pre and post-MSC application. The risk of death for the intubated patients was 7 times higher than for those who were not intubated. About 64% of the patients included in the study died of COVID-19-related pneumonia.

In a study conducted on 99 patients with COVID-19 disease over a period of 25 days in January 2020 in Beijing Wuhan Hospital, China, elderly males with comorbidities were found to be likelier to be affected by COVID-19 pneumonia (20). We also observed comparable life expectancy values for elderly patients with comorbid diseases. However, when the correlation between gender and survival was considered, it was seen that women lived for a shorter period, and the mortality rates were greater than those of men (76% vs. 61%).

Both Weiss et al. and Wilson et al. have strongly claimed that MSC infusions are well-tolerated in patients with acute or chronic respiratory failure, but they were unable to provide evidence for this assertion. This is because it can be challenging to determine whether the effects of a treatment are due to the underlying critical illness or the experimental treatment being tested (6,21). Moreover, MSC applications are associated with the risk of microvascular embolization with pro-coagulant activity through tissue factor and intravenous administration, leading to pulmonary embolization by the embolus being trapped in the lung microvascular system(22,23). Also, high doses are also considered to increase the risk of death and cause mortality (22,23). One of the limitations of this research is that the coagulation status of the patients could not be evaluated, and the causes of death from the file records were determined as respiratory failure due to pneumonia.

Furthermore, it is known that MSC applications have anti-inflammatory effects (6,7). However, we couldn't find statistically significant difference regarding the levels of the inflammation marker, CRP, during the 14 days following MSC application. Despite being a retrospective analysis, we were able to verify the anti-inflammatory properties of MSCs using an important and easily measurable laboratory parameter.

Kangelaris et al. discovered that among the 457 ARDS patients who did not receive MSC treatment, those who were intubated had a higher morbidity and disease severity compared to those who were not intubated (24). Similarly, in our study, the risk of death in intubated COVID-19 patients who had MSC application was 7 times higher than in those who were not intubated (median survival: 22 days vs. >75 days) (Table 2, Figure 3). In light of these results, we think that intubation should be avoided as much as possible during intensive care treatment, and oxygenation should be provided by methods other than intubation.

Notably, the mortality rate observed in the present study (64%) is comparable to that reported in a previous study conducted in Türkiye to analyze the data of patients who were treated according to the COVID-19 diagnosis and treatment protocol published by the Ministry of Health and were not treated with MSC; they also reported 64% (53/83) mortality in patients hospitalized in the intensive care unit (25). When these results were compared, it was concluded that MSC application did not negatively affect the survival of the patients.

In conclusion, the increase in overall hospital admissions due to the COVID-19 pandemic, especially in the emergency department, has forced healthcare providers to look for newer treatment options. One such modality is MSC application, whose beneficial effects have only been demonstrated in in vitro and in vivo studies, and therapeutic efficacy by means of clinical studies has yet to be determined. The results of the present study, conducted on unvaccinated patients, suggest that MSC application is not effective enough in the treatment of COVID-19 pneumonia. Therefore, larger multicenter randomized controlled clinical studies are needed to confirm its potential therapeutic efficacy in COVID-19 pneumonia.

**Ethics Committee Approval:** This study was approved by Ankara City Hospital Ethics Committee (Date: 10.03.2021, No: E2-21-242).

**Author Contributions:** Conception/Design of Study- H.C., F.K., S.T., H.C.Ç.; Data Acquisition- F.K., S.T., M.F.F., A.B., M.G.; Data Analysis/ Interpretation- H.C., H.C.Ç., A.T., A.B., A.D.; Drafting Manuscript- F.K., S.T., M.F.F., A.B., A.T.; Critical Revision of Manuscript- H.C., H.C.Ç., A.D., M.G.; Final Approval and Accountability- H.C., H.C.Ç., F.K., S.T., A.D., M.F.F., A.B., M.G., A.T.; Material and Technical Support- F.K., S.T., M.F.F., A.B., A.T.; Supervision- H.C., H.C.Ç., A.D., M.G.

**Peer Review:** Externally peer-reviewed.

**Conflict of Interest:** Authors declared no conflict of interest.

**Financial Disclosure:** The authors declared that this study has received no financial support.

## REFERENCES

- Leng Z, Zhu R, Hou W, Feng Y, Yang Y, Han Q, et al. Transplantation of ACE2 - Mesenchymal Stem Cells Improves the Outcome of Patients with COVID-19 Pneumonia. *Aging Dis* 2020;11(2):216-28.
- Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet* 2020;395(10223):497-506
- Galipeau J, Sensebe L. Mesenchymal Stromal Cells: Clinical Challenges and Therapeutic Opportunities. *Cell Stem Cell* 2018;22(6):824-33.
- Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal Stromal Cells: Sensors and Switchers of Inflammation. *Cell Stem Cell* 2013;13(4):392-402.
- Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One* 2010;5:e10088.
- Wilson JG, Liu KD, Zhuo H, Caballero L, McMillan M, Fang X, et al. Mesenchymal stem (stromal) cells for treatment of ARDS: a phase 1 clinical trial. *The Lancet Respiratory Medicine* 2015;3(1):24-32.
- Hayes M, Curley G, Laffey JG. Mesenchymal stem cells - a promising therapy for Acute Respiratory Distress Syndrome. *F1000 Med Rep* 2012;4:2. doi: 10.3410/M4-2.
- Huppert LA, Liu KD, Matthay MA. Therapeutic potential of mesenchymal stromal cells in the treatment of ARDS. *Transfusion* 2019;59(S1):869-75.
- Mueller SM, Glowacki J. Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *J Cell Biochem* 2001;82(4):583-90.
- Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* 2003;33(6):919-26.
- Mosna F, Sensebe L, Krampfer M. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide. *Stem Cells Dev* 2010;19(10):1449-70.
- Rojas M, Cárdenas N, Kocyildirim E, Tedrow JR, Cáceres E, Deans R, et al. Human adult bone marrow-derived stem cells decrease severity of lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome in sheep. *Stem Cell Res Ther* 2014;5(2):42.
- La Francesca S, Ting AE, Sakamoto J, Rhudy J, Bonenfant NR, Borg ZD, et al. Multipotent adult progenitor cells decrease cold ischemic injury in ex vivo perfused human lungs: an initial pilot and feasibility study. *Transplant Res* 2014;3:19.
- Danchuk S, Ylostalo JH, Hossain F, Sorge R, Ramsey A, Bonvillain RW, et al. Human multipotent stromal cells attenuate lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice via secretion of tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced protein 6. *Stem Cell Res Ther* 2011;2(3):27.
- Matthay MA, Anversa P, Bhattacharya J. Cell therapy for lung diseases. Report from an NIH-NHLBI workshop. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;188(3):370-5.
- Pati S, Gerber MH, Menge TD, Wataha KA, Zhao Y, Baumgartner JA, et al. Bone marrow derived mesenchymal stem cells inhibit inflammation and preserve vascular endothelial integrity in the lungs after hemorrhagic shock. *PLoS One* 2011; 6(9):e25171.
- Rojas M, Xu J, Woods CR, Mora AL, Spears W, Roman J, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;33(2):145-52.
- Hashmi S, Ahmed M, Murad MH, Litzow MR, Adams RH, Ball LM, et al. Survival after mesenchymal stromal cell therapy in steroid-refractory acute graft-versus-host disease: systematic review and meta-analysis. *Lancet Haematol* 2016;3(1):e45-e52.
- Kamen DL, Nietert PJ, Wang H, Duke T, Cloud C, Robinson A, et al. CT-04 Safety and efficacy of allogeneic umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (MSCs) in patients with systemic lupus erythematosus: results of an open-label phase I study. *Lupus* 2018;5(Suppl 2):A46-A47.
- Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet* 2020;395(10223):507-13.
- Weiss DJ, Casaburi R, Flannery R, LeRoux-Williams M, Tashkin DP, et al. A placebo-controlled, randomized trial of mesenchymal stem cells in COPD. *Chest* 2013;143(6):1590-98.
- Li C, Zhao H, Wang B. Challenges for Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy for COVID-19. *Drug Des Devel Ther* 2020;14:3995-4001.
- Coppin L, Sokal E, Stephenne X. Thrombogenic Risk Induced by Intravascular Mesenchymal Stem Cell Therapy: Current Status and Future Perspectives. *Cells* 2019;8(10):1160.
- Kangelaris KN, Ware LB, Wang CY, Janz DR, Zhuo H, Matthay MA, et al. Timing of Intubation and Clinical Outcomes in Adults with Acute Respiratory Distress Syndrome. *Crit Care Med* 2016;44(1):120-9.
- Satici C, Demirkol MA, Sargin Altunok E, Gursoy B, Alkan M, Kamat S, et al. Performance of pneumonia severity index and CURB-65 in predicting 30-day mortality in patients with COVID-19. *Int J Infect Dis* 2020;98:84-9.



# DIŞ HEKİMLİĞİNDE SERVİKAL LENF NODLARININ ULTRASONOGRAFİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ: RETROSPEKTİF ÇALIŞMA

## EVALUATION OF CERVICAL LYMPH NODES IN DENTISTRY BY ULTRASONOGRAPHY: A RETROSPECTIVE STUDY

Ahmet Faruk ERTÜRK<sup>1</sup> , İlknur ÖZCAN<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Biruni Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız, Diş ve Çene Radyolojisi Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup>İstanbul Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız, Diş ve Çene Radyolojisi Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ORCID ID: A.F.E. 0000-0002-4404-1547; İ.Ö. 0000-0001-9006-5630

**Atf/Citation:** Erturk AF, Ozcan I. Diş hekimliğinde servikal lenf nodlarının ultrasonografi ile değerlendirilmesi: retrospektif çalışma. Journal of Advanced Research in Health Sciences 2023;6(1):46-49. <https://doi.org/10.26650/JARHS2022-1124301>

### ÖZ

**Amaç:** Servikal lenf nodları sıklıkla bir dizi hastalık durumlarında rol oynar. Servikal lenfadenopatinin en sık görülen nedenleri tüberküloz, uzak metastaz ve lenfomadır. Ultrasonografi sıklıkla servikal lenf nodlarını incelemek ve karakterize etmek için kullanılır. Bu çalışma, çeşitli nedenlerle ultrasonografi (USG) yapılan hastalarda servikal lenf nodlarını görüntüleme ultrasonografinin rolünü değerlendirmek için tasarlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Araştırmamıza 01.01.2020 ve 01.01.2021 tarihleri arasında kliniğimize müracaat eden hastalar arasından herhangi bir nedenle USG yapılmış ve USG bakılan bölgelerde lenf nodları görülmüş 25 kişi dahil edilmiştir. Hastaların lenf nodları 4 ayrı bölge için sağ ve sol olmak üzere değerlendirilmiştir.

**Bulgular:** Sağ ve sol submandibular bölgeledeki lenf nodlarının transversal çapları diğerlerine göre oldukça yüksek görülmüştür. Sağ submandibular lenf nodlarının vertikal yüksekliklerinin diğerlerine göre daha fazla olduğu görülmüştür.

**Sonuç:** Sonuç olarak servikal lenf nodlarının ultrasonografik incelemesinin tanı açısından önemli bilgiler verebileceği ve özellikle diş hekimliği alanında USG'nin yaygınlaşmasıyla hekimlerin baş-boyun bölgesindeki servikal lenf nodlarını da inceleyerek oral kanserlerin ya da diğer primer kanserlerin metastazları konusunda erken tanı konulabilmesine yardımcı olabileceği düşüncesindeyiz.

**Anahtar Kelimeler:** Lenfadenopati, Lokal lenf nodu muayenesi, ultrasonografi

### ABSTRACT

**Objective:** Cervical lymph nodes are often involved in some disease states. The most common causes of cervical lymphadenopathy are tuberculosis, distant metastasis, and lymphoma. Ultrasonography is often used to map and characterize cervical lymph nodes. This study was designed to evaluate the role of ultrasonography in imaging cervical lymph nodes in patients undergoing ultrasonography (US) for various reasons.

**Materials and Methods:** Among the patients who came to our clinic between 01.01.2020 and 01.01.2021, 25 people who had US for any reason and had lymph nodes in the regions where US was examined were included in our study. The lymph nodes of the patients were evaluated for 4-four different regions, right and left.

**Results:** Transverse diameters of lymph nodes in the right and left submandibular regions were considerably bigger than the others.

**Conclusion:** As a result, we think that ultrasonographic examination of cervical lymph nodes can provide important information in terms of diagnosis and, especially with the widespread use of USG in the field of dentistry, physicians can also examine cervical lymph nodes in the head and neck region to help make an early diagnosis of metastases of oral cancers or other primary cancers.

**Keywords:** Lymphadenopathy, Local lymph node assay, ultrasonography

**Sorumlu Yazar/Corresponding Author:** Ahmet Faruk ERTÜRK E-mail: afebty@gmail.com

**Başvuru/Submitted:** 31.05.2022 • **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 21.06.2022 • **Son Revizyon/Last Revision Received:** 20.09.2022

• **Kabul/Accepted:** 12.09.2022 • **Online Yayın/Published Online:** 17.01.2023



This work is licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License



## GİRİŞ

Ultrasonografi (USG), vücuda yüksek frekanslı ses dalgaları göndererek farklı doku yüzeylerinden gelen ekoları (yankıları) saptama esasına dayanan bir görüntüleme yöntemidir. Ses, dalga tipi bir enerji türü olup cisimlerin titreşimi sonucunda meydana gelir. X-ışınlarının aksine ses dalgaları, elektromanyetik dalgalar değildir. Sesin iletilmesi için katı, sıvı veya gaz ortamına ihtiyaç vardır ve yayılımı, bir yerden başka bir yere enerji taşınımı şeklindedir.

Ses dalgalarının yayılma hızı, ortamın yoğunluğuna bağlıdır. Ses dalgaları üçe ayrılır.

İnfrasound (Sesötesi): Frekansı 20 Hertz veya altındaki sestir.

İşitilebilir Ses: Frekansı 20-20.000 Hertz arasında olan ve insanların işitilebileceği sestir.

Ultrasound (Ultrason, Ultrases): 20.000 Hertz üzerinde 2-20 Megahertz (MHz) frekansa sahip işitilemeyen sestir.

Klinik uygulamada 2-20 MHz frekanslı akustik dalgalar uygulanır. Ultrasesin kaynağı, bir yandan akustik dalga yayan, diğer yandan da incelenen bir dokudan yansıyan dalganın mekanik salınımı olarak geri dönen akustik sinyallerin alıcısı olan bir piezoelektrik cihaz içeren probdur. Hasta dokuları homojen olmadığından farklı dokulardan gelen ekolar da birbirinden farklı olmaktadır. Probdaki piezoelektrik elemanlar tarafından alınan akustik dalgalar, ekranda gerçek zamanlı siyah beyaz iki boyutlu bir görüntü (B modu) şeklinde sunulan elektrik sinyaline dönüştürülür (1). Bu modda, ekojenite değerlendirilir. Güçlü ekolar üreten alan hiperekoik, diğer yandan hiç ekoları olmayan alanlar ise anekoik (yanksız) olarak isimlendirilir. Hipoekoik alanlar, çevredeki yapılardan daha düşük ekojenite ile karakterize iken aynı veya benzer ekojeniteye sahip alanlar izoekoik olarak adlandırılır (2).

Bir ultrason ünitesinin fizibilitesi, uygulanan problemlere bağlıdır. Lenf nodlarının incelenmesinde yüksek frekanslı lineer problemler kullanılması nedeniyle yüzeysel olarak görünen lenf nodlarının yeterli olan düşük penetrasyon derinliğine sahip yüksek çözünürlüklü görüntüler sunmasıdır (3).

Lenf nodları için USG taraması, özel bir muayene koltuğunda, yatan veya dik oturan bir hastada yapılır. Ultrases, gazlar tarafından güçlü bir şekilde yansıtıldığından cilt ve prob arasındaki hava ortamını ortadan kaldırmak amacıyla ilgilenilen bölge için hastanın cildine bolca suda çözünür bir jel uygulanır. Bununla birlikte dinamik bir gerçek zamanlı muayene olduğu için çalışma sırasında probun incelenen alan üzerinde hafifçe hareket ettirilmesi gerektiği unutulmamalıdır (4).

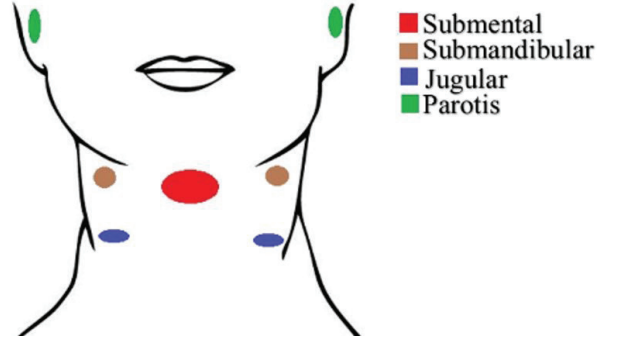
Servikal lenf nodları bağışıklık sisteminin bir parçası olup sıklıkla bir dizi hastalık durumlarında görev alır. Servikal lenfadenopatinin en sık görülen nedenleri tüberküloz, uzak metastaz ve lenfoma olup dental enfeksiyonlar sonucu da servikal lenfadenopati gelişebilmektedir. Ultrasonografi sıklıkla servikal lenf nodlarını haritalamak ve karakterize etmek için kullanılır (5).

Bu çalışma, çeşitli nedenlerle USG alınan hastalarda servikal lenf nodlarını görüntülemeye ultrasonografinin rolünü değerlendirmek için tasarlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

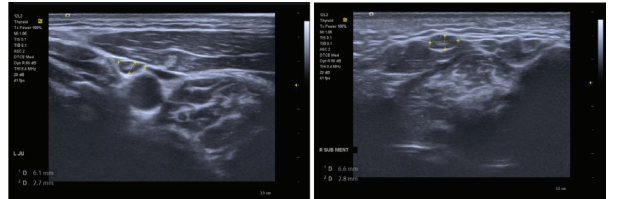
Bu çalışma Heslinki Deklerasyonu 2008 prensiplerine uygun olarak İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 14.12.2021 tarih ve 565 Sayılı onayıyla ve hastalardan gönüllü olur formu alınarak yapılmıştır. Araştırmamıza 01.01.2020 ve 01.01.2021 tarihleri arasında İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Radyolojisi Anabilim Dalı'na müracaat eden hastalar arasından herhangi bir nedenle USG alınmış ve USG bakılan bölgelerde lenf nodları görülmüş 25 kişi dahil edilmiştir. Hastaların radyolojik muayenesinde anabilim dalımızda bulunan Siemens Healthineers - Acuson Juniper Diagnostik Ultrason Sistemi kullanılmıştır. Hastalardan görüntü alınırken cihaza ait lineer problemler kullanılmıştır.

Hastaların lenf nodları sağ ve sol olmak üzere 4 ayrı bölge için değerlendirilmiştir. (Şekil 1).



Şekil 1: Hastalarda değerlendirilen lenf nodu bölgelerine ait sematik harita

Her bölgede görülen lenf nodlarının transversal çapları ve yüksekliği ölçülerek mm cinsinden boyutları hesaplanmıştır (Şekil 2).



Şekil 2: USG'de lenf nodlarının çap ve yüksekliklerinin ölçülmesi

## İstatistiksel İncelemeler

Çalışmamızda istatistiksel analizler için SPSS 21.00 (Statistical Package for Social Sciences, IBM Inc., ABD) uygulaması kullanılmıştır. Sürekli değişkenlerin tanımlayıcı istatistikleri, ortalama standart sapma, minimum ve maksimum olarak verilmiştir. Sürekli değişkenlerin normallik denetimi Saphiro-Wilk testi ile yapılmıştır. Gruplar arasındaki fark değerlendirmelerinde Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Değişkenler arasındaki ilişki için Spearman korelasyon testi uygulanmıştır. İstatistik anlamlılık sınırı p<0,05 olarak alınmıştır.

## BULGULAR

Çalışmamıza dahil edilen hastaların yaş ortalamaları tabloda verilmiştir (Tablo 1).

**Tablo 1:** Cinsiyetlere göre yaş ortalamaları

Cinsiyet	Yaş ortalaması	Std. sapma	Minimum	Maximum	n
Kadın	40,55	17,23	21	67	11
Erkek	42,79	19,74	11	66	14
Toplam	41,80	18,33	11	67	25

Lenf nodu bulunan bölgelere göre lenf nodlarının transversal çapının mm cinsinden ortalama değerleri tabloda verilmiştir (Tablo 2).

**Tablo 2:** Lenf nodlarının bölgelere göre ortalama transversal çapları

Lenf nodu bölgesi	Ortalama	Std. sapma	n	Min	Maks
Submental	7,76	3,85	6	4,50	13,10
Sağ Jugular	8,35	2,36	7	5,20	12,40
Sağ Submandibular	8,97	2,82	8	5,10	13,50
Sağ Parotis	5,83	2,55	8	2,90	11,20
Sol Jugular	7,32	1,51	9	5,40	10,60
Sol Submandibular	9,31	4,75	16	3,30	22,10
Sol Parotis	7,47	2,13	14	3,40	11,00

Tablodaki veriler incelendiğinde sağ ve sol submandibular bölgeledeki lenf nodlarının transversal çapları diğerlerine göre oldukça yüksek görülmüştür.

Lenf nodu bulunan bölgelere göre lenf nodlarının vertikal yükseklikleri mm cinsinden ortalama olarak tabloda verilmiştir (Tablo 3).

Tablodaki veriler incelendiğinde sağ submandibular lenf nodlarının vertikal yüksekliklerinin diğerlerine göre daha fazla olduğu görülmüştür.

**Tablo 3:** Lenf nodlarının bölgelere göre ortalama alanları

Lenf nodu bölgesi	Ortalama alan (mm <sup>2</sup> )	Std. sapma	n	Min	Maks
Submental	26,01	17,12	6	13,77	48,47
Sağ Jugular	40,43	21,77	7	13,00	60,76
Sağ Submandibular	48,21	18,61	8	21,42	81,00
Sağ Parotis	29,89	28,31	8	6,67	97,44
Sol Jugular	26,67	11,84	9	9,18	51,94
Sol Submandibular	51,16	43,16	16	6,93	165,75
Sol Parotis	29,85	16,81	14	8,50	72,60

Bölgelere göre lenf nodları arasındaki korelasyon incelendiğinde sağ submandibular bölge ile sol submandibular bölgedeki lenf nodlarının çapları arasında istatistiksel olarak anlamlı, pozitif yönde yüksek ilişki görülmüştür ( $r=0,943$ ;  $p=0,005$ ).

Yaş ile lenf nodlarının çapları arasındaki korelasyon incelendiğinde sol jugular lenf nodları ile yaş olarak anlamlı, pozitif yönde orta düzeyde ilişki görülmüştür ( $r=0,681$ ;  $p=0,043$ ).

Cinsiyetler açısından lenf nodları incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir.

## TARTIŞMA

Baş boyun tümörleri başta olmak üzere tümörlerin tanı ve tedavisinde servikal lenf nodlarının değerlendirilmesi çok önemli bir rol oynar. USG özellikle tümör evrelemesi ve cerrahinin gerekli olup olmadığını, cerrahinin kapsamını, postoperatif radyoterapi ve diğer tedavilere olan ihtiyacı ve tümör prognozunu belirlemek için yararlıdır (6-8).

Ultrasonografi, servikal lenf nodlarının değerlendirilmesi için giderek artan bir şekilde noninvaziv bir araç olarak kabul edilmektedir. Normal lenf nodların ultrasonografik görünümü, anormal nodlardan farklıdır. Anormal nodları tanımlamaya yardımcı olan ultrasonografik özellikler şekil, boyut, hilus yokluğu, intranodal nekroz, kalsifikasyon, matlaşma, periferik halo ve belirgin vaskülaritedir. Normal lenf nodülü, bir hilus, belirgin kenarlara sahip diskoid şeklinde olup kalsifikasyon, nekroz veya yumuşak doku ödemi varlığında morfolojik değişiklik gösterebilir. Normal ve anormal servikal lenf nodları arasındaki ayırım oldukça basittir (5, 9).

Lenf nodlarını boyutu önceleri malinitenin bir göstergesi olarak kullanılmıştır. Ancak tek başına bu değer malinite göstergesi olarak kabul görmemiştir. Servikal lenf nodları için boyutun (enine çap olarak belirlenen) farklı eşik değerleri öne sürülmüştür. Lenf nodları için şüphe uyandırması ve biyopsiye yönlendirmesi gereken minimum transvers çap ortalama 10 mmdir (10). Bizim çalışmamızda da incelenen tüm lenf nodlarının transversal çapları 10 mm'nin altında ölçülmüştür.

Van den Brekel ve ark. baş ve boyun kanserinden şüphelenildiğinde, dıgastrik bölgede minimum 8 mm ve boynun diğer bölgelerinde en az 7 mm çaplı lenf nodlarının malign olarak kabul edilmesi gerektiğini öne sürmüşlerdir (11).

Ayrırcı tanıda enine çapın mı yoksa boyuna çapın mı kullanılması gerektiği kesin değildir. En büyük (uzunlamasına) çapın, çoğu metastaz tespiti için güvenilir bir gösterge olmadığını bildiren birçok çalışma mevcuttur (12-14). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada meme kanserli hastalarda saptanan 198 palpe edilemeyen aksiller lenf nodu değerlendirilmiş ve metastatik ile benign nodlar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (15).

Tek bir boyut değeri, lenf nodlarının ayrırcı tanısında güvenle kullanılabilir kadar yüksek duyarlılık ve özgüllük sağlamaz. Ancak malinitesi olduğu bilinen hastaların incelemelerinde nodal boyutundaki artış tutulumu düşündürülebilir. Ayrıca, malign

lenf nodlarının boyutundaki değişiklik, tedavinin izlenmesinde yararlıdır (16-17).

Sonuç olarak servikal lenf nodlarının ultrasonografik incelemesinin tanı açısından önemli bilgiler verebileceği ve özellikle diş hekimliği alanında USG'nin yaygınlaşmasıyla hekimlerin baş-boyun bölgesindeki servikal lenf nodlarını da inceleyerek oral kanserlerin ya da diğer primer kanserlerin metastazları konusunda erken tanı konulabilmesine yardımcı olabileceği düşüncesindedir.

**Etik Komite Onayı:** Bu çalışma için etik komite onayı İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Tarih: 14.12.2021, No: 2021/66).

**Hakem Değerlendirmesi:** Diş bağımsız.

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

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir.

**Finansal Destek:** Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

**Ethics Committee Approval:** This study was approved by Istanbul University Faculty of Dentistry Clinical Research Ethics Committee (Date: 14.12.2021, No: 2021/66).

**Peer Review:** Externally peer-reviewed.

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

**Conflict of Interest:** The authors have no conflict of interest to declare.

**Financial Disclosure:** The authors declared that this study has received no financial support.

## KAYNAKLAR

1. Stagnitti A, Marini A, Impara L, Drudi F, Odoardi GL. Duplex Doppler ultrasound study of the temporomandibular joint. J Ultrasound 2012;15(2):111-4.

2. Katzberg RW. Is ultrasonography of the temporomandibular joint ready for prime time? Is there a "window" of opportunity? J Oral Maxillofac Surg 2012;70(6):1310-4.
3. Whites E, Drage N. Essentials of dental radiography and radiology. 2013: Elsevier Health Sciences.p.218-20.
4. Landes CA, Goral W, Mack MG, Sader R. 3-D sonography for diagnosis of osteoarthritis and disk degeneration of the temporomandibular joint, compared with MRI. Ultrasound Med Biol 2006;32(5):627-32.
5. Khanna R, Sharma AD, Khanna S, M. Kumar, Shukla RC. Usefulness of ultrasonography for the evaluation of cervical lymphadenopathy. World J Surg Oncol 2011;9:29.
6. Gyorki D, Boyle J, Ganly I, Morris L, Shaha A, Singh B, et al. Incidence and location of positive nonsentinel lymph nodes in head and neck melanoma. Eur J Surg Oncol (EJSO) 2014;40(3):305-10.
7. Yang JR, Song Y, Jia YL, Ruan LT. Application of multimodal ultrasonography for differentiating benign and malignant cervical lymphadenopathy. Jpn J Radiol 2021;39(10):938-45.
8. Ying M, Ahuja A, Brook F. Accuracy of sonographic vascular features in differentiating different causes of cervical lymphadenopathy. Ultrasound Med Biol 2004;30(4):441-7.
9. Esen G. Ultrasound of superficial lymph nodes. Eur J Radiol 2006;58(3):345-59.
10. Bruneton J, Rubaltelli L. Lymph nodes in: Solbiati L e Rizzato G (Ed), Ultrasound of superficial structures. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1995.
11. Van den Brekel M, Castelijns JA, Stel HV, Luth W, Valk J, Van der Waal I. et al., Occult metastatic neck disease: detection with US and US-guided fine-needle aspiration cytology. Radiology 1991;180(2):457-61.
12. Vassallo P, Wernecke K, Roos N, Peters P. Differentiation of benign from malignant superficial lymphadenopathy: the role of high-resolution US. Radiology 1992;183(1):215-20.
13. Feu J, Tresserra F, Fabregas R, Navarro B, Grases P, Suris J, et al. Metastatic breast carcinoma in axillary lymph nodes: in vitro US detection. Radiology 1997; 205(3):831-5.
14. Yang WT, Chang J, Metreweli C. Patients with breast cancer: differences in color Doppler flow and gray-scale US features of benign and malignant axillary lymph nodes. Radiology 2000;215(2):568-73.
15. Esen G, Gurses B, Yilmaz MH, Ilvan S, Ulus S, Celik V, et al. Gray scale and power Doppler US in the preoperative evaluation of axillary metastases in breast cancer patients with no palpable lymph nodes. Eur Radiol 2005;15(6):1215-23.
16. Ahuja A, Ying M. Sonography of neck lymph nodes. Part II: abnormal lymph nodes. Clin Radiol 2003;58(5):359-66.
17. Brontzos EN, Panagioutou IE, Bafaloukos DI, Kelekis DA. Ultrasonographic detection of regional lymph node metastases in patients with intermediate or thick malignant melanoma. Oncol Rep 2003;10(2):505-10.

# RETROSPECTIVE LATERAL SEFALOMETRIC ANALYSIS OF PATIENTS USING MANDIBLE ADVANCEMENT DEVICES IN THE TREATMENT OF OBSTRUCTIVE SLEEP APNEA SYNDROME

## OBSTRÜKTİF UYKU APNE TEDAVİSİNDE MANDİBULAYI ÖNDE KONUMLANDIRAN APAREY YAPILAN HASTALARDA RETROSPEKTİF LATERAL SEFALOMETRİK İNCELEME

Almira Ada DİKEN TÜRKSAVAR<sup>1</sup> , Ali Can BULUT<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Biruni University, Faculty of Dentistry, Department of Prosthodontics, Istanbul, Türkiye

<sup>2</sup>Kırıkkale University, Faculty of Dentistry, Department of Prosthodontics, Kırıkkale, Türkiye

ORCID ID: A.A.D.T. 0000-0003-3558-3202; A.C.B. 0000-0002-1586-7403

**Citation/Atf:** Diken Turksayar AA, Bulut AC. Retrospective lateral sefalometric analysis of patients using mandible advancement devices in the treatment of obstructive sleep apnea syndrome. Journal of Advanced Research in Health Sciences 2023;6(1):50-55. <https://doi.org/10.26650/JARHS2023-1200633>

### ABSTRACT

**Objective:** Obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) is a sleep disorder with occurs in the upper airway during sleep and is characterized by recurrent collapses. The mandible advancement device (MAD) is a successful treatment option for patients with moderate and severe OSAS. This study examines the effectiveness of the MAD appliance in patients diagnosed with OSAS.

**Material and methods:** The angle between A point, Nasion and Sella (ANB), angle between B point, Nasion and Sella (SNB) and lower respiratory tract changes in 20 cases diagnosed with OSAS and treated with MAD appliances were examined. The lateral cephalometric films of the patients before and after the appliance were evaluated by matching. The obtained data were statistically evaluated with the paired comparison t-test.

**Results:** In the measurements made with lateral cephalometric imaging of patients with and without appliances, the SNB and posterior airway size (PAS) values increased while the ANB values decreased. No change was observed in the SNA values.

**Conclusion:** According to lateral cephalometric imaging analysis, it can be said that MAD appliances are effective in the treatment of OSAS.

**Keywords:** Obstructive sleep apnea, mandible advancement device (mad), lateral cephalometry

### ÖZ

**Amaç:** Obstrüktif uyku apne sendromu (OSAS) uyku sırasında üst hava yolunda meydana gelen ve tekrarlayan kollapslarla karakterize uyku düzensizliği sendromudur. Mandibulayı önde konumlandırılan (MAD) apareyler orta ve ileri derecedeki OSAS hastalarında, başarı oranı yüksek bir tedavi seçeneğidir. Bu çalışmada OSAS tanısı alan hastalarda MAD apareyin etkisi incelenmiştir.

**Gereç ve Yöntemler:** OSAS tanısı konmuş ve MAD apareylerle tedavi edilen 20 vakanın, Nasion ve Sella arasının oluşturduğu açı (ANB), Nasion ve Sella arasının oluşturduğu açı (SNB) ve alt solunum yolu değişimleri incelenmiştir. Hastaların başlangıç ve aparey yapıldıktan sonraki lateral sefalometrik filmleri karşılaştırılarak değerlendirildi. Elde edilen veriler t-testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

**Bulgular:** Apareyli ve apareysiz hastaların lateral sefalometrik görüntüleme ile yapılan ölçümlerinde SNB ve PAS değerlerinde artarken ANB değerleri azalmıştır. SNA değerlerinde ise değişiklik olmadığı görülmüştür.

**Sonuç:** Lateral sefalometrik görüntüleme ölçümlerine göre MAD apareylerinin OSAS tedavisinde etkili olduğu söylenebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Obstrüktif uyku apne, mandibulayı önde konumlandırılan (MAD) apareyler, lateral sefalometri

**Corresponding Author/Sorumlu Yazar:** Almira Ada DİKEN TÜRKSAVAR E-mail: [almiraadadiken@hotmail.com](mailto:almiraadadiken@hotmail.com)

**Submitted/Başvuru:** 07.11.2022 • **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 21.12.2022 • **Last Revision Received/Son Revizyon:** 02.01.2023

• **Accepted/Kabul:** 09.01.2023 • **Published Online/Online Yayın:** 28.02.2023



This work is licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

## INTRODUCTION

There are upper airway sleep disorders that can be exacerbated from simple snoring to obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) (1). OSAS is the involuntary interruption of breathing for 10 seconds or more during the breathing phase of the upper respiratory tract during sleep (1,2). OSAS with a prevalence ranging from 1-5% (2); causes systemic hypertension, ischemic heart disease, cardiac arrhythmias, restless and insufficient sleep, bronchial hyperreactivity, overlap syndrome, cerebrovascular diseases, cognitive impairment, headache, excessive daytime sleepiness, anxiety, gastro-oesophageal reflux secondary polycythemia, depression and work accidents and thus leads to a decrease in quality of life (1-4). The etiology of OSAS is multifactorial. It has been reported that it is twice as common in middle-aged men as in women. Obesity, alcohol and smoking habits, use of antidepressant drugs, otorhinolaryngological diseases, macroglossia, micrognathia and retrognathia also play a role in the emergence of the syndrome (1,2,4-7).

One of the most prominent symptoms of OSAS is snoring (4). It is seen that snoring is 25% more common in men than in women in the adult population. Snoring is caused by the vibration of the soft tissues in the airways. This condition is usually caused by air-flow creating excessive pressure by narrowing the upper airway ducts. Although snoring is always seen in OSAS patients, OSAS cannot be diagnosed in every patient with a snoring problem (7).

The most important diagnostic method of OSAS is polysomnography (PSG) recorded overnight in the sleep laboratory. PSG is the "gold standard" in the diagnosis of OSAS (1,2). According to the American Academy of Dental Sleep Medicine (AADSM), when taking dental and medical anamnesis, it is necessary to examine the reports sent by the consulted physician; to control the teeth and restorations; examine the soft tissue; examine the intraoral and parafunctional habits; examine the TMJ; examine the periodontal condition; control the occlusion; request a cephalometric film; and to obtain the necessary models for diagnosis and appliance construction (8). Lateral cephalometric films should be used in determining the problems related to the maxilla-mandible relationship and in planning the treatment with the appliance to be applied to the mandible in cases (9,10). The skeletal and airway anatomy of the OSAS and/or snoring patient can be easily observed through lateral cephalometric imaging. The points used for measurements on lateral cephalometric imaging on the midline are the deepest point of the concavity, located between the Spina nasalis anterior and the Prosthion (A point), and the most concave points of the anterior contour of the Mandibular symphysis (B point). The SNA angle formed between the A point, Nasion and Sella and the SNB angle formed between B point, Nasion and Sella are the angles that provide information about the development of the lower jaw and its position relative to the upper jaw (10,11). The ANB angle, which shows the positions of the maxilla and mandible relative to each other, and the measurement of the distance between the dorsal surface of the tongue and the posterior pharyngeal wall on the line connecting the B

and gonion points, or in other words, the length of the lower airway space PAS are also factors that should be evaluated in lateral cephalometry (10). Moreover, the models of the maxilla and mandible and their relationship recordings can be used to determine how retrognathic the mandibular position is and how effective it is in sliding the tongue towards the posterior and lateral pharyngeal wall (11).

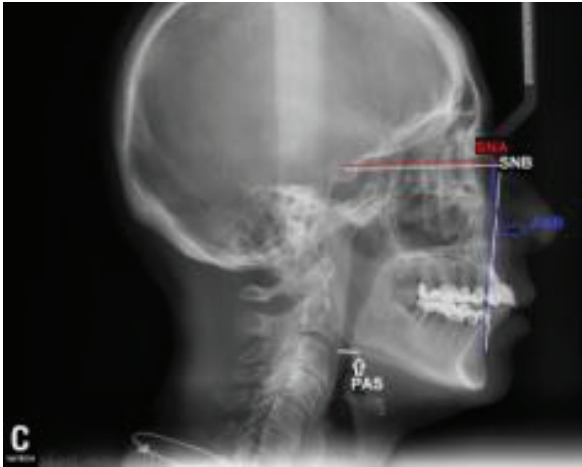
The American Sleep Diseases Association reported that the use of oral devices in patients with moderate to severe OSAS should be used by patients who refuse nasal CPAP (Continuous positive airway pressure) treatment, and in patients with primary snoring or a diagnosis of mild OSAS. Oral devices can be used in cases that are not suitable for preventive treatments such as sleep position change and weight loss and cannot be treated with these methods (8,9). Oral appliances have many advantages such as being inexpensive; time-effective; easy to carry; being more easily tolerated by patients; being a non-invasive and reversible method; not affecting the daily life of the patient; and having suitable appliance options for patients with or without teeth (8). In addition, the use of oral appliances can cause side effects such as dry mouth, TMJ dysfunction, tooth movements and occlusion disorders. There are also some disadvantages such as requiring lifelong use and not being able to control the patient's compliance with the treatment (9).

The most preferred and most successful oral appliances are mandibular advancement devices (MAD). Although there are many different designs of MADs, the one-piece model is generally preferred. They attach to the jaws by means of metal clasps or acrylic parts of the plaque to the outer surfaces of their teeth (9). There are gaps in the middle of the appliance for air passage and these are made to position the mandible forward. In this way, they both expand the airway and affect the genioglossus muscle. It is simple and inexpensive to prepare and it is easy for patients to tolerate these appliances (2,8,9,11). The aim of this study is to retrospectively examine the changes in the lower respiratory tract and the jaw relationships of the patients during this treatment in our clinics. In this study, the changes in the lower air space changes of the patients before and after the treatment and the amount of change of the mandible with respect to the maxilla, as well as the changes of the mandible according to the cranial base were evaluated.

## MATERIAL and METHODS

Laterocephalometric films of patients who were recently diagnosed with mild or moderate OSAS (apnea-hypopnea index between 20 and 37) in Biruni University Faculty of Dentistry- Kırıkkale University Faculty of Dentistry, during the treatment with the oral appliance, were retrospectively analyzed for diagnosis and post-treatment evaluation. (Biruni University Non-Invasive Clinical Research Ethics Committee Decision No: 2021 /51-26) The PAS (posterior airway size), SNA, SNB, ANB, points and angles were measured and compared on the lateral cephalometric images taken before and after the appliance, whose age and gender were recorded. (Figure 1). The sample size required for the study





**Figure 1:** Lateral cephalometric measurement points in Case 3 (Pre-treatment)

was calculated with a power analysis software (G\*Power 3.0.10, Kiel, Germany) at a significance level of 0.05 and a power of 80%, and it was determined that a minimum of 20 individuals were required. The study details were explained to all participants and a signed consent form was obtained. The study included data from patients previously diagnosed with mild or moderate OSAS who were treated with the oral appliance and had lateral cephalometric recordings. Data belonging to patients who did not have lateral cephalometric records or who were diagnosed with advanced OSAS were excluded. In addition, the following criteria were sought in patients: not having any pathology in the airway, not having any congenital and/or acquired anomalies (cleft lip and palate etc.), not having received orthodontic treatment before, detecting reference points properly on initial radiographs and having sufficient image quality, and correct head position on lateral cephalometric film to be positioned. The records of patients who did not meet the criteria were not evaluated. All patients admitted to the study had used intraoral appliances prepared by controlling the patient's lower jaw movements following the temporomandibular joint examination. After all necessary treatments were performed in the mouth of the patients, upper and lower jaw impressions were obtained using additional silicone material (Elite HD+, Zhermack, Rovigo, Italy) for the construction of oral appliances. Models were created using type IV plaster (Jade Stone; Whip Mix Corp). Acrylic splints (Heraeus Kulzer, Berkshire, UK) were prepared for the upper and lower jaws separately. Then, the splints were customized for the upper and lower jaws. While the splints were in the patient's mouth, the lower jaw was fixed in a forward position using zinc oxide eugenol (TempBond; Kerr Corp) and transferred to a semi-adjustable articulator (Articulator #3140; Whip Mix Corp). In that position, the gap between the two splints was filled with acrylic in a key-lock relationship. Polymerization was performed by leaving gaps in the front region to allow the patient to breathe, and the appliance was completed. These appliances have a height of 75% of the maxi-

mum amount of protrusion and are positioned anteriorly to the mandible and are called "mandibular advancement devices" (Figure 2-3).



**Figure 2:** Mandibular and maxillary models and MAD appliance for Case 1



**Figure 3:** Case1 Intraoral view of the MAD appliance

The 20 patients included in the study were grouped as Class 1, Class 2, and Class 3 according to the ANB angle (norm value  $2^{\circ} \pm 2^{\circ}$ ). (Class 1 group:  $4^{\circ} > \text{ANB} > 0^{\circ}$ , Class 2 group:  $\text{ANB} > 4^{\circ}$ , Class 3 group  $\text{ANB} < 0^{\circ}$ ). The N (Nasion) point used as a reference in our evaluation is the most anterior point of the Sutura Frontonasalis and the deepest point of the recess in that region. Point A is the deepest point of the maxillary anterior alveolar bony recess below the Anterior Nasal Spina (ANS), while point B is the deepest point of the mandibular anterior alveolar bony recess above the Pogonion point. Lateral cephalometric images of all included patients were taken using the Carestream CS 9000 (Kodak Dental Systems, NewYork, USA) device with the standard technique (60-90 kVp, 2-15 mA, 1.2 sec.). Recorded lateral cephalometric films were run on an Adobe Photoshop program and measurements were made from the same points (Figure 4-5). Measurements were made by a single, experienced researcher. (A.B) According to the measurements obtained, the statistical evaluation of the differences between the measurement values before the oral appliance application and with the oral appliance was performed with the t-test (paired comparison t-test). (SPSS v23; IBM)





Figure 4: Case 3-Lateral cephalometric imaging with MAD appliance



Figure 5: Case 5- Lateral cephalometric films (Pre-treatment and post-treatment, respectively)

## RESULTS

According to pre-treatment and post-treatment Lateral sefalometric imaging, 17 patients (11 females and 6 males) had Class 1 occlusion, and 3 patients (2 female and 1 male) had Class 2 occlusion (ANB first measurement) (Table 1).

An increase in SNB and PAS values, a decrease in ANB values, and no change in SNA values in the measurements made with

Table 1: Type of Occlusion

Man		Gender		Total
		Woman		
Occlusion	class 1	11	6	17
	class 2	1	2	3
Total		12	8	20

Table 2: Descriptive Analysis

	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
AGE	28.00	63.00	40.2500	8.18776
SNA initial	80.00	84.00	82.0500	1.27630
SNA final	80.00	84.00	82.0500	1.27630
SNB initial	77.00	81.00	78.9750	1.22984
SNB final	80.00	84.00	81.7000	1.12858
PAS initial	3.00	4.80	3.7000	.55346
PAS final	7.00	11.00	8.7150	1.04139
ANB initial	3.50	7.00	4.2750	1.00623
ANB final	.80	4.50	1.4950	1.11094

AGE: Hastaların yaşlarını göstermektedir, SNA: angle between A point, Nasion and Sella, SNB: angle between B point, Nasion and Sella, PAS: Posterior airway size, ANB: angle between A point, Nasion and Sella.

lateral cephalometric imaging of the patients with and without appliances were observed (Table 2). The increase between SNB initial value and SNB final value and the increase between the PAS initial value and post-treatment value were statistically significant. ( $p = .000$ ) (Table 3). Moreover, Table 3 shows that the ANB value, that is, the angle of the mandible with the maxilla, decreased after the snoring appliance and this value was statistically significant. ( $p = .000$ ). No change in SNA angles was observed.

## DISCUSSION

Intraoral devices play an active role in the treatment of OSAS. In a study conducted in 2018, it was suggested that oral appliance treatment could be an alternative to CPAP in patients with mild and moderate OSAS. Moreover, it has been reported that

Table 3: Paired Test

Pair	Mean	SD	Paired Differences		t	df	Sig. (2-tailed)
			95% Confidence				
			Lower	Upper			
ANB initial- ANB final	2.78000	.37219	2.60581	2.95419	33.404	19	.000
SNB initial- SNB final	2.72500	.76906	3.08493	2.36507	15.846	19	.000
PAS initial- PAS final	5.01500	1.02458	5.49452	4.53548	21.890	19	.000

ANB: Angle between A point, Nasion and Sella, SNB: Angle between B point, Nasion and Sella, PAS: Posterior airway size, SD: Standard deviation.

oral appliances are more advantageous in terms of patient use and acceptability (9).

Dentists are part of the OSAS treatment process and should identify potential patients and refer them to the sleep laboratory for a polysomnography diagnosis and treatment planning. In a review of studies conducted with MAD in 2019; it was reported that snoring was treated at rates of up to 90% in 10 studies, and the apnea index decreased to a certain extent after treatment with intraoral devices in 18 studies (12).

In a case report presented by Güzel et al., it was suggested that patients' complaints were completely resolved after the use of the MAD appliance, and the apnea-hypopnea index decreased from 33 to 7 (13). In the protrusion study of Marklund et al., a 50% and 75% maximum protrusion amount was examined and it was shown that 75% maximum protrusion was more effective than 50% (14). For this reason, only patients using intraoral devices designed for 75% protrusion were included in our study.

Carvalho et al. prepared one of the two appliances of different designs in a way to keep the mandible at a 6-8 mm protrusion and approximately 8 mm (A) and the other (B) without protrusion of the mandible and with a vertical opening of 2 mm. As a result of the study, they found the A appliance to be more effective (15). In a meta-analysis conducted in 2018, the cephalometric method was not used in some of the studies examining the effects of appliances without protrusion and at 75% protrusion; in some, cephalometric examination of the airway was performed in addition to polysomnography. In some studies, the mandible is advanced up to 50% of its maximum protrusion, 70% in some, and 75% in others with an intraoral appliance. Based on the data compiled, the researchers reported that the recommended amount of protrusion is 50-75% of the maximum anterior positioning of the mandible (16). Moreover, there are studies stating that an increased amount of protrusion would lead to an increase in dental and skeletal side effects, and that less mandibular protrusion may cause a milder decrease in the number of apneas in general. However, gender and the amount of pharyngeal stenosis may also affect this mechanism (14). While the appliance used by patients in this study moves the lower jaw forward by 75% of the maximum protrusion, it also creates the amount of protrusion, which is defined as the maximum protrusion that the patient is comfortable with, giving the same values for almost every patient. Therefore, patients using appliances of different designs were not included in the evaluation.

In lateral cephalometric analysis; the PAS, SNA, PNS-P, Go-Pog, SNB, and MP-H points and angles are sufficient (10). This imaging method is also used in pharyngeal area measurements in OSAS patients, as well as in the diagnosis and treatment process. There are many studies showing the relationship between lateral cephalometric measurements and treatment results (8,11-13,15). In addition to studies reporting that enlargement occurs in the velopharynx with the use of MAD, there are also studies reporting that most enlargement occurs in the oropharynx and hypopharynx (8,11,15). Consistent with these data, an increase was observed in all three parts of the oropharynx, nasopharynx, and hypopharynx

in the cases evaluated in our study.

Ng and Yow, in their study in 2019, reported that MAD oral appliances can be used effectively in the treatment of mild and moderate sleep apnea, and that these devices provide a significant reduction in the Apnea-hypopnea index and improvements in oxygen saturation (17). Furthermore, they reported an improvement in sleep quality, a reduction in daytime insomnia complaints, and 90% reported a reduction in snoring (17). Marklund et al. suggested that 80% of mild apnea cases, 65% of moderate apnea cases and 25% of severe apnea cases were successful in cases using MAD appliances (14). In a recent study, it was reported that it had successful results in 90% mild-moderate apnea treatment and 60% in moderate-severe apnea (18).

Although there are surgical treatments that provide 90% success, oral appliances are advantageous for patients who do not want to undergo surgery, are afraid, or do not have the cost of their operation covered. As such, their use is increasing given that the treatment success rate is close to surgical procedures (16-18). Furthermore, the complication rate after the use of intraoral appliances is very low. Intraoral appliances have a faster and higher treatment success than behavior modification therapy. MAD appliances can be used and accepted more easily by the patient than CPAP. Oral appliances have advantages such as occupying less space in volume, being easy to carry, being cost-effective and having low replacement costs. Although CPAP is the most effective treatment in the treatment of OSAS, it has been observed that 10% of the patients almost never try it and some patients discontinue the treatment. There are many studies indicating that MAD appliances are a highly successful treatment method in the treatment of OSAS and can be an alternative to CPAP (9,14,15,18). In addition, in a recent study, it was reported that MAD appliances positively affect the load distribution on the temporomandibular joint and periodontal ligament (19). In the treatment of OSAS, which requires a multidisciplinary approach, the dentist can take an active role in the treatment with the application of oral appliances (9,14,15,18).

This study revealed that MAD appliances after laterocephalometric measurements are effective in the treatment of OSAS. However, this study has some limitations as mentioned above. In our study, only patients with one type of appliance were evaluated, and the time of use of the appliances was not examined separately. Further investigations from diagnosis to treatment in further studies will provide more detailed information about the effectiveness of MAD devices.

---

**Ethics Committee Approval:** This study was approved by Biruni University Non-Interventional Clinical Research Ethics Committee (Date: 2021/51-26, No: 21.05.2021).

**Peer Review:** Externally peer-reviewed.

**Author Contributions:** Conception/Design of Study- A.C.B., A.A.D.T.; Data Acquisition- A.C.B.; Data Analysis/Interpretation- A.C.B., A.A.D.T.;

Drafting Manuscript- A.C.B., A.A.D.T.; Critical Revision of Manuscript- A.C.B., A.A.D.T.; Final Approval and Accountability- A.C.B., A.A.D.T.; Material and Technical Support- A.C.B., A.A.D.T.; Supervision- A.C.B.

**Conflict of Interest:** The authors have no conflict of interest to declare.

**Financial Disclosure:** The authors declared that this study has received no financial support.

## REFERENCES

1. Mubashir T, Abrahamyan L, Niazi A, Piyasena D, Arif AA, Wong J, et al. The prevalence of obstructive sleep apnea in mild cognitive impairment: a systematic review. *BMC Neurol* 2019;19(1):195.
2. Köktürk O, Tatlıcıoğlu T, Kemaloğlu Y, Fırat H, Çetin N. Habituel horlaması olan olgularda obstrüktif sleep apne sendromu prevalansı. *Tüberküloz ve Toraks* 1997; 45:7-11.
3. Lombardi C, Pengo MF, Parati G. Obstructive sleep apnea syndrome and autonomic dysfunction. *Auton Neurosci* 2019; 221:102563.
4. Donovan LM, Kapur VK. Prevalence and characteristics of central compared to obstructive sleep apnea: analyses from the sleep heart health study cohort. *Sleep* 2016;39(7):1353-9.
5. Köktürk O. Uykuda solunum bozuklukları; tarihçe, tanımlar, hastalık spektrumu ve boyutu. *Tüberküloz ve Toraks* 1998;46:187-92.
6. Köktürk O. Obstrüktif uyku apne sendromu epidemiyolojisi. *Tüberküloz ve Toraks* 1998;46:193-201.
7. Köktürk O. Obstrüktif uyku apne sendromu sonuçları. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi* 2000;48(3):273-89.
8. García NM, Blaya F, Urquijo EL, Heras ES, D'Amato R. Oral appliance for Obstructive sleep apnea: prototyping and optimization of the mandibular protrusion device. *J Med Syst* 2019;43(5):107.
9. Mehta NR, Correa LP. Oral appliance therapy and temporomandibular disorders. *Sleep Med Clin* 2018;13(4):513-9.
10. Kurtulmuş H, Çöert S, Tuncer AV. Obstrüktif uyku apnesinin tanısında lateral sefalometrik yaklaşım ve mandibular ilerletici splint ile tedavisi. *EÜ Dişhek Fak Derg* 2007;28:113-22.
11. Cillo JE, Dattilo DJ. Maxillomandibular Advancement for obstructive sleep apnea produces long-term horizontal advancement of the maxilla and mandible. *J Oral Maxillofac Surg* 2019;77(12):2524-8.
12. Barewal RM. Obstructive Sleep apnea: the role of gender in prevalence, symptoms, and treatment success. *Dent Clin North Am* 2019;63(2):297-308.
13. Güzel KG, Meşe A, Tanrıkulu T. Obstrüktif uyku apnesi sendromunun tedavisinde protetik yaklaşım: Olgu sunumu. *Atatürk Üniv Diş Hek Fak Derg* 2011;4:86-91.
14. Marklund M, Franklin KA, Persson M. Orthodontic side-effects of mandibular advancement devices during treatment of snoring and sleep apnoea. *Eur J Orthod* 2001;23:135-44.
15. Carvalho FR, Lentini-Oliveira DA, Prado LB, Prado GF, Carvalho LB. Oral appliances and functional orthopaedic appliances for obstructive sleep apnoea in children. *Cochrane Database Syst Rev* 2016;10(10):CD005520. doi: 10.1002/14651858.
16. Schell TG. Avoiding and managing oral appliance therapy side effects. *Sleep Med Clin* 2018;13(4):503-12.
17. Ng JH, Yow M. Oral appliances in the management of obstructive sleep apnea. *Sleep Med Clin* 2019;14(1):109-18.
18. Koretsi V, Eliades T, Papageorgiou SN. Oral interventions for obstructive sleep apnea. *Dtsch Arztebl Int* 2018;115(12):200-7.
19. Brunzini A, Gracco A, Mazzoli A, Mandolini M, Manieri S, et al. M. Preliminary simulation model toward the study of the effects caused by different mandibular advancement devices in OSAS treatment. *Computer methods in biomechanics and biomedical engineering* 2018;21(13):693-702.

# HEK 293 HÜCRELERİNE FARKLI DOZ VE SÜRELERDE UYGULANAN KLORPİRİFOS VE TANNİK ASİTİN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

## INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF CHLORPYRIFOS AND TANNIC ACID APPLIED TO HEK 293 CELLS IN DIFFERENT DOSES AND TIMES ON CELL VITALITY

Sevil EROL<sup>1,2</sup> , Bahar ÖZTÜRK KURT<sup>3</sup> , Bircan DİNÇ<sup>4</sup> , Semra ÖZDEMİR<sup>3</sup> 

<sup>1</sup>İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyofizik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup>Beykent Üniversitesi, Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, İstanbul, Türkiye

<sup>3</sup>İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

<sup>4</sup>Bahçeşehir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ORCID ID: S.E. 0000-0002-7711-2639; B.Ö.K. 0000-0002-1171-002X; B.D. 0000-0002-9717-6410; S.Ö. 0000-0001-5262-3574

**Atf/Citation:** Erol S, Ozturk Kurt B, Dinc B, Ozdemir S. HEK 293 hücrelerine farklı doz ve sürelerde uygulanan klorpirifos ve tannik asitin hücre canlılığı üzerine etkilerinin araştırılması. Journal of Advanced Research in Health Sciences 2023;6(1):56-63. <https://doi.org/10.26650/JARHS2023-1175367>

### ÖZ

**Amaç:** Organofosfatlı bir pestisit olan klorpirifos, yaygın olarak kullanılan bir böcek öldürücüdür ve etkisini asetilkolinesterazın etkinliğini engelleyerek, kalp kasında, düz kasta, merkezi sinir sisteminde asetilkolin birikimine neden olarak zehirlenme ile gösterir. Pestisitler kanserin, nörodejeneratif hastalıkların, üreme bozukluğunun ve birçok organ fonksiyonunun bozulmasında risk faktörüdürler. Tannik asit(TA) antioksidan, antiinflamatuvar, antikanserijen özellikleri ile geleneksel ve modern tıpta kullanılan bir polifenoldür. Çalışmamız insan embriyonik böbrek hücresi olan HEK 293 hücre hattına klorpirifos ve tannik asitin farklı doz ve sürelerde uygulanmasının hücre canlılığı üzerine olası etkilerini araştırmak üzere planlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışma, kontrol, klorpirifos ve tannik asit grubu olmak üzere 3 grup ile yapılmıştır. HEK 293 hücrelerinde klorpirifos ve tannik asitin hücre canlılığı üzerine hangi dozlarda ve hangi sürelerde daha etkin olduğunu belirlemek amacıyla MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum-bromid] ve xCELLigence analiz yöntemleri kullanılmıştır. Bu amaçla hücre kültürü ortamına 10, 30, 60 ve 90 µg/ml klorpirifos ve 5, 10, 15, 20 ve 25 µM tannik asit eklenerek inkübasyon gerçekleştirilmiş ve hücre canlılığı analizleri yapılmıştır.

**Bulgular:** 30 µg/ml, 60 µg/ml ve 90 µg/ml klorpirifos uygulanan gruplarda 24, 48 ve 72 saatlik sürede hücre canlılığının kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı görülmüştür. Klorpirifosa ait IC<sub>50</sub> (%50 baskılayıcı konsantrasyon) değeri 24 saatlik maruziyette 79,94 µg/ml bulunmuştur. Tannik asitin 25 µM uygulandığı grubun absorbans değerinin diğer gruplara göre anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir (p<0.001).

**Sonuç:** Klorpirifosun hücre canlılığı üzerinde özellikle yüksek dozlarda etkili olduğu ve canlılığı daha çok azalttığı görülmüştür. Tannik asitin hücre canlılığını artırmada etkili dozunun 10µM olduğu ve yüksek dozlarda canlılığı azaltma yönünde etkili olduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** HEK-293, klorpirifos, tannik asit, Hücre canlılığı analizi

### ABSTRACT

**Objective:** Chlorpyrifos, an organophosphate pesticide, is a widely used insecticide and shows its effect with poisoning by inhibiting the activity of acetylcholinesterase, causing acetylcholine accumulation in neuromuscular junctions, heart muscle, smooth muscle and central nervous system. Pesticides are risk factors for cancer, neurodegenerative diseases, neurotoxicity, reproductive dysfunction and deterioration of many organ functions. Tannic acid is a polyphenol used in traditional and modern medicine with its many properties such as antioxidant, anti-inflammatory and anticarcinogenic. Our study was planned to investigate the possible effects of the application of chlorpyrifos and tannic acid at different doses and durations on the cell viability of the human embryonic kidney cell HEK293 cell line.

**Materials and Method:** The study was carried out on 3 groups as control group, chlorpyrifos group and tannic acid group. MTT and xCELLigence analysis methods were used to determine at which doses and at what time chlorpyrifos and tannic acid were more effective on cell viability in HEK 293 cells. For this purpose, incubation was carried out by adding 10, 30, 60 and 90 µg/ml chlorpyrifos and 5, 10, 15, 20 and 25 µM tannic acid to the cell culture medium.

**Results:** It was observed that the cell viability of the 30 µg/ml, 60 µg/ml and 90 µg/ml chlorpyrifos groups decreased significantly over the 24, 48 and 72 hours compared to the control group. The IC<sub>50</sub> value of chlorpyrifos was found to be 79.94 µg/ml at 24-hour exposure. It was determined that the absorbance value of the group in which 25 µM of tannic acid was applied decreased significantly compared to the other study groups (p<0.001).

**Conclusion:** It has been observed that chlorpyrifos is effective on cell viability especially at high doses and decreases viability more. It has been determined that the effective dose of tannic acid in increasing cell viability is 10µM and it is effective in reducing viability at high doses.

**Keywords:** HEK-293, chlorpyrifos, tannic acid, Cell viability analysis

**Sorumlu Yazar/Corresponding Author:** Sevil EROL E-mail: [sevilrol@beykent.edu.tr](mailto:sevilrol@beykent.edu.tr)

**Başvuru/Submitted:** 14.09.2022 • **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 27.09.2022 • **Son Revizyon/Last Revision Received:** 14.12.2022 •

**Kabul/Accepted:** 11.01.2023 • **Online Yayın/Published Online:** 09.02.2023



This work is licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

## GİRİŞ

Dünya nüfusunun hızlı bir şekilde ve kontrolsüzce artması, tüketime bağlı olarak gıdaya olan ihtiyacı sürekli olarak artırmakta ve yeterli miktarda ürün sağlanamamaktadır. Bugün tüm dünyada ve ülkemizde de ürün miktarındaki artışı sağlayabilmek amacıyla tarımda çeşitli zararlılarla mücadelede "pestisit" olarak adlandırılan çeşitli kimyasallar kullanılmaktadır. Ancak tarımda kullanılan bu ilaçlar, toprakta, suda ve ürünlerin üzerinde uzun zaman hiç bozulmadan kalabilmekte ve besin zinciri ile insanlara kadar ulaşmaktadır (1-2). Organofosfatlı bir pestisit olan klorpirifos [0,0-diethyl-0-(3,5,6-trichloro-2-pyridinyl) phosphorothioate], yaygın olarak kullanılan bir böcek öldürücüdür. Klorpirifos, daha çok temas ve gastrointestinal sistem toksisitesi yoluyla etkili olur. Dış parazitlerde ve konakçı organizmalarda kolinesteraz enzimiyle birleşip onu inhibe ederek etkisini gösterir. Organofosfatlı insektisitler, insanlarda ve hayvanlarda asetilkolini (ACh) parçalayan asetilkolinesterazın (AChE) etkinliğini dönüşümsüz olarak engeller ve vücutta nöromusküler kavşaklarda, kalp kasında, düz kasta, parasempatik sinir uçlarında ve merkezi sinir sisteminde bulunan kolinerjik sinapslarda asetilkolin birikimine neden olarak zehirlenmeye yol açmaktadır (3-4).

Toksisiteyi, kimyasal ve fizyolojik faktörler, ısı, ilacın uygulandığı doz, uygulanma yolu ve diğer kimyasal maddelerle bir arada kullanılıp kullanılmadığı gibi faktörler etkilemektedir (3). Pestisitlerin bir grubu olan organofosfatlı insektisitler içinde yer alan klorpirifosun serbest oksijen radikallerinin üretimini artırdığı ve oksidatif doku hasarlarına yol açtığı bildirilmiştir. Oluşan radikallerin, lipitlere, proteinlere ve DNA'ya zarar veren reaksiyonları başlattıkları bilinmektedir (5). Reaktif oksijen ürünlerinin oluşmasını ve bunların oluşturduğu hasarı önlemek amacıyla antioksidan savunma mekanizmaları etkin rol oynarlar (6).

Polifenol çeşitliliği arasında, tannik asidin geleneksel tıpta kullanımını, zehirli maddelerin detoksifiye edilmesinden, bitkisel tıbbın terapötik gücünün gösterilmesine kadar uzayan geniş bir yelpazede nesiller öncesine dayanmaktadır (7-8). Tannik asit, derinin, demir mazi mürekkebinin, kırmızı şarapların bitkisel tabaklanmasında ve çeşitli hastalıkları tedavi etmede geleneksel bir ilaç olarak kullanılan önemli bir bileşendir. Bitki kaynaklı polifenolik fitokimyasallar beslenme çeşitliliği içerisinde her yerde bulunabilir ve geniş bir kullanım alanına sahiptir (9-11). Mevcut araştırmalar, tannik asitin antikanserijen, antimikrobiyal, antitumörjenik, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antiallerjik ve antioksidan etkinliğe sahip olduğunu ve kanamayı durdurabilme özelliğini göstermiştir. Ayrıca tannik asitin antiviral ve antifungal aktiviteleri de mevcuttur (12-15).

Tannik asitin oksidan ve antioksidan mekanizmaları tam olarak aydınlatılmamıştır. Tannik asit, hem geçiş metallere varlığında DNA hasarını indükleyerek bir prooksidan olarak hem de baskılayıcı hidroksil radikal üretimi ile antioksidan olarak işlev görebilmektedir (16-17). Tannik asitin hidroksil radikal oluşumuna karşı bir antioksidan olarak hareket ettiği ve yüksek süperoksit anyon radikali ve hidrojen peroksit süpürücüyü sahip olduğu bilinmektedir. Ancak aynı zamanda bir prooksidan olarak hareket ettiği, en belirgin olarak kromatindeki bakır iyonlarını

bağladığı ve DNA'ya zarar verdiği gösterilmiştir (18-21). Bununla birlikte tannik asitler çözünebilir tanenler için verilebilecek en iyi örneklerdir. Sağlık alanında büzüştürücü, hemostatik, anti-septik, yatıştırıcı, bağışıklık sistemini kuvvetlendirici, ateş düşürücü, peklilik yapıcı, antiromatizmal gibi etkilere sahip olan tanenlerin, bakır, kurşun ve alkaloid zehirlenmelerinde antidot olarak kullanıldığı bilinmektedir (22-24).

Bu çalışmada, daha çok deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda etkileri gözlemlenen klorpirifos insektisiti ile antioksidan ve prooksidan özellikleri olduğu bilinen tannik asitin insan embriyonik böbrek hücresi HEK 293 hücre hattında doz ve süreye bağlı olarak hücre canlılığı üzerine olan etkilerinin MTT ve xCELLİnge yöntemleri ile incelenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda klorpirifosun "(Klorpirifos-etil (Safban 25 WP) -Safa Tarım A.Ş.)" ve tannik asitin "(TEKKİM Tannik Asit Pur. Gr. 500 Gr LB.TK.201783.00502)" hücre canlılığı üzerine etkilerini insan embriyonik böbrek hücrelerinde (Human Kidney Embryonic Cells – HEK 293) araştırmayı amaçladık. Çalışmamızda kullandığımız HEK293 hücre hattı, Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonundan (American Type Culture Collection - ATCC® CRL1573™) soğuk zincir ile teslim alındı ve çalışma başlayana kadar Bahçeşehir Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Hücre Kültürü laboratuvarında bulunan sıvı azot tankında -196°C'de muhafaza edildi.

Çalışmaya başlamadan önce kullanılacak materyaller otoklavlanarak 37°C'lik etüvde sterilize edildi, ayrıca her çalışma öncesinde hücre kültürü laboratuvarı ve laminar akım kabini sterilize etmek amacıyla 15 dakika ultraviyole ışık (UV) kullanıldı. Hücreler deneysel çalışmada kullanılmak amacıyla sıvı azot tankından çıkartılarak 37°C'de su banyosunda hızlı bir şekilde çözdürüldü. Kriyotüp içeriği, toplam hacim 6 ml olacak şekilde %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin içeren besiyerinden 5 ml konulan santrifüj tüpüne aktarıldı. 5 dakika süresince 1500 RPM'de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve yıkama işlemi iki kez tekrarlandı. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre peleti üzerine 500 µl besiyeri eklenip hücreler pipetaj yapıldı. Hücre süspansiyonu 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklara (T-25 kültür kabı) aktarıldı ve üzerine 5 ml besiyeri eklendi. Üzerine besiyeri eklenen hücreler CO<sub>2</sub> inkübatörde 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> ve %97 nemli hava içerecek şekilde standart kültür ortamında inkübasyona bırakıldı.

Çalışma grupları 10, 30, 60 ve 90 µg/ml klorpirifos eklenerek hazırlanan klorpirifos grubu ile 5, 10, 15, 20 ve 25 µM tannik asit eklenerek hazırlanan tannik asit gruplarıdır (9,25-28). Kontrol grubu ise içerisinde klorpirifos veya tannik asit bulunmayan besiyer ortamı ile oluşturulmuş gruptur. Tüm deney grupları belirlenen dozlarda 24, 48 ve 72 saat inkübe edildi.

### Hücre Canlılığı Analizleri

MTT Yöntemi: 1g MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum-bromid] 200 ml PBS (Phosphate Buffered Saline) (pH 7.4 , 5 mg/ml) ile alüminyum folyoya sarılan balon



joje içerisinde karanlık ortamda vortexlenerek çözdürüldü ve 0.22 µm filtreden geçirildi. Deney aşamasından önce çözelti 37° C'lik su banyosunda ısıtıldı. Deneyde 3 ayrı 96'lık plate ile çalışıldı ve 96'lık plate kuyucuklarının her birinde 100 µl'de 10000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> inkübatöründe hücrelerin yapışması için 24 saatlik inkübasyon sonrasında kontrol, klorpirifos 10, 30, 60, 90 µg/ml ve tannik asit 5, 10, 15, 20, 25 µM konsantrasyonlarında uygulamalar yapıldı. Her bir kuyuya 10 µl MTT solüsyonu eklenerek 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında hücrelerin yüzeyinde var olan medyum bir pipet ile alınıp 50 µl DMSO (Dimetyl Sulfoxide) ilave edildikten sonra tekrar 10 dk inkübatörde bekletildi. İnkübasyonu yapılmış olan hücrelerin, mikroplate okuyucu ile 570 nm absorbans değerinde ölçümleri yapıldı. Kontrol kuyucukları belirlenen absorbans değerlerinin ortalaması alındı ve bu değer %100 canlı hücre olarak belirlendi. Klorpirifos-etil ve tannik asit ilave edilmiş kuyucuklardan okunan absorbans değerleri kontrol absorbans değerine oranlandı ve yüzde canlılık olarak kabul edildi. Sonuçta 24 saatlik MTT canlılık analizi sonuçları bulundu. 48. ve 72. saat MTT canlılık analizi sonuçlarını elde etmek için farklı konsantrasyondaki maddelerin hücrelere uygulanma işleminden sonra inkübasyon süreleri ayarlanarak tüm işlemler tekrarlandı. Microsoft Excel programı ile uygulanan doz ve % hücre canlılığı eğrisi elde edilerek IC<sub>50</sub> (%50 baskılayıcı konsantrasyon) değerleri logaritmik eğim grafiği ile hesaplandı.

**xCELLigence yöntemi:** xCELLigence, elektriksel impedans teknolojisi sayesinde hücrelerin elektrotlara bağlanıp bağlanmamasına bağlı olarak ölçüm yapan, hücre bazlı olan mikroelektronik biyosensör sisteminden oluşur. xCELLigence, mikroelektronik hücre sensörü dizisinden oluşmaktadır. Sensör sayesinde elektronik empedansın ölçülmesini, elektrotlar üzerinde var olan değişikliklerin tespit edilmesini sağlar ve değişikliklerin izlenme olanağını sağlar. Hücre indeksi, elektrik empedansındaki değişikliklerin ölçülmesi amacıyla kullanılır. Hücre sayısı, canlılığı, morfolojisi elektrod empedansını etkilemektedir. Hücre indeksindeki azalışa ve artışa göre elde edilen bilgiler yazılım ile değerlendirilip sonuçlandırılır. xCELLigence yöntemi ile hücre proliferasyonu yani hücrelerin çoğalıp çoğalmadığı, sitotoksikite yani canlı hücreler üzerindeki toksik etki oranı belirlenebilir. xCELLigence yöntemi hücre karakterizasyonu hakkında bilgi verir (29-30).

Çalışmamızda HEK293 insan embriyonik böbrek hücre hattı, %10 fetal bovine serum ve %1 Streptomisin-Penisilin içeren DMEM besiyerinde gerektiğinde pasajlama işlemleri yapılarak yeterli hücre sayısına ulaşıncaya kadar kültür ortamında çoğaltıldı. Hücreler besiyeri ortamında 37 °C'de ve %5 CO<sub>2</sub> ile nemlendirilmiş inkübatörde T25 hücre kültürü flakslarında kültüre edildi. Hücreler flaksta %80 doluluğa ulaştığında steril hücre kazıyıcı ile kazınarak ve falcon tüpüne aktarılacak şekilde soğutmalı santrifüjde 1500 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Hücreler daha sonra e-plate'lere ekilmek üzere hücre sayım prosedürüne göre sayılıp, sayım sonucu elde edilen hücre sayısı 1x 10<sup>6</sup> olarak hesaplandı.

RTCA (Real Time Cell Analysis) programında deneyde kullanılacak kuyucukların seçimi, hücre türü, kuyu başına kullanılacak hücre sayısı, kullanılacak bileşiğin adı, konsantrasyonu ve konsantrasyon birimi bilgileri girilerek deneyle ilgili veriler tanımlandı.

Plakaların cihazdan çıkarılacağı her bir aşama için (Step 1, Step 2 ve Step 3) ayrı ayrı planlamalar yapıldı. Blank okuması tamamlandığında plaketler inkübatörden laminar kabine alınıp 16 kuyulu e-plate'lerin her bir kuyusuna 150 µl'de yaklaşık 1.5x10<sup>4</sup> hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Hücreleri ektikten 24 saat sonra madde uygulanacağı için "Duration" seçeneği 24 saate, kuyulardan 15 dakika aralıklarla ölçüm almak için "Interval" seçeneği 15'e ayarlandı. Bu süre sonunda, toplamda 16 kuyusu bulunan plakalara klorpirifos için 0, 10, 30, 60, 90 µg/ml ve tannik asit için 0, 5, 10, 15, 20, 25 µM konsantrasyonlarında madde uygulaması yapıldı. Hücre üzerine etkisi incelenen her bir madde için ayrı bir plaka kullanıldı. (Step 1: Interval 1:00 Duration 0:0:0; Step 2:Interval 15:00 Duration 24:00; Step 3: Interval 15:00 Duration 96:00)

Süre sonunda sistemden, alt kısmında iyi bir iletken olan altın ile kaplı elektrotlara yapışan hücre sayısına ve kontrol grubuna göre, hücrelerdeki değişime bağlı olarak hücre indeksi değerleri elde edildi. İstatistiksel değerlendirmenin yapılabilmesi için gerekli uygun sayıya ulaşabilmek adına her bir madde için iki 16'lı e-plate kullanılarak toplamda 6 ölçüm sonucu elde edildi.

**İstatistiksel analiz:** Örneklerin % canlılık değerleri hesaplandı. Sonuçlar IBM SPSS 21 (Statistical Package for the Social Sciences) programı kullanılarak değerlendirildi. Grup içi karşılaştırmalarda parametrik olmayan gruplar için Kruskal Wallis, parametrik olan gruplar için One-Way ANOVA testleri yapıldı. Sonuçlar ortalama ± SD (standart sapma) olarak verilip anlamlılık düzeyi p<0.05 olarak kabul edildi.

## BULGULAR

**Klorpirifosun doza bağlı etkisinde MTT hücre canlılığı analizi**  
24 saatlik MTT analiz sonuçlarına göre; klorpirifosun 10 µg/ml uygulandığı grubun MTT değeri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma olduğu belirlendi (\*p<0.05). 30 µg/ml, 60 µg/ml ve 90 µg/ml klorpirifos uygulanan grupların MTT değerleri de kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma tespit edildi (<sup>b</sup>p<0.001) (Tablo 1, Şekil 1). HEK293 hücrelerinin 24 saat boyunca klorpirifosa maruz kalmasıyla elde edilen IC<sub>50</sub> değeri 79,94 µg/ml'dir. 48 saatlik MTT analiz sonuçlarına göre; 10 µg/ml, 30 µg/ml ve 60 µg/ml klorpirifos uygulanan gruplarının absorbans değerlerinin 90 µg/ml uygulanan gruba göre anlamlı olarak artmış olduğu (<sup>a</sup>p<0.001) görüldü. 10 µg/ml klorpirifos dozunun uygulandığı grubun MTT değeri ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma olduğu belirlendi (<sup>b</sup>p<0.05) (Tablo 2, Şekil 1). HEK293 hücrelerinin 48 saat boyunca klorpirifosa maruz kalmasıyla elde edilen IC<sub>50</sub> değeri 85,95 µg/ml'dir. 72 saatlik MTT analiz sonuçlarına göre; 30, 60, 90 µg/ml uygulanan grupların absorbans değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma belirlendi (\*p<0.001). Kontrol ve 10 µg/ml klorpirifos uygulanan gruplar arasında 72 saatlik MTT sonuçlarına göre istatistiksel açıdan anlamlı fark tespit edilmedi (Tablo 3, Şekil 1). HEK293 hücrelerinin 72 saat boyunca klorpirifosa maruz kalmasıyla elde edilen IC<sub>50</sub> değeri 80,23 µg/ml'dir.

**Tannik asitin doza bağlı etkisinde MTT hücre canlılığı analizi**  
24 saatlik MTT analiz sonuçlarına göre; tannik asitin 5µM uy-

**Tablo 1:** Klorpirifos'un (KP) 24 saatlik MTT sonuçlarına ait ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD)

Parametre	Kontrol	10 µg/ml	30 µg/ml	60 µg/ml	90 µg/ml
MTT (570 nm)	0,226±0,03	0,204±0,06 <sup>a</sup>	0,157±0,04 <sup>b</sup>	0,140±0,03 <sup>b</sup>	0,097±0,05 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>p<0.05 ve <sup>b</sup>p<0.001 kontrolle karşılaştırıldığında

**Tablo 2:** Klorpirifos'un (KP) 48 saatlik MTT sonuçlarına ait ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD)

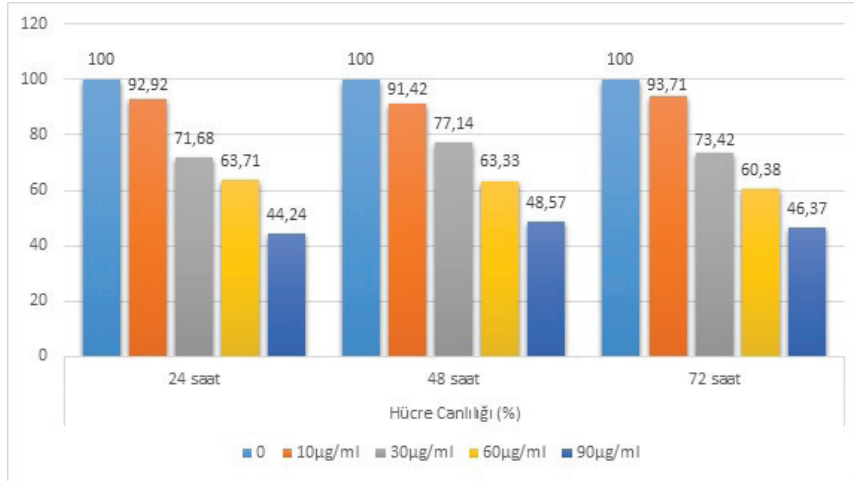
Parametre	Kontrol	10 µg/ml	30 µg/ml	60 µg/ml	90 µg/ml
MTT (570 nm)	0,210±0,02	0,191±0,02 <sup>a,b</sup>	0,162±0,01 <sup>a</sup>	0,133±0,01 <sup>a</sup>	0,102±0,01

<sup>a</sup>p<0.001 90 µg/ml ile karşılaştırıldığında, <sup>b</sup>p<0.001 kontrolle karşılaştırıldığında

**Tablo 3:** Klorpirifos'un (KP) 72 saatlik MTT sonuçlarına ait ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD)

Parametre	Kontrol	10 µg/ml	30 µg/ml	60 µg/ml	90 µg/ml
MTT (570 nm)	0,207±0,03	0,187±0,06	0,147±0,02 <sup>a</sup>	0,121±0,03 <sup>a</sup>	0,092±0,05 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>p<0.001 kontrolle karşılaştırıldığında



**Şekil 1:** Klorpirifos'a ait 24, 48 ve 72 saatlik % hücre canlılığı/konsantrasyon grafiği

güldüğü grupta absorbanın kontrol grubuna göre <sup>a</sup>p<0.01 anlamlılığında azalmış olduğu gözlemlendi. 15 µM, 20 µM ve 25 µM tannik asit uygulanan gruplarda ise absorban değerlerinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldığı (<sup>b</sup>p<0.001) belirlendi. 25 µM tannik asit uygulanan grubun absorban değerinin diğer çalışma gruplarına göre anlamlı olarak azaldığı tespit edildi (<sup>c</sup>p<0.001) (Tablo 4, Şekil 2). HEK293 hücrelerinin 24 saat boyunca tannik asite maruz kalmasıyla elde edilen IC<sub>50</sub> değeri 21,34 µM 'dır. 48 saatlik MTT analiz sonuçlarına göre; tannik asitin farklı dozlarda uygulandığı grupların 48 saat sonraki verileri incelendiğinde 10 µM uygulanan grupta kontrole göre anlamlı artışlar gözlemlendi (<sup>a</sup>p<0.01). 20 µM ve 25 µM yüksek dozlarda

ise absorban değerlerinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldığı belirlendi (<sup>b</sup>p<0.001). 10 µM uygulanan grubunun absorban değerinin 5 µM ve 15 µM gruplarına göre (<sup>c</sup>p<0.01) ve 20 µM ve 25 µM'lık gruplara göre (<sup>d</sup>p<0.001) arttığı görüldü (Tablo 5, Şekil 2). HEK293 hücrelerinin 48 saat boyunca tannik asite maruz kalmasıyla elde edilen IC<sub>50</sub> değeri 23,99 µM'dır. 72 saatlik MTT analiz sonuçlarına göre; tannik asitin 10 µM uygulandığı grupta 72 saatlik maruziyette absorban değeri kontrole göre artmışken (<sup>a</sup>p<0.001), 20 µM ve 25 µM uygulandığı gruplarda ise azaldı (<sup>b</sup>p<0.001). 25 µM uygulanan grubun değerleri tüm gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük olduğu belirlendi (<sup>c</sup>p<0.001) (Tablo 6, Şekil 2). HEK293 hücrelerinin 72

**Tablo 4:** Tannik asit'in 24 saatlik MTT sonuçlarına ait ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD)

Parametre	Kontrol	5 µM	10µM	15 µM	20µM	25 µM
MTT (570 nm)	0,18±0,08	0,155±0,04 <sup>a,c</sup>	0,176±0,04 <sup>c</sup>	0,112±0,06 <sup>b,c</sup>	0,095±0,04 <sup>b,c</sup>	0,07±0,07 <sup>b,c</sup>

<sup>a</sup>p<0.01, <sup>b</sup>p<0.001 kontrolle karşılaştırıldığında, <sup>c</sup>p<0.001 25 µM ile karşılaştırıldığında

**Tablo 5:** Tannik asit'in 48 saatlik MTT sonuçlarına ait ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD)

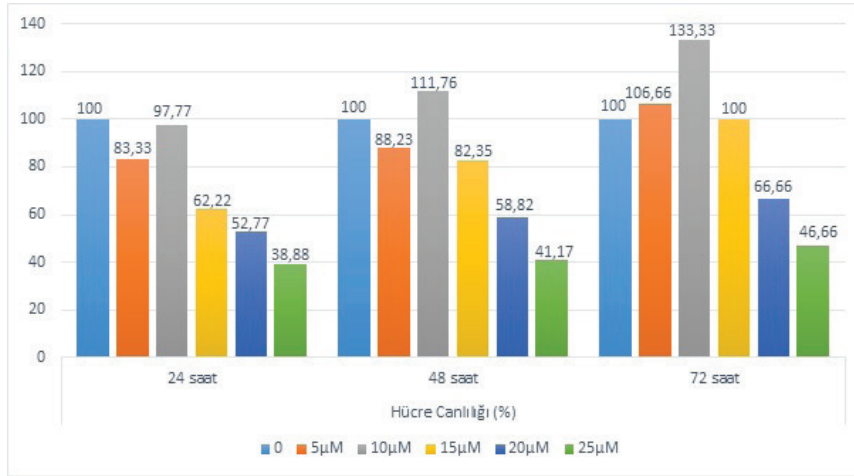
Parametre	Kontrol	5 µM	10µM	15 µM	20µM	25 µM
MTT (570 nm)	0,17±0,01	0,15±0,01 <sup>c</sup>	0,19±0,01 <sup>a</sup>	0,14±0,02 <sup>b,c</sup>	0,10±0,03 <sup>b,d</sup>	0,07±0,02 <sup>b,d</sup>

<sup>a</sup>p<0.01 <sup>b</sup>p<0.001 kontrolle karşılaştırıldığında, <sup>c</sup>p<0.01, <sup>d</sup>p<0.05 10 µM ile karşılaştırıldığında

**Tablo 6:** Tannik asit'in 72 saatlik MTT sonuçlarına ait ortalama (M) ve standart sapma (SD) değerleri (M±SD)

Parametre	Kontrol	5 µM	10µM	15 µM	20µM	25 µM
MTT (570 nm)	0,15±0,02	0,161±0,01 <sup>c</sup>	0,20±0,01 <sup>a,c</sup>	0,153±0,01 <sup>a,c</sup>	0,10±0,01 <sup>b,c</sup>	0,07±0,01 <sup>b,c</sup>

<sup>a</sup>p<0.001, <sup>b</sup>p<0.001 kontrolle karşılaştırıldığında, <sup>c</sup>p<0.001 25 µM ile karşılaştırıldığında



**Şekil 2:** Tannik asitin 24, 48 ve 72 saatlik % hücre canlılığı/konsantrasyon grafiği

saat boyunca tannik asite maruz kalmasıyla elde edilen IC<sub>50</sub> değeri 25,89 µM'dir.

#### xCELLigence Analiz Sonuçları

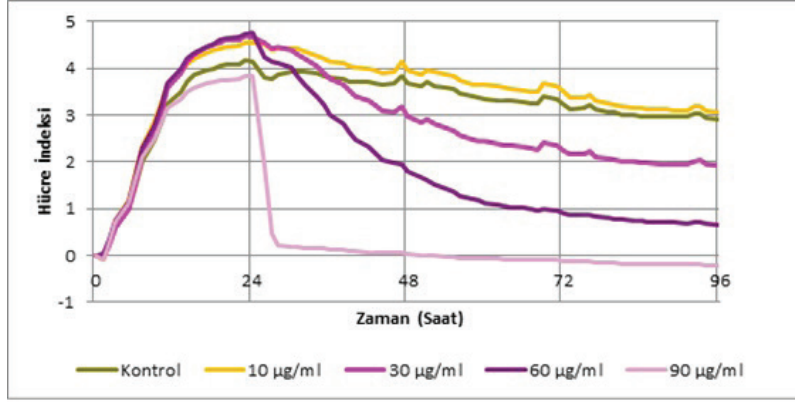
##### Klorpirifos'un xCELLigence Analiz Sonuçları

HEK293 hücrelerinin 24 saatlik XCELLigence analiz sonuçlarına göre, 30 µg/mL ve 60 µg/mL klorpirifos uygulanan gruplarda hücre indeksinin 90 µg/mL uygulanan gruba göre anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuştur (p<0.01). HEK293 hücrelerinin 48 saatlik XCELLigence analiz sonuçlarına göre 60 µg/mL klorpirifos uygulanan grubun hücre indeksinin 10 µg/mL uygulanan gruba göre daha düşük olduğu tespit edildi (p<0.001). Kontrol grubu ve 10 µg/mL uygulanan grupların hücre indeksinin 90 µg/mL uygulanan gruba göre anlamlı olarak yüksek olduğu belirlendi (p<0.001). HEK293 hücrelerinin 72 saatlik xCELLigence analiz

sonuçlarına göre 10 µg/mL uygulanan grubun hücre indeksinin 60 µg/mL klorpirifos uygulanan gruba göre anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı (p<0.01). 90 µg/mL klorpirifos uygulanan grubun hücre indeksinin kontrol ve 10 µg/mL uygulanan gruplara göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak azaldığı belirlendi (p<0.001) (Şekil 3).

##### Tannik Asit'in xCELLigence Analiz Sonuçları

HEK293 hücrelerinin 24 saatlik XCELLigence analiz sonuçlarına göre, 25 µM tannik asit uygulanan grubun hücre indeksinin 20 µM uygulanan gruba göre anlamlı olarak düşük olduğu (p<0.01) belirlendi. 20 µM ve 25 µM tannik asit uygulanan grupların hücre indeksinin, kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğu saptandı (p<0.001). HEK293 hücrelerinin 48 saatlik xCELLigence analiz sonuçlarına göre, 15 µM tannik asit uygulanan grubun



**Şekil 3:** Değişen konsantrasyonlarda klorpirifos'a maruz bırakılan HEK 293 hücrelerinin ortalama gerçek zamanlı hücre analizi xCELLigence proliferasyon eğrileri

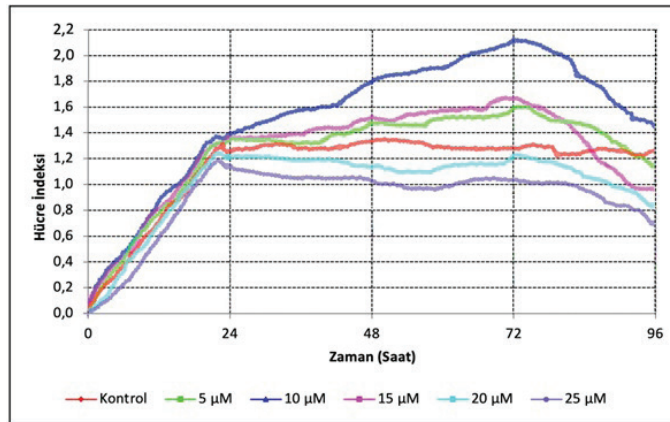
hücre indeksinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış olduğu belirlendi ( $p < 0.05$ ). 20  $\mu\text{M}$  ve 25  $\mu\text{M}$  uygulanan grupların hücre indeksinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmış olduğu belirlendi (sırasıyla  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ). Tannik asitin 10  $\mu\text{M}$  uygulandığı grubun hücre indeksinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış olduğu görüldü ( $p < 0.05$ ). HEK293 hücrelerinin 72 saatlik xCELLigence analiz sonuçlarına göre 20  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ) ve 25  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ) uygulanan grupların hücre indeksinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı belirlendi. Tannik asitin 10  $\mu\text{M}$  uygulandığı grubun hücre indeksi kontrol ( $p < 0.01$ ), 20 ve 25  $\mu\text{M}$  uygulana gruplara göre  $p < 0.001$  anlamlılığında yüksektir (Şekil 4).

## TARTIŞMA

Organofosfatlı insektisitler kimyasal yapılarından dolayı yağda çözünebilirler (lipofiliktir) ve noniyonizedir. Lipofilik özelliklerinden dolayı hücre membranını, kan beyin bariyerini geçebilirler ve bu yollarla hasara yol açabilirler (4,31). Çalışmamızda kullandığımız klorpirifos toksisite yönünden orta düzeyde riskli olan bir organofosfatlı insektisit grubu içerisinde yer almaktadır ve maruz kalındığında başlıca hepatoksisite, nörotoksisite ve endokrin sistem bozuklukları görülmektedir. Özellikle merkezi

sinir sisteminde nörolojik toksisite yanında DNA hasarına da neden olarak çok ciddi hasarlara yol açmaktadır. Bazı çalışmalar klorpirifosa maruziyetin gelişimsel bozuklukla, otoimmün sistem patolojileri ile, akciğer, böbrek ve meme kanseri gibi kanser türleriyle bağlantılı olduğunu da göstermiştir (32).

Ulusal Bilimler Akademisi raporu, 21. yüzyılda toksisite testlerinde, in vitro yola dayalı toksisite testini genişletmek ve tüm hayvan yaklaşımlarını en aza indirmek için diğer bilimsel araçların kullanımına yönelik bir paradigma değişikliğinin temelini atmıştır (Ulusal Araştırma Konseyi, 2007). Maruz kalan insan hücre kültürlerinin biyoinformatik analizleri gibi bu alternatif yöntemler, bir yaklaşım kullanarak in vivo toksisiteyi tahmin etmede kabul görmektedir (9). Geleneksel olarak, pestisitlerin toksik potansiyelini incelemek için hayvan modelleri kullanılmaktadır. Günümüzde daha fazla sayıda yeni pestisit keşfedilmesiyle, toksisiteyi tespit etmek için in vivo modellerin kullanılması zaman, etik ve maliyet açısından pratik olmadığı anlayışı kabul görmeye başlamıştır. In vitro hücre kültürü sistemlerinin, kimyasallar veya ilaca maruz kalma yoluyla hedef organlarda toksisite tahmini için faydalı olduğu kanıtlanmıştır. Hücre tabanlı sistemler, yüksek düzeyde entegrasyon sunduğundan, kimya-



**Şekil 4:** Değişen konsantrasyonlarda Tannik Asit'e maruz bırakılan HEK 293 hücrelerinin ortalama gerçek zamanlı hücre analizi xCELLigence proliferasyon eğrileri

salların bozulmamış hücrelerle etkileşimlerini incelemek için popüler hale gelmiştir. Toksikite çalışmaları için karaciğer, böbrek, nöron vb. çeşitli in vitro hücre sistemleri geliştirilmiştir. Çalışmada kullandığımız böbrek hücre kültürü sistemi, ksenobiyotiklerin vücuttan atılmasını ve toksisitesini göstermesi açısından ideal ortam şartlarını barındırmaktadır (33).

Klorpirifos'un HEK293 hücrelerine etkisini araştırmak için uyguladığımız dozların 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası hücre canlılığındaki azalmanın doza bağlı olarak değiştiğini söyleyebiliriz. Toksik etkisini gördüğümüz klorpirifosun, doz arttıkça hücre canlılığında % 44,24'e kadar azalma meydana getirdiği görülmüştür.

Çok sayıda biyoaktif bitkisel biyomoleküller arasında, polifenoller her zaman faydalı özellikleri göz önünde bulundurularak odak noktası olmaya devam etmektedir. Sağlığa yararlı bir aile olarak tanımlanan polifenollerin, antikanser, antimutajenik, antienflamatuar, antimikrobiyal, antibakteriyel, antiseptik ve antioksidan özellikleri olduğu bilinmektedir (9). Tannik asit, benzersiz biyokimyasal özellikleri nedeniyle biyoloji ve tıbbi araştırmalar alanında son on yılda popülerlik kazanmış, doğal olarak oluşan bir antioksidan polifenoldür. Kullanımının temel olarak hidroksil grubu, proteinler ve diğer biyomoleküllerle bağlar özellikle hidrojen bağları oluşturmaya yönelik afinitesinden kaynaklanmaktadır. Günümüzde tannik asit ile yapılan çalışmalar, birçok yeni farmasötik ve biyomedikal uygulamanın geliştirilmesine yol açmıştır. Tannik asitin bir antioksidan olarak iltihabı azalttığı, yaygın patojenik bakteride bir antibiyotik görevi gördüğü ve çeşitli kanser türlerinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir (7).

Çalışmamız sonucunda tannik asitin belli bir doz artışından sonra toksik olabileceğini ve prooksidan özellik gösterebileceğini, dozu arttırdığımızda azalmış hücre canlılığı ile ifade edebileceğimizi düşünmekteyiz. Tannik asitin antioksidan mı yoksa oksidasyonu artıran bir prooksidan gibi mi davrandığı tamamen konsantrasyonla ilişkilidir. Farklı konsantrasyonlarda antioksidan ve prooksidan özelliğe sahip oluşu her iki durum için de tannik asitin olumlu katkısı olduğunu gösterir, çünkü prooksidan özelliği ile oksidatif stresi indüklemek ve metal iyonlarını bağlama yeteneğine sahip olup antibakteriyel ve antikanser özellik gösterir (21, 23, 34-36).

Çalışmamızın temel hedeflerinden biri tannik asitin hücre canlılığına etkisini, en çok bilinen ve kullanılan MTT yöntemi yanında empedans değişimi esaslı olan xCELLigence analizi yöntemi ile de görmekti. Yöntemler arasında tannik asit etkinliğini değerlendirmede hücre çoğalmasında olumlu yönde etkileyen dozların her iki yöntemde de aynı dozlar olduğu tespit edilmiştir. Yüksek doz tannik asit uyguladığımız gruplarda her iki yöntemde de hücre canlılığının kontrole göre anlamlı olarak azaldığını bulduk. Kullanılan farklı yöntemlerin sonuçlarının birbirini desteklemekte oldukları görülmüştür.

Çalışma sonunda bulduğumuz IC50 değerlerinin bu hücre hattı kullanılarak yapılacak diğer çalışmaları planlamada fayda sağlayacağını söyleyebiliriz. Klorpirifos toksisitesini azaltabilecek

oksidan ve antioksidan maddeler ile ilgili olan ve tannik asitin bu toksisite de ne yönde hareket edeceğini tespit edecek çalışmalar yapılmasının gerekli olduğunu ifade edebiliriz.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Çalışma Konsepti/Tasarım- S.E., S.Ö.; Veri Toplama- B.Ö.K., B.D.; Veri Analizi/Yorumlama- S.Ö., B.Ö.K., S.E., B.D.; Yazı Taslağı- S.E., S.Ö., B.Ö.K., B.D.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- S.Ö., S.E.; Son Onay ve Sorumluluk- S.E., S.Ö., B.Ö.K., B.D.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir

**Finansal Destek:** Bu çalışma İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje numarası: 34836).

**Peer Review:** Externally peer-reviewed.

**Author Contributions:** Conception/Design of Study- S.E., S.Ö.; Data Acquisition- B.Ö.K., B.D.; Data Analysis/Interpretation- S.Ö., B.Ö.K., S.E., B.D.; Drafting Manuscript- S.E., S.Ö., B.Ö.K., B.D.; Critical Revision of Manuscript- S.Ö., S.E.; Final Approval and Accountability- S.E., S.Ö., B.Ö.K., B.D.

**Conflict of Interest:** Authors declared no conflict of interest.

**Financial Disclosure:** This study was supported by Istanbul University-Cerrahpaşa Scientific Research Projects Unit (Project number: 34836).

## KAYNAKLAR

1. Kurutaş EB, Kılınc M. Pestisitlerin biyolojik sistemler üzerine etkisi. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi 2003;12(3):215-28.
2. Vural N. Toksikoloji. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları. Ankara. 2005.p.344-55.
3. Sağmanlıgil H. Tavuklarda ivermektin ve klorpirifosun toksikolojik etkileşim özellikleri üzerinde deneysel araştırmalar., YYÜ Vet Fak Derg 1994;5(1-2):65-84.
4. Türkmen R, Özdemir M. Klorpirifos-Etil uygulanan diyabetli ratlarda likopenin antioksidan ve hipoglisemik etkilerinin araştırılması. Kocatepe Vet J 2015;8(1):1-17.
5. Mercan S, Eren B, Dinç N. Pestisit klorpirifosun rat (wistar albino) karaciğerinde oluşturduğu hasar üzerine kurkuminin antioksidan etkisinin incelenmesi. Anadolu J Agr Sci 2017;32(1):132-38.
6. Kayhan FE, Kaymak G, Akbulut C, Ertuğ ND. 2,4-D (Diklorofenoksiasetik Asit)'in zebra balığı (Danio rerio Hamilton, 1822) solungaçlarında antioksidan enzimler ve lipid peroksidasyon seviyesi üzerine akut etkilerinin belirlenmesi. Trakya Univ J Nat Sci 2017;18(2):143-48.
7. Baldwin A, Booth B. Biomedical applications of tannic acid. J Biomaterials Appl 2022;36(8):1503-23.
8. Wilson WC, Macgregor AR, Stewart CP. The clinical course and pathology of burns and scalds under modern methods of treatment. Br J Surg 1938;25(100):826-65.
9. Perumal P, Mhlanga P, Somboro MA, Amoako DG, Khumalo HM, Khan RM. Cytoproliferative and anti-oxidant effects induced



- by tannic acid in human embryonic kidney (HEK-293) cells. *Biomolecules* 2019;9(12):767-84.
10. Croft K. Dietary polyphenols: Antioxidants or not? *Arch Biochem Biophys* 2016;595:120–24.
  11. Wang TY, Li Q, Bi KS. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian J Pharm Sci* 2018;13(1):12–23.
  12. Zhang PY. Polyphenols in health and disease. *Cell Biochem Biophys* 2015;73:649–64.
  13. Somboro AM, Osei Sekyere J, Amoako DG, Kumalo HM, Khan R, Bester LA, et al. In vitro potentiation of carbapenems with tannic acid against carbapenemase-producing enterobacteriaceae: Exploring natural products as potential carbapenemase inhibitors. *J Appl Microbiol* 2019;126(2):452–67.
  14. Badhani B, Sharma N, Kakkar R. Gallic acid: A versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. *RSC Adv* 2015;5:27540–57.
  15. Myint KB, Sing LC, Wei Z. Tannic acid as phytochemical potentiator for antibiotic resistance adaptation. *APCBEE Procedia* 2013;7:175-81.
  16. Sieniawska E, Baj T. Tannins. In: Simone B, Rupika D, editors. *Pharmacognosy*. Elsevier London UK 2017, pp.199-232.
  17. Gülçin İ, Huyut Z, Elmastaş M, Aboul-Enein HY. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arab J Chem* 2010;3(1):43-53.
  18. Greenwell M and Rahman PK. Medicinal plants: Their use in anticancer treatment. *Int J Pharm Sci Res* 2015;6(10):4103–12.
  19. Khan HY, Hadi SM, Mohammad RM, Azmi AS. Prooxidant anticancer activity of plant-derived polyphenolic compounds: An underappreciated phenomenon. *Functional foods in cancer prevention and therapy*. London: Academic Press 2020, pp.221-36.
  20. Ullah MF, Khan HY, Zubair H, Shamim U, Hadi SM. The antioxidant ascorbic acid mobilizes nuclear copper leading to a prooxidant breakage of cellular DNA: implications for chemotherapeutic action against cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011;67(1): 103-10.
  21. Farhan M, Oves M, Chibber S, Hadi SM, Ahmad A. Mobilization of nuclear copper by green tea polyphenol epicatechin-3-gallate and subsequent prooxidant breakage of cellular DNA: implications for cancer chemotherapy. *Int J Mol Sci* 2017;18(1):34-48.
  22. Tatlı O. İnorganik veya organik çinko kapsayan etlik piliç rasyonlarına tannik asit katılmasının performans ve sindirilebilirlik üzerine etkisi. Adnan Menderes Üniv. 2015.
  23. Aşkın M. Ratlarda midpalatal sutur osteotomisi ile uygulanan üst çene genişletmesi sonrası kemik oluşumuna tannik asitin etkisinin değerlendirilmesi. Atatürk Üniv. 2019.
  24. Çalışlar S. Tanenlerin kanatlı hayvan beslemede etkileri. *KSÜ Tarım ve Doğa Derg* 2018;21(4):615-23.
  25. Taşpınar E. Klorpirifos uygulanan HEK 293 hücrelerinde antioksidan kullanımının apoptoz ve oksidan sistem üzerine etkisinin incelenmesi. İstanbul Üniv. 2019.
  26. Özsoğacı N. Elektromanyetik alan uygulamasının (Wi-Fi 2.4 GHz) insan embriyonik böbrek hücrelerinde (HEK293) apoptoz ve oksidatif stres değerleri üzerine selenyum ve çinkonun etkisi. İstanbul Üniv. 2016.
  27. Ergün D. Hipoksi ve hiperkapninin insan embriyonik böbrek hücre membranında (HEK293) TRPM2 kanal aktivitesine etkisinin patch clamp tekniği ve enzimatik ölçümler ile araştırılması. İstanbul Üniv. 2018.
  28. Chu X, Guo Y, Xu B, Li W, Lin Y, Sun X, et al. Effects of tannic acid, green tea and red wine on hERG channels expressed in HEK293 cells. *Plos One* 2015;10(12):1-13.
  29. xCELLigence Real Time Cell Analyzer. Genomax Technologies. URL: <https://www.genomaxtech.com/index.php/popular-articles/147-xCelligence>.
  30. Ke N, Wang X, Xu X, Abbasi YA. The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. *Methods Mol Biol* 2011;740:33-43.
  31. Demirdöğen B. Organofosfatlı pestisit zehirlenmeleri ve serum paraoksonaz 1 (PON1) enziminin organofosfat metabolizmasındaki rolü. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Derg* 2010;67(2):97-112.
  32. Sun L, Zhang S, Guo W, He W, Qian Y, Qu G, et al. Sublethal exposure of organophosphate pesticide chlorpyrifos alters cellular iron metabolism in hepatocytes and macrophages. *Int J Mol Med* 2014;34(5):1395-400.
  33. Polláková J, Pistl J, Kovalkovičová N, Csank T, Kočiřová A, Legáth J. Use of cultured cells of mammal and insect origin to assess cytotoxic effects of the pesticide chlorpyrifos. *Pol J Environ Stud* 2012;21(4):1001-06.
  34. Mitra I, Saha A and Roy K. Exploring quantitative structure–activity relationship studies of antioxidant phenolic compounds obtained from traditional Chinese medicinal plants. *Mol Simulation* 2010;36(13):1067-79.
  35. Kaczmarek B. Tannic acid with antiviral and antibacterial activity as a promising component of biomaterials—A minireview. *Materials* 2020;13(14):3224.
  36. Saraiva MA, Castro RH, Cordeiro RP, Sobrinho TP, Castro VA, Amorim EC, et al. In vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial and toxicity properties of extracts of *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Anacardiaceae). *Afr J Pharm Pharmacol* 2011;5(14):1724-31.

# REGULATION OF THE CXCL10 EXPRESSION AND INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIPS OF THE CXCL10 DNA SEQUENCE VARIATION AND DISEASE

## CXCL10 EKSPRESYONUNUN DÜZENLENMESİ VE CXCL10 DNA DİZİ VARYASYONU VE HASTALIK İLİŞKİLERİNİN İNCELENMESİ

Hayriye ŞENTÜRK ÇİFTÇİ<sup>1</sup> , Süleyman Rüştü OĞUZ<sup>2</sup> , Ekin Ece GÜRER<sup>4</sup> , Demet KIVANÇ İZGİ<sup>1,4</sup> ,  
Meltem SAVRAN KARADENİZ<sup>3</sup> 

<sup>1</sup>Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Istanbul, Türkiye

<sup>2</sup>T.C. Demiroglu Bilim University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biology and Genetic, Istanbul, Türkiye

<sup>3</sup>Istanbul University, Istanbul Faculty of Medicine, Department of Anaesthesiology and Reanimation, Istanbul, Türkiye

<sup>4</sup>Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Medical Biology, Istanbul, Türkiye

ORCID ID: H.Ş.Ç 0000-0001-5160-5227; S.R.O. 0000-0002-5854-1163; E.E.G. 0000-0002-1758-9814; D.K.İ. 0000-0002-2451-5709; M.S.K. 0000-0002-5663-1026

**Citation/Atf:** Senturk Ciftci H, Oguz SR, Gurer EE, Kivanc Izgi D, Savran Karadeniz M. Regulation of the CXCL10 expression and investigation of the relationships of the CXCL10 DNA sequence variation and disease. Journal of Advanced Research in Health Sciences 2023;6(1):64-72. <https://doi.org/10.26650/JARHS2023-1193923>

### ABSTRACT

**Objective:** Chemokine proteins are significantly effective in inflammation and immunity. Chemokines are from the family of the chemokine proteins and they organise the leukocyte trafficking through the formation of chemotactic activity in the cells that express the appropriate chemokine receptors. CXCL10 is involved in the CXC chemokine family and is effective in biological events such as chemotaxis, apoptosis, cell growth, and angiostasis through the attachment to the CXCR3 receptor. CXCL10 is pleiotropic due to its effects on different disease groups such as autoimmune disorders, transplantation, infectious diseases, and cancer. The aim of this study was to assess the potential role of CXCL10 on the pathogenesis of various diseases.

**Material and methods:** The eQTL effects of CXCL10 expression and the regulation of microRNAs (miRNAs) in terms of co-regulated gene clusters were examined. The STRING/GeneMANIA/KEGG PATHWAY/GeneCards was used for the investigation of the gene-protein and pathway interactions; for the detection of miRNA targeting CXCL102, TargetScan/miRDB was used; for the investigation of the association of CXCL10 and miRNA region single nucleotide polymorphisms (SNP) with the diseases, GRASP and GWAS were used; GSEA/MSigDB database was used for gene enrichment analysis

**Results:** Both the GSEA/MSigDB tool and the gene set enrichment analysis recommended the use of the enriched forms of the genes involved in breast and prostate cancers and in response to inflammation, and to interferon and regulatory T cells (FDR<1E-50). 182 genes (at a 5-fold threshold) that are structurally co-expressed with five additional CXCL genes close to CXCL10 were identified with the use of the CO-Regulation database (CORD). No enrichment was detected for the common targets of

### ÖZ

**Amaç:** Kemokin proteinlerinin, inflamasyon ve bağışıklıkta önemli rolleri vardır. Kemokinler, kemokin proteinleri ailesinin bir üyesi olup uygun kemokin reseptörlerini eksprese eden hücrelerde kemotaktik aktivite üreterek lökosit trafiğinde önemli bir rol oynarlar. CXCL10, CXC kemokin ailesinin bir üyesidir ve CXCR3 reseptörüne bağlanarak kemotaksi, apoptoz, hücre büyümesi, yeni damar oluşumu gibi biyolojik olaylarda etkili olur. CXCL10, otoimmün bozukluklar, transplantasyon, bulaşıcı hastalıklar ve kanser gibi farklı hastalık gruplarında etkileri olması dolayısıyla pleiotropiktir. Çalışmamızda CXCL10'un çeşitli hastalıkların patogenezi üzerindeki potansiyel rolünü değerlendirmek amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntemler:** CXCL10 ekspresyonunun eQTL etkileri ve mikroRNA'ların (miRNA'lar); birlikte düzenlenmiş gen kümeleri açısından düzenlenmesi incelendi. Gen-protein ve yolak etkileşimlerinin incelenmesi için STRING/GeneMANIA/KEGG PATHWAY/GeneCards; CXCL102'yi hedefleyen miRNA'ların tespiti için TargetScan/miRDB; CXCL10'u hedeflemek için Blood eQTL Tarayıcı / BIOS / mQTLdb; CXCL10 ve miRNA bölgesi tek nükleotid polimorfizmleri (SNP)'nin hastalıklarla olan ilişkisinin incelenmesi için GRASP ve GWAS, gen zenginleştirme analizi için ise GSEA/MSigDB veri tabanları kullanıldı.

**Bulgular:** Birlikte eksprese edilen genler için, GSEA/MSigDB veri tabanında yapılan gen seti zenginleştirme analizi sonucunda, immün yanıt ve inflamatuvar yanıtta yer alan genler, interferon ve düzenleyici T hücrelerine yanıtta yer alan genler, ve ayrıca meme ve prostat kanserlerinde yer alan genler ile gen setinin genişletilmesi önerildi (FDR<1E-50). CO-Düzenleme Veritabanı (CORD), CXCL10 çevresinde yer alan beş ek CXCL geni de dahil olmak üzere, yapısal olarak birlikte eksprese edilen 182 gen (5 kat eşikte) tanımlandı. Birlikte eksprese edilen gen seti, herhangi bir miRNA'nın ortak

**Corresponding Author/Sorumlu Yazar:** Hayriye ŞENTÜRK ÇİFTÇİ E-mail: hayriyesenturk@gmail.com

**Submitted/Başvuru:** 25.10.2022 • **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 18.11.2022 • **Last Revision Received/Son Revizyon:** 12.12.2022

• **Accepted/Kabul:** 02.12.2022 • **Published Online/Online Yayın:** 15.02.2023



This work is licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

any miRNA in the co-expressed gene sets. The CXCL10 targeting miRNAs were selected, and the TargetScan program was used to identify other target genes in our study. Thus, 80 miRNAs were identified, and the same GSEA analysis was performed for each miRNA target. The association of SNPs with the diseases was investigated for the gene region of each miRNA in the GWAS databases, and an association was detected with the autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, Crohn's disease, and psoriasis, and with multiple sclerosis, Type 1 diabetes, myasthenia gravis, and allergy/asthma ( $P < 1E-04$ ). For SNPs in CXCL10, no GWAS associations were found; however, SNPs acting as eQTL/meQTL in the blood for CXCL10 had GWAS associations with longevity, aging, inflammatory bowel disease (IBD), and breast cancer ( $P < 1E-04$ ). Although we found no strong evidence for miRNA-mediated CXCL10 expression in our study, strong genetic associations were found associated with inflammatory and immune disorders in the miRNAs neighboring variants.

**Conclusion:** In conclusion, we suggest that there is a stronger role of CXCL10 in inflammation, autoimmunity, and possibly cancer than its role in transplantation.

**Keywords:** Genes, disease relationships, autoimmune diseases, bioinformatics, CXCL10

## INTRODUCTION

Human body has been found to have roughly 50 chemokines (1). Chemokines are the protein molecules with multiple domains, and with the molecular weight of 8-12 kD. The chemokine genes are located at locus 17q11.2-12, while the C-X-C chemokine genes are located at locus 4q13. CXCL10 (C-X-C Motif Chemokine Ligand 10) is a protein-encoding gene, and was first discovered as a chemokine which was induced by interferon (IFN)  $\gamma$ , and produced by various cell types such as monocytes, neutrophils, endothelial cells, keratinocytes, fibroblasts, and mesenchymal cells (2-8). Various studies in the literature reported that chemokines and particularly CXCL10 are produced by various cell and tissue types, and have pleiotropic effects on various processes including immunity, angiogenesis and organ-specific cancer metastasis (9). The CXCL10 C-X-C motif chemokine ligand is a chemokine of the CXCL sub-family and is an antimicrobial gene encoding the ligand corresponding to the CXCR3 receptor. Binding of this protein to CXCR3 provides it with pleiotropic effects, such as stimulation of monocytes, induction of migration of natural killer cells and T cells, and modulation of adhesion molecule expression (2). Among the related pathways, there is a signaling with the peptide ligand binding receptors and G protein-linked receptors, and the CXCL10 is effective through this pathway in various human diseases such as chronic inflammation, infectious diseases, immune dysfunction, tumor growth, metastasis, and invasion (10). In addition, CXCL10 has been identified as an important biomarker that predicts disease severity and can be used as a prognostic indicator in multiple diseases. Understanding the role of CXCL10 in the pathogenesis and progression of diseases could underpin its development as a potential biomarker and therapeutic target for related human malignancies (11). The study of the role of CXCL10 in the pathogenesis of infectious diseases has shown its various roles in the pathogenesis and progression of other diseases (12). The use of CXCL10 as a po-

tehterleri için zenginleşmeye sahip değildi. Çalışmamızda CXCL10'u hedefleyen miRNA'lar seçildi ve diğer hedef genleri belirlemek için de TargetScan programı kullanıldı. Böylece 80 miRNA belirlendi ve her bir miRNA'nın hedefleri aynı GSEA analizine tabi tutuldu. GWAS veri tabanlarındaki her bir miRNA gen bölgesi için SNP'lerin hastalıklar ile ilişkileri incelendi ve bu inceleme sonucunda Romatoid artrit, Ankilozan spondilit, Crohn Hastalığı, Psoriasis gibi otoimmün hastalıklar, Multipl Skleroz, Tip 1 diyabet, Miyastenia gravis ve alerji/astım gibi hastalıklar ile ilişki tespit edildi ( $P < 1E-04$ ). CXCL10 içindeki SNP'ler için ise herhangi bir GWAS ilişkisi bulunmadı, ancak CXCL10 için kanda eQTL/meQTL olarak hareket eden SNP'lerin, uzun ömür, yaşlanma, inflamatuvar barsak hastalığı (IBD) ve meme kanseri ile GWAS ilişkileri tespit edildi ( $P < 1E-04$ ). Çalışmamızda miRNA aracılı CXCL10 ekspresyonu için güçlü kanıtlar elde edilememiş olsa da, miRNA'ların yakınındaki varyantlar, inflamatuvar ve immün bozukluklarla güçlü genetik ilişkiler gösterdi.

**Sonuç:** CXCL10'un inflamasyon, otoimmünite ve muhtemelen kanserde oynadığı rolün transplantasyondan daha güçlü olduğu sonucuna vardık.

**Anahtar Kelimeler:** Genler, hastalık ilişkileri, otoimmün hastalıklar, biyoinformatik, CXCL10

tential therapeutic target in infectious diseases is still a topic under discussion. Specifically, this chemokine controls chemotaxis during the inflammatory response that occurs in allograft rejection after transplantation. Interestingly, there was a strong association between CXCL10 production, immune response, and graft survival after allotransplantation. Increased production of CXCL10 has been observed in patients in various organ transplants. This enhanced production is suggested to be probably due to graft or immune cells and is thought to be associated with an increase in the concentration of circulating CXCL10. The fact that the measurement of the level of CXCL10 in serum and plasma is easy makes it possible to use the detection and quantification of circulating CXCL10 to reveal the immune status of a transplant recipient (13). The production of IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha by Th1 lymphocytes located in tissues stimulates the secretion of CXCL10 from various cells and causes the autoimmune process to continue, generating an amplification feedback loop. There is a need for further studies to reveal the contribution of interactions between chemokines and cytokines to the pathogenesis of autoimmune diseases and to evaluate the potential of the utilisation of CXCL10 as a new therapeutic target in various autoimmune diseases (14). We aimed to examine the role of CXCL10 in the pathogenesis and prognosis of diseases using various databases and tools in the present study.

## MATERIAL And METHODS

For the investigation of gene-protein and pathway interactions, the STRING ([string-db.org/](http://string-db.org/))/Gene MANIA (<https://genemania.org/>)/ KEGG PATHWAY (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) /GeneCards ([www.genecards.org](http://www.genecards.org)) was used; for the detection of miRNAs targeting CXCL10 the TargetScan ([www.targetscan.org](http://www.targetscan.org) )/miRDB ([www.mirdb.org](http://www.mirdb.org)) was used; Blood eQTL Browser was used for targeting CXCL10 (<http://www.genenetwork.nl/bloudeqtlbrowser/>)

BIOS (<http://genenetwork.nl/biosqtlbrowser/>) /mQTLdb (<http://mqtlb.org/>); for the investigation of the association of CXCL10 and miRNA region single nucleotide polymorphisms (SNP) with the diseases, GRASP (<https://grasp.nhlbi.nih.gov/search.aspx>) and GWAS (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/>) were used and GSEA/MSigDB database (<https://www.gsea-msigdb.org/>) was used for gene enrichment analysis.

## RESULTS

The GeneMANIA database detected 77.64% of the physical interactions related to CXCL10 (Figure 1). The co-expression interaction with CXCL9 and CXCR3 chemokines was 8.01%. In addition, the pathway interaction of CXCL10 and CXCL9 with the CXCR3 receptor was 1.88%. With GenMANIA, 26 genes that interact with CXCL10 have been identified, including 8 additional CXCL genes around CXCL10. With the use of 5 fold threshold in the common expression analysis on CO-Regulation database or CORD, 182 harmoniously expressed genes were identified including the additional 5 CXCL genes (CXCL2/3/9/9/11/13) found as CXCL10 (CHR4Q21) in the cytogenetic band.

10 MHC region genes including HLA-DRA, DQA1, DPA1, UBD, AIF1, IER3, C2, CFB, TAP2 and HLA-DRB3 were also found to be strongly co-regulated; however, the counterparts of beta chain encoding were missing. The most important common expression model was detected in the spleen, as well as in other tissues and cells related to immunity such as neutrophils, thymus and B cells. After selecting the miRNAs targeting CXCL10, 80 miRNAs were identified in the TargetScan program, which is used to identify other target genes, and the same GSEA analysis was performed for the targets of each miRNA. Using

the TargetScan (<http://www.targetscan.org>), miRNAs targeting CXCL10 with a context score lower than -0.30 were selected, and other target genes were identified. In total, 80 miRNAs were determined to target CXCL10. When the gene sets consisting of the targets of these miRNAs were analysed using the same GSEA analysis for each miRNA separately, the results did not reach as much statistical significance as the co-expressed gene set had reached. The Targetscan program that was used to select miRNAs targeting CXCL10 and identify other target genes obtained results close to statistical significance, suggesting that miRNAs play an important role in the regulation of CXCL10 expression (Table 1). The gene set enrichment analysis to detect the set of genes co-expressed in the GSEA/MSigDB tool suggested the enrichment of genes involved in breast and prostate cancers, immune and inflammatory response, and response to interferon and regulatory T cells (FDR<10-50). None of the miRNA targets had enrichment by the co-expressed gene set. We examined the eQTLs/meQTLs for CXCL10 together with the relevant miRNA variants in order to understand the regulation of the CXCL10 (eQTL effects and miRNAs; co-regulated gene sets) expression, the disease associations of CXCL10 sequence variants and their pathophysiological roles (Table 2). As a result of the investigation of the disease associations of SNPs from each miRNA gene regions in GWAS databases, the P was found as < 10-4 for the autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, celiac disease, and psoriasis, and for multiple sclerosis, Type 1 diabetes, myasthenia gravis, Gravis disease, and allergies/asthma. The SNPs within CXCL10 showed no GWAS associations; however, SNPs acting as eQTL/meQTL in the blood for CXCL10 showed GWAS associations with longevity, aging, IBD, and breast cancer (P<10-4) (Table 3).

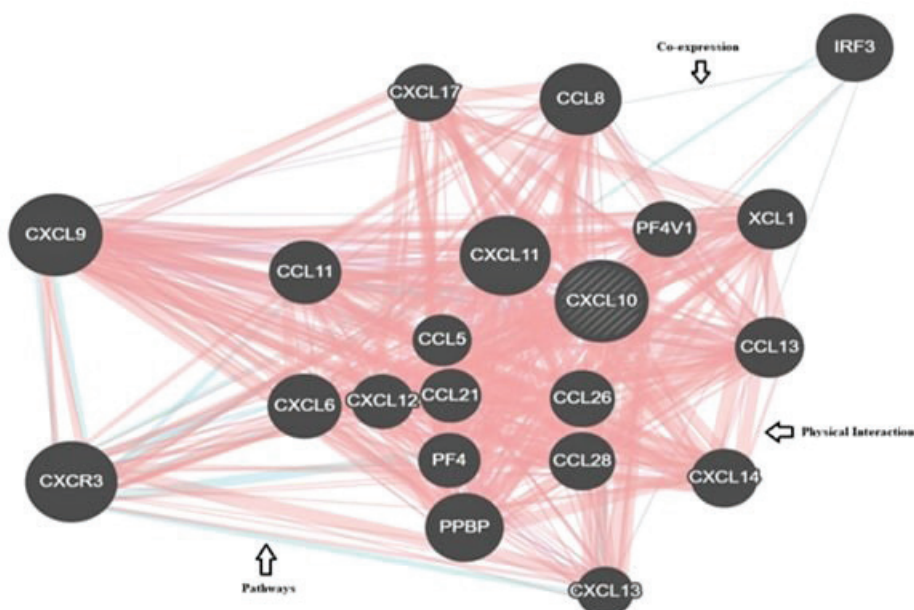


Figure 1: CXCL 10-related physical interactions

**Table 1:** miRNAs targeting CXCL10

miRNA	Gene name (Gene ID)	Chromosome and coordinates	Conserved binding site for CXCL10	Context ++ score for CXCL10
hsa-miR-503-5p	MIR503 (574506)	chrX: 134546328..134546398	Yes	-0.33
hsa-miR-497-5p	MIR497 (574456)	Chromosome 17, NC_000017.11 (7017911..7018022)	Yes	-0.36
hsa-miR-15a-5p	MIR15A (406948)	Chromosome 13, NC_000013.11 (50049119..50049201)	Yes	-0.34
hsa-miR-15b-5p	MIR15B (406949)	Chromosome 3 NC_000003.12 (160404588..160404685)	Yes	-0.34
hsa-miR-6838-5p	MIR6838 (102465504)	Chromosome 7 NC_000007.14 (44073378..44073433)	Yes	-0.33
hsa-miR-424-5p	MIR424 (494336)	chrX: NC_000023.11 (134546614..134546711)	Yes	-0.33
hsa-miR-6828-5p	MIR6828 (102465497)	Chromosome 3 NC_000003.12 (170423103..170423162)	No	-0.47
hsa-miR-6079	MIR6079 (102464830)	Chromosome 1 NC_000001.11 (43838622..43838683)	No	-0.49
hsa-miR-8085	MIR8085 (102465879)	Chromosome 19 NC_000019.10 (44758657..44758721)	No	-0.48
hsa-miR-6731-5p	MIR6731 (102465437)	Chromosome 1 NC_000001.11 (24919345..24919416)	No	-0.45
hsa-miR-9500	MIR9500 (103504730)	Chromosome 2 NC_000002.12 (218823090..218823154)	No	-0.46
hsa-miR-135b-3p	MIR135B (442891)	Chromosome 1, NC_000001.11 (205448302..205448398,	No	-0.37
hsa-miR-135b-5p	MIR135B (442891)	Chromosome 1, NC_000001.11 (205448302..205448398,	No	-0.52
hsa-miR-135a-5p	MIR135A1 (406925)	Chromosome 3, NC_000003.12 (52294219..52294308,	No	-0.52
hsa-miR-3591-5p	MIR3591 (100616357)	Chromosome 18, NC_000018.10 (58451080..58451152)	No	-0.49
hsa-miR-5587-5p	MIR5587 (100847028)	Chromosome 16, NC_000016.10 (535316..535368)	No	-0.55
hsa-miR-646	MIR646 (693231)	Chromosome 20, NC_000020.11 (60308474..60308567)	No	-0.54
hsa-miR-4524b-5p	MIR4524B (100847008)	Chromosome 17, NC_000017.11 (69099542..69099656)	No	-0.35
hsa-miR-4524a-5p	MIR4524A (100616316)	Chromosome 17, NC_000017.11 (69099564..69099632)	No	-0.35
hsa-miR-155-3p	MIR155 (406947)	Chromosome 21, NC_000021.9 (25573980..25574044)	No	-0.41
hsa-miR-4451	MIR4451 (100616349)	Chromosome 4, NC_000004.12 (85722468..85722533)	No	-0.37
hsa-miR-3132	MIR3132 (100423039)	Chromosome 2, NC_000002.12 (219549073..219549147)	No	-0.35
hsa-miR-197-5p	MIR197 (406974)	Chromosome 1, NC_000001.11 (109598893..109598967)	No	-0.32
hsa-miR-6755-5p	MIR6755 (102465452)	Chromosome 11, NC_000011.10 (86278333..86278398)	No	-0.37
hsa-miR-5006-5p	MIR5006 (100847026)	Chromosome 13, NC_000013.11 (41568286..41568395)	No	-0.36



hsa-miR-371a-3p	MIR371A (442916)	Chromosome 19, NC_000019.10 (53787675..53787741)	No	-0.35
hsa-miR-519e-3p	MIR519E (574463)	Chromosome 19, NC_000019.10 (53679940..53680023)	No	-0.34
hsa-miR-33b-3p	MIR33B (693120)	Chromosome 17, NC_000017.11 (17813836..17813931)	No	-0.3
hsa-miR-371b-3p	MIR371B (100616185)	Chromosome 19, NC_000019.10 (53787677..53787742)	No	-0.3
hsa-miR-4732-5p	MIR4732 (100616385)	Chromosome 17, NC_000017.11 (28861655..28861730)	No	-0.38
hsa-miR-936	MIR936 (100126326)	Chromosome 10, NC_000010.11 (104048089..104048186)	No	-0.4
hsa-miR-589-3p	MIR589 (693174)	Chromosome 7, NC_000007.14 (5495819..5495917)	No	-0.32
hsa-miR-6510-5p	MIR6510 (102466658)	Chromosome 17, NC_000017.11 (41517164..41517217)	No	-0.37
hsa-miR-6834-5p	MIR6834 (102465501)	Chromosome 6, NC_000006.12 (33290245..33290325)	No	-0.32
hsa-miR-4710	MIR4710 (100616300)	Chromosome 14, NC_000014.9 (104677694..104677749)	No	-0.3
hsa-miR-6739-5p	MIR6739 (102466724)	Chromosome 1, NC_000001.11 (201863373..201863447)	No	-0.4
hsa-miR-6733-5p	MIR6733 (102465439)	Chromosome 1, NC_000001.11 (43171652..43171712)	No	-0.37
hsa-miR-3153	MIR3153 (100422936)	Chromosome 9, NC_000009.12 (89312225..89312306)	No	-0.36
hsa-miR-6771-3p	MIR6771 (102465462)	Chromosome 16, NC_000016.10 (50292616..50292675)	No	-0.5
hsa-miR-4251	MIR4251 (100422968)	Chromosome 1, NC_000001.11 (3127975..3128035)	No	-0.44
hsa-miR-5689	MIR5689 (100846998)	Chromosome 6, NC_000006.12 (10439717..10439794)	No	-0.35
hsa-miR-1276	MIR1276 (100302121)	Chromosome 15, NC_000015.10 (85770496..85770578)	No	-0.43
hsa-miR-548ax	MIR548AX (100847063)	Chromosome X, NC_000023.11 (11318614..11318686)	No	-0.37
hsa-miR-548ao-5p	MIR548AO (100847068)	Chromosome 8, NC_000008.11 (41271048..41271143)	No	-0.37
hsa-miR-449a	MIR449A (554213)	Chromosome 5, NC_000005.10 (55170532..55170622)	No	-0.46
hsa-miR-449b-5p	MIR449B (693123)	Chromosome 5, NC_000005.10 (55170646..55170742)	No	-0.48
hsa-miR-34a-5p	MIR34A (407040)	Chromosome 1, NC_000001.11 (9151668..9151777,)	No	-0.46
hsa-miR-34c-5p	MIR34C (407042)	Chromosome 11, NC_000011.10 (111513439..111513515)	No	-0.47
hsa-miR-7106-5p	MIR7106 (102466222)	Chromosome 12, NC_000012.12 (113159113..113159177)	No	-0.4
hsa-miR-3689b-3p	MIR3689B (100500906)	Chromosome 9, NC_000009.12 (134850125..134850272)	No	-0.42
hsa-miR-3689c	MIR3689C (100616333)	Chromosome 9, NC_000009.12 (134849298..134849369)	No	-0.42

hsa-miR-6779-5p	MIR6779 (102465467)	Chromosome 17,NC_000017.11 (38914979..38915042)	No	-0.43
hsa-miR-6780a-5p	MIR6780A (102466195)	Chromosome 17,NC_000017.11 (42708084..42708151)	No	-0.42
hsa-miR-30b-3p	MIR30B (407030)	Chromosome 8, NC_000008.11 (134800520..134800607)	No	-0.43
hsa-miR-3689a-3p	MIR3689A(100500846)	Chromosome 9,NC_000009.12 (134849487..134849564)	No	-0.42
hsa-miR-1273h-5p	MIR1273H(102466247)	Chromosome 16,NC_000016.10 (24203116..24203231)	No	-0.44
hsa-miR-6773-5p	MIR6773(102466194)	Chromosome 16,NC_000016.10 (68233426..68233499,)	No	-0.6
hsa-miR-6724-5p	MIR6724(102465433)	Chromosome 21,NC_000021.9 (8205315..8205406)	No	-0.64
hsa-miR-297	MIR297(100126354)	Chromosome 4,NC_000004.12 (110860582..110860647)	No	-0.44
hsa-miR-3942-3p	MIR3942(100500904)	Chromosome 15,NC_000015.10 (35372256..35372364)	No	-0.41
hsa-miR-4789-3p	MIR4789(100616395)	Chromosome 3,NC_000003.12 (175369540..175369621)	No	-0.37
hsa-miR-466	MIR466(100423038)	Chromosome 3, NC_000003.12 (31161704..31161787)	No	-0.42
hsa-let-7g-3p	MIRLET7G(406780)	Chromosome 3, NC_000003.12 (52268278..52268361)	No	-0.49
hsa-let-7a-2-3p	MIRLET7A1(406881)	Chromosome 9, NC_000009.12 (94175957..94176036)	No	-0.49
hsa-miR-6505-3p	MIR6505(102466657)	Chromosome 12, NC_000012.12 (48132797..48132867)	No	-0.31
hsa-miR-8087	MIR8087(102465881)	Chromosome 11,NC_000011.10 (27514970..27515047,)	No	-0.35
hsa-miR-570-3p	MIR570(693155)	Chromosome 3, NC_000003.12 (195699401..195699497)	No	-0.33
hsa-miR-4666a-5p	MIR4666A(100616308)	Chromosome 1,NC_000001.11 (228462074..228462152)	No	-0.51
hsa-miR-7152-5p	MIR7152(102465689)	Chromosome 10,NC_000010.11 (71790747..71790800)	No	-0.58
hsa-miR-4742-3p	MIR4742(100616468)	Chromosome 1,NC_000001.11 (224398227..224398311)	No	-0.54
hsa-miR-411-3p	MIR411(639121)	Chromosome 14, NC_000014.9 (101023325..101023420)	No	-0.42
hsa-miR-379-3p	MIR379(494328)	Chromosome 14, NC_000014.9 (101022066..101022132)	No	-0.42
hsa-miR-1911-5p	MIR1911(100302222)	Chromosome X,NC_000023.11 (114763184..114763263)	No	-0.46
hsa-miR-5192	MIR5192(100847087)	Chromosome 2, NC_000002.12 (62205826..62205917)	No	-0.3
hsa-miR-665	MIR665(100126315)	Chromosome 14, NC_000014.9 (100875033..100875104)	No	-0.61
hsa-miR-6830-3p	MIR6830(102465498)	Chromosome 5, NC_000005.10 (132217849..132217918,)	No	-0.38

CXCL10: C-X-C motif chemokine ligand 10

**Table 2:** CXCL10 eQTLs exon and meQTLs

p value	SNP	SNP Chromosome	SNP Chromosome Position	Exon Chromosome	SNP Allele	Assesed Allele	FDR
5,60E	rs78347618	4	chr_4_76942273_76943101	4	76942687 G/A	A	0.00
1,76E	rs6532172	4	chr_4_76943844_76943970	4	76943907 G/A	A	0.00
6,14	rs71629031	4	chr_4_76943519_76943608	4	76943563 C/T	T	0.00
7,21	Rs6532172	4	chr_4_76944524_76944650	4	76944587 G/A	A	0.00

Perform a quick search for mQTL's across ARIES

Timepoint	SNP	SNP Chr	SNP Pos	A1	A2	CpG	CpG Chr	CpG Pos	beta	Effect Size	p-value	Trans
Adolescence	rs78347618	4	76949076	G	A	cg00809888	4	76862425	-0.40453	0.00335	7.33e-19	N
Birth	rs78347618	4	76949076	G	A	cg04038163	4	76925155	-0.32746	0.02455	7.31e-15	N
Birth	rs78347618	4	76949076	G	A	cg00809888	4	76862425	-0.36992	0.00314	2.37e-16	N
Childhood	rs78347618	4	76949076	G	A	cg00809888	4	76862425	-0.40100	0.00291	8.56e-21	N
Childhood	rs78347618	4	76949076	G	A	cg22252999	4	76996414	-0.23837	0.03478	3.98e-10	N
Childhood	rs78347618	4	76949076	G	A	cg14724265	4	76823661	0.20684	0.01968	2.75e-08	N
Childhood	rs78347618	4	76949076	G	A	cg04038163	4	76925155	-0.36875	0.03244	1.09e-20	N
Middle Age	rs78347618	4	76949076	G	A	cg00809888	4	76862425	-0.42298	0.00384	3.59e-22	N
Middle Age	rs78347618	4	76949076	G	A	cg26767154	4	77069770	-0.21420	0.00210	8.01e-10	N
Middle Age	rs78347618	4	76949076	G	A	cg22252999	4	76996414	-0.21198	0.03325	8.88e-10	N
Pregnancy	rs78347618	4	76949076	G	A	cg22252999	4	76996414	-0.29214	0.02448	1.48e-11	N
Pregnancy	rs78347618	4	76949076	G	A	cg00809888	4	76862425	-0.32682	0.00212	2.14e-13	N

CXCL10: C-X-C motif chemokine ligand 10, eQTLs: Expression quantitative trait loci, meQTLs: Methylation quantitative trait loci, SNP: Single nucleotide polymorphism

**Table 3:** GWAS associations of eQTLs and meQTLs for CXCL10

eQTL	Associated trait	P value	Effect size	PMID	Source
<b>SDAD1 rs2273</b>	<b>Longevity</b>	<b>1E-06</b>	<b>NA</b>	<b>20834067</b>	<b>PheGenI</b>
<b>ART3 rs12504339</b>	<b>Serum albumin levels</b>	<b>1.3E-05</b>	<b>NA</b>	<b>dbGaP</b>	<b>PheGenI</b>
<b>CXCL9 rs2276886</b>	<b>Heart rate</b>	<b>1.5E-05</b>	<b>NA</b>	<b>17903306</b>	<b>PheGenI</b>
<b>CXCL9 rs2276886</b>	<b>Inflammatory bowel disease</b>	<b>9.2E-05</b>	<b>beta=-0.0766</b>	<b>26192919</b>	<b>PhenoScanner</b>
<b>ART3 rs13139234</b>	<b>Serum creatinine level</b>	<b>1.1E-05</b>	<b>NA</b>	<b>20383146</b>	<b>GRASP</b>
<b>ART3 rs13111494</b>	<b>Aging</b>	<b>1.3E-05</b>	<b>NA</b>	<b>22445811</b>	<b>GRASP</b>
<b>ART3 rs13111494</b>	<b>Autism</b>	<b>5E-05</b>	<b>NA</b>	<b>20663923</b>	<b>GRASP</b>
<b>SCARB2 rs6532244</b>	<b>Breast cancer</b>	<b>2.1E-04</b>	<b>NA</b>	<b>17529973</b>	<b>PhenoScanner</b>
<b>SCARB2 rs894251</b>	<b>Body mass index (BMI)</b>	<b>1.7E-04</b>	<b>NA</b>	<b>21935397</b>	<b>GRASP</b>

GWAS: Genome-wide association studies, eQTLs: Expression quantitative trait loci, meQTLs: Methylation quantitative trait loci, CXCL10: C-X-C motif chemokine ligand 10, SDAD1: SDA1 Domain Containing 1, ART3: ADP-Ribosyltransferase 3, CXCL9: C-X-C Motif Chemokine Ligand 9, SCARB2: Scavenger Receptor Class B Member 2

## DISCUSSION

CXC chemokine family also involves the CXCL10, which binds to the CXCR3 receptor, acting in biological events such as chemotaxis, apoptosis, cell growth and angiostasis (15). Proinflammatory cytokines have roles in various different processes, including chemotaxis, differentiation and activation of peripheral immune cells, regulation of cell growth, apoptosis and modulation

of angiostatic effects (16). Therefore, they have important roles during viral infections, varying from activating immune cells and stimulating their migration to infected areas. Mechanically, the G protein-mediated signaling is activated with the binding of CXCL10 to the CXCR3 receptor, and the intracellular calcium production and actin reorganization are increased by the downstream activation of the phospholipase C-dependent pathway (17). CXCL10 is associated with the diseases such as periapical

periodontitis and viral encephalitis, and interactions between immune cells and microRNAs in the tumor microenvironment and CCR5 pathway in macrophages. The gene ontology (GO) descriptions associated with this gene involve the signaling receptor binding and chemokine activity. CXCL9 is an important paralog of this gene (2). miRNAs suppress the target genes by binding to the binding sites in their 3' untranslated regions after transcription, and thus they ensure the regulation of gene expression. Co-expression analysis was performed to identify the genes that showed similar expression patterns with CXCL10. This similarity suggests co-regulation, either at the transcriptional level (through the same transcription factors) or at the post-transcriptional level (through the same microRNAs). The determination of the hsa-miR-15a-5p binding site as a protected area with the TargetScan program reflects the strong biological relationship of this area. The increase in miR-15a expression may decrease the CXCL10 expression and thus can suppress the activation of abnormal T cells in the immune response, while decreasing the expression of miR-15a can abnormally activate the immune response (18). Particularly the spleen, and the neutrophils, thymus, and B cells as the other immune-associated tissues and cells were found to have the most highly significant pattern of co-expression. The GSEA/MSigDB tool (<http://software.broadinstitute.org/gsea>) was used for the gene set enrichment analysis (19). Statistically significant results (FDR q value <math>\leq 1E-50</math>) were obtained for breast and prostate cancers, immune and inflammatory response, interferon response and regulatory T cells with this program. In our study, GSEA analysis with 269 genes from co-expression analysis using a 2-fold expression change as a threshold yielded similar results for tumor necrosis factor and inflammatory response, as well as interferon gamma and alpha response. Since the co-expression analysis gives statistically highly significant and biologically reasonable results using the TargetScan program (<http://www.targetscan.org>) it was examined whether the common expression patterns are caused by microRNA (miRNA) mediated regulation (20). For this analysis, miRNAs targeting CXCL10 with a context score lower than -0.30 were selected, and other target genes were identified. In total, 80 miRNAs were determined to target CXCL10. The results did not reach as much statistical significance as in the co-expressed gene set after the same GSEA analysis was performed for each miRNA separately in the gene sets of the miRNA targets. This observation suggested that miRNA-mediated gene expression regulation does not play an important role in the regulation of CXCL10 expression. The investigation of the disease relationships of SNPs within each miRNA gene in GWAS databases showed no genome-wide relationship on the threshold of statistical significance. It has been established that SNPs acting as expression quantitative trait loci (eQTL) or methylation quantitative trait loci (meQTL) correlated with the expression levels of CXCL10 and could be the markers for disease susceptibility mediated by CXCL10 expression variation. CXCL10 eQTLs were obtained from Blood QTL and MeQTLs, and all QTLs were found to be cis, and trans-eQTL or trans-meQTL were not detected. Most CXCL10 eQTLs were also eQTLs for NAAA (N-acyl ethanolamine acid amidase) downstream from CXCL10. The eQTLs were obtained from Blood QTL Browser and

the MeQTLs were obtained from mQTLdb. All QTLs were cis and there was no trans-eQTL or meQTL. All eQTLs and meQTLs were examined for GWAS associations in GWAS catalogue, dbGAP and GRASP databases. The most statistically significant association was with longevity (rs2273), and another SNP (rs13111494) showed an association with aging in a different study.

## CONCLUSION

Although we found no strong evidence for miRNA-mediated CXCL10 expression in our study, variants close to miRNAs showed stronger genetic associations with inflammatory and immune disorders. This finding suggests that CXCL10 plays a stronger role in autoimmunity, inflammation and possibly in cancer than its role in transplantation.

**Peer Review:** Externally peer-reviewed.

**Author Contributions:** Conception/Design of Study- H.Ş.Ç., S.R.Ö.; Data Acquisition- D.K.İ., E.E.G.; Data Analysis/Interpretation- H.Ş.Ç., S.R.Ö., M.S.K.; Drafting Manuscript- H.Ş.Ç., S.R.Ö., D.K.İ., E.E.G.; Critical Revision of Manuscript- M.S.K.; Final Approval and Accountability- H.Ş.Ç., S.R.Ö., M.S.K., E.E.G., D.K.İ.; Material and Technical Support- H.Ş.Ç., S.R.Ö.; Supervision- M.S.K, Hayriye ŞENTÜRK ÇİFTÇİ and Süleyman Rüştü OĞUZ, contributed equally to this work.

**Conflict of Interest:** Authors declared no conflict of interest.

**Financial Disclosure:** The authors declared that this study has received no financial support.

## REFERENCES

1. Gerber PA, Hippe A, Bühren BA, Müller A, Homey B. Chemokines in tumor-associated angiogenesis. *Biol Chem* 2009;390(12):1213-23.
2. Roccaro AM, Sacco A, Purschke WG, Moschetta M, Buchner K, Maasch C, et al. SDF-1 inhibition targets the bone marrow niche for cancer therapy. *Cell Rep* 2014;9(1):118-28.
3. Ciesielski CJ, Andreakos E, Foxwell BM, Feldmann M. TNF $\alpha$ -induced macrophage chemokine secretion is more dependent on NF- $\kappa$ B expression than lipopolysaccharides-induced macrophage chemokine secretion. *Eur J Immunol* 2002;32(7):2037-45.
4. Ohmori Y, Hamilton TA. The interferon-stimulated response element and a  $\kappa$ B site mediate synergistic induction of murine IP-10 gene transcription by IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . *J Immunol* 1995;154(10):5235-44.
5. Shields PL, Morland CM, Salmon M, Qin S, Hubscher SG, Adams DH. Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver. *J Immunol* 1999;163(11):6236-43.
6. Dillman JF 3rd, McGary KL, Schlager JJ. An inhibitor of p38 MAP kinase downregulates cytokine release induced by sulfur mustard exposure in human epidermal keratinocytes. *Toxicol In Vitro* 2004;18(5):593-9.
7. Ohmori Y, Hamilton TA. Cell type and stimulus specific regulation of chemokine gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;198(2):590-6.

8. Treacy O, Ryan AE, Heinzl T, O'Flynn L, Cregg M, Wilk M et al. Adenoviral transduction of mesenchymal stem cells: in vitro responses and in vivo immune responses after cell transplantation. *PLoS One* 2012;7(8):e42662. doi: 10.1371/journal.pone.0042662.
9. Ahmadi Z, Arababadi MK, Hassanshahi G. CXCL10 activities, biological structure, and source along with its significant role played in pathophysiology of type I diabetes mellitus. *Inflammation* 2013;36(2):364-71.
10. Thelen M. Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol* 2001;2(2):129-34.
11. Liu M, Guo S, Stiles JK. The emerging role of CXCL10 in cancer (Review). *Oncol Lett* 2011;2(4):583-9.
12. Liu M, Guo S, Hibbert JM, Jain V, Singh N, Wilson NO et al. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. *Cytokine Growth Factor Rev* 2011;22(3):121-30.
13. Romagnani P, Crescioli C. CXCL10: candidate biomarker in transplantation. *Clin Chim Acta* 2012;413(17-18):1364-73.
14. Antonelli A, Ferrari SM, Giuggioli D, Ferrannini E, Ferri C, Fallahi P. Chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)10 in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 2014;13(3):272-80.
15. Moser M, Willmann K. Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. *Ann Rheum Dis* 2004;63(Suppl 2):84-9.
16. Angiolillo AL, Sgadari C, Taub DD, Liao F, Farber JM, Maheshwari S, et al. Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med* 1995;182(1):155-62.
17. Smit MJ, Verdijk P, van der Raaij-Helmer EM, Navis M, Hensbergen PJ, Leurs R, et al. CXCR3-mediated chemotaxis of human T cells is regulated by a Gi- and phospholipase C-dependent pathway and not via activation of MEK/p44/p42 MAPK nor Akt/PI-3 kinase. *Blood* 2003;102(6):1959-65.
18. Liu XF, Wang RQ, Hu B, Luo MC, Zeng QM, Zhou H, et al. MiR-15a contributes abnormal immune response in myasthenia gravis by targeting CXCL10. *Clin Immunol* 2016;164:106-13.
19. Liberzon A, Subramanian A, Pinchback R, Thorvaldsdottir H, Tamayo P, Mesirov JP. Molecular Signatures database (MSigDB) 3.0. *Bioinformatics* 2011;27(12):1739-40.
20. Agarwal V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Computational and Systems Biology Genetics and Genomics* 2015;4:e05005. doi: 10.7554/eLife.05005.



# STREPTOCOCCUS MILLERI GRUP (SMG) BAKTERİLERİNİN BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TANIMLANMASI

## IDENTIFICATION OF *STREPTOCOCCUS MILLERI* GROUP (SMG) BACTERIA BY BIOCHEMICAL AND MOLECULAR METHODS

Gülşen GÜNEL<sup>1,2</sup> , Bülent GÜRLER<sup>3</sup> 

<sup>1</sup>İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup>İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

<sup>3</sup>İstanbul Sağlık ve Teknoloji Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ORCID ID: G.G. 0000-0003-1574-0231; B.G. 0000-0002-6433-5198

**Atf/Citation:** Gunel G, Gurler B. Streptococcus milleri grup (SMG) bakterilerinin biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle tanımlanması. Journal of Advanced Research in Health Sciences 2023;6(1):73-79. <https://doi.org/10.26650/JARHS2023-1164336>

### ÖZ

**Amaç:** *Streptococcus milleri* grubu (SMG) bakterilerin, moleküler, biyokimyasal ve yarı otomatize tekniklerle tür ayırımının yapılması ve tedavide sık kullanılan antibiyotiklere karşı duyarlılık sonuçlarının araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışma, SMG bakteriler ile ilgili bazı önemli noktalara dikkat çekmek ve epidemiyolojik olarak önemini tespit etmek için planlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmamıza 100 streptokok cinsi bakteri dahil edilmiştir. Tür tanımlaması için biyokimyasal testler ve API 20 STREP yarı otomatik identifikasyon kiti kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile hedef gen bölgeleri (HLY-MIX-U, HLY-INT-D, HLY-CC-D, 16S-ANG-U, 16S-ANG-D, ILY-4DFw, ILY-wholeC Bw) çoğaltılarak tür tanımlamaları doğrulanmıştır.

**Bulgular:** Tüm örneklerin Voges-Proskauer (VP) deneyi pozitif, hipurat hidrolizi ve pirolidonil arylamidaz (PYR) negatif olarak saptanmıştır. Tüm suşlar Lancefield grup antijeni açısından değerlendirilmiş olup, %42 G, %26 F, %5 ise C grup antijenine sahip olduğu bulunmuştur. Suşların %27'sinin ise Lancefield grup antijenleri ile antijen tipi saptanamamıştır. 100 suşun tamamı vankomisin, seftriakson, sefepim, sefotaksim, levofloksasin, linezolid antibiyotiklerine duyarlı olarak bulunmuştur. Suşlarda, %16 eritromisin, %6 klindamisin, %5 tetrasiklin, %1 kloramfenikol direnci saptanmıştır. Ampisilin ve penisilin direnci E-test yöntemi ile saptanmış ve %1 ampisilin/penisiline dirençli *Streptococcus anginosus* suşu, %2 ampisiline orta duyarlı *S. anginosus* suşu saptanmıştır. API 20 STREP sonuçlarına göre bakterilerin %41 cins bazında tanımlanmış, %45'i *S. anginosus*, %5'i *Streptococcus constellatus*, %1'i *Streptococcus intermedius* olarak sonuçlandırılmıştır. Multiplex polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) sonuçları ise %56 *S. anginosus*, %24 *S.constellatus*, %8'i *S. intermedius* olarak saptanmıştır. Suşların %12'sinde herhangi bir bant saptanamamıştır.

**Sonuç:** *Streptococcus milleri* grubun biyokimyasal identifikasyon şemasının henüz tam olarak tanımlanmadığı saptanmıştır. Antibiyotik duyarlılık sonuçlarımıza göre SMG'de direnç gelişimi ciddi boyutta değildir. Grubu tanımlamada ticari kitlerin yetersiz olabileceği ve yapılacak çalışmaların mutlaka moleküler bir yöntemle desteklenmesi gerekmektedir. *Streptococcus milleri* grubun biyokimyasal identifikasyon şemasının henüz tam olarak tanımlanmadığı saptanmıştır. Antibiyotik duyarlılık sonuçlarımıza göre SMG'de direnç gelişimi ciddi boyutta değildir. Grubu tanımlamada ticari kitlerin yetersiz olabileceği ve yapılacak çalışmaların mutlaka moleküler bir yöntemle desteklenmesi gerekmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Streptococcus milleri* grup, PZR, lancefield grup antijeni, API, voges-proskauer

### ABSTRACT

**Objective:** The aim of this study was to differentiate the strains of *Streptococcus milleri* group (SMG) bacteria using molecular, biochemical and semi-automated techniques and to investigate the results of susceptibility to commonly used antibiotics in treatment. It was anticipated that the study would draw attention to some important points about SMG bacteria and to determine their epidemiological importance.

**Materials and method:** A total of 100 streptococcal bacteria were included in our study. Biochemical tests and the API 20 STREP semi-automatic identification kit were used for species identification. Species identifications were confirmed by amplification of the target gene regions (HLY-MIX-U, HLY-INT-D, HLY-CC-D, 16S-ANG-U, 16S-ANG-D, ILY-4DFw, ILY-wholeC Bw) by polymerase chain reaction (PCR).

**Results:** Voges-Proskauer tests of all strains were positive, whereas hippurate hydrolysis and pyrrolidinyl arylamidase (PYR) tests were negative. All strains were evaluated in terms of Lancefield group antigen, and it was found that 42% were G, 26% were F, and 5% were C group antigen. It was not possible to determine antigen type with Lancefield group antigens in 27% of the strains. All of the isolates were found to be susceptible to vancomycin, ceftriaxone, cefepime, cefotaxime, levofloxacin, and linezolid. Erythromycin, clindamycin, tetracycline, and chloramphenicol resistance was found in 16%, 6%, 5%, and %1 of the isolates, respectively. Ampicillin and penicillin resistance were determined by the E-test method. One *Streptococcus anginosus* strain was resistant to ampicillin and penicillin, and two *S. anginosus* isolates were found to be intermediately susceptible to ampicillin. According to API 20 STREP results, 41% of the isolates were identified as genus level, 45% were *S. anginosus*, 5% were *Streptococcus constellatus*, and 1% were *Streptococcus intermedius*. Multiplex polymerase chain reaction (PCR) results were found to be 56% *S. anginosus*, 24% *S. constellatus*, and 8% *S. intermedius*. No band was detected in 12% of the strains. It has been determined that the biochemical identification scheme of the *Streptococcus milleri* group has not yet been fully defined. According to the antibiotic susceptibility results, the development of resistance in SMG is not critical. Commercial kits are unsatisfactory in identifying this group, and the studies should be supported with molecular methods.

**Keywords:** Lancefield group antigen, *Streptococcus milleri* group, voges-proskauer, PCR, API

**Sorumlu Yazar/Corresponding Author:** Gülşen GÜNEL E-mail: [gulsen\\_gunel@hotmail.com](mailto:gulsen_gunel@hotmail.com)

**Başvuru/Submitted:** 19.09.2022 • **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 26.09.2022 • **Son Revizyon/Last Revision Received:** 17.01.2023 •

**Kabul/Accepted:** 18.01.2023 • **Online Yayın/Published Online:** 09.02.2023



This work is licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

## GİRİŞ

Streptokoklar doğada oldukça yaygın bulunan, vücudun çeşitli bölgelerinde normal florada yer alan; Gram pozitif, zincir ya da diplokok biçiminde, sporsuz ve hareketsiz koklardır (1,2). Streptokoklar, kanlı agarda hemoliz yapma özelliklerine, biyokimyasal özelliklerine ve antijenik yapılarına göre sınıflandırılmaktadırlar (1,3).

Streptokoklar oksijen gereksinimlerine göre aerobik, fakültatif anaerobik ve zorunlu anaerobik olarak iki guruba ayrılırlar. Kanlı agar'da (%5 koyun kanı) hemoliz yapma özelliklerine göre (Brown sınıflandırması) ise alfa hemolitik, beta hemolitik ve hemoliz özelliği göstermeyen olarak üç grupta incelenirler (4-5). Fizyolojik özelliklerine göre ise (Sherman sınıflandırması) pyojenik streptokoklar, laktokoklar, enterokoklar ve viridans streptokoklar olarak dört grupta incelenirler (6). Hücre duvarı polisakkarit yapısına (Lancefield sınıflandırması) göre A, B, C, D grubu ve diğer gruplar (G-V) olmak üzere ayrılırlar (7, 8). Biyokimyasal sınıflandırmada ise şekerleri fermente etmeleri, bazı enzimleri üretmeleri, antibiyotik duyarlılıkları, farklı besiyelerinde oluşturdukları koloni morfolojileri ve hemoliz özelliklerine göre beş grupta kategorize edilmişlerdir. 16S rRNA dizi analizine göre ise piyojenik grup, anginosus grup, mitis grup, salivarius grup, bovis grup ve mutas grup olarak sınıflandırılmışlardır (9).

Son zamanlarda, *Streptococcus* cinsinin üyelerinin, çoklu genom düzeyinde filogenetik ağaçlar ve bu grupların üyeleri tarafından benzersiz bir şekilde paylaşılan çok sayıda oldukça spesifik moleküler belirteçler tarafından desteklenen tanımlanmış 14 tür grubuna yerleştirilmesi önerilmiştir (10).

Streptokoklarda koloni çapı, 0,5 mm'dan daha büyük olanlar; piyojen, 0,5 mm'dan daha küçük olanlar ise; Avrupa'da *Streptococcus milleri* grup (SMG) olarak, Amerika'da ise *Streptococcus anginosus* grup olarak adlandırılmaktadır (1, 2, 11, 12). Grup *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus* olarak üç türe; *S. constellatus* da *S. constellatus* subsp. *constellatus*, *S. constellatus* subsp. *pharyngis* olmak üzere iki alt türe ayrılmaktadır (2, 13). SMG bakterilerinin DNA yapıları daha çok non-hemolitik streptokoklara benzemektedir. Orofaringeal, ürogenital, gastrointestinal sistemde komensal olarak bulunmaktadırlar (1, 2, 11, 13). Biyokimyasal özelliklerinden, Voges-Proskauer (VP) pozitif, eskülin hidrolizi pozitif, pirolidonil arilamidaz (PYR) negatif, üreaz negatif ve hipurat hidrolizi negatif, diğer streptokok türlerinden ayırımı yapılabilir (3, 14).

SMG'de VP testinin pozitif olup, diğer beta hemolitik streptokoklarda negatif olması, tür ayırımı sağlayan en önemli özelliktir (13, 14). Tanı amaçlı hazırlanmış çeşitli ticari kitler de bulunmaktadır, fakat sonuçların birbirleri ile farklılık göstermesi nedeni ile sık tercih edilmemektedir (3). SMG bakteriler, beyin absesi, kan, idrar ve cerahat gibi birçok örnekten izole edilebilmektedir. Normal vücut florasında bulunan ve boğaz sürüntülerinden izole edilen beta hemoliz yapmış suşların patojen olup olmadığı hala tartışılmaktadır (11, 13, 15). SMG bakteriler, genel olarak beta-laktam antibiyotiklere duyarlı ve aminoglikozid an-

tibiyotiklere dirençlidir. Steril vücut bölgelerinden izole edilen *S. anginosus* suşlarında mutlaka antibiyotiklerin minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerinin saptanması gerekmektedir. SMG bakterilerinde makrolid, linkozamid ve streptogramin B (MLS) direnci görülebilmekle; vankomisin, linezolid ve daptomisine direnç henüz bildirilmemiştir (3, 11-13).

Çeşitli hasta gruplarında etken olarak kabul edilen ve direnç geliştirebilen SMG üyeleri ile ilgili ülkemizde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen streptokoklarda konvansiyonel, yarı otomatize ve moleküler yöntemlerle SMG bakterilerin oranı araştırılmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

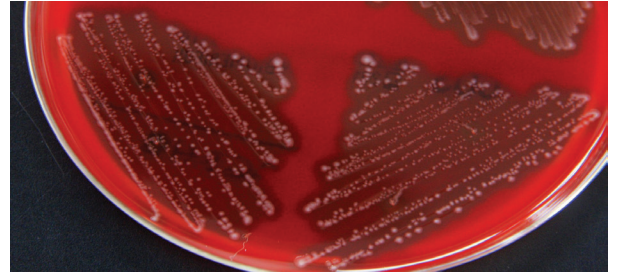
### Hasta Grubu

Çalışmamızda İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji bölümüne gönderilen boğaz sürüntüsü ve çeşitli klinik örneklerden (abse, kan kültürü, doku parçası ve cerahat) izole edilen toplam 100 streptokok cinsi bakteri çalışmaya dahil edilmiştir.

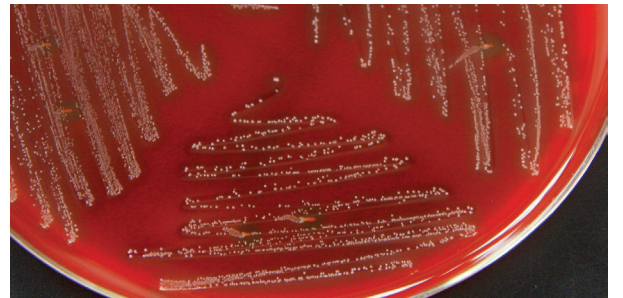
### Koloni Morfolojisi ve Hemoliz Türünün Değerlendirilmesi

Klinik örneklerin %5 koyun kanlı agarda 18-24 saatlik inkübasyonu sonrası oluşturdukları koloni morfolojisine göre, 0,5 mm'den küçük olan streptokoklar (pinpoint, toplu iğne başı koloni morfolojisi) çalışmaya dahil edilmiştir.

Streptokoklar, %5 koyun kanlı agardaki hemolitik aktivitelerine göre alfa, beta, ve hemoliz oluşturmayan (non-hemolitik) olarak sınıflandırılmıştır. Şekil 1'de A grubu beta hemolitik streptokokların, Şekil 2'de SMG'nin koloni morfolojisi gösterilmiştir.



Şekil 1: A grubu beta hemolitik streptokok morfolojisi



Şekil 2: SMG koloni morfolojisi

### Biyokimyasal Testler

Biyokimyasal özelliklerin saptanması için katalaz, Voges Proskauer, Lateks Aglutinasyon Testi, PYR, şeker fermentasyon, arjinin hidrolizi, hipurat hidrolizi, eskülin hidrolizi ve üreaz testleri gerçekleştirilmiştir.

Konvansiyonel biyokimyasal testlerin karşılaştırılmasının yapılması amacı ile API 20 STREP kiti kullanılmıştır.

### Katalaz Testi

Temiz bir lam üzerine bir damla %3 hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) damlatılmış ve üzerine beta hemoliz özelliği gösteren bir koloni süspansiyonu ekilmiştir. Hava kabarcıklarının gözlenmesi pozitif sonuç (katalaz enziminin varlığı) olarak kabul edilmiştir (16).

### Voges Proskauer Testi

Taze streptokok kolonileri, steril bir öze ile 2 ml Voges-Proskauer (VP) içeren deney tüplerine inoküle edilmiş ve 37°C'de 6 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında üzerlerine %5'lik α-naftol ve %40'lık potasyum hidroksit (KOH) damlatılmış, oda ısısında 30 dakika bekletilmiştir. Pembe-kırmızı renk oluşumu pozitif olarak kabul edilmiştir (16).

### Lateks Aglutinasyon Testi (Lancefield Grup Aglutinasyon)

Kit kullanım prosedürüne (Streptococcal Grouping Kit, Oxoid, İngiltere) uygun olarak, 2-5 streptokok kolonisi 400 µl ekstraksiyon enzimi içinde süspansiyon haline getirilmiş ve 37°C'de 15 dakika bekletilmiştir. Her bir grup antijenine karşı antikorla (A, B, C, D, F ve G grubu) kaplı lateks boncukları içeren solüsyonlardan bir damla test kartlarına damlatılmıştır. Üzerlerine süspansiyon halinde olan bakteri örneklerinden konularak karıştırılmış ve çöktelti oluşturanlar grup antijeninde pozitif olarak kabul edilmiştir.

### PYR Testi

Kit prosedürüne göre (Oxoid Biochemical Identification System (O.B.I.S.), Oxoid, İngiltere), steril öze ile üç-beş koloni alınmış, PYR test kartına koyulmuş ve üzerine bir damla solüsyon-1 ilave edilerek üç dakika beklenmiştir. Süre sonunda solüsyon-2 damlatılmış ve yirmi saniye sonunda pembe-mor renk vermesi pozitif kabul edilmiştir. Pozitif kontrol olarak *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 standart suşu kullanılmıştır (16).

### Şeker Fermentasyon Deneyleri

100 ml peptonlu su içerisine 25 gr şeker (mannitol, sorbitol, rafinoz, arjinin, sakkaroz, trehaloz veya laktoz) eklenmiş ve pH: 7,2 olarak ayarlanmıştır. Hazırlanan şekerli çözeltiler 0.45 mm gözenekli filtreden (Stedim Biotech, Almanya) geçirilmiştir. Sarı renk oluşumu bakterinin şekeri kullandığını göstermiş ve pozitif olarak kabul edilmiştir (16).

### Arjinin Hidrolizi Deneyi

100 ml arjinin mediumu (pH: 7.0) için, 0,5 gr maya özeti ve tripton, 0,2 gr K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,05 gr Glukoz, 0,3 gr D-arjinin monomiklorür eklenmiş ve steril edilmiş, cam tüplere 2,5 ml dağıtılmıştır.

Tüplerin içine her bir suş inoküle edilmiş ve 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında her bir tüpe 1 damla Nessler's ayracı damlatılmıştır. Parlak sarı renk oluşumu pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir (16).

### Hipurat Hidrolizi Deneyi

Bakterilerin hipurik asidi hidrolize ederek benzoik asit ve glisine ayrıştırmasını gözlemlemek amacı ile yapılmıştır (17). Bakteri kolonileri, 10gr/ml hipurat bulunan endorflarda süspansiyon haline getirilmiş, iki saat 37°C'de inkübe edilmiş ve üzerine 400 µl ninhidrin ayırıcı eklenmiştir. 15 dakika oda ısısında inkübasyona devam edilmiş ve süre sonunda mavi/mor renk oluşumu pozitif kabul edilmiştir (16).

### Eskülin Hidrolizi Deneyi

Safra-eskülin agara, saf kolonilerden ekim yapılmıştır. 24 saat 37°C'de inkübasyon sonucunda siyah-kahverengi renk değişimi pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir. Pozitif kontrol olarak *E. faecalis* ATCC 29212 suşu kullanılmıştır (16, 18).

### Üre Hidrolizi Deneyi

900 ml distile su içerisine, 15 gr agar eklenmiş ve 121°C'de 15 dakika otoklavda steril hale getirilir. Soğuduktan sonra içerisine, 100 ml distile su içerisindedir 29 gr üre çözündürülmüş ve filtreden geçirilmiş karışım eklenmiş, steril şartlarda tüplere dağıtılmıştır (pH: 6,8). 24 saat 37°C'de inkübasyon sonucunda sarı rengin, pembe/kırmızı renk değişimi pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir (16).

### Yarı Otomatize Sistem ile bakterilerin değerlendirilmesi (API 20 Strep Testi)

Ticari API 20 Strep kiti ile tüm suşlar değerlendirilmiştir. Kit prospektüsüne göre (Biomerieux, Fransa) saf kültür kolonileri, steril eküvyon yardımı ile toplanarak kit ile birlikte verilen %0,85'lik tuzlu su içerisindedir süspansiyon edilmiştir. Bakteri süspansiyonu 4 McFarland yoğunluğunda hazırlanmıştır. Daha sonra bu süspansiyondan striplere dağıtılmış, 35-37°C'de 4 ve 24 saat inkübe edilmiş, süre sonunda ayrıları damlatılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

### Antibiyotik Duyarlılık Deneyleri

Antibiyotik duyarlılık deneyleri Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ve bazı antibiyotikler için gradient-test (E-test, bioMerieux, Fransa) yöntemi ile yapılmıştır (19).

### Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi ile Antibiyotik Duyarlılık Deneyleri

Antibiyotik duyarlılık deneyleri "Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI)" (19) kriterleri göz önüne alınarak yapılmıştır, sefepim (FEP) 30µg, vankomisin (VA) 30µg, seftriakson (CRO) 30µg, sefotaksim (CTX) 30µg, eritromisin (E) 30µg, klindamisin (DA) 30µg, levofloksasin (LEV) 30µg, tetrasiklin (TE) 30µg, kloramfenikol (C) 30µg ve linezolid (LZD) 30µg (BD, USA) test edilmiştir. % 5 koyun kanı içeren Mueller Hinton besiyerine 0,5 McFarland bulanıklığında hazırlanmış koloni süspansiyonu steril eküvyon yardımı ile yayılmıştır ve üzerine antibiyotik diskleri yerleştirilmiştir (19).

### Gradient-Test Yöntemi ile Antibiyotik Duyarlılık Deneyleri

24 saatlik taze kültürden Mueller Hinton Broth besiyerinde 0.5 McFarland yoğunluğunda bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Süspansiyon, steril eküvyonla Mueller Hinton Agar üzerine yayılmış ve üzerine gradient-test (E-Test, Biomerieux, Fransa) şe-

**Tablo 1:** SMG için spesifik gen bölgeleri ve çoğaltılan ürün boyutları (20, 21)

Hedef Gen Bölgesi	Kullanılan Primerler	Çoğaltılan Ürün Boyu (bp)
HYL-MIX-U	TGGTGGGAYTAYGARATYGG	428 bp
HLY-INT-D	GCTGTATCAATGGAGTGTCTGTC	752 bp
HLY-CC-D	CTCTCTCTTGAGATTGTTGC	
16S-ANG-U	GCGTAGGTAACCTGCCTATTAGA	105 bp
16S-ANG-D	CGCAGGTCCATCTACTAGC	
ILY-4DFw	CTCACCTCAATCATGATGGTGC	819 bp
ILY-wholeC Bw	CGACTCACTATAGGGAGATCAAGCATGG	

ritleri koyulmuştur. Ekim yapılmış besiyerleri 18-24 saat süreyle 37°C'de CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda CLSI kriterlerine göre yorumlanmıştır. Deneylerde kontrol için *S. pneumoniae* ATCC 49619 standart suşu kullanılmıştır (19).

#### Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Saf halde olan kanlı agar besiyerindeki kolonilerden DNA izolasyonu, kaynatma yöntemi ile yapılmıştır. Bu amaçla, yaklaşık 0,5 McFarland bulanıklığında hazırladığımız süspansiyondan 500 µl ependorflara aktarılmış ve 100°C'de 10 dakika kaynatılmıştır. 13000 g'de 15 dakika santrifüj edilmiş örneklerin, dip pelletlerine dokunmadan üst kısımdaki süpernatandan 200 µl alınmıştır.

Primer olarak, Tablo 1'de gösterdiği şekilde *S. milleri* grup için spesifik gen bölgelerini içeren HYL-MIX-U, HLY-INT-D, HLY-CC-D, 16S-ANG-U, 16S-ANG-D, ILY-4DFw, ILY-wholeC Bw primerleri (Fermantas, Türkiye) kullanılmıştır (20,21).

Primerlerin son konsantrasyonları 20 µM olarak ayarlanmıştır. PZR karışımı için daha önceden ekstraksiyonu yapılan 2,5 µl DNA kullanılmıştır. Her bir örnek için, 12,5 µl 2X Mastermix (Fermantas, 2X Mastermix, ABD) ve her bir primerden 10 pmol kullanılmıştır (toplam hacim 25µl).

Pozitif kontrol olarak *S. anginosus* NCTC 10713, *S. constellatus* NCDO 2226, *S. intermedius* NCDO 2227 suşlarından ekstrakte edilen DNA ve negatif kontrol olarak da hedef DNA yerine aynı miktarda distile su kullanılmıştır. Amplifikasyon programı, 94°C'de 4 dakika (1 döngü), 94°C'de 45 saniye, 54°C'de 45 saniye, 65°C'de 2,5 dakika (30 döngü) olarak ayarlanmıştır (22). %1'lik agaroz jel de yürütülen örnekler jel translüminatör üzerine alınarak UV ışık altında görüntülenmiştir.

#### BULGULAR

Çalışmada yer alan suşlar farklı klinik örneklerden izole edilmiştir. 81 boğaz sürüntüsü, 10 apse, iki batın içi sıvı, iki doku parçası, iki kan kültürü, 1 balgam, 1 periton sıvısı ve 1 trnak iltihabı örneklerinden suşların izolasyonları yapılmıştır. Hasta yaşları 1 ve 82 arasında değişmektedir (20,29 ± 20,92).

Tüm suşlar Gram boyamada, Gram pozitif, zincir yapmış koklar olarak görülmüştür. Oksidaz ve katalaz özellikleri negatif olarak

saptanmıştır. İzole edilen suşların 90 tanesinin beta hemolitik, dört suşun alfa hemolitik olduğu ve 6 tanesinin hemoliz yapmadığı bulunmuştur.

Tüm suşların VP testleri, hipurat hidrolizleri ve PYR testleri negatif olarak tespit edilmiştir. Üreaz testi iki suşta pozitif olarak saptanmıştır.

Tüm suşlar Lancefield grup antijeni açısından değerlendirilmiş olup, 42 suşun (%42) G grup antijenine, 26 suşun (%26) F grup antijenine, beş (%5) suşun C grup antijenine sahip olduğu tespit edilmiştir. 27 (%27) suşun grup antijeni saptanamamıştır.

Tüm şeker fermentasyonu deneyleri konvansiyonel olarak, her bir şeker için yapılmıştır (100 suşta). 78'i sakkarozu (%78), 69'u (%69) trehalozu, 61'i (%61) laktozu, 10'u (%10) manitolü, yedisini (%7) sorbitolü ve yedisini (%7) rafinozu kullanmıştır.

Suşların arjinini hidroliz edip etmedikleri Nessler ayracı kullanılarak çalışılmış ve tüm suşlar pozitif olarak saptanmıştır.

Eskülin hidrolizi açısından suşlar değerlendirildiğinde, 57 suş eskülin pozitif (%57), 43 suş (%43) eskülin negatif sonuç vermiştir.

API 20 STREP testi ile, 100 suşun 41'i (%41) *Streptococcus* olarak tiplendirilmiş, 45'i (%45) *S. anginosus*, beşi (%5) *S. constellatus*, bir (%1) suş *S. intermedius* olarak tiplendirilmiştir. Tablo 2'de API 20 STREP sonuçları gösterilmiştir.

**Tablo 2:** Yarı Otomatize sistem ile bakterilerin değerlendirilme sonuçları (API 20 Strep)

Cins ya da tür düzeyinde isimlendirme	Bakteri sayısı
<i>Streptococcus milleri</i> grup	41
<i>Streptococcus anginosus</i>	45
<i>Streptococcus constellatus</i>	5
<i>Streptococcus intermedius</i>	1
<i>Enterococcus durans</i>	2
<i>Streptococcus salivarius</i>	1
<i>Granuli adiacens</i>	1
<i>Enterococcus avium</i>	1
<i>Streptococcus agalacita</i>	1
<i>Leuconostoc</i> spp.	1
<i>Streptococcus suis</i> II	1

Antibiyotik duyarlılık deneyleri CLSI'n önerdiği şekilde yapılmış olup tüm suşlar vankomisin, seftriakson, sefepim, sefotaksim, levofloksasin ve linezolid duyarlı bulunmuştur.

Suşların %16'sında eritromisin direnci saptanmış ve bu direnci gösterenlerin 10'unun *S. anginosus*, dördünün ise *S. constellatus* olduğu belirlenmiştir.

Streptokok izolatlarında %6 klindamisin direnci saptanmış ve



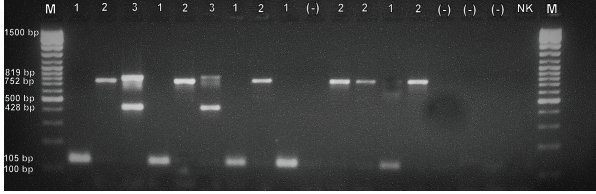
beş *S. anginosus*, üç *S.constellatus* suşunun bu dirence sahip olduğu gözlenmiştir. İzolatlarımızda %5 tetrasiklin direnci gözlenmiş; bu dirence sahip olan suşların üçü *S.constellatus*, ikisi *S.anginosus* olarak belirlenmiştir. %1 oranında saptanan klo-ramfenikol direnci *S.anginosus*'da görülmüştür.

Ampisilin ve penisilin direnci gradient-test yöntemi ile incelenmiş olup, bir *S. anginosus* suşu hem ampisilin hem de penisiline dirençli olarak saptanmıştır. Yine aynı yöntemle ampisiline orta duyarlı iki *S.anginosus* suşu saptanmıştır.

PZR sonuçlarına göre %56 *S. anginosus*, %24 *S. constellatus*, %8 *S. intermedius* olarak saptanmıştır. %12'sinde herhangi bir bant saptanamamıştır (Şekil 3).

### TARTIŞMA

SMG bakterileri heterojen yapıda bulunan bir grup olup üç alt türe ayrılmaktadır: *S. anginosus*, *S. constellatus*, *S. intermedius*.



Şekil 3: PZR bant profilleri.

M: Marker, 1: *S.anginosus*, 2: *S.constellatus*, 3: *S.intermedius*,  
NK: Negatif kontrol

SMG bakterileri filogenetik özellikleri nedeni ile viridans streptokoklar içinde yer almaktadır fakat klinik olarak oluşturdukları tablolar viridans streptokoklardan farklıdır. SMG, değişken biyokimyasal, hemolitik özelliğe ve farklı Lancefield grup antijenlerine sahiptir. Tanımlamada günümüzde yarı otomatize, otomatize sistemler ya da ticari kitlerden yararlanılsa da grup üyelerinin kesin olarak ayrılabilmesi için moleküler yöntemlerle desteklenmesi gerekmektedir (23-24). SMG, klinik olarak perikardit, endokardit, karaciğer ve beyin abseleri gibi birçok hastalıktan tek başına ya da polimikrobiyal olarak izole edilmiş fakat ciddi bir direnç oluşumu görülmemiştir (1, 3, 11, 25, 26).

Çalışmamızda biyokimyasal özellikler olarak VP pozitifliği, hipurat hidrolizi ve PYR negatifliği temel esas olarak alınmış fakat bu kriterler tanımlamada yeterli olmamıştır. Yapılan literatür taramasında Fox ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada VP negatif, Lancefield C grup antijenine sahip *S. anginosus* bakterilerinin de olduğu gösterilmiştir (27). Bu sebeple VP pozitifliğinin her zaman kesin bir ayırtıcılığı olmayabileceği düşünülmüştür.

Amri ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da hipurat hidrolizinin yalancı pozitif sonuç verebileceği belirtilmiştir (28). Yaptığımız çalışmada 4 ve 2 McFarland süspansiyon bulanıklıklarında pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Daha sonra API 20 STREP'te bulunan hipurat hidrolizi ile de sonuçlar karşılaştırılmış ve tüm suşlar hipurat hidrolizi açısından negatif bulunmuştur. Böylece

hipuart hidrolizi pozitifliğinin kesin bir ayırtıcılığı olmayabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda arjinin fermentasyonunda da çeşitli sorunlar ile karşılaşmıştır. Arjinin fermentasyonunun kesinlikle pozitif olması gerektiği vurgulandığı bir çalışmanın aksine, çalışmamızda tüm suşlarda arjinin fermentasyonu negatif olarak tespit edilmiştir (1). Niven ve arkadaşlarının önerileri doğrultusunda Nessler' ayracı ile amonyak oluşumunun araştırıldığı yöntemde ise tüm suşların arjinin fermentasyon deneylerinin pozitif olduğu saptanmıştır (29). Elde edilen bu sonuçlar klasik şeker fermentasyonu ile hazırlanan arjininin streptokoklar için yeterli olmadığını göstermiş, bu grupta arjinin hidrolizinde ve bakterinin ürettiği amonyağı göstermekte sadece peptonlu suyun yeterli olmadığı saptanmıştır.

Hong Kong'da yapılan beş yıllık bir çalışmada, 377 infeksiyöz endokardit tanılı hasta grubu ile çalışılmış ve sadece altı olgudan SMG izole edilmiştir. Sonuçlar API 20 STREP, ID 32 STREP, VITEK GPI ve 16S rRNA sekanslama yöntemleri ile değerlendirilmiştir. Sonuçlara bakıldığında API 20 STREP'te sadece bir suş %94, ID32 STREP'te ise beş suş %99 doğruluk oranıyla *S. anginosus* olarak tanımlanmış ve VITEK GPI ile üç suş tanımlanamamıştır. 16S rRNA sekanslama yöntemi ile suşlar tekrar değerlendirmeye alınmış ve tamamı *S. anginosus* olarak saptanmıştır (30). Bu çalışma, bizim çalışmamızdaki API 20 STREP ile yapılan deney sonuçları (%92) ile paralellik göstermektedir. Bu sonuçlara dayanarak otomatize ticari sistemlerin SMG'yi tanımlamada yeterli olduğu, fakat bu amaçla hazırlanan ticari kitlerin gözden geçirilmesi gerektiği düşünülmektedir. Çalışmamızda elde edilen %92 oranı sonuçların yorumlanmasında yüksek gibi görünse de %26'lık kısmın saptanamaması ve PZR ile uyumsuz sonuçlar verdiği göz önünde bulundurulmalıdır.

Arjantin'de 64 suş ile yapılan bir çalışmada disk difüzyon ve MİK yöntemiyle 40 *S. anginosus*, 18 *S. constellatus* ve altı *S. intermedius* belirlenmiştir. *S. anginosus* suşlarında %12,5 penisilin, %2,5 eritromisin, *S. constellatus* suşlarında %4,5 penisilin ve eritromisin ve *S. intermedius* suşlarında ise %33,3 penisilin direnci saptanmıştır (31).

Çalışmamızda ise *S.anginosus* suşlarının diğer grup üyelerine oranlara daha dirençli olduğu gözlenmiştir. *S.constellatus'un* ise *S.intermedius'tan* daha yüksek oranda dirençli olduğu saptanmıştır. Ampisilin ve penisilin direnci saptanan suşların boğaz infeksiyonlarından izole edildiğini göz önünde bulundurarak, ampirik tedavi de kullanılan birinci basamak antibiyotiklerin direnç oranı düşük olsa da tekrar revize edilmesi ve kültür sonucu çıkmadan tedaviye başlanmaması gerektiği düşünülmektedir.

Çalışmamızda *S. anginosus* suşlarının diğer grup üyelerine oranlara daha dirençli olduğu gözlenmiştir. *S. constellatus'un* *S. intermedius'tan* daha yüksek oranda dirençli olduğu saptanmıştır. Ampisilin ve penisilin direnci saptanan suşların üst solunum yolu infeksiyonlarından izole edildiğini göz önünde bulundurarak, ampirik tedavide kullanılan birinci basamak antibiyotiklerin direnç oranı düşük olsa da tekrar revize edilmesi ve kültür sonucu çıkmadan tedaviye başlanmaması gerektiği düşünülmektedir.



Sonuç olarak *Streptococcus milleri* grubun biyokimyasal identifikasyon şemasının henüz tam olarak kesinleşmediği belirlenmiştir. Antibiyotik duyarlılık sonuçlarımıza dayanarak henüz direnç gelişiminin ciddi boyutta olmadığı saptanmış olup steril vücut bölgelerinden izole edilen suşlarda MİK değerlerinin belirlenmesi gerekmektedir. Grubu tanımlamada ticari kitlerin yetersiz olabileceği saptanmış ve yapılacak çalışmaların mutlaka moleküler bir yöntemle desteklenmesi gerekmektedir. Günümüzde hızlı taq kitlerinin yaygınlaşması ile rutin laboratuvarlarda oturabilecek, primer setleri ile kullanımı da diğer otomatize sistemler kadar hızlı olabilecektir (4 saat). Bu çalışmanın ülkemizde yapılacak diğer çalışmalar için temel olacağı düşünülmektedir.

**Teşekkür:** İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne desteklerinden ötürü teşekkür ederiz.

The University of Tokushima'dan Dr. Hideaki Nagamune ve Queen Mary, University of London'dan Dr. Robert A. Whiley'e deneylerimizde kullandığımız standart suşları (*S. anginosus* NCTC 10713 *S. intermedius* NCDO 2227 ve *S. constellatus* subsp. *constellatus* NCDO2226) temin edip bizimle bilgi alışverişinde oldukları için teşekkür ederiz.

**Etik Komite Onayı:** Bu çalışma için etik komite onayı İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Tarih: 27.05.2011, No: 08).

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

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

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir .

**Finansal Destek:** Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 17164).

**Acknowledgments:** Authors would like to thank Istanbul University Scientific Research Projects Unit.

**Ethics Committee Approval:** This study was approved by Istanbul Faculty of Medicine Clinical Research Ethics Committee (Date: 27.05.2011, No: 08).

**Peer Review:** Externally peer-reviewed.

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

**Conflict of Interest:** The authors have no conflict of interest to declare.

**Financial Disclosure:** This study was supported by the Istanbul University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project No: 17164).

## KAYNAKLAR

- 1- Forbes BA, Sham DF, Weissfeld AS. Catalase-negative, Gram-positive cocci, Streptococcus, enterococcus and similar organisms. In: Tille PM, editors. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. Missouri: Mosby; 2008.p.298-315.
- 2- Procop GW, Church CL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL. Isolation and identification of Streptococci and Streptococcus-Like bacteria. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2006.p.701-45.
- 3- Ruoff KL, Bisno AL. Classification of Streptococci. In: Mandell GL, Bannett JE, Dolin R, editors. Principles and Practice of Infectious Diseases. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2005.p.2591-610.
- 4- Patterson MJ. Streptococcus. In: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 13. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7611/>
- 5- Hansen AP, Hucker GJ, Snyder MA. Hemolytic properties of the mastitis streptococcus. American J Public Health 1933;23(12):1262-70.
- 6- Sherman JM. The Streptococci. Microbiol Mol Biol Reviews 1937;1(1):3-97.
- 7- Lancefield R. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. J Exp Med 1933;57(4):571-95.
- 8- Carroll KC. Biographical Feature: Rebecca Lancefield, Ph.D. J Clin Microbiol. 2019;57(8):e00728-19. doi:10.1128/JCM.00728-19
- 9- Hardie JM, Whiley RA. Classification and overview of the genera Streptococcus and Enterococcus. J Appl Microbiol. 1997;83(S1):1S-11S. doi:10.1046/j.1365-2672.83.s1.1.x
- 10- Patel S, Gupta RS. Robust demarcation of fourteen different species groups within the genus Streptococcus based on genome-based phylogenies and molecular signatures. Infect Genet Evol 2018;66:130-51.
- 11- Yao JDC, Moellering RC-JR. Antibacterial Agents. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. Manual of Clinical Microbiology. Washington: ASM press; 2007.p.1077-113.
- 12- Berkiten R. Gram pozitif koklar: Laboratuvar tanı, epidemiyoloji, korunma. İçinde: Bozkaya E, editör. Tıbbi Mikrobiyoloji-2. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri; 2005.sf.1-28.
- 13- Berkiten R. Mini (pinpoint) koloni oluşturan beta-hemolitik streptokoklar: Streptococcus milleri grubu ve çeşitli özellikleri. Ankem Dergisi 2008;22(2):89-94.
- 14- Ardıç N. B grubu Streptokoklar (*Streptococcus agalactiae*). Klimik Dergisi 2003;16(3):101-5.
- 15- Wilson L.G. The early recognition of streptococci as causes of disease. Medical history. 1987;31(4):403-14.
- 16- Biochemical Tests for the Identification of Aerobic Bacteria. Editor(s):Amy L.Leber. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2016; Chapter 3.17. 4th Edition. Volume 1-3. doi:10.1128/9781555818814.ch3.17.1
- 17- Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Barış Yayınları: İzmir; 2002:495-521.
- 18- York MK, Traylor MM, Hardy J, Henry M. Biochemical tests for identification of aerobic bacteria. In: Lynne JG, editors. Clinical Microbiology Procedures Handbook, Washington DC: ASM press;

2010. doi/book/10.1128/9781683670438.CMPH
- 19- Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-second Informational Supplement. CLSI document M100-S22, Wayne PA; Clinical and Laboratory Standards Institute;2012.
- 20- Takao A, Nagamune H, Maeda N. Identification of the Anginosus group within the genus *Streptococcus* using polymerase chain reaction. FEMS Microbiol letters 2004;233(1):83-9.
- 21- Goto T, Nagamune H, Miyazaki A, Kawamura Y, Ohnishi O, Hattori K, et al. Rapid identification of *Streptococcus intermedius* by PCR with the *ily* gene as a species marker gene. J Med Microbiol 2002;51(2):178-86.
- 22- Hoshino T, Fujiwara T, Kilian M. Use of phylogenetic and phenotypic analyses to identify nonhemolytic streptococci isolated from bacteremic patients. J Clin Microbiol 2005;43(12):6073-85.
- 23- Jiang S, Li M, Fu T, Shan F, Jiang L, Shao Z. Clinical Characteristics of Infections Caused by *Streptococcus Anginosus* Group. Scientific reports 2020;10(1):9032.
- 24- Pilarczyk-Zurek M, Sitkiewicz I, Koziel J. The Clinical View on *Streptococcus anginosus* group-opportunistic pathogens coming out of hiding. Frontiers in microbiology 2022;13:956677.
- 25- Lehman DC, Mahon CR, Suvarna K. *Streptococcus*, enterococcus and other catalase-negative Gram-positive cocci. In: Mahon CR, Lehman DC ve Manuselis G, editors. Textbook of Diagnostic Microbiology. Philadelphia; Elsevier. 2007. p.382-95.
- 26- Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Beta Hemolitik Streptokoklar. İçinde: Söyletir G, Över U, editörler. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, Etkenlere Göre İnfeksiyonlar. Ankara; Nobel Tıp Kitabevleri:2002.sf.1478-97.
- 27- Fox K, Turner J, Fox A. Role of beta-hemolytic group C streptococci in pharyngitis: Incidence and Biochemical Characteristics of *Streptococcus equisimilis* and *Streptococcus anginosus* in patients and healthy controls. J Clin Microbiol 1993;31(4):804-7.
- 28- Al Amri A, Senok AC, Al Ismaeel AY, Al-Mahmeed AE, Botta GA. Multiplex PCR for direct identification of *Campylobacter* spp. in human and chicken stools. J Medical Microbiol 2007;56(Pt 10):1350-55.
- 29- Niven CF, Smiley KL, Sherman JM. The hydrolysis of arginine by streptococci. J Bacteriol 1942;43(6):651-60.
- 30- Woo PC, Tse H, Chan KM, Lau SK, Fung AM, Yip KT, et al. *Streptococcus milleri* endocarditis caused by *Streptococcus anginosus*. Diag Microbiol and Infec Disease 2004;48(2):81-8.
- 31- Bantar C, Fernandez Canigia L, Relloso S, Lanza A, Bianchini H, Smayevsky J. Species belonging to the *Streptococcus milleri* group: antimicrobial susceptibility and comparative prevalence in significant clinical specimens. American Soc for Microbiol 1996;34(8):2020-22.

# THE PROTECTIVE EFFECTS OF TETRANDRINE AGAINST TO HISTOLOGICAL, SPERMATOLOGICAL AND OXIDATIVE DAMAGE INDUCED BY AROCLOR 1254 ON THE MALE RATS REPRODUCTIVE SYSTEM

## ERKEK SIÇANLARDA AROKLOR 1254'ÜN NEDEN OLDUĞU REPRODUKTİF HASARA KARŞI TETRANDRİNİN KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Feride ÖZDEMİR<sup>1</sup>, Aslı ÇETİN TAŞLIDERE<sup>2</sup>, Osman ÇİFTÇİ<sup>3</sup>, Muhterem AYDIN<sup>4</sup>, Neşe BAŞAK TÜRKMEN<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Istanbul University, Institute of Graduate Studies in Health Sciences, Department of Histology and Embryology, Istanbul, Türkiye

<sup>2</sup>Inonu University, Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology Malatya, Türkiye

<sup>3</sup>Pamukkale University, Faculty of Medicine, Department of Pharmacology Denizli, Türkiye

<sup>4</sup>Firat University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Reproduction and Artificial Insemination, Elazığ, Türkiye

<sup>5</sup>Inonu University Department of Pharmaceutical Toxicology, Faculty of Pharmacy, Malatya, Türkiye

ORCID ID: F.Ö. 0000-0003-1327-9146; A.Ç.T. 0000-0003-3902-3210; O.Ç. 0000-0001-5755-3560; M.A. 0000-0002-6494-9229; N.B.T. 0000-0001-5566-8321

Citation/Atf: Ozdemir F, Cetin Taslidere A, Ciftci O, Aydin M, Basak Turkmen N. Journal of Advanced Research in Health Sciences 2023;6(1):80-87. <https://doi.org/10.26650/JARHS2023-1181839>

### ABSTRACT

**Objectives:** Aroclor (AR) 1254; has many adverse effects on male reproduction such as carcinogenic, teratogenic, immune and endocrine disruption problems. Tetrandrine (TET), a bisbenzillisoquinoline alkaloid isolated from the root of *Stephania tetrandra* S. Moore, has protective effects such as immunomodulatory, anti-cancer, and anti-inflammatory. The objective of this study was to investigate the possible curative effects of TET therapy against testicular damage (histological, spermatological and oxidative damage) induced by AR1254.

**Materials and Methods:** Twenty-eight male rats were randomly divided into four equal-sized groups: a control group; (1 ml of corn oil by gastric oral gavage), AR1254 group; (2 mg/kg) AR1254 administered intraperitoneally), TET group; (TET by gastric oral gavage 30 mg/kg) and AR 1254 + TET group;(Aroclor 1254 and TET administered together at the same doses as the previous groups.

**Results:** The AR1254 treatment caused morphological and spermatological damage on testis tissue; oedema vacuolization and congestion, in interstitial area, reduction in spermatogenic cells, arrested spermatocytes at different stages of spermatogenesis, shedding of spermatogenic serial cells into tubular lumens, a decline in epididymal sperm concentrations, sperm motility and a rise in abnormal sperm ratios. The AR1254 administration induced an increase in the oxidative parameters and a decrease in enzymatic and nonenzymatic antioxidant levels. The TET treatment significantly ameliorated histological, oxidative, and sperm damage caused by AR1254.

**Conclusion:** This study demonstrated the protective effects of TET against AR1254-induced male rat reproductive damage.

**Keywords:** Aroclor1254, testis, tetrandrine, rat, caspase-3

### ÖZ

**Amaç:** Aroklor (AR) 1254; Kanserojenik, endokrin bozucu, nörotoksik, immünsüpresif, teratojenik etkileri olan poliloklorlu bifenil bileşiğidir. *Stephania tetrandra* S. Moore'un kökünden izole edilen bir bisbenzillisoquinolin alkaloid olan Tetrandrin (TET) ise immünomodülatör, anti kanser, anti-inflamatuar etkilere sahiptir. Bu çalışma, AR1254'ün neden olduğu testis hasarına (histolojik, spermatolojik ve oksidatif hasar) karşı TET tedavisinin koruyucu, iyileştirici etkilerini göstermek amacıyla planlandı.

**Materyal ve Metot:** Çalışmamızda 28 adet Sprague-Dawley cinsi siçanlar kullanıldı ve rastgele seçilerek 4 gruba ayrıldı. (n=7) Gruplar sırasıyla: Kontrol grubu; (1 ml mısır yağı gastrik gavaj ile), AR1254; (2 mg/kg/gün intraperitoneal yolla), TET grubu 30 mg/kg/gün gastrik gavaj ile), AR1254+TET grubu; Aroclor1254 ve TET grubuna uygulan dozlar aynı şekilde uygulanarak oluşturuldu. Deney süresi sonunda siçanlardan alınan testis dokuları histopatolojik ve biyokimyasal yöntemlerle analiz edildi.

**Bulgular:** AR1254 uygulaması sonucunda siçan testis dokusunda interstisyel alanda; vakuolizasyon, ödem, vasküler konjesyon, spermatogenik hücrelerde; azalma, bölünmenin herhangi bir evresinde duraksama ve lümen dökülme, epididimal sperm konsantrasyonunda, sperm hareketliliğinde azalma ve anormal sperm oranlarında ise artış gözlemlendi. AR1254 uygulaması oksidatif stres parametrelerinde artışa ve buna karşılık antioksidan seviyelerinde ise azalışa sebep oldu. Uygulanan TET tedavisi, AR1254'ün neden olduğu histolojik, oksidatif ve sperm hasarını önemli ölçüde iyileştirdi.

**Sonuç:** Bu çalışmada, erkek siçanlarda AR1254 ile oluşturulan testis dokusu hasarına karşı TET'in koruyucu ve iyileştirici etkileri gösterildi.

**Anahtar kelimeler:** Aroklor1254, testis, tetrandrin, siçan, kaspa-3

**Corresponding Author/Sorumlu Yazar:** Feride ÖZDEMİR E-mail: feridekarahan1@gmail.com

**Submitted/Başvuru:** 29.09.2022 • **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 18.10.2022 • **Last Revision Received/Son Revizyon:** 25.11.2022

• **Accepted/Kabul:** 25.11.2022 • **Published Online/Online Yayın:** 09.02.2023



This work is licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

## INTRODUCTION

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are chlorine compounds with the formula  $C_{12}H_{10-x}Cl_x$  which are the most permanent in nature among all known chemicals (1). Owing to their excellent physicochemical properties of stability, unflammability, vis-cosity and electrical insulation, they are used in the production of capacitors, transformers, hydraulic pumps, printing ink, paints, pesticides and electrical insulating liquids (2). It is known that they tend to accumulate in the food chain and fatty tissues due to their lipophilic properties and cause environmental contamination and threaten human health (3,4). PCBs are taken into the body through the respiratory system and gastrointestinal tract and transferred through the blood to the liver and other organs (5). The carcinogenic, immune suppressor, neurotoxic, hepatotoxic and teratogenic effects of PCBs and their disruptive effects on the endocrine system have been shown in previous studies (2, 5) PCBs cause endocrine disorders by mimicking steroid hormones such as estrogen. Thus, they accumulate in steroid producing organs such as adrenal glands, testes, and ovaries (6).

Aroclor 1254 which is a mixture of PCBs, is one of the common factors causing environmental pollution. Many previous studies demonstrated that AR1254 has detrimental effects on the male reproductive system (7). An exposure to AR1254 can cause dysregulation in gonadotropin and steroid hormone levels, metabolic dysfunction in Sertoli cells, decreased luteinizing hormone (LH) receptor density and steroidogenic enzyme activity in Leydig cells, and a decrease in weight of testis and male accessory glands (7-10). In addition, it can cause a decline in sperm motility and quality (9, 11) and deterioration may occur in testicular tissue (12,13).

Tetrandrin is an alkaloid isolated from the Radix Stephania tetrandra plant which is used for traditional Chinese medicine (14, 15). TET has anti-inflammatory, immunomodulator, antioxidant, anti-cancer and anti-apoptotic effects and it is defined as a calcium-channel blocker. It has been reported that Tetrandrin showed its apoptotic effects in cancer cells by activating death receptors and FAS ligand. Also it has been shown that Tetrandrine activates caspase -3 to induce apoptosis in hepatic stellate cells (16, 17). Chemotherapeutic agents which are used as the main treatment method against cancer, cause lots of damage in human beings such as fertility problems, nerve and muscle problems and weight changes. Plant species have been used in medicine for many years. Because of the side effects of chemotherapeutic agents used in cancer treatments, today's studies focus on plant -drug therapy.

As a result this study planned to investigate possible curative effects of TET treatment on AR1254 induced testicular damage in rats. For this purpose, histological damage, morphologic changes, oxidative stress and sperm parameters were evaluated.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals

Aroclor 1254 (ampule of 50 mg, CAS No:11097- 69-1), Tetrand-

rine (CAS No: 518-34-3) and the other complementary chemicals were obtained from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

### Animals

Twenty eight healthy adult male Sprague Dawley rats, (3–4 months, 200-250 g) were obtained from the Experimental Animal Institute (Malatya, Turkey). Animals were fed ad libitum with standard laboratory pellet chow and kept under standard conditions. This study was approved by Inonu University,- The Institutional Animal Ethical Committee- (Malatya, Turkey). (Date: 28 January 2014 and Protocol no: 2014/A-01)

### Experimental Design

We determined the doses of Aroclor 1254 (AR1254) and tetrandrine (TET) based on previous studies. In these studies, AR1254 was intraperitoneally (i.p.) given to the rats at the dose of 2 mg /kg/day (6, 13, 18). and TET was given to the rats at dose of 30 mg/kg/day (19, 20).

All Sprague Dawley rats were randomly divided into four groups as control (n=7), AR1254 (n=7), TET (n=7) and AR1254+TET(n=7) groups in this study.

1 ml of corn oil (the solvent of AR1254 and TET) was administered by gastric oral gavage to the control group;

AR1254 was administered intraperitoneally (i.p) (2mg/kg/day) to the AR1254 group.

TET was administered 2mg/kg/day with gastric oral gavage (30 mg/kg/day) to the TET group.

AR1254 was administered i.p. (2mg/kg/day) and TET was administered 30mg/kg/day with gastric oral gavage to the AR1254 +TET group.

At the end of the experimental protocol (four weeks) all rats were anesthetized (mixture of ketamine hydrochloride). The left and right testis tissue samples were removed for biochemical and histopathological analysis.

### Light Microscopic Examinations

For light microscopic evaluation, testis tissue samples in all groups were fixed in 10% neutral formaldehyde embedded in paraffin and sectioned apart. Hematoxylin and eosin (H&E) staining were applied on sections mounted on a slide. All testis tissue samples were analyzed with a light microscope and an image analysis system (Leica). The seminiferous tubule diameters and germinal epithelial thickness were measured by counting 100 seminiferous tubules. The tubule diameters were determined by taking micrographs at 20x magnification and taking the average of the horizontal and vertical diameters of the round tubules on the screen. The tubular epithelial thickness was determined by randomly selecting three regions of the intratubular epithelium in each micrograph at 20x magnification and taking the average of these three values for each tubule (Table 1). For Histological scoring 10 different areas were examined and intact seminiferous tubules, atrophic, and degenerated tubules were evaluated (Table 2).

**Table 1:** Tubular diameter and germinal layer thickness measurements after administration of AR1254 and/or TET in study groups

Groups	Tubule diameter	Tubular epithelium thickness
Control	303.45±2.99 <sup>a</sup>	80.18±0.66 <sup>a</sup>
AR 1254	267.56±2.44 <sup>b</sup>	53.57±0.64 <sup>b</sup>
TET	299.62±3.39 <sup>a</sup>	78.94±0.71 <sup>a</sup>
AR1254 + TET	287.24±3.18 <sup>c</sup>	69.37±0.62 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>: There was no difference between control and TET, <sup>b</sup>: Shows that AR1254 differs from all groups. <sup>c</sup>: Shows that AR1254 + TET differs from all groups (p<0.0001)

**Table 2:** Proportion of normal, degenerated and atrophic seminiferous tubules after AR1254 and/or TET administration in study groups

Groups	Normal	Degenerate	Atrophic
Control	3.33±0.09 <sup>a</sup>	0.15±0.05 <sup>a</sup>	0.38±0.06 <sup>a</sup>
AR 1254	0.17±0.05 <sup>b</sup>	0.40±0.08 <sup>b</sup>	3.88±0.14 <sup>b</sup>
TET	2.68±0.07 <sup>c</sup>	0.18±0.05 <sup>c</sup>	0.65±0.08 <sup>c</sup>
AR 1254 + TET	1.85±0.12 <sup>d</sup>	0.33±0.07 <sup>d</sup>	1.13±0.10 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>: There was no difference between control and TET, <sup>b</sup>: Shows that AR1254 differs from all groups. <sup>c</sup>: Shows that TET differs AR1254, and AR1254+TET groups, <sup>d</sup>: Shows that AR1254 + TET differs from all groups (p<0.0001)

### Immunohistochemical analysis

After deparaffinization and rehydration procedures, slides were boiled in the citrate buffer (pH 7.6) and washed with phosphate-buffered saline (PBS). Respectively, sections were incubated in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (7 min) primer antibody (caspase-3-) (2 hours), Biotinylated Goat Anti Polyvalent (10 min), streptavidin peroxidase (10 min) and chromogen (15 min) Then slides were applied with Mayer's hematoxylin (1 min) stained sections were analyzed with light microscope and an image analysis system (Leica).

### Evaluation of sperm parameters

Testis, epididymis, seminal vesicle, and prostate tissues were removed, weighed and values of weights parameters and sperm parameters were evaluated in all groups.

The Hemocytometer method was used for determination of epididymal sperm concentration. The cauda epididymis was used for sperm motility evaluation (21). All epididymal sperm cells (200x magnification) and percentage of sperm motility (400x magnification) were evaluated using a light microscope (Leica). To evaluate the percentage motility score of sperm cells, the slides were stained with eosin-nigrosin (1.67% eosin, 10% nigrosin and 0.1M sodium citrate) and analyzed at 400x magnification. Three hundred spermatozoa were randomly selected on each slide and head, mid, tail and total morphologically abnormal spermatozoas ratios were presented as percentages (21, 22).

### Biochemical Analyses

Homogenized testis tissues were used for biochemical parameters. For determination of TBARS levels, testis tissues were evaluated spectrophotometrically at 532 nm (23). The reduced glutathione (GSH) level was measured at 412 nm (24). Catalase (CAT) activity was determined using the method defined by Aebi et al. (25). The superoxide dismutase (SOD) activity was determined using the method defined by Sun et al. (26). The SOD activity was evaluated by the nitroblue tetrazolium (NBT) method and measured by spectrophotometer at 560 nm. For determination of the glutathione peroxidase activity (GPx) the Beutler method was used (27). The GPx activity measured spectrophotometrically at 340 nm.

### Statistical analysis

Histological values were analysed using the SPSS 13 statistical program. Since our data are suitable for non-normal distribution, we used the Kruskal–Wallis test for comparison between groups. The significance of differences between the groups were evaluated by pair wise comparisons with the Mann-Whitney U test. All data were presented as the arithmetic mean ± standard error (SE), p ≤ 0.0001 were regarded as statistically significant.

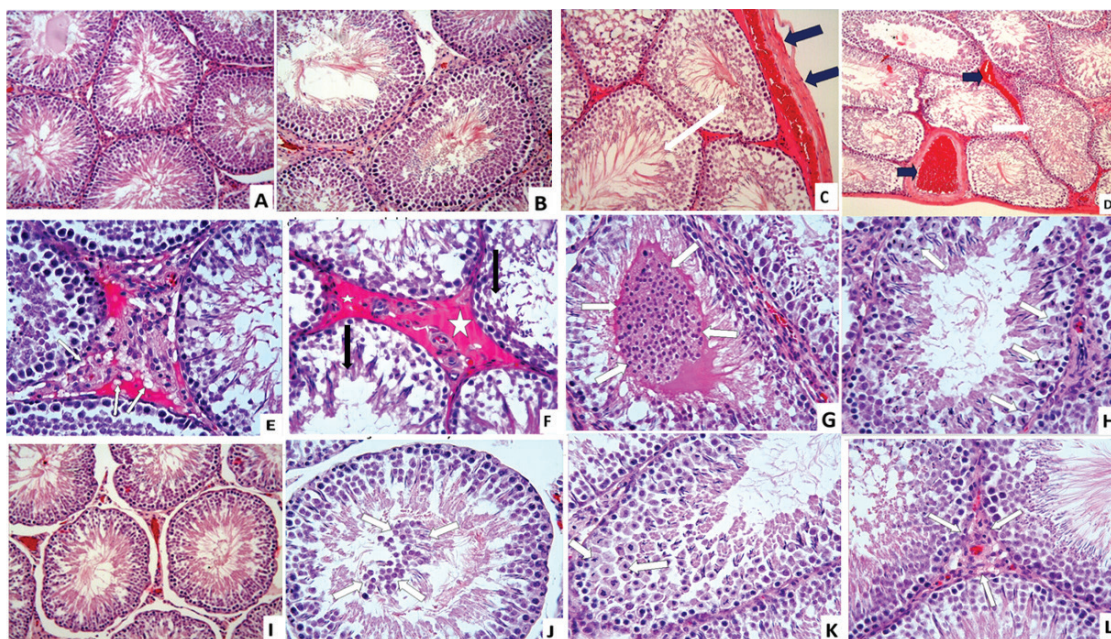
Biochemical and Spermatological values were analysed using the "SPSS for Windows 12.0" statistical program. Since our data are suitable for non-normal distribution, we used the Kruskal–Wallis test for comparison between groups. The significance of differences between the groups were evaluated by pair wise comparisons with the Mann-Whitney U test. All data were presented as the arithmetic mean ± standard error (SE), p ≤ 0.05 were regarded as statistically significant.

## RESULTS

### Histological results

Hematoxylin and eosin applied testis tissue sections in all groups were evaluated in general morphology. In both the control and TET group; seminiferous tubule's interstitial cells and germinal epithelium, exhibited normal histological appearances as shown in Figure (1A, 1B). However, in the AR1254 group histopathological lesions such as tubular degeneration, vascular congestion in tunika albuginea layer and interstitium Figure (1C, 1D), vacuolisation Figure (1E) interstitial oedema, tubular degeneration Figure (1F), reduction in spermatogenic cells, Figure (1G), and arrested spermatocytes at different stages of spermatogenesis Figure (1H) were observed. The TET treatment showed ameliorative effects on the AR1254 induced testes toxicity Figure (1I, 1J, 1K, 1L). Histopathological changes analyzed in the AR1254+TET group were milder than the AR1254 group. Compared with the AR1254 alone group, vascular congestion, interstitial oedema and vacuolisation, the rate of arrested spermatocytes in different stages of spermatogenesis and shedding of spermatogenic serial cells into tubular lumens were decreased markedly in the AR1254+TET group. Curative effects were observed in testicular tissues of all animals in the AR1254+TET group.

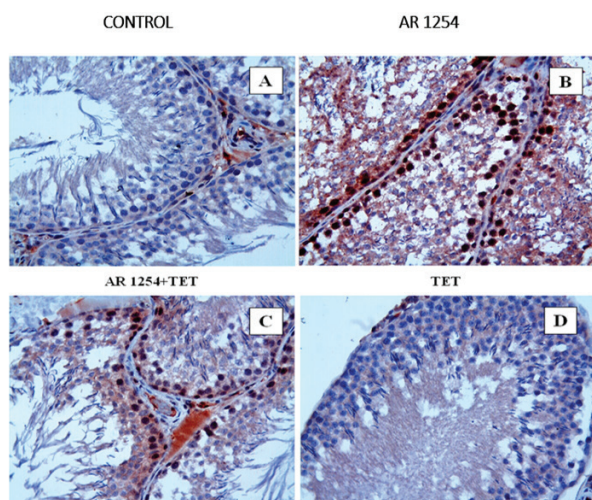




**Figure 1:** Testis tissue showed normal histological appearance in Control (A) and Tetrandrine (B) groups. Germinal epithelium, seminiferous tubules and interstitial cells exhibited normal histological appearances. H&E; X20 In AR1254 group (C-H) in testis tissue, vascular congestion in tunika albuginea and in interstitial area and deterioration in seminiferous tubules (white arrows) (C, D), vacuolization in the in interstitial area (white arrows) (E), interstitial oedema (white asteriks), and tubular degeneration (black arrows) (F), deterioration in the seminiferous tubule epithelium and shedding of spermatogenic serial cells into tubular lumens (white arrows) (G), arrested spermatocytes at different stages of spermatogenesis (H), C: H&E; x20. D: H&E; x10, E, F, G, H: H&E; X40. In TET+ AR1254 group (I-L) deterioration in seminiferous tubules, vascular congestion and oedema in interstitial area (I) shedding of spermatogenic serial cells into tubular lumens (white arrows) (J), the rate of arrested spermatocytes at different stages of spermatogenesis (white arrows) (K) and interstitial vacuolisation (white arrows) (L) was decreased markedly), A: H&E; x20., B, C, D: H&E; X40.

In morphometric measurements the germinal layer thickness and the tubular diameter of the control and TET groups did not exhibit any significant differences as shown Table 1. A significant decrease was observed in seminiferous tubule diameters of the

groups treated with AR1254 ( $p < 0.0001$ ). TET reduced the morphometric effects of AR1254; with  $p$ -value of ( $p < 0.0001$ ). Testicular seminiferous tubules were analyzed as intact (normal), degenerated, and atrophic tubules. The higher rates of atrophic tubules in the AR1254 group decreased significantly with TET treatment as shown in Table 2. Curative effects were observed in testicular tissues of all animals in the AR1254+TET group



**Figure 2:** Caspase-3 immunoreactivity in seminiferous tubules of Control (A), AR 1254 (B), AR 1254+ TET (C) and TET (D) groups. Caspase-3; X40.

#### Immunohistochemical results

Immunoreactivity of Caspase-3 in seminiferous tubule cells were evaluated. Caspase-3 positive cells were not detected in the TET and control groups. The intensity of caspase-3 positive cells was dramatically high in the AR1254 group. The ratio of immunoreactive caspase-3 positive stained cells was less in the AR1254 + TET group as indicated in Figure 2A,B,C,D.

#### Organ weights and sperm parameters

As shown in Table 3, there was no statistically significant difference in weight data among all groups (testis, epididymis, seminal vesicle, prostate tissues).

Sperm parameters in all groups were presented in Table 4. The results showed that AR1254 caused a decrease in epididymal sperm concentrations and sperm motility and an increase in abnormal sperm ratios. The TET treatment significantly increased

**Table 3:** Testis weights, epididymal weights, seminal vesicle weight and prostate weights in study groups

Groups	Testis weight (g)		Epididymal weight (g)		Seminal vesicle weight (g)	Prostate weight (g)
	Right	Left	Right	Left		
Control	1.285±0.02	1.307±0.03	0.615±0.03	0.571±0.04	1.419±0.09	0.486±0.03
AR1254	1.330±0.05	1.348±0.043	1.348±0.043	0.547±0.03	1.365±0.09	0.498±0.02
TET	1.350±0.04	1.362±0.02	1.362±0.02	0.509±0.01	1.224±0.10	0.430±0.03
AR1254 + TET	1.362±0.06	1.414±0.03	1.414±0.03	0.609±0.01	1.069±0.01	0.374±0.03

There was no statistically significant difference in weight data among all groups

**Table 4:** Epididymal sperm concentration, sperm motility and abnormal sperm rate in study groups

Groups	Sperm motility(%)	Epididymal sperm concentration (million g/tissue)	Abnormal sperm rate (%)		
			Head	Tail	Total
Control	85.73±2.08 <sup>a</sup>	234.50±8.48 <sup>a</sup>	4.57±0.29 <sup>a</sup>	4.42±0.29 <sup>a</sup>	9.00±0.37
AR1254	58.85±1.85 <sup>b</sup>	139.28±6.77 <sup>b</sup>	9.85±0.50 <sup>b</sup>	8.85±0.59 <sup>b</sup>	18.71±0.47
TET	92.85±1.48 <sup>a</sup>	301.78±5.28 <sup>c</sup>	4.57±0.29 <sup>a</sup>	4.14±0.45 <sup>a</sup>	8.71±0.68
AR1254 + TET	80.57±1.25 <sup>a</sup>	185.71±8.75 <sup>d</sup>	7.28±0.47 <sup>c</sup>	6.85±0.55 <sup>c</sup>	14.14±0.82

It shows the statistical difference (p≤0,01) between groups a,b,c and d in the same column.

sperm motility and concentration, but the ameliorative effect of on abnormal sperm ratios were not statistically significant.

### Biochemical results

The biochemical parameters are presented in Table 5. As a result of oxidative damage, the testicular TBARS level was significantly increased in the Aroclor 1254 group. Administration of AR1254 caused a statistical decrease in the GPx, SOD, CAT and GSH levels. TET treatment resulted in a significant decrease in the TBARS level and an increase in the GPx SOD, CAT and GSH levels in the TET +AR1254 group. There was no statistical difference in biochemical parameters between the control group and the TET group.

### DISCUSSION

Water resources in the world have become a threat to human health depending on the behavior of people towards nature. Polychlorinated biphenyls, which are used in industry and agriculture, are transmitted into the environment by mixing sewage and chemical wastes into the water (6). Due to their persistence in nature and their accumulation in the fat tissue

of animals and humans, by contaminating the food chain, they pose many negative effects on nature and human health (28, 29).

In this study Aroclor 1254 was used as a toxic agent in order to induce testicular damage under experimental conditions. The ameliorative effects of TET on the reproductive system were investigated based on histological, spermatological and oxidative parameters to provide a novel pharmacological perspective in attempts to promote reproductive health.

Many studies have shown that AR 1254 and other PCB compounds cause reproductive damage through histological, spermatological and biochemical changes and damage to the testicular structures (9, 11, 30, 31). Hsu et al. demonstrated that PCBs led to a decrease in motility, concentration and sperm attachment to oocyte and penetration and an increase in abnormal sperm rate (30). Likewise, Erkekoglu P. et al showed that an AR1254 (15 mg/kg) injection resulted in a decrease in epididymal sperm concentrations, sperm motility and testis tissues weight (32). In another study, Moreno et al. reported an increase in sperm abnormalities and a significant reduction in sperm count in

**Table 5:** The levels of SOD, CAT, GPx, GSH and TBARS in testicular tissue of rat in study groups

	Control (Mean±SD)	AR1254 (Mean±SD)	TET (Mean±SD)	AR1254 + TET (Mean±SD)
TBARS(nmol/g tissue)	5.31±0.91 <sup>a</sup>	8.70±1.03 <sup>b</sup>	4.98±0.81 <sup>a</sup>	6.05±0.14 <sup>c</sup>
GSH (nmol/ml)	130.2±4.7 <sup>ac</sup>	89.6±5.2 <sup>b</sup>	143.1±6.1 <sup>a</sup>	125.8±4.5 <sup>c</sup>
CAT (k/mg protein)	0.034±0.005 <sup>a</sup>	0.019±0.002 <sup>b</sup>	0.039±0.007 <sup>a</sup>	0.024±0.003 <sup>d</sup>
SOD (U/mg protein)	42.1±2.01 <sup>a</sup>	24.6±2.69 <sup>b</sup>	39.9±1.97 <sup>a</sup>	33.6±2.41 <sup>c</sup>
GPx (U/mg protein)	247.1±23.2 <sup>a</sup>	171.4±19.1 <sup>b</sup>	219± 21.7 <sup>c</sup>	198.7±20.3 <sup>d</sup>

It shows the statistical difference (p≤0,01) between groups a,b,c in the same column



mice with AR 1254 (50/500 µg/kg) whereas there was no meaningful change in testicular and epididymal weights (33). Similarly, previous studies found that the administration of AR1254 caused a reduction in epididymal sperm concentration, sperm motility and increased abnormal sperm ratios and there was no statistically significant difference in testes, epididymis, seminal vesicle and prostate weights. In the AR1254+TET group, a remarkable increase in sperm quality, motility and concentration, and reduction in the abnormal sperm ratio (Head, tail, total) were observed. Administration of TET significantly ameliorated the toxicity of AR1254 in spermatogenesis.

It has been indicated in previous research that PCBs exposure led to morphological damage in testicular tissues (12, 13, 33, 34). Jia X et al. showed that; AR1254 administration in rats (1 or 3mg/kg 21 days) and primer culture Sertoli cells (5 or 10µg/ml - 48h) could cause the blood–testis barrier disruption via p38 MAPK pathway (34). Sangalang et al. indicated that AR 1254 led to histopathological damages such as disorganization in testicular lobules and spermatogenic cells, reduction of spermatogenesis, fibrosis and necrosis of the lobule walls (35). Oskam et al. reported that degenerative seminiferous tubules, decrease in seminiferous epithelial thickness, increase in intercellular spaces, and deterioration in spermiogenesis and cells with pycnotic nuclei in testicular tissue (36). In addition, Ateşşahin et al. reported a reduction in spermatogenic cells, degeneration, desquamation, disorganization, interstitial oedema and congestion in seminiferous tubule of rats treated with AR 1254 (13). Consistent with the findings of previous studies, this research observed that tubular degeneration and reduction in spermatogenic cells, arrest spermatocytes at different stages of spermatogenesis, the shedding of spermatogenic serial cells into tubular lumens, vascular congestion in tunika albuginea layer and interstitium, interstitial oedema and vacuolization in testis tissue were induced with AR1254 administration. Moreover this study observed that AR 1254 administration caused a decrease in tubular diameter and tubular epithelial thickness similar to Ateşşahin et al findings (13). In the AR1254+TET group, TET treatment significantly improved testicular damage. Tubular epithelial thickness and tubular diameter values increased significantly compared to the AR1254 group. The mechanism underlying the therapeutic effects of TET on testicular tissue is not yet clear, but it may be related to inducing autophagy and cell cycle arrest, inhibiting oxidative stress, improving metastasis and suppressing tumor cell growth (37).

Apoptosis is a physiological process of cell death that plays a crucial role in homeostasis. Apoptosis is characterized by DNA fragmentation, nuclear fragmentation, chromatin condensation, and cell shrinkage. Although apoptosis is thought to be a homeostatic mechanism for maintaining cell populations in tissues, previous studies have shown that many factors are involved in this process, including reactive oxygen species, death factors, and toxic agents. The imbalance of these factors leads to the formation of autoimmune diseases, neurodegenerative diseases and many types of cancer (38). Mitochondrial damage from oxidative stress, a potent mediator of apoptosis, causes

cytochrome C release, caspase activation, and apoptotic death. Caspases initiate apoptosis by activating the proteolytic cleavage cascade. Caspase 3, a protease that is activated in the early stages of apoptosis, is one of 14 members of the caspase family (39). It is known that PCB 132 and AR1254 administrations increase pro-apoptotic molecules caspase-3 and caspase-9 activities in testicular tissue of rats (13, 30, 40). Studies have shown that TET initiates apoptosis by inducing caspase-3 activation in tumor cell lines. In vitro, administration of TET at high concentrations induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells, while administration at low concentrations stimulates autophagy and has an antitumor effect (41, 42). Apoptotic cells were evaluated by caspase-3 immunoreactivity in our study. Compared to AR1254+TET, the intensity of caspase-3- positive staining was higher in the AR1254 group. The decrease in the rate of apoptotic cells in the TET + AR1254 group can be explained by the inhibition of oxidative stress by TET.

Oxidative stress is defined as disruption of the balance between antioxidants and reactive oxygen species (ROS). The effect of the antioxidant system protects cells from damage caused by free radicals. TBARS, which formed as a result of peroxidation of lipid and causes damage to cells, is one of the most important markers of oxidative stress. Due to high content polyunsaturated fatty acids, testis tissue is under the effects of oxidative stress (43,44). It is known that antioxidant parameters such as SOD, CAT, GPx, GSH reduces free radicals and protects cells against adverse effects of lipid peroxidation. Previous studies showed that Ar1254 application causes an increment in TBARS level and reduction in CAT, SOD, GR, GPx and GSH activities in testis tissue (8, 9, 13, 45). It has also been reported that antioxidant treatments such as Vitamin E, vitamin C, quercetin, zinc, lycopene and ellagic acid in conjunction with the Aroclor administration reduce the level of TBARS and increase activities of CAT, GSH, GSH-Px and SOD (9, 13, 45 -47). Similarly to the findings of previous studies with Aroclor 1254 administration, we have observed remarkable increase in TBARS level and significant decrease in GSH, CAT, GSH-Px, SOD, levels. In the AR+TET group, TET reversed toxic damage of AR1254, TBARS level decreased, SOD, CAT, GSH-Px and GSH levels increased significantly. A review of literature indicated that, there are no previous studies focusing on the mechanism underlying the protective effect of TET against oxidative stress induced by AR1254 in testis tissue. However, it has been reported that TET, a calcium-channel blocker, inhibits lipid peroxidation in the heart, liver, pancreas and brain tissues, reduces the levels of reactive oxygen species (ROS), and suppresses the formation of cytokines and inflammatory mediator(17, 48-50). These findings correlate with the results of biochemical parameters evaluating oxidative stress in our study.

As a result, administration of AR1254 led to histopathological changes, increased apoptotic cells count, abnormal sperm ratios and decreased sperm concentrations and motility, which are caused by oxidative damage. TET treatment significantly reduced the disrupting effects of AR1254, due to its strong antioxidant, radical eliminating and anti-inflammatory properties.

The literature review process of this research indicated that no research has been conducted on the effects of TET on the male reproductive system. The results of this study suggested that TET treatment may be used against AR1254 induced male reproductive toxicity.

**Ethics Committee Approval:** This study was approved by Inonu University Faculty of Medicine Experimental Animal Research Ethics Committee (Date: 28.01.2014, No: 2014/A-01).

**Author Contributions:** Conception/Design of Study- F.Ö., A.Ç.T., O.Ç., M.A., N.B.T.; Data Acquisition- F.Ö., A.Ç.T., O.Ç., M.A., N.B.T.; Data Analysis/Interpretation- F.Ö., A.Ç.T., O.Ç., M.A., N.B.T.; Drafting Manuscript- F.Ö., A.Ç.T., O.Ç., M.A., N.B.T.; Critical Revision of Manuscript- F.Ö., A.Ç.T., O.Ç., M.A., N.B.T.; Final Approval and Accountability- F.Ö., A.Ç.T.; Material and Technical Support- F.Ö., A.Ç.T., O.Ç., M.A., N.B.T.; Supervision- F.Ö., A.Ç.T., O.Ç., M.A., N.B.T.

**Peer Review:** Externally peer-reviewed.

**Conflict of Interest:** Authors declared no conflict of interest.

**Financial Disclosure:** This research was financially supported by the Inonu University Scientific Research Projects Unit (No. 2013/11).

## REFERENCES

- Lilienthal H, Fastabend A, Hany J, Kaya H, Roth-Härer A, Dunemann L, et al. Reduced levels of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 in rat dams and offspring after exposure to a reconstituted PCB mixture. *Toxicol Sci* 2000;57(2):292-301.
- Carpenter DO. Polychlorinated biphenyls and human health. *Int J Occup Med Environ Health* 1998;11(4):291-303.
- Kamrin M, Ringer R. PCB residues in mammals: A review. *Toxicol Environ Chem* 1994;41(1-2):63-84.
- Carpenter DO. Environmental contaminants and human health: the health effects of persistent toxic substances. *Firat Med J* 2005;10(1):1-4.
- Kimbrough RD, Krouskas CA. Human Exposure to Polychlorinated Biphenyls and Health Effects. *Toxicol Rev* 2003;22(4):217-33.
- Mazen NF, Zidan RA. Histological study on the effect of aroclor 1254 on the epididymis of adult rats and the role of L-NAME administration. *Ultrastruct Pathol* 2017;41(2):154-67.
- Krishnamoorthy G, Murugesan P, Muthuvel R, Gunadharini D, Vijayababu M, Arunkumar A, et al. Effect of Aroclor 1254 on Sertoli cellular antioxidant system, androgen binding protein and lactate in adult rat in vitro. *Toxicology* 2005;212(2-3):195-205.
- Murugesan P, Kanagaraj P, Yuvaraj S, Balasubramanian K, Aruldas MM, Arunakaran J. The inhibitory effects of polychlorinated biphenyl Aroclor 1254 on Leydig cell LH receptors, steroidogenic enzymes and antioxidant enzymes in adult rats. *Reprod Toxicol* 2005;20(1):117-26.
- Aly HA, Domènech Ò, Abdel-Naim AB. Aroclor 1254 impairs spermatogenesis and induces oxidative stress in rat testicular mitochondria. *Food Chem Toxicol* 2009;47(8):1733-8.
- Ahmad SU, Tariq S, Jalali S, Ahmad MM. Environmental pollutant Aroclor 1242 (PCB) disrupts reproduction in adult male rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Environ Res* 2003;93(3):272-8.
- Krishnamoorthy G, Venkataraman P, Arunkumar A, Vignesh R, Aruldas M, Arunakaran J. Ameliorative effect of vitamins ( $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid) on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress in rat epididymal sperm. *Reprod Toxicol* 2007;23(2):239-45.
- Alston DA, Tandler B, Gentles B, Smith EE. Testicular histopathology in deer mice (*Peromyscus maniculatus*) following exposure to polychlorinated biphenyl. *Chemosphere* 2003;52(1):283-5.
- Ateşşahin A, Türk G, Yılmaz S, Sönmez M, Sakin F, Çeribası AO. Modulatory effects of lycopene and ellagic acid on reproductive dysfunction induced by polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) in male rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2010;106(6):479-89.
- Ruan L, Huang HS, Jin WX, Chen H-M, Li XJ, Gong Q-J. Tetrandrine attenuated cerebral ischemia/reperfusion injury and induced differential proteomic changes in a MCAO mice model using 2-D DIGE. *Neurochem Res* 2013;38(9):1871-9.
- Zhang J, Yu B, Zhang XQ, Sheng ZF, Li SJ, Wang ZJ, et al. Tetrandrine, an antihypertensive alkaloid, improves the sleep state of spontaneously hypertensive rats (SHRs). *J Ethnopharmacol* 2014;151(1):729-32.
- Yin M-F, Lian LH, Piao D-M, Nan J-X. Tetrandrine stimulates the apoptosis of hepatic stellate cells and ameliorates development of fibrosis in a thioacetamide rat model. *World J Gastroenterol* 2007;13(8):1214-20.
- Chen Y, Tsai YH, Tseng SH. The potential of tetrandrine as a protective agent for ischemic stroke. *Molecules* 2011;16(9):8020-32.
- Murugesan P, Muthusamy T, Balasubramanian K, Arunakaran J. Studies on the protective role of vitamin C and E against polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254)—induced oxidative damage in Leydig cells. *Free Radic Res* 2005;39(11):1259-72.
- Zhong Z, Qian Z, Zhang X, Chen F, Ni S, Kang Z, et al. Tetrandrine prevents bone loss in ovariectomized mice by inhibiting RANKL-induced osteoclastogenesis. *Front Pharmacol* 2020;10:1530.
- Lv Yi, Wu Zz, Chen Lx, Wu Bx, Chen Li, Qin Gc, et al. Neuroprotective effects of tetrandrine against vascular dementia. *Neural Regen Res* 2016;11(3):454-59.
- Türk G, Sönmez M, Aydın M, Yüce A, Gür S, Yüksel M, et al. Effects of pomegranate juice consumption on sperm quality, spermatogenic cell density, antioxidant activity and testosterone level in male rats. *Clin Nutr* 2008;27(2):289-96.
- Ciftci O, Ozdemir I, Aydın M, Beytur A. Beneficial effects of chrysin on the reproductive system of adult male rats. *Andrologia* 2012;44(3):181-6.
- Yagi K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Free radical and antioxidant protocols: Methods Mol Biol*. Springer; 1998. DOI: p. 101-6. 10.1385/0-89603-472-0:10
- Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;82(1):70-7.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in enzymology* 1984;105:121-6.
- Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988;34(3):497-500.
- Beutler E. Red cell metabolism: a manual of biochemical methods. 1984.
- Çakıroğulları GÇ, Seçer S. Poliklorlu Bifeniller ve Sucul Yaşam. *Ankara Üniversitesi Çevre Bilimleri Dergisi* 2011;3(1):73-88.

29. Ahlborg UG, Hanberg A, Kenne K. Risk assessment of polychlorinated biphenyls (PCBs): Document for Risk Assessment, Institute of Environmental Medicine, Stockholm, Sweden; 1992. pp. 46-58.
30. Hsu PC, Li MH, Guo YL. Postnatal exposure of 2, 2', 3, 3', 4, 6'-hexachlorobiphenyl and 2, 2', 3, 4', 5', 6-hexachlorobiphenyl on sperm function and hormone levels in adult rats. *Toxicology* 2003;187(2-3):117-26.
31. Hsu PC, Pan MH, Li LA, Chen CJ, Tsai SS, Guo YL. Exposure in utero to 2, 2', 3, 3', 4, 6'-hexachlorobiphenyl (PCB 132) impairs sperm function and alters testicular apoptosis-related gene expression in rat offspring. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;221(1):68-75.
32. Aydin S, Erkekoglu P, Başaran N, Kocer-Gumusel B. Impact of selenium status on Aroclor 1254-induced DNA damage in sperm and different tissues of rats. *Toxicol Mech Methods* 2018;28(4):252-61.
33. Lopes Moreno JM. Effect of Pcb's (Aroclor 1254) on spermatogenesis In Testis of Mouse 2009. pp.1-61. Available from: <http://www.portaldonhecimento.gov.br/bitstream/10961/67/1/EFFECT%20of%20PCBs%20%28AROCLOR%201254%29%20on%20Spermatogenesis%20in%20testis%20of%20mouse.pdf>
34. Jia X, Xu Y, Wu W, Fan Y, Wang G, Zhang T, et al. Aroclor1254 disrupts the blood–testis barrier by promoting endocytosis and degradation of junction proteins via p38 MAPK pathway. *Cell Death Dis* 2017;8(5):e2823-e. doi: 10.1038/cddis.2017.224
35. Sangalang G, Freeman H, Crowell R. Testicular abnormalities in cod (Gadus morhua) fed Aroclor 1254. *Arch Environ Contam Toxicol* 1981;10(5):617-26.
36. Oskam IC, Lyche JL, Krogenæs A, Thomassen R, Skaare JU, Wiger R, et al. Effects of long-term maternal exposure to low doses of PCB126 and PCB153 on the reproductive system and related hormones of young male goats. *Reproduction* 2005;130(5):731-42.
37. Luan F, He X, Zeng N. Tetrandrine: a review of its anticancer potentials, clinical settings, pharmacokinetics and drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol* 2020;72(11):1491-512.
38. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007;35(4):495-516.
39. Yang GS, Wang W, Wang YM, Chen ZD, Wang S, Fang JJ. Effect of cocaine on germ cell apoptosis in rats at different ages. *Asian J Androl* 2006;8(5):569-75.
40. Mathur PP, Huang L, Kashou A, Vaithinathan S, Agarwal A. Environmental toxicants and testicular apoptosis. *Open Reprod Sci J* 2011;3(1):114-24.
41. Liu C, Gong K, Mao X, Li W. Tetrandrine induces apoptosis by activating reactive oxygen species and repressing Akt activity in human hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2011;129(6):1519-31.
42. Gong K, Chen C, Zhan Y, Chen Y, Huang Z, Li W. Autophagy-related gene 7 (ATG7) and reactive oxygen species/extracellular signal-regulated kinase regulate tetrandrine-induced autophagy in human hepatocellular carcinoma. *J Biol Chem* 2012;287(42):35576-88.
43. Aitken RJ, Roman SD. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Adv Exp Med Biol* 2008;636:154-71.
44. Kaya K, Ciftci O, Aydin M, Cetin A, Basak N. Favourable effect of  $\beta$ -glucan treatment against cisplatin-induced reproductive system damage in male rats. *Andrologia* 2019;51(9):e13342. doi: 10.1111/and.13342
45. Banudevi S, Sharmila M, Murugesan P, Srinivasan N, Balasubramanian K, Aruldas M, et al. Effects of Vitamin C and E on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress, androgen binding protein and lactate in rat Sertoli cells. *Reprod Toxicol* 2004;19(2):201-8.
46. Zhang YMC. Protective effect of quercetin on Aroclor 1254–induced oxidative damage in cultured chicken spermatogonial cells. *Toxicol Sci* 2005;88(2):545-50.
47. Venkataraman P, Sridhar M, Dhanammal S, Vijayababu M, Srinivasan N, Arunakaran J. Antioxidant role of zinc in PCB (Aroclor 1254) exposed ventral prostate of albino rats. *J Nutr Biochem* 2004;15(10):608-13.
48. Koh SB, Ban JY, Lee BY, Seong YH. Protective effects of fangchinoline and tetrandrine on hydrogen peroxide-induced oxidative neuronal cell damage in cultured rat cerebellar granule cells. *Planta Medica* 2003;69(6):506-12.
49. Li YY, Li XL, Yang CX, Zhong H, Yao H, Zhu L. Effects of tetrandrine and QYT on ICAM-1 and SOD gene expression in pancreas and liver of rats with acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003;9(1):155-59.
50. Hui SC, Chan TY, Chen YY. Tetrandrine inhibits lipid peroxidation but lacks reactivity towards superoxide anion and hydrogen peroxide. *Pharmacol Toxicol* 1996;78(3):200-1.



# DEREGULATED EXPRESSIONS OF MYC ALTER THE EXPRESSIONS OF tRNAs IN BREAST CANCER CELLS

## MYC MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE tRNA'LARIN İFADESİNİ REGÜLE EDER

Pervin Elvan TOKGÜN<sup>1</sup> , Onur TOKGÜN<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Pamukkale University, Faculty of Medicine, Department of Medical Genetics, Denizli, Türkiye

ORCID ID: P.E.T. 0000-0001 9025-4140; O.T. 0000-0003-0537-9032

**Citation/Atf:** Tokgun PE, Tokgun O. Deregulated expressions of MYC alter the expressions of tnas in breast cancer cells. Journal of Advanced Research in Health Sciences 2023;6(1):88-95. <https://doi.org/10.26650/JARHS2023-1199491>

### ABSTRACT

**Objective:** The protein synthesis process is started with DNA being transcribed into mRNA in the nucleus, then mRNA is transported to the cytoplasm and attaches to a ribosome in order to be translated into a protein. Protein synthesis not only occurs in the cytoplasm. Mitochondria by itself also has its own genetic system. Therefore mtDNA can be replicated, transcribed, and translated. *MYC* oncogene drives the generation of many cancer types. *MYC* also controls some target genes related to ribosome biogenesis and protein synthesis. Increased expressions of tRNA synthetases have been found to be important players in promoting tumor growth in various types of human cancers. In this study we aimed to identify deregulated expressions of tRNAs that are players both in the nucleus and mitochondria in a *MYC*-dependent manner in breast cancer cells.

**Material and Methods:** Cells were infected with lentiviral *MYC* shRNA/overexpression vectors in order to manipulate *MYC* expressions. TRIZOL reagent was used for RNA isolation and libraries were generated for sequencing. The quality of the RNA samples and libraries was assessed using Agilent BioAnalyzer. Sequencing was performed on the Illumina HT2500 platform.

**Results:** We obtained 6 nuclear-encoded mitochondrial tRNAs and 65 nuclear tRNAs as a result of deregulated expression of *MYC*.

**Conclusion:** This study reveals *MYC*-dependent regulation of tRNAs in breast cancer. Further functional studies are required for underlying molecular mechanisms.

**Keywords:** tRNA, next-generation sequencing, breast cancer

### ÖZ

**Amaç:** Protein sentezi süreci, DNA'nın çekirdekte mRNA'ya kopyalanmasıyla başlar, ardından mRNA, bir proteine çevrilmek üzere sitoplazmaya taşınır ve ribozoma bağlanır. Protein sentezi sadece sitoplazmada gerçekleşmez. Mitokondri de kendi genetik sistemine sahiptir. Bu nedenle mtDNA'da replikasyon, transkripsiyon ve translasyon gerçekleşir. *MYC* onkogeni, birçok kanser türünün gelişimine neden olur. *MYC* ayrıca ribozom biyogenezini ve protein sentezi ile ilgili bazı hedef genleri kontrol eder. tRNA sentetazlarının artan ifadelerinin, çeşitli insan kanseri türlerinde tümör büyümesini desteklemede önemli rolü olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada, nükleus ve mitokondride görev yapan tRNA'ların *MYC*'e bağımlı ifadelerini belirlemeyi amaçladık.

**Gereç ve Yöntem:** Hücreler lentiviral *MYC* overekspresyon/shRNA vektörleri ile infekte edildi. RNA izolasyonu için TRIZOL reaktifi kullanıldı ve yeni nesil dizileme için kütüphaneler hazırlandı. RNA örneklerinin ve kütüphanelerin kalitesi, Agilent BioAnalyzer kullanılarak değerlendirildi. Dizileme, Illumina HT2500 platformunda yapıldı.

**Bulgular:** Meme kanseri hücrelerinde *MYC* ifade değişimine bağlı olarak 65 nükleer tRNA ve 6 nükleer kodlanmış mitokondriyal tRNA saptandı.

**Sonuç:** Bu çalışma, meme kanserinde tRNA'ların *MYC*'e bağımlı regülasyonunu ortaya koymaktadır. Moleküler mekanizmaların aydınlatılması için daha ileri fonksiyonel çalışmalar gereklidir.

**Anahtar Kelimeler:** tRNA, yeni nesil dizileme, meme kanseri

**Corresponding Author/Sorumlu Yazar:** Pervin Elvan TOKGÜN E-mail: [parslan@pau.edu.tr](mailto:parslan@pau.edu.tr)

**Submitted/Başvuru:** 04.11.2022 • **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 04.01.2023 • **Last Revision Received/Son Revizyon:** 04.01.2023

• **Accepted/Kabul:** 04.01.2023 • **Published Online/Online Yayın:** 14.02.2023



This work is licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

## INTRODUCTION

The protein synthesis process is started with DNA being transcribed into mRNA in the nucleus, then mRNA is transported to the cytoplasm and attaches to a ribosome in order to be translated into a protein. In this journey, the ribosome reads the chain of codons in the mRNA strand and tRNA translates each three-base codon on the mRNA into an amino acid which creates a polypeptide, that can be processed into a protein. Transfer RNA is an important player in protein synthesis and besides, they also have important roles in the epigenetic regulation of gene expression in various cancers (1).

Protein synthesis not only occurs in the cytoplasm. Mitochondria by itself also has its own genetic system. Therefore mtDNA can be replicated, transcribed, and translated. The double-stranded and circular mitochondrial genome is within a size of 16.5 kb and contains 37 genes encoding 13 proteins, 2 rRNAs and 22 tRNAs (2). The localization of tRNAs are on both the heavy and light strands of the mitochondrial genome and they are transcribed as long polycistronic precursors (3). The tRNA punctuation model was described in 1981 and this model reveals that coding sequences are generally separated by few nucleotides and long polycistronic precursors are processed into mature mRNA and rRNA by cleavage of the 5' and 3'-ends of the flanking tRNAs. (4). tRNAs participate in the protein translation process that mRNAs are converted into an amino acid chain. In mitochondrial translation, the primary processing occurs through cleavage at the 5' end of tRNA by mitochondrial RNase P4 and 3' end by the mitochondrial RNase Z (5,6). mt-RNase P is composed of mitochondrial RNase P proteins 1,2,3 and MRPP1-3 (7). There are four steps of mitochondrial protein translation including initiation, elongation, termination, and ribosome recycling. Mitochondrial translation mechanisms are much more similar to prokaryotic translation (8). For the mitochondrial protein synthesis, MTIF2, MTIF3 (initiation factors), EFTU, EF-TS, mtEF-G1 (elongation factors), MTRF1L (a release factor), MRRF and EF-G2mt (ribosome recycling factors) are required. A deficiency of protein translation factors, mt-tRNAs, mitochondrial ribosome proteins, etc results in abnormal mitochondrial translation, which is associated with a variety of diseases, such as cancer, nervous system diseases, and cardiovascular diseases (9-13).

The structural changes of mtDNA in encoded protein subunits unshared electron transport function and ROS production increases. Carcinogenesis occurs depending on enhanced oxidative stress related to an increased ROS production in mitochondria (14). Increased expressions of tRNA synthetases have been found to be important players in promoting tumor growth in various types of human cancers (15,16). Many studies suggested the important roles of tRNAs in cancer as potential biomarkers.

*MYC* oncogene drives the generation of many cancer types including breast cancer (17-19). *MYC* amplification and overexpression in breast cancer are related to poor outcomes for the patients (20). *MYC* also controls some target genes that

have roles in ribosome biogenesis and protein synthesis (21). After *MYC* binding sites are identified, transcriptional targets are explored and 400 nuclear genes encoding mitochondrial proteins were found to be targets of *MYC* by chromosomal immunoprecipitation analysis of promoter microarrays including genes related to protein import, mitochondrial ribosome, mitochondrial transcription/translation and complex assembly, whereas 198 genes were induced as a result of ectopic expression of *MYC* (22,23). Besides, *MYC* was found to regulate mitochondrial gene expression indirectly via microRNAs (24).

It has been shown that the regulation of tRNA ligases by *MYC* is imputed as a fundamental contributor to *MYC*-driven cell growth in *Drosophila* (25). Even small RNA sequencing performs successful mapping and alignment of gene transcripts and small RNA types including miRNAs, snRNAs, rRNA, and tRNAs, most workflows have been developed for miRNA analysis. But pipelines for the analysis of transfer RNAs are rare. Besides, the roles of tRNAs on cancer development are not very well known. Both mRNAs and tRNAs are important in protein synthesis. Therefore, in the direction of the knowledge that *MYC* regulates both nuclear and mitochondrial genes, here we aimed to illustrate in breast cancer cells if deregulated expressions of *MYC* also affect the expression levels of tRNAs that are players both in the nucleus and mitochondria.

## MATERIALS and METHODS

### Cell culture

MDA-MB-231 cells are cultured in RPMI1640 Medium (GIBCO, USA) containing heat-inactivated 5% FBS (GIBCO, USA), 1% Penicillin-Streptomycin (GIBCO, USA) and 1% L-glutamine (GIBCO, USA) and MCF-7 cells are cultured in DMEM Medium (SIGMA, USA) containing heat-inactivated 5% FBS (GIBCO, USA), 1% Penicillin-Streptomycin (GIBCO, USA) and 1% L-glutamine (GIBCO, USA) and are incubated at 37°C, with 5% CO<sub>2</sub> and 95% humidity in air.

### Lentivirus infection

Inducible lentiviral overexpression/shRNA vectors were designed by Dr.Onur Tokgun (26). MDA-MB-231 and MCF-7 cells were counted and seeded with 3ml medium. Twenty four hours after, cells were infected with a combination of 20 µl lentivirus and 8 µl Polybrene (Sigma Aldrich). After removing the cell media, cells were washed with PBS (GIBCO) twice and replaced with the RPMI140 medium supplemented with 10% Tet-Free FBS (Clonetech) 24 hours after infection. Cells were selected with puromycin in a concentration of 2 µg/ml and induced with Doxycycline (DOX) in a concentration of 2.0 µg/ml.

### RNA isolation

Total RNA was isolated from MCF-7 DX-/DX+, MDA-MB-231 DX-/DX+ cells in a density of 5x10<sup>7</sup> cells grown on T175 flasks. Cell pellets were lysed in 500 µl TRIzol reagent. Subsequently, 100 µl of chloroform was used for phase separation, 100% isopropanol for RNA precipitation and ice-cold 75% ethanol for washing. RNA was eluted in 30 µl RNase-free water. The RNA integrity and purity were measured with a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

### qRT-PCR

Total RNA was reverse transcribed using a High-capacity cDNA reverse transcription kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). qRT-PCR reactions were prepared using BioRAD iTaQ Universal SYBR Green Master mix. Oligonucleotide sequences are as follows: *MYC*, F: CTTCTCTCCGCTCGGATTCT R: GAAGGTGATC-CAGACTCTGACCTT; *GAPDH*, F: AGGTCGGTGTGAACGGATTG R: GGGGTCGTTGATGGCAACA. *GAPDH* was used as an endogenous control. mRNA expression of *Myc* between DX+ versus DX- was measured using Eq. 2- $\Delta\Delta C_t$ .

### Small RNA sequencing

Small RNA sequencing was performed at the MacroGen company (South Korea) using the Illumina HT2500 platform. The RNA yield and size distribution of the libraries were analyzed with an Agilent 2100 Bioanalyzer. Libraries generated from 50 ng/ $\mu$ L total RNA samples using the SMART-seq v4 (Takara, America). First, poly(A) tail is added to input RNA using Poly(A) Polymerase in order to facilitate oligo(dT)-primed cDNA synthesis. Then adapter-linked RNA fragments are transformed into cDNA fragments and followed by PCR purification. The sizes of the amplified cDNA fragments were checked using a Bioanalyzer DNA High sensitivity chip. The cDNA fragments are sequenced according to the read length using the "sequence by synthesis" method on the Illumina platform.

### Bioinformatic analysis

Raw sequence readings were filtered and the adapter sequences were removed from the raw sequence readings using the CutAdapt program. The clipped reads are clustered for matching 100% of the sequence and read length. Clustered reads were then aligned with the reference genome (hg19). To classify sRNA types, clustered reads were mapped to the reference genome and non-coding RNA database Rfam v9.1. The expression levels of RNA transcripts in high throughput data are calculated as FPKM (fragments per kilobase of transcript per million reads mapped) (27).

### Statistical analysis

The graphs, calculations, and statistical analyses were performed using GraphPad Prism software version 8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Unpaired Student's t-test was used for comparisons of differential expressions of *MYC*. Statistical results with \*\*\*\* $p < 0.0001$  were considered as statistically significant.

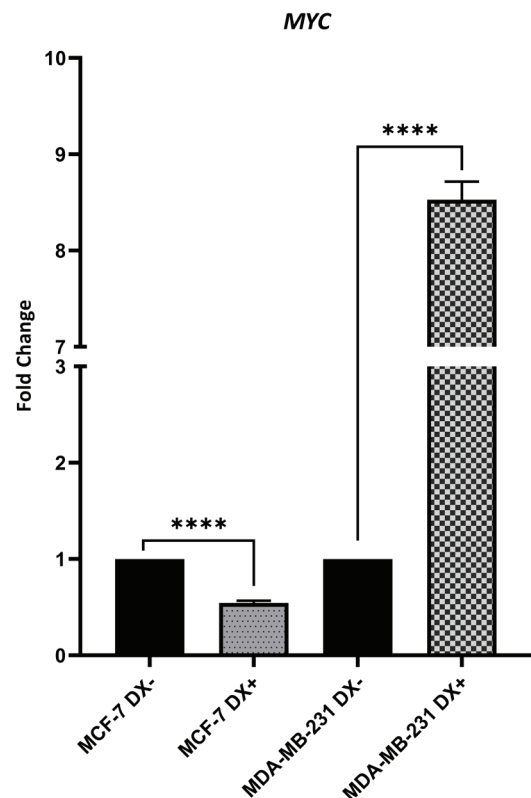
### RESULTS

The deregulated expression levels of *MYC* in breast cancer cells are shown in Figure 1. The total base number, number of readings, GC percentage, Q20 (%), and Q30 (%) were calculated and 3' adapter sequences were removed using the "Cutadapt" program. Sequences smaller than 15 nucleotides were filtered and the reads were matched to the reference genome (hg19), respectively (Table 1). The length analysis of sRNA population was categorized by performing a length analysis.

Rfam v9.1 and Genbank databases were used to determine sRNAs as well as tRNAs. When sRNA sequences are paired with RNAs from Genbank and Rfam databases, tRNAs (MCF-7 DX- 2.71%, MCF-7 DX+ 1.53%, MDA-MB-231 DX- 1% and MDA-MB-231 DX+ 1.66%) was one of the most common sRNA classes in cells. In total, 71 tRNAs were determined, of which 6 of them were nuclear-encoded mitochondrial tRNAs (Table 2). A HeatMap analysis of detected tRNAs are shown in Figure 2.

**Table 1:** Raw Data Statistics and Filtered Number of Reads

Sample	Total Reads	GC (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
MDA-MB-231 DX-	26.377.797	43.03	84.74	79.81
MDA-MB-231 DX+	32.880.597	42.28	82.79	77.62
MCF-7 DX-	34.892.493	39.42	86.16	81.82
MCF-7 DX+	45.257.303	36.98	92.47	89.11
<b>Filtered short reads of less than 15 bases</b>				
MDA-MB-231 DX-	12.245.859	68.76	97.03	93.51
MDA-MB-231 DX+	14.806.966	74.96	97.67	94.72
MCF-7 DX-	13.832.085	78.66	97.42	94.33
MCF-7 DX+	14.696.527	63.74	97.79	95.08



**Figure 1:** Expression levels of *MYC* after *MYC* inhibition/over-expression in breast cancer cells by lentiviral vectors (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

**Table 2:** Deregulated expressions of tRNAs depending on *MYC* manipulation

Gene_Name	tRNA_Type	Position	MDA-MB-231 DX-	MDA-MB-231 DX+	MCF-7 DX-	MCF-7 DX+
nmt-tRNA-Gln-CTG-1-1	Gln-CTG	chr10:20036618-20036674:-	0	3	319	7
nmt-tRNA-Gln-TTG-7-1	Gln-TTG	chr2:131029911-131029982:-	81	113	2964	542
nmt-tRNA-Gln-TTG-9-1	Gln-TTG	chr2:132143133-132143204:+	86	131	3206	628
nmt-tRNA-Leu-TAA-4-1	Leu-TAA	chrX:55207755-55207829:-	1498	325	91	171
nmt-tRNA-Ser-TGA-1-1	Ser-TGA	chr2:131033024-131033093:-	73	121	957	240
nmt-tRNA-Ser-TGA-3-1	Ser-TGA	chr17:22028179-22028247:-	16	56	743	108
tRNA-Ala-AGC-10-1	Ala-AGC	chr6:26687485-26687557:+	1	48	20	3
tRNA-Ala-AGC-4-1	Ala-AGC	chr6:28626014-28626085:-	1	411	98	32
tRNA-Ala-CGC-1-1	Ala-CGC	chr6:26553731-26553802:+	1	406	98	22
tRNA-Ala-CGC-2-1	Ala-CGC	chr6:28641613-28641684:-	1	393	61	23
tRNA-Ala-CGC-3-1	Ala-CGC	chr2:157257281-157257352:+	1	425	72	56
tRNA-Ala-TGC-3-2	Ala-TGC	chr12:125406301-125406372:-	1	392	72	23
tRNA-Ala-TGC-4-1	Ala-TGC	chr12:125424512-125424583:+	1	407	115	65
tRNA-Arg-CCG-1-1	Arg-CCG	chr6:28710729-28710801:-	1	32	121	49
tRNA-Arg-CCG-2-1	Arg-CCG	chr17:66016013-66016085:-	1	882	468	177
tRNA-Arg-CCT-1-1	Arg-CCT	chr17:73030001-73030073:+	1	372	85	38
tRNA-Arg-CCT-4-1	Arg-CCT	chr7:139025446-139025518:+	1	380	249	38
tRNA-Arg-TCG-3-1	Arg-TCG	chr17:73031208-73031280:+	1	31	125	53
tRNA-Arg-TCT-5-1	Arg-TCT	chr6:27529963-27530049:+	1	28	151	33
tRNA-Asp-GTC-1-1	Asp-GTC	chr12:98897281-98897352:+	34	1098	2804	1508
tRNA-Asp-GTC-2-1	Asp-GTC	chr1:161410615-161410686:-	83	1314	3090	2264
tRNA-Asp-GTC-3-1	Asp-GTC	chr6:27551236-27551307:-	83	981	3021	1462
tRNA-Asp-GTC-4-1	Asp-GTC	chr9:77517990-77518061:-	81	947	2730	1356
tRNA-Glu-CTC-1-1	Glu-CTC	chr1:145399233-145399304:-	8	1797	2363	1263
tRNA-Glu-CTC-3-1	Glu-CTC	chr13:42030061-42030132:-	1	577	223	163
tRNA-Glu-TTC-1-1	Glu-TTC	chr2:131094701-131094772:-	6	346	810	240
tRNA-Glu-TTC-2-1	Glu-TTC	chr13:45492062-45492133:-	7	363	873	278
tRNA-Glu-TTC-3-1	Glu-TTC	chr1:17199078-17199149:+	7	1243	2063	684
tRNA-Glu-TTC-4-1	Glu-TTC	chr1:16861774-16861845:-	7	1272	2179	710
tRNA-Gly-CCC-1-1	Gly-CCC	chr1:16872434-16872504:-	53	449	200	133
tRNA-Gly-CCC-5-1	Gly-CCC	chr1:17053780-17053850:+	6	309	109	64
tRNA-Gly-CCC-6-1	Gly-CCC	chr1:149680215-149680275:-	53	380	161	98
tRNA-Gly-GCC-1-1	Gly-GCC	chr1:161413094-161413164:+	59	613	1028	270
tRNA-Gly-GCC-2-1	Gly-GCC	chr1:161493637-161493707:-	59	625	1058	270
tRNA-His-GTG-1-1	His-GTG	chr1:145396881-145396952:-	1	101	226	300
tRNA-Ile-AAT-1-1	Ile-AAT	chr6:58149254-58149327:+	1	116	787	115
tRNA-Ile-AAT-2-1	Ile-AAT	chr6:27655967-27656040:+	1	65	385	57
tRNA-Ile-AAT-5-1	Ile-AAT	chr6:26554350-26554423:+	1	118	787	115
tRNA-Ile-AAT-6-1	Ile-AAT	chr6:26745255-26745328:-	1	65	384	57
tRNA-Ile-AAT-9-1	Ile-AAT	chr6:27241739-27241812:+	1	31	336	12
tRNA-Leu-AAG-1-1	Leu-AAG	chr5:180524474-180524555:-	1	196	113	33
tRNA-Leu-AAG-2-1	Leu-AAG	chr5:180614701-180614782:+	1	187	137	36

tRNA-Leu-AAG-3-1	Leu-AAG	chr6:28956779-28956860:+	1	237	122	36
tRNA-Leu-AAG-4-1	Leu-AAG	chr6:28446400-28446481:-	1	156	108	25
tRNA-Leu-CAA-1-2	Leu-CAA	chr6:28908830-28908934:+	1	129	43	9
tRNA-Leu-CAA-2-1	Leu-CAA	chr6:27573417-27573524:-	1	154	34	8
tRNA-Leu-CAA-3-1	Leu-CAA	chr6:27570348-27570454:-	1	178	36	9
tRNA-Leu-CAA-4-1	Leu-CAA	chr1:249168054-249168159:+	1	158	34	8
tRNA-Leu-TAG-1-1	Leu-TAG	chr17:8023632-8023713:-	1	197	113	33
tRNA-Leu-TAG-2-1	Leu-TAG	chr14:21093529-21093610:+	1	185	135	34
tRNA-Lys-CTT-1-1	Lys-CTT	chr14:58706613-58706685:-	2	76	501	34
tRNA-Lys-CTT-2-1	Lys-CTT	chr1:145395522-145395594:-	1	92	496	35
tRNA-Lys-CTT-3-1	Lys-CTT	chr16:3207406-3207478:-	1	69	484	30
tRNA-Lys-CTT-4-1	Lys-CTT	chr16:3241501-3241573:+	3	71	507	37
tRNA-Lys-CTT-5-1	Lys-CTT	chr16:3230555-3230627:-	1	57	423	22
tRNA-Lys-CTT-chr7-30	Lys-CTT	chr7:96770888-96770952:-	1	41	402	20
tRNA-Lys-TTT-1-1	Lys-TTT	chr16:73512216-73512288:-	1	123	156	19
tRNA-Lys-TTT-2-1	Lys-TTT	chr11:122430655-122430727:+	1	126	163	21
tRNA-Lys-TTT-3-1	Lys-TTT	chr1:204475655-204475727:+	1	123	91	19
tRNA-Lys-TTT-5-1	Lys-TTT	chr11:59323902-59323974:+	1	107	85	14
tRNA-Lys-TTT-6-1	Lys-TTT	chr6:27302769-27302841:-	1	107	59	11
tRNA-Met-CAT-1-1	Met-CAT	chr8:124169470-124169542:-	1	64	498	105
tRNA-Met-CAT-6-1	Met-CAT	chr16:87417628-87417700:-	1	52	231	78
tRNA-Pro-AGG-1-1	Pro-AGG	chr16:3241989-3242060:+	50	2743	303	253
tRNA-Pro-TGG-1-1	Pro-TGG	chr14:21101165-21101236:+	59	3210	334	240
tRNA-Pro-TGG-3-1	Pro-TGG	chr5:180615854-180615925:-	59	3283	343	282
tRNA-Ser-AGA-chr11-8	Ser-AGA	chr11:103274966-103275035:+	46	100	1170	217
tRNA-Tyr-GTA-chr1-127	Tyr-GTA	chr1:566376-566441:-	288	182	426	569
tRNA-Tyr-GTA-chr14-8	Tyr-GTA	chr14:32954018-32954083:+	280	163	398	527
tRNA-Tyr-GTA-chr21-2	Tyr-GTA	chr21:10492972-10493037:-	288	182	426	569
tRNA-Val-CAC-10-1	Val-CAC	chr1:17006501-17006573:-	1	149	71	14

## DISCUSSION

Enhanced protein synthesis and proliferation are properties of tumor cells. Even though the translation machinery components were found to be dysregulated in cancer, the role of tRNAs has not been established well. Recently, genome-wide expressions of differential tRNAs in breast cancer were investigated using high throughput technologies. Functional and phenotypic characterization has been performed by transcriptome analyses. Therefore, tRNAs are believed to play important roles in the regulation and progression of breast cancer and they can be expected as promising prognostic biomarkers (11).

In our study we investigated the *MYC*-dependent deregulated expressions of tRNAs in breast cancer cells by using next-generation sequencing and bioinformatic analysis revealed that 6 out of 71 tRNAs were nuclear-encoded mt-tRNAs.

In the tRNA nomenclature, tRNA-Amino acid refers to the type of tRNA to be charged with an amino acid (28,29). Our results

have shown that nmt-tRNA-Gln anticodon CTG and TTG were found to be deregulated. Sangha et al. demonstrated that tRNA<sup>Gln</sup> showed a median decrease and was downregulated in several cancers (30). We observed that tRNA<sup>Ser</sup> was deregulated depending on *MYC*. Serine tRNAs (tRNA<sup>Ser</sup>) are found to be overexpressed in breast tumors resulting in poor prognosis and an increased risk of recurrence (31).

Our results also demonstrated that upon *MYC* overexpression the level of tRNA<sup>Leu</sup> was downregulated and vice versa for *MYC* inhibition. Leucyl-tRNA synthetase was reported as a tumor suppressor in breast cancer (32). Despite the fact that *MYC* amplification is correlated with malignant phenotypes it masks the effect of the tumor suppressor as for tRNA<sup>Leu</sup>.

Although RNAseq approaches have many advantages like the characterization of transcriptomes, there are also some limitations especially in providing an absolute quantification for the transcripts. With the advance of small RNA sequencing,



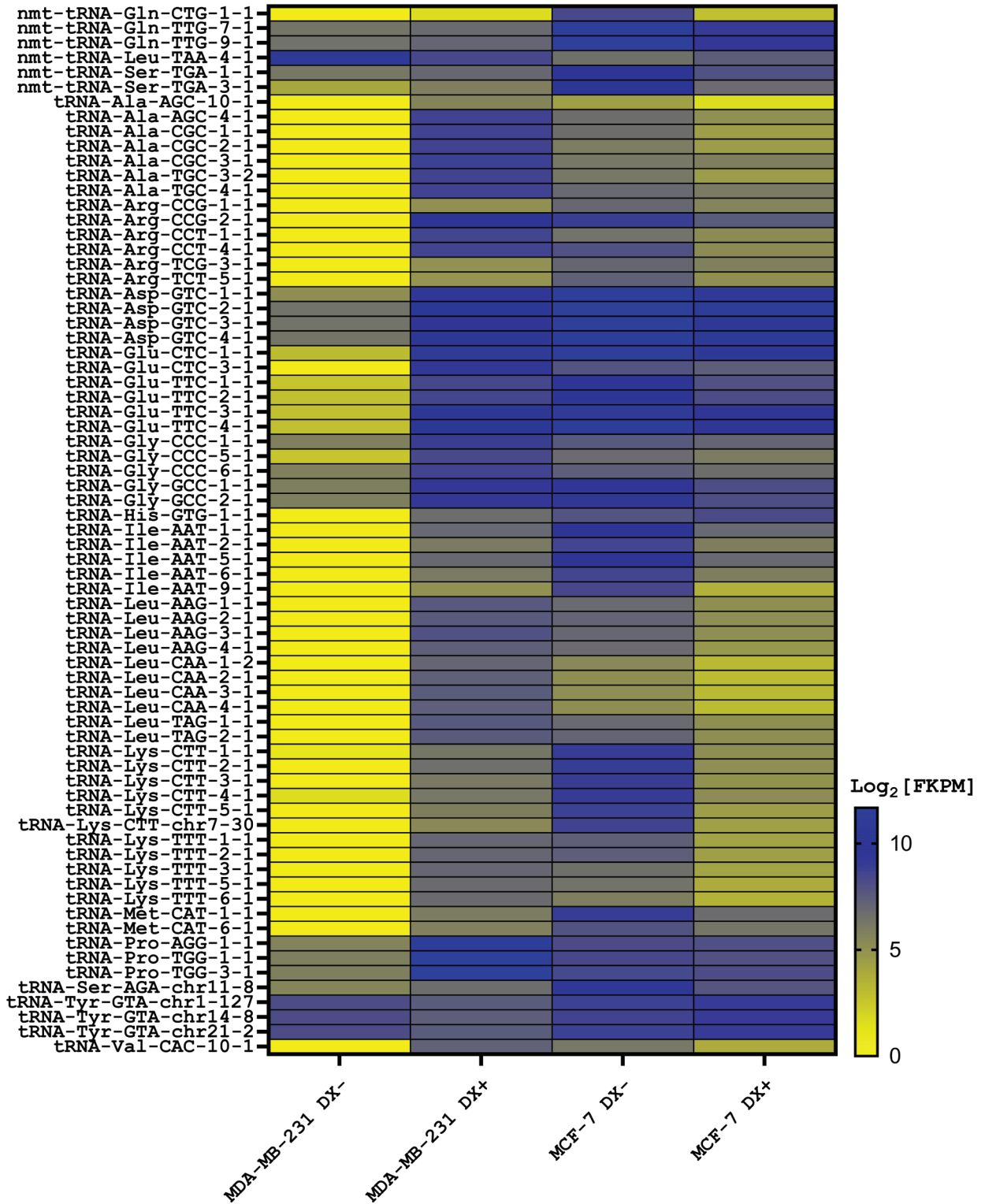


Figure 2: HeatMap Analysis of detected tRNAs in breast cancer cells

it is possible to quantify tRNA gene expression but the limitation is that because of the complexity of tRNA structure sequencing, biases can arise, and also it could be challenging to discriminate reads from mature tRNAs or precursor tRNAs. But nevertheless, small RNA sequencing data are in use for tRNA expressions (33,34).

This study reveals the deregulated expressions of tRNAs including nuclear-encoded mt tRNAs in breast cancer depending on *MYC* overexpression/inhibition. Functional studies are required for underlying molecular mechanisms.

---

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

**Peer Review:** Externally peer-reviewed.

**Conflict of Interest:** Authors declared no conflict of interest.

**Financial Disclosure:** This study is supported by Pamukkale University Scientific Research Department (Project no: 2016HZDP006).

## REFERENCES

- Gupta T, Malkin MG, Huang S. tRNA function and dysregulation in cancer. *Front Cell Dev Biol* 2022;1;10:886642.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981;290(5806):457-65.
- Montoya J, Christianson T, Levens D, Rabinowitz M, Attardi G. Identification of initiation sites for heavy-strand and light-strand transcription in human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79(23):7195-9;
- Ojala D, Montoya J, Attardi G. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* 1981;290(5806):470-4.
- Takaku H, Minagawa A, Takagi M, Nashimoto M. A candidate prostate cancer susceptibility gene encodes tRNA 3' processing endoribonuclease. *Nucleic Acids Res* 2003;31(9):2272-8
- Gagliardi D, Stepien PP, Temperley RJ, Lightowlers RN, Chrzanowska-Lightowlers ZM. Messenger RNA stability in mitochondria: different means to an end. *Trends Genet* 2004;20(6):260-7.
- Holzmann J, Frank P, Löffler E, Bennett KL, Gerner C, Rossmanith W. RNase P without RNA: identification and functional reconstitution of the human mitochondrial tRNA processing enzyme. *Cell* 2008;135(3):462-74
- Koripella RK, Sharma M, Risteff P, Keshavan P, Agrawal RK. Structural insights into unique features of the human mitochondrial ribosome recycling. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2019;116(17):8283-8
- De Silva D, Tu YT, Amunts A, Fontanesi F, Barrientos A. Mitochondrial ribosome assembly in health and disease. *Cell Cycle* 2015;14(14):2226-50
- Kwon NH, Lee JY, Kim S. Role of tRNAs in Breast Cancer Regulation. *Adv Exp Med Biol* 2021;1187:121-45
- Pavon-Eternod M, Gomes S, Geslain R, Dai Q, Rosner MR, Pan T. tRNA over-expression in breast cancer and functional consequences. *Nucleic Acids Res* 2009;37(21):7268-80.
- Ferrari A, Del'olio S, Barrientos A. The diseased mitoribosome. *FEBS Lett* 2020;595(8):1025-61.
- Kummer E, Ban N. Mechanisms and regulation of protein synthesis in mitochondria. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2021;22(5):307-25.
- Cheung EC, Vousden KH. The role of ROS in tumour development and progression. *Nat Rev Cancer* 2022;22(5):280-97.
- Park SG, Schimmel P, Kim S. Aminoacyl tRNA synthetases and their connections to disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(32):11043-9.
- Hyeon DY, Kim JH, Ahn TJ, Cho Y, Hwang D, Kim S. Evolution of the multi-tRNA synthetase complex and its role in cancer. *J Biol Chem* 2019;294(14):5340-51.
- Green AR, Aleskandarany MA, Agarwal D, Elsheikh S, Nolan CC, Diez-Rodriguez M, et al. *MYC* functions are specific in biological subtypes of breast cancer and confers resistance to endocrine therapy in luminal tumours. *Br J Cancer* 2016;114(8):917-28.
- Tokgun O, Tokgun PE, Inci K, Akca H. lncRNAs as potential targets in small cell lung cancer: *MYC* -dependent regulation. *Anticancer Agents Med Chem* 2020;20(17):2074-81.
- Dardenne E, Beltran H, Benelli M, Gayvert K, Berger A, Puca L, et al. N-Myc Induces an EZH2-Mediated Transcriptional Program Driving Neuroendocrine Prostate Cancer. *Cancer Cell* 2016;30(4):563-77.
- Xu J, Chen Y, Olopade OI. *MYC* and Breast Cancer. *Genes Cancer* 2010;1(6):629-40.
- Dang CV. *MYC*, metabolism, cell growth, and tumorigenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3(8):a014217.
- Kim J, Lee JH, Iyer VR. Global identification of *Myc* target genes reveals its direct role in mitochondrial biogenesis and its E-box usage in vivo. *PLoS One* 2008;3(3):e1798.
- Seitz V, Butzhammer P, Hirsch B, Hecht J, Gütgemann I, Ehlers A, Lenze D, Oker E, Sommerfeld A, von der Wall E, König C, Zinser C, Spang R, Hummel M. Deep sequencing of *MYC* DNA-binding sites in Burkitt lymphoma. *PLoS One* 2011;6(11):e26837.
- Dang CV. *MYC*, microRNAs and glutamine addiction in cancers. *Cell Cycle* 2009;8(20):3243-5.
- Zirin J, Ni X, Sack LM, Yang-Zhou D, Hu Y, Brathwaite R, Bulyk ML, Elledge SJ, Perrimon N. Interspecies analysis of *MYC* targets identifies tRNA synthetases as mediators of growth and survival in *MYC*-overexpressing cells. *PNAS* 2019;116(29):14614-9.
- Tokgun O, Fiorentino FP, Tokgun PE, Yokota J, Akca H. Design of a Lentiviral Vector for the Inducible Expression of *MYC*: A New Strategy for Construction Approach. *Mol Biotechnol* 2017;59(6):200-6.
- Conesa A, Madrigal P, Tarazona S, Gomez-Cabrero D, Cervera A, McPherson A, Szczesniak MW, Gaffney DJ, Elo LL, Zhang X, Mortazavi A. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biol* 2016;17(13):2-19.
- Goodenbour JM, Pan T. Diversity of tRNA genes in eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 2006;34(21):6137-46.
- Goodarzi H, Nguyen HC, Zhang S, Dill BD, Molina H, Tavazoie SF. Modulated expression of specific tRNAs drives gene expression and cancer progression. *Cell* 2016;165(6):1416-27
- Sangha AK, Kantidakis T. The aminoacyl-tRNA synthetase and tRNA expression levels are deregulated in cancer and correlate independently with patient survival. *Curr Issues Mol Biol* 2022;44(7):3001-17.

31. Santos M, Fidalgo A, Varanda AS, Soares AR, Almeida GM, Martins D, et al. upregulation of tRNA-Ser-AGA-2-1 promotes malignant behavior in normal bronchial cells. *Front Mol Biosci* 2022;9:809985.
32. Passarelli MC, Pinzaru AM, Asgharian H, Liberti MV, Heissel S, Molina H, Goodarzi H, Tavazoie SF. Leucyl-tRNA synthetase is a tumour suppressor in breast cancer and regulates codon-dependent translation dynamics. *Nat Cell Biol* 2022;24(3):307-15.
33. Hoffmann A, Fallmann J, Vilardo E, Mörl M, Stadler PF, Amman F. Accurate mapping of tRNA reads. *Bioinformatics* 2018;34(7):1116-24.
34. Torres AG, Reina O, Stephan-Otto Attolini C, Ribas de Pouplana L. Differential expression of human tRNA genes drives the abundance of tRNA-derived fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019;116(17):8451-6.

# EVALUATION OF MAXILLARY AND MANDIBULAR RIGHT AND LEFT SIDE TOOTH SIZE DISCREPANCIES IN AVERAGE AND HIGH BOLTON GROUPS

## NORMAL VE YÜKSEK BOLTON GRUPLARINDA MAKSİLLER VE MANDİBULAR SAĞ VE SOL DİŞ BOYUT FARKLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Feyza HACIĞAOĞLU AKKIZ<sup>1</sup> , Evren ÖZTAŞ<sup>1,2</sup> 

<sup>1</sup>Istanbul University, Institute of Graduate Studies in Health Sciences, Department of Orthodontics, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup>Istanbul University, Faculty of Dentistry, Department of Orthodontics, İstanbul, Türkiye

ORCID ID: F.H.A. 0000-0003-1585-2719; E.Ö. 0000-0001-9095-0525

**Citation/Atf:** Hacıgaoğlu Akkiz F, Öztas E. Evaluation of Maxillary and Mandibular Right and Left Side Tooth Size Discrepancies in Average and High Bolton Groups. *JouJournal of Advanced Research in Health Sciences* 2023;6(1):96-101. <https://doi.org/10.26650/JARHS2023-1122152>

### ABSTRACT

**Objective:** Evaluating the effects of maxillary and mandibular right and left side tooth size discrepancies on achieving dental midline symmetry and favorable orthodontic occlusion.

**Materials and Method:** 90 pretreatment dental casts, selected randomly and in permanent dentition, were grouped according to the Bolton analysis as Average Bolton Group (ABG; n:67) and High Bolton Group (HBG; n:23). To designate the left and right dentition size asymmetries and calculate the mesiodistal width of the mandibular and maxillary teeth, a digital caliper was used on orthodontic casts. The hypothesis was tested using a statistical hypothesis test. To statistically compare ABG and HBG groups, the independent samples “t” test was used. The results were evaluated at a significance level of  $p<0.05$ .

**Results:** The difference between the total width of the upper right and left dentition was  $0.65\pm 0.55$  mm ( $p<0.05$ ) and the difference between the width of the lower right and left dentition was  $0.55\pm 0.49$  mm ( $p<0.05$ ) in the ABG, while in HBG the difference between the sum of the upper right and left dentition was  $0.55\pm 0.39$  mm ( $p<0.05$ ) and the difference between the sum of the lower right and left dentition was  $0.53\pm 0.43$  mm ( $p<0.05$ ). There were no statistically significant differences between the ABG and HBG ( $p>0.05$ ) according to the independent samples “t” test.

**Conclusions:** The results indicated that there are minimal but statistically significant differences between the right and left mesiodistal tooth width totals both in ABG and HBG that should be considered to attain favorable orthodontic treatment results and dental midline symmetry.

**Key Words:** Bolton analysis, average bolton, high bolton, dental asymmetry, tooth size discrepancy

### ÖZ

**Amaç:** Maksiller ve mandibular sağ ve sol diş boyutlarındaki uyumsuzlukların dental ve orta hat simetrisini sağlama ve uygun ortodontik oklüzyon elde etme üzerindeki etkisini değerlendirmektir.

**Gereç ve Yöntem:** Ortodontik tedavi öncesi daimi dentisyondaki 90 alçı model rastgele seçilmiş ve Bolton analizine göre Normal Bolton Grubu (NBG; n:67) ve Yüksek Bolton Grubu (YBG; n:23) olarak sınıflandırılmıştır. Maksiller ve mandibular dişlerin meziodistal genişliğini ölçmek ve aralarındaki sol ve sağ diş boyutu asimetrisini belirlemek için doğrudan alçı modellerden dijital kumpas ile ölçümler yapılmıştır. Hipotezi test etmek için İstatistiksel Hipotez Testi kullanılmıştır. NBG ve YBG’yi istatistiksel olarak karşılaştırmak için Bağımsız Gruplar “t” testi kullanılmıştır. Sonuçlar  $p<0.05$  anlamlılık düzeyinde değerlendirilmiştir.

**Bulgular:** İstatistiksel hipotez testi sonuçlarına göre, NBG’de üst sağ ve sol dişlerin toplamı arasındaki farkın  $0.65\pm 0.55$  mm, alt sağ ve sol dişlerin toplamı arasındaki farkın ise  $0.55\pm 0.49$  mm ( $p<0.05$ ) bulunurken, YBG’de üst sağ ve sol diş genişliği arasındaki fark  $0.55\pm 0.39$  mm ( $p<0.05$ ) ve alt sağ ve sol diş genişliği arasındaki fark  $0.53\pm 0.43$  mm ( $p<0.05$ ) olarak bulunmuştur. Bağımsız gruplar “t” testi sonucunda, NBG ve YBG arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).

**Sonuç:** Bolton analizi, ideal bir oklüzyon elde etmek için üst ve alt diş boyut uyumsuzluklarını ve oranlarını ifade ederken, bir ortodontik tedavi planında sağ ve sol yarım arklardaki diş boyutu farklılıkları çoğunlukla göz ardı edilmektedir. Sonuçlar hem ABG hem de HBG’de sağ ve sol meziodistal diş genişliği toplamları arasında, uygun ortodontik tedavi sonuçları ve dental orta hat simetrisi elde etmek için dikkate alınması gereken minimal ancak istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğunu göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Bolton analizi, yüksek bolton, normal bolton, dental asimetri, diş boyutu uyumsuzluğu

**Corresponding Author/Sorumlu Yazar:** Feyza HACIĞAOĞLU AKKIZ E-mail: feyzahaciagaoglu@gmail.com

**Submitted/Başvuru:** 27.05.2022 • **Revision Requested/Revizyon Talebi:** 06.06.2022 • **Last Revision Received/Son Revizyon:** 21.11.2022

• **Accepted/Kabul:** 25.11.2022 • **Published Online/Online Yayın:** 28.02.2023



This work is licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

## INTRODUCTION

The main goals of orthodontic treatment are balanced and ideal occlusal relationship and function, dentofacial aesthetics, and long-term stability (1). Ideal occlusion can be defined as occlusion in which centric occlusion is accompanied by a centric relationship, effective chewing, and ideal aesthetics are provided within physiological limits and in harmony with the stomatognathic system (2). In most orthodontic patients, since the discrepancies in the dimensions of the teeth do not allow the teeth to be aligned properly in the dental arch and the ideal occlusal relationship to be formed, these goals are challenging to achieve and require personalized ideal treatment planning (1).

Dental crowding is one of the most common clinical findings seen in orthodontic patients. The causes of dental crowding include developmental incompatibility between the lower and upper jaws, early loss of primary teeth, incompatibility between the mesiodistal diameters of the teeth and arch length of the teeth, functional disorders in the oral and perioral muscles, bad habits and supernumerary teeth (3). Methods that appear as current principles to solve the crowding are transverse jaw expansion, proclination of anterior teeth, extraction of premolars and/or other teeth, intra-arch distalization of teeth, and interproximal enamel reduction.

It has been emphasized that tooth size discrepancy is one of the critical causes of crowding and orthodontic malocclusion, and this discrepancy in tooth dimensions should be eliminated by extraction or interproximal enamel reduction (4). An orthodontically ideal occlusion is a complete orthodontic occlusion when the ratio of the sum of the mesiodistal diameters of the upper and lower 12 teeth determined by Bolton model analysis during orthodontic treatment planning is compatible at the beginning ( $91.3 \pm 1.9\%$ ) and end ( $91.3 \pm 1.9\%$ ) treatment (5). Angle Class I relationship can be obtained with cusp-embasure relationship, overjet, and overbite relationship. Values outside this ratio are an indicator of excess or lack of dental material in the lower or upper dental arch. As a result, it is not possible to reach the optimum overjet, overbite, and Class I canine and molar relationship at the end of orthodontic treatment in patients with tooth size discrepancy.

### Tooth size ratios and occlusion

Studies on tooth size and morphology date back to the early 1900s. G.V. Black was the first to work with tooth dimensions; he measured tooth dimensions and developed tables that are still used today (Figure 1) (6). One type of orthodontic irregularity is tooth size discrepancies. Bolton defined these discrepancies as individual disproportions between tooth sizes (7).

In 1923, Young suggested for the first time that the overbite, especially the deep bite, is affected by the size relationship of the upper teeth to the lower teeth (8). According to Young's study, excessive tooth size in the upper teeth causes deep bites, and excessive tooth size in the lower teeth causes insufficient bite.

In the 1940s, Wheeler published a textbook called Dental Anatomy and Physiology, which has survived to the present day (9). In this book, he investigated the average tooth sizes necessary for the teeth to be placed in the ideal position possible as a result of the measurements he made on a large number of skulls.

Lundstrom examined 319 individuals aged 13 years, randomly selected in 1954 regarding occlusion characteristics, and reported a variation between the mesiodistal widths of the upper and lower teeth (8). Lundstrom created three different tooth size ratios and emphasized that deviations in those particular ratios would affect tooth position, overbite, and overjet (8).

Today, the most well-known tooth size analysis in the orthodontic literature is the analysis by Wayne A. Bolton regarding the mesiodistal tooth size ratios between teeth in the mandible and maxilla (7). While creating its formula, a total of 55 patients, 44 of who had orthodontic treatment without extraction and 11 of whom were untreated, with perfect Angle Class I canine and molar relationships were evaluated and reported at two rates. The total ratio (12 teeth ratio) and the anterior ratio (6 tooth ratio) were obtained by dividing the sum of the mesiodistal widths of the lower anterior six teeth by the sum of the mesiodistal widths of the upper anterior six teeth.

As a result of this procedure, the mean and standard deviation values obtained for the total ratio were  $91.3 \pm 1.91$  and  $77.2 \pm 1.65$  for the anterior ratio. This ratio is defined as the 'Bolton Ratio.' It has been reported that "Bolton Discrepancy" will occur when this harmony between the upper and lower teeth is disrupted. This study concluded that unless the average ratio was obtained between the mesiodistal dimensions of the upper and lower teeth, a suitable occlusal relationship could not be achieved at the end of orthodontic treatment (7).

$$\text{Total Ratio} = \frac{\text{The Sum of mandibular 12}}{\text{The Sum of Maxillary 12}} \times 100$$

$$\text{Anterior Ratio} = \frac{\text{The Sum of Mandibular 6}}{\text{The Sum of Maxillary 6}} \times 100$$

The Total Bolton ratio of patients in the Average Bolton Group without tooth size discrepancy was  $91.3 \pm 1.91\%$ , which was determined as the reference range in Bolton's study, and the total Bolton ratio of patients in the High Bolton Group was greater than  $93.21\%$ . Anterior Bolton Ratio was accepted as  $77.2 \pm 1.65\%$ ; the Anterior Bolton ratio of patients in the High Bolton Group was considered greater than  $78.85\%$  (7).

### Dental midline deviations

Dental midline deviations generally occur due to the posterior crossbite, early loss of deciduous teeth, arch asymmetries, tooth size discrepancies, congenitally missing teeth (retained primary tooth), ankylosis of primary molars, supernumerary teeth, and habits (10-13).

Becker stated that posterior teeth positioned lower than the bite plane (infra-occlusion) may also cause midline deviations



(14). It is suggested that the reason for this is the stretching of the transseptal fibers on the tooth side in infra-occlusion. Loss of one or two primary teeth on the same side or loss of two primary teeth on one side and one primary tooth on the other side also causes deviations in the midline. Dental midline deviations are also observed in unilateral congenital tooth deficiencies or agenesis and the presence of a supernumerary tooth (10-13).

In cases where the face is symmetrical, four different dental midline deviations may be encountered (13):

- The upper dental midline may deviate from the midline of the face.
- The lower dental midline may deviate from the midline of the face.
- Concerning the midline of the face, the upper dental midline may be on one side and the lower dental midline on the other.
- The midlines of the dental arches of both jaws may overlap and deviate from the midline of the face.

A major factor in coordinating symmetry, posterior interdigitation, overbite, and overjet in neutroclusion is the relative harmony in mesiodistal width of the maxillary and mandibular dentitions (28). The importance of this geometric relationship becomes apparent to orthodontists, especially in the finishing stages of a treated case (15).

This study aims to evaluate the effects of mandibular and maxillary right and left semi-arch's tooth size discrepancies on establishing midline symmetry. The null hypothesis of this study is that the sum of maxillary and mandibular right and left side semi-arch dentition widths is equal.

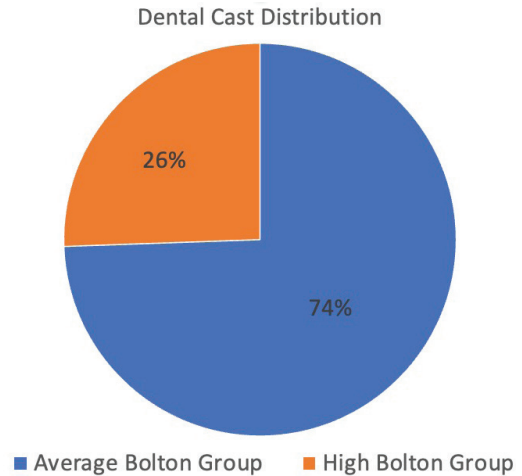
## MATERIAL AND METHODS

In our study, 4927 pretreatment orthodontic dental casts taken from patients in Istanbul University Faculty of Dentistry Department of Orthodontics between 2010 and 2015 were examined. Dental casts were selected according to the following inclusion criteria:

1. Permanent and fully erupted dentition, including second molars
2. Clearly selectable anatomical contours of all teeth
3. Permanent dentition with 6 to 8 mm of crowding both in upper and lower arches
4. Absence of dental fillings on all dental casts
5. Absence of dental caries on all dental casts
6. No broken teeth on all dental casts
7. Absence of severe mesio-distal or occlusal tooth wear on dental casts
8. Absence of teeth with crown and/or bridge prosthesis applied on dental casts
9. Absence of congenital tooth deficiency or shape anomaly on all dental casts

To calculate the estimated sample size, a power analysis was performed using G\*-power 3.1.9.2 software with effect size 0.4858, standard deviation 1.3 (alpha error probability: 0.05), and power of 0.8. The results yielded 60 minimum orthodontic subjects (16).

Ninety pretreatment orthodontic dental casts that met the inclusion criteria were selected randomly. They were grouped according to the Bolton analysis as Average Bolton Group (ABG; n:67) and High Bolton Group (HBG; n:23) as shown in Figure 1.



**Figure 1:** Dental Cast Distribution among Average and High Bolton Groups

The criteria for the formation of the Average and High Bolton Group are shown in Table 1 and Table 2 below.

**Table 1:** Criteria for the formation of the Average and High Bolton Groups according to the Independent Samples "t" test - Total Bolton Ratio ±

Ideal total ratio	Average Bolton Group (n=67)	High Bolton Group (n=23)	IB/ AB	IB/ HB
91.3%±1.91	91.71±1.28	95.28±0.89	NS	*

NS: Not Significant, IB:Ideal Bolton, AB: Average Bolton, HB: High Bolton, \*: p<0.001

**Table 2:** Criteria for the formation of the Average and High Bolton Groups according to the Independent Samples "t" test - Anterior Bolton Ratio

Ideal anterior ratio	Average Bolton Group (n=67)	High Bolton Group (n=23)	IB/ AB	IB/ HB
77.2%±1.65	78.79±2.00	81.07±2.32	NS	*

NS: Not Significant, IB: Ideal Bolton, AB: Average Bolton, HB: High Bolton, \*: p<0.001

The null hypothesis of this research is that the sum of maxillary and mandibular left and right-side dentition widths is equal (Figure 2).

Measurements were performed manually with a digital caliper (Mitutoyo Digimatic Caliper, Japan, model no-500-196-30 CD-6' ASX) directly on orthodontic casts to measure the maxillary and mandibular 6-6 teeth' mesiodistal widths and identify the right and left tooth size discrepancies among them (Figure 3).

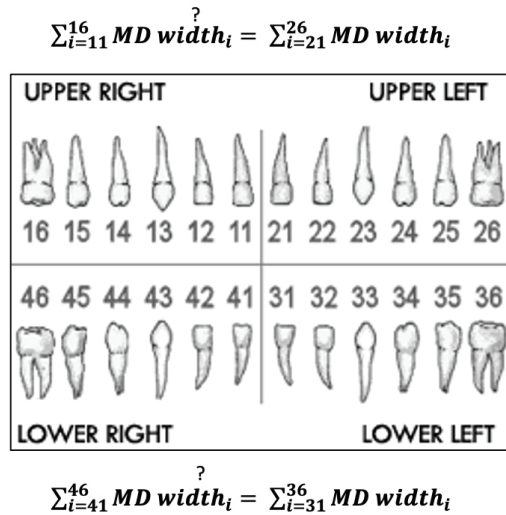


Figure 2: Mesiodistal sums of both maxillary and mandibular semi-arches (17)

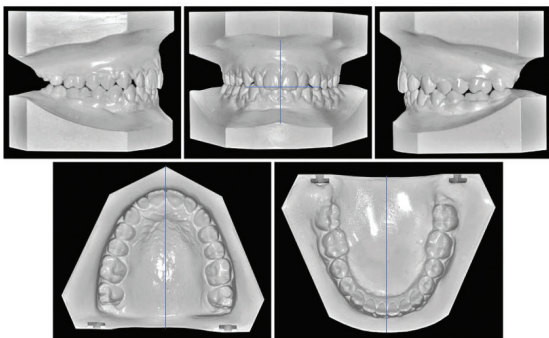


Figure 3: Dental cast samples (18)

To determine the reproducibility and reliability of the measurements, the tooth size values of each dental cast analyzed within the scope of the present study were measured again with a digital caliper 15 days after the first measurements by the same researcher (F.H.A.) (Table 3).

The statistical analyses were performed in this study using the NCSS (Number Cruncher Statistical System, Utah, USA) 2007 statistical software package program. To test the null hypothesis, which states both Average and High Bolton groups have identical mesiodistal teeth widths on both the right and left side, a “Statistical hypothesis test” was used. To compare Average and High Bolton groups statistically, besides descriptive statistical methods (averages, standard deviation), the independent samples “t” test was also used. The results were evaluated at a significance level of  $p < 0.05$ , with a 95% confidence interval.

## RESULTS

The results of method error checking for repeatability of dental cast measurements are shown in Table 3. As can be seen in the

table, the reliability coefficient values (Intraclass Correlation Coefficient) were found over 0.700 (0.965-0.998) in all measurements. The fact that the reliability coefficients were very close to the exact value of 1.00 showed that the measurements could be repeated with a statistically insignificant error.

Table 3: The Results of the Method Error by using the Intraclass Correlation Coefficient (ICC)

		Intraclass Correlation Coefficient (ICC)	95% confidence interval
All Groups	Total Ratio	0.993	0.989-0.995
	Anterior Ratio	0.992	0.987-0.994
Average Bolton Group	Total Ratio	0.984	0.973-0.990
	Anterior Ratio	0.968	0.923-0.987
High Bolton Group	Total Ratio	0.988	0.980-0.992
	Anterior Ratio	0.996	0.990-0.998

In Average Bolton Group: The average value was found to be 0.097 mm for the upper right and left dentition’s mesiodistal width difference. The average value was found to be 0.003 mm for the lower right and left dentition’s mesiodistal width difference. The upper right and left dentition’s mesiodistal width difference was found to be  $0.65 \pm 0.55$  mm ( $p < 0.05$ ), and the lower right and left dentition’s mesiodistal width difference was found  $0.55 \pm 0.49$  mm ( $p < 0.05$ ) (Figure 4).

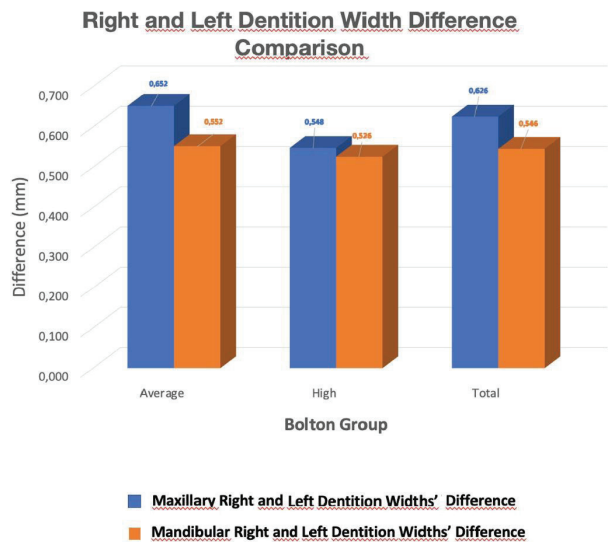


Figure 4: Maxillary and Mandibular Right and Left Dentition Width Difference Comparison according to the independent samples “t” test

In the High Bolton Group: The average value was found to be 0.19 mm for the upper right and left dentition’s mesiodistal width difference. The average value was found to be -0.083 mm for the mesiodistal width difference between the lower right and left dentition. The upper right and left dentition’s

mesiodistal width difference was  $0.55\pm 0.39$  mm ( $p<0.05$ ), and the lower right and left dentition's mesiodistal width difference was  $0.53\pm 0.43$  mm ( $p\leq 0.05$ ) (Figure 4).

There are no statistically significant differences between the Average Bolton Group and High Bolton Group according to the independent samples "t" test shown in Figure 2 ( $p>0,05$ ).

## DISCUSSION

In most orthodontic patients, treatment goals are challenging to achieve because the discrepancies in tooth sizes do not allow the teeth to be aligned properly in the dental arch and to form an ideal occlusal relationship. In 1958, Bolton determined the average total and anterior ratio values required for an ideal lower and upper occlusal relationship (7). Today, it has become a reference for researchers and clinicians concerning treatment planning. The absence of tooth size discrepancy has been identified as the seventh key to ideal occlusion (1). In patients with intra-arch tooth size discrepancy, some material removal from the teeth (interdental enamel reduction) or the addition of some restorative material to the tooth is required to open some space up or close space in the opposite arch. Therefore, it is crucial to determine the amount and location of tooth size discrepancy during the pretreatment phase (1,2,7).

In our study, with the help of a digital caliper on dental casts, the mesiodistal widths of 12 teeth in each of the upper and lower dental arches- from the distal of the first molar to the distal of the other first molar- were calculated. Asquith et al. reported that the difference between the measurements made on the digital model and dental plaster casts was less than 0.5 mm, which was not clinically significant (10, 19). Similarly, Quimby et al. reported that measurements made with digital methods were larger than the measurements made on dental plaster casts (19). Although the difference was small, it was statistically significant but not clinically. It was reported that digital methods could be used besides the measurements on the dental casts being more reliable. Santora et al. also reported that digital measurements were smaller in their research, in which they compared the measurements made on the digital casts and dental plaster casts (20). It has been reported that the difference between the measurements is due to the shrinkage that occurs in the alginate during the transfer of the alginate impression taken to the company. In three-dimensional imaging, the measurements carried out between the selected points by enlarging the contact points may vary depending on the person's clinical experience. Another method used to measure tooth dimensions is the direct intraoral measurement which has been compared with dental cast measurements by researchers in the past years. In those studies, it was stated that the differences between the results of the two methods were insignificant (21-22). In conclusion, considering the cost of the measurements, our retrospective study was done on dental plaster casts since there is no scientifically significant difference between dental plaster casts, digital measurement, and intraoral direct measurement methods.

All Bolton analyses are conducted according to the assumption that the sum of maxillary and mandibular left and right-side

dentition widths is equal. Many researchers focused on the effects of lower and upper teeth ratios on malocclusion in their studies; however, there is a limited number of studies in the literature comparing the sizes of the right and left teeth width on both arches. While some investigators reported significant differences between right and left tooth sizes, some investigators reported that difference was not statistically significant (22,23,27-33). In a study conducted by Ballard et al. with 500 models, it was found that in 90% of cases, there was a tooth discrepancy between the right and left teeth, not less than 0.25 mm and not more than 0.50 mm (34). Lysell and Myrberg reported a difference between right and left tooth sizes in the examination of 580 female and 530 male individuals with primary and permanent dentition models, while Lundström reported that the right and left differences were insignificant in their measurements (8, 35). Garn et al. on the other hand, suggest that asymmetry is more common in the last tooth of each morphological class, and this is more common in cases with congenital third-molar deficiency (36). In our study, we found a significant difference between right and left tooth size, both in the Average and High Bolton groups. The mean Bolton value measured in the Average Bolton group was  $1.11\pm 0.67$  mm, and  $3.72\pm 0.90$  mm in the High Bolton group in our study. In the Average Bolton Group, although there was no significant tooth size discrepancy that prevents ideal occlusion, the difference between the mesiodistal width of the upper right and left semi-arch was found  $0.65\pm 0.55$  mm ( $p<0.05$ ) and the difference between the mesiodistal width of the lower right and left semi-arch was  $0.55\pm 0.49$  mm ( $p<0.05$ ). To provide dental symmetry, interproximal enamel should be reduced to both maxillary and mandibular right semi-arch teeth accordingly to the excessive tooth materials. In the High Bolton Group, besides the  $3.72\pm 0.90$  mm tooth size discrepancy, the upper right and left dentition's mesiodistal width difference was  $0.55\pm 0.39$  mm ( $p<0.05$ ), and the difference between the width of the lower right and left dentition was  $0.53\pm 0.43$  mm ( $p<0.05$ ). To avoid dental asymmetry and equalize right and left tooth size sums, interproximal enamel reduction or tooth extraction must be done accordingly to the right and left tooth width difference.

## CONCLUSION

The null hypothesis was rejected. The results of this study showed both in the Average and High Bolton Group, there were minimal but statistically significant differences between the patient's right and left mesiodistal tooth width totals that must be considered to attain favorable orthodontic treatment results and dental midline symmetry.

To estimate an ideal occlusion, orthodontists refer to Bolton analysis which shows upper and lower tooth size discrepancies. However, tooth size asymmetries on the right and left sides of the dental arch have frequently been underestimated in an orthodontic treatment plan. This difference between right and left dental semi-arches should be considered to obtain ideal orthodontic treatment results and dental midline symmetry.

The difference in the mesiodistal widths of the right and left teeth prevents inter-arch and intra-arch symmetry even if Bolton values are provided. In addition to the Bolton values, the

widths of the right and left teeth should also be calculated and included in orthodontic treatment planning to ensure dental symmetry.

If there is significant asymmetry in the widths of the maxillary or mandibular right and left teeth, stripping large teeth and placing veneers/composite restorations on small teeth will provide symmetry.

**Author Contributions:** Conception/Design of Study- F.H.A.; Data Acquisition- F.H.A.; Data Analysis/Interpretation- F.H.A., E.Ö.; Drafting Manuscript- xx; Critical Revision of Manuscript- E.Ö.; Final Approval and Accountability- F.H.A.; Material and Technical Support- F.H.A.; Supervision- E.Ö.

**Peer Review:** Externally peer-reviewed.

**Conflict of Interest:** Authors declared no conflict of interest.

**Financial Disclosure:** Authors declared no financial support.

## REFERENCES

- Lapenaite E, Lopatiene K. Interproximal enamel reduction as a part of orthodontic treatment. *Stomatologija* 2014;16(1):19-24.
- Ülgen M. Ortodonti Anomaliler, Sefalometri, Etiyoloji, Büyüme ve Gelişim, Tanı. Ankara Üniversitesi Basımevi; 2006.
- McNeill C. Occlusion: what it is and what it is not. *J Calif Dent Assoc* 2000;28(10):748-58.
- Agenter MK, Harris EF, Blair RN. Influence of tooth crown size on malocclusion. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2009;136(6):795-804. doi:10.1016/j.ajodo.2007.12.030
- Hashim HA, Al-Ghamdi S. Tooth width and arch dimensions in normal and malocclusion samples: an odontometric study. *J Contemp Dent Pract* 2005;6(2):36-51.
- Black GV. *Descriptive Anatomy of the Human Teeth*. Philadelphia : Wilmington Dental Manufacturing Co.; 1892.
- Bolton W. Disharmony In Tooth Size And Its Relation To The Analysis And Treatment Of Malocclusion. *Angle Orthod* 1958;28:113-30.
- Lundstrom A. Intermaxillary tooth width ratio and tooth alignment and occlusion. *Acta Odontol Scand* 1955;12(3-4):265-92.
- Wheeler R. *A Textbook of Dental Anatomy and Physiology*. WB Saunders; 1950.
- Proffit W, Fields H, Ackerman J, Thomas P, Tulloch JFC. *Contemporary Orthodontics*. Mosby Company; 1986.
- Proffit W, White R. *Surgical-Orthodontic Treatment*. Mosby Company; 1991.
- Pinkham J, Casamassimo P, McTigue D, Fields H, Novvak A. *Preventive Dentistry*. W.B. Saunders Company; 1994.
- Jerrold L, Lowenstein LJ. The midline: diagnosis and treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1990;97(6):453-62.
- Becker A, Karnei-R'em RM, Steigman S. The effects of infraocclusion: Part 3. Dental arch length and the midline. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1992;102(5):427-33.
- Sperry TP, Worms FW, Isaacson RJ, Speidel TM. Tooth-size discrepancy in mandibular prognathism. *Am J Orthod* 1977;72(2):183-90.
- Gaddam R, Arya S, Shetty KS. Incidence of tooth size discrepancy in different groups of malocclusion and its relation to extraction. *J Int Oral Health* 2015;7(Suppl 1):48-53.
- Canadian Tooth Numbering System (By The Numbers). Published online December 22, 2017. 12/04/2022 URL: [summerleadental.com/clinicinfo/all-about-the-tooth-numbers/](http://summerleadental.com/clinicinfo/all-about-the-tooth-numbers/).
- Chae JM. A new protocol of Tweed-Merrifield directional force technology with microimplant anchorage. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006;130(1):100-9.
- Asquith J, Gillgrass T, Mossey P. Three-dimensional imaging of orthodontic models: a pilot study. *Eur J Orthod* 2007;29(5):517-22.
- Santoro M, Galkin S, Teredesai M, Nicolay OF, Cangialosi TJ. Comparison of measurements made on digital and plaster models. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2003;124(1):101-5.
- Neff C. The size relationship between the maxillary and mandibular anterior segments of the dental arch. *Angle Orthod* 1957;27:138-47.
- Lundstrom A. Intermaxillary tooth width ratio and tooth alignment and occlusion. *Acta Odontol Scand* 1955;12(3-4):265-92.
- Horowitz S, Osborne R, Degeorge F. Hereditary factors in tooth dimensions, a study of the anterior teeth of twins. *Angle Orthod* 1958;28(2):87-93.
- Barrett MJ, Brown T, Luke JJ. Dental observations on Australian aborigines: mesiodistal crown diameters of deciduous teeth. *Aust Dent J* 1963;8(4):299-302.
- Uğur T. Sürekli dişlerin mesio-distal boyutlarının saptanması. *J Istanbul Univ Fac Dent* 1975;9:101-43.
- Keene HJ. Mesiodistal crown diameters of permanent teeth in male American Negroes. *Am J Orthod* 1979;76(1):95-9.
- Kapoor DN, Chawla TN, Sharma JK. A study on mesio-distal crown width of anterior teeth among north Indians. *JIDA: J Indian Dent Assoc* 1973;45(8):241-5.
- Ballard ML, Wylie WL. Mixed dentition case analysis, estimating size of unerupted permanent teeth. *Am J Orthod* 1947;33(11):754-9.
- Macko DJ, Ferguson FS, Sonnenberg EM. Mesiodistal crown dimensions of permanent teeth of black Americans. *ASDC J Dent Child* 1979; 46(4):314-8.
- Barrett MJ, Brown T, Luke JJ. Dental observations on Australian aborigines: mesiodistal crown diameters of deciduous teeth. *Aust Dent J* 1963;8(4):299-302.
- Hattab FN, al-Khateeb S, Sultan I. Mesiodistal crown diameters of permanent teeth in Jordanians. *Arch Oral Biol* 1996;41(7):641-5.
- Rudolph DJ, Dominguez PD, Ahn K, Think T. The use of tooth thickness in predicting intermaxillary tooth-size discrepancies. *Angle Orthod* 1998;68(2):133-40.
- Otuyemi OD, Noar JH. A comparison of crown size dimensions of the permanent teeth in a Nigerian and a British population. *Eur J Orthod* 1996;18(6):623-8.
- Ballard M. Asymmetry in tooth size : A factor in the etiology, diagnosis and treatment of malocclusion. *Angle Orthod* 1944;14:67-70.
- Lysell L, Myrberg N. Mesiodistal tooth size in the deciduous and permanent dentitions. *Eur J Orthod* 1982;4(2):113-22.
- Garn SM, Lewis AB, Kerewsky RS. The meaning of bilateral asymmetry in the permanent dentition. *Angle Orthod* 1966;36(1):55-62.



# KOMPOZİT YÜZEYE FARKLI PÜRÜZLENDİRME YÖNTEMLERİ İLE YAPIŞTIRILAN METAL BRACKETLERİN MAKASLAMA BAĞLANMA DAYANIMLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

## EVALUATION OF THE SHEAR BOND STRENGTH OF METAL BRACKETS TO THE COMPOSITE SURFACE WITH DIFFERENT ROUGHENING METHODS

Muhammet Furkan VATAN<sup>1</sup> , S. Evren ÖZTAŞ<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>İstanbul Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi Ortodonti Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup>İstanbul Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi Ortodonti Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ORCID ID: M.F.V. 0000-0002-7513-3022; S.E.Ö. 0000-0001-9095-0525

**Atf/Citation:** Vatan MF, Oztas SE. Kompozit yüzeye farklı pürüzlendirme yöntemleri ile yapıştırılan metal braketlerin makaslama bağlanma dayanımlarının değerlendirilmesi. Journal of Advanced Research in Health Sciences 2023;6(1):102-107. <https://doi.org/10.26650/JARHS2023-1151235>

### ÖZ

**Amaç:** Ortodontik tedavi uygulamaları sırasında hekimleri en çok zorlayan sorunlardan biri özellikle ön bölge dişlerinin bukkal yüzeylerinde bulunan kompozit dolgulardır. Kompozit yüzeyin doğru bir şekilde pürüzlendirilmesi braketlerin bağlanma dayanımlarını etkilediği düşünülmekte fakat bununla ilgili literatürde az çalışmaya rastlanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı kompozit yüzeylerin çeşitli pürüzlendirme yöntemleri ile hazırlanması sonrası yapıştırılan braketlerin bağlanma dayanımlarını ölçmek ve kopma bölgelerinin artık adeziv indeksi (Adhesive Remnant Index: ARI) ile incelenmesidir.

**Gereç ve Yöntem:** Nanofil kompozitten 5x5x2 mm boyutlarında oluşturulmuş 36 adet örnek rastgele olarak 3 gruba ayrılmış, yüzeyler %37'lik ortofosforik asit, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ile kumlama ve Er:YAG lazer ile pürüzlendirilmiş ve yüzeylere üst santral kesici braketleri yapıştırılmıştır. Universal test cihazı ile birlikte braketler yüzeyden ayrılmış ve ortaya çıkan bağlanma kuvveti megapascal (MPa) cinsinden kaydedilmiştir. Sıyırma sonrası yüzeyler optik mikroskop altında x20 büyütme ile incelenmiştir.

**Bulgular:** Test sonuçlarının değerlendirilmesi sonucunda ortofosforik asit için 4.724±0.891 MPa, kumlama için 9.077±1.480 MPa ve lazer için 9.319±1.628 MPa'lık bir bağlanma kuvveti oluşmuştur. Er:YAG lazer ve kumlama yapılan gruplardaki bağlanma kuvvetleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0.05). Ortofosforik asit grubunda bağlanma kuvveti hem Er:YAG lazere göre hem de kumlamaya göre istatistiksel olarak düşük bulunmuştur (p<0.05) ARI skorlamasına göre ise 3 grupta da yüksek oranda yapıştırıcı artığının kompozit yüzeyde kaldığı ARI skor 3'e rastlanmıştır.

**Sonuç:** Kompozit yüzeylere metal braket yapıştırılırken kullanılan ortofosforik asit sonucu oluşan bağlanma kuvveti klinik olarak yetersizdir. Klinik olarak uygun koşullar oluşturulabilirse etkili ve pratik pürüzlendirme yöntemi olarak kumlama gözlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Nanofil kompozit, metal braketler, kumlama, bağlanma dayanımı, yüzey pürüzlendirme, lazer

### ABSTRACT

**Objective:** For orthodontists, one of the most challenging problems for orthodontic treatment applications is composite fillings, especially on the buccal surfaces of anterior teeth. While it has been shown that the correct roughening of the composite surface affects the bond strength of the brackets, there are few studies in the related literature. The aim of this study is to evaluate the bond strength of the bonded brackets after the composite surfaces have been prepared with various roughening methods and to examine the composite surfaces with the Adhesive Remnant Index (ARI).

**Materials and method:** 36 samples created from nanofil composite with dimensions of 5x5x2 mm were randomly divided into 3 groups. After that the surfaces were roughened with 37% orthophosphoric acid, sandblasted with Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and roughened with an Er:YAG laser. Then, the upper central brackets were adhered to the surfaces. With the Universal test device, the brackets were separated from the surface and the resulting bond strength was recorded in megapascals (MPa). For ARI scoring, the surfaces were examined under x20 magnification with an optical microscope.

**Results:** As a result of the evaluation of the test results, a bond strength of 4.724±0.891 MPa for orthophosphoric acid, 9.077±1.480 MPa for sandblasting, and 9.319±1.628 MPa for the laser were recorded. The difference between the bond strengths of the Er:YAG laser and sandblasted groups was not statistically significant (p>0.05). In the orthophosphoric acid group, the bond strength was found to be statistically lower than both the Er:YAG laser and sandblasting (p<0.05) According to ARI scoring, an ARI score of 3 was found, in which a high percentage of adhesive residue remained on the composite surface in all three groups.

**Conclusion:** The bond strength resulting from the orthophosphoric acid used while bonding metal brackets to composite surfaces is clinically insufficient. If clinically appropriate conditions can be formed, sandblasting has been observed as an effective and practical roughening method.

**Keywords:** Nanofill composite, metal braces, sandblasting, bond strength, surface roughening, laser

**Sorumlu Yazar/Corresponding Author:** Muhammet Furkan VATAN E-mail: [furkanvatan@gmail.com](mailto:furkanvatan@gmail.com)

**Başvuru/Submitted:** 30.07.2022 • **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 23.08.2022 • **Son Revizyon/Last Revision Received:** 16.10.2022 •

**Kabul/Accepted:** 01.11.2022 • **Online Yayın/Published Online:** 09.02.2023



This work is licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License



## GİRİŞ

1970'li yıllarda erişkin hastalar, ortodonti hastalarının %3'ünü oluştururken, bu oran 1990'lı yılların sonuna doğru %25'e kadar çıkmıştır (1). Erişkin birey sayısındaki artış ile birlikte, ağız içerisinde restorasyonlu diş bulunma ihtimali de artmıştır. 2004 yılında Türkiye'de yapılan DMFT indeksini inceleyen bir çalışmaya göre 5, 12, 15, 35-44 ve 65-74 yaşlarında restoratif tedavi gereksinimi sırasıyla, %68,7, %61,8, %61,8, %81,5 ve %96,2 olarak tespit edilmiştir (2). Özellikle ortodontik braketlerin yapıştırıldığı dişlerin vestibül veya bukkal yüzeylerinde bulunan restorasyonlar ortodontik tedavinin planlanmasını ve başarısını etkileyen faktörlerin başında gelmektedir (3,4).

Günümüzde, kompozit rezin sistemler; estetik, fiziksel, mekanik özellikler ve mikromekanik adezyon mekanizmalarındaki avantajları sayesinde, direkt ve indirekt restoratif tedavilerde sıklıkla kullanılan dental materyallerinden biridir (5). Kompozit rezin sistemler arasında bulunan nanofil kompozitler ise düşük polimerizasyon büzülmesi, düşük su emilimi, yüksek mekanik dayanıklılık ve düşük aşınma dirençleriyle birlikte hem arka hem de ön bölge dişlerde sıklıkla kullanılmaktadır (6-9).

Sabit ortodontik tedavilerde mine yüzeyinin pürüzlendirilmesi tedavinin başarısı için oldukça önemlidir. Mine yüzeyin pürüzlendirilmesinin bağlanma dayanımına etkisinin olmadığı gösteren çalışmalar olmasına rağmen birçok çalışma da yüzeye braket yapıştırmadan önce pürüzlendirme yapılması önerilmektedir (10,11). Doğru bir yapıştırma prosedürü ile birlikte bireylerin dişlerine yapıştırılan braketler daha iyi bir bağlanma direnci oluşturmakta ve ortodontik tedavinin başarısını arttırmaktadır (12).

Literatürde mine yüzeyi pürüzlendirme prosedürleri için oldukça fazla sayıda çalışma bulunmaktayken kompozit yüzeylerin pürüzlendirilmesi ve en iyi metodun belirlenmesi için yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın amacı nanofil kompozit rezinler kullanılarak diş yüzeyini taklit eden örneklerin %37'lik ortofosforik asit,  $Al_2O_3$  ile kumlama ve Er:YAG lazer ile pürüzlendirilmesi sonrasında bu yüzeylere yapıştırılan metal braketlerin bağlanma dayanımlarının in-vitro olarak incelenmesi ve ideal yapıştırma prosedürünün tespit edilmesidir.

## GEREK VE YÖNTEM

İstatistiksel incelemeler için G\*Power programı kullanılarak yapılan Power analizi sonucunda SBS için effect size d (etki boyutu):0,412, standart sapma değeri 1,2, Power:0,80 ve  $\alpha$ :0,05 için tespit edilen örneklem sayısı her alt grup için minimum n=12 olarak saptanmıştır.

Bu çalışmada lazer kesim cihazıyla özel olarak üretilen bir rehber sayesinde oluşturulan 36 kompozit örnek kullanılmıştır. Nanofil kompozit materyalinden (Ultimate Filltek,3M ESPE, Germany) 5x5x2 mm boyutlarından oluşturulan örnekler rastgele olarak 3 gruba ayrılmış ve yüzeylere pürüzlendirme sonrasında 11,14 mm<sup>2</sup> taban alanına sahip üst sağ santral metal braketler

(Ortho Technology, 0,018"x0,022" slot, Opal Orthodontics, South Jordan, Utah, USA) yapıştırılmıştır.

Deney Grupları:

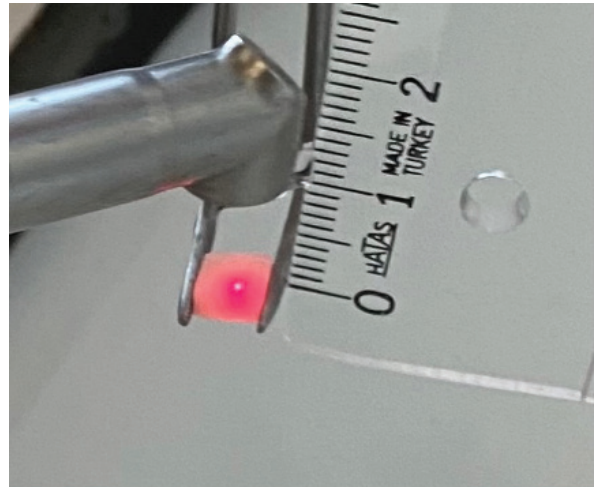
- Grup 1: Kompozit yüzeyler %37'lik ortofosforik asit ile pürüzlendirilmiş ve metal üst santral braketleri yapıştırılmıştır.
- Grup 2: Kompozit yüzeyler 50 mm  $Al_2O_3$  kumlama ile pürüzlendirilmiş ve metal üst santral braketleri yapıştırılmıştır.
- Grup 3: Kompozit yüzeyler Er:YAG lazer ile pürüzlendirilmiş ve metal üst santral braketleri yapıştırılmıştır.

Tüm yüzeyler pürüzlendirmeden önce düşük devirli bir anguldurva, polisaj fırçası ve florsüz polisaj patı ile birlikte 10 saniye boyunca temizlenmiştir. Sonrasında 10'ar saniye boyunca hava su spreyi ile yıkanmış ve kurutulmuştur.

Grup 1: Temizlenen yüzeylerde braket yapıştırılacak alanlar belirlenmiş ve %37'lik ortofosforik asit uygulanıp 20 saniye boyunca beklenmiştir. Daha sonra yüzey 20 saniye boyunca hava su spreyi ile yıkanmış ve 20 saniye boyunca kurutulmuştur.

Grup 2:  $Al_2O_3$  ile kumlama, ağız içi kumlama cihazı yardımıyla (Microetcher II, Danville Materials, Oakland, ABD) 2,5 bar basınç altında, örnek yüzeylerine dik olacak şekilde ortalama 10 mm uzaklıktan, 10 saniye süre ile, 50  $\mu$ m boyutundaki  $Al_2O_3$  ile kumlama işlemi yapılmıştır. Sonrasında hava su spreyi ile birlikte 20 saniye boyunca yüzeyler yıkanmış ve 20 saniye boyunca hava sıkılarak yüzey kurutulmuştur.

Grup 3: 1.6 W gücünde, 2.94  $\mu$ m dalga boyunda, 80  $\mu$ s sürede ve 20 Hz tekrarlanma hızında ayarlanan cihaz ile birlikte Er:YAG lazer uygulaması 10 mm uzaklıktan bir presel yardımıyla tutulan örnekler su soğutması altında yapılmıştır (Şekil 1).



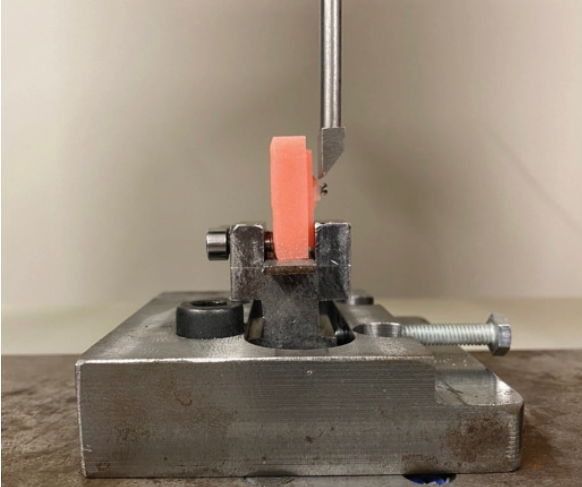
**Şekil 1:** Lazer ile yüzeyin pürüzlendirilmesi için uzaklık ölçümü ve lazer işleminin uygulanması

Tüm gruplarda ara bağlayıcı olarak Transbond XT Primer (3M/Unitek, Monrovia, California) sürülmüş, primerin inceltilmesi

için hava sıkılmış ve 20 saniye boyunca LED (3M Elipar-S10, 3M ESPE, St. Paul, Minnesota, USA) ışıkla polimerizasyon sağlanmıştır. Her bir örnek tabanına Transbond XT sürülmüş ve braket yüzeye yerleştirilmiş, bir sond yardımıyla ortasından bastırılarak taşan yapıştırıcı fazlalıkları temizlenmiş, braketler mesial ve distal kenarlarından LED ışıkla birlikte 20'şer saniye ışınlanmıştır.

### Bağlanma Dayanımlarının Değerlendirilmesi

Yapıştırılan braketlerin bağlanma dayanımı İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Araştırma Laboratuvarı'nda bulunan Instron Universal Test Cihazı (AG-IS, SHIMADZU Corp., Kyoto, Japan) ile değerlendirilmiştir (Şekil 2). Cihazın alt tablası sabit olmak koşuluyla üzerine örnekler yerleştirilmiş, üst hareketli parçasına ise ucu bıçak sırtı şeklinde sonlanan yüklemeye ucu bağlanmıştır. Yüklemeye ucunun yönü braketin tabanı doğrultusunda paralel olacak şekilde, braket ile kompozit yüzey arasına yerleştirilmiştir. Test cihazının hareketli üst tablasının hızı 1 mm/dakika, aygıtın uygulayacağı maksimum kuvvet ise 500 N olarak ayarlanmış ve ölçümler 0,2 N hassasiyetle yapılmıştır. Braketin yapıştırılan kompozit yüzeyden ayrıldığı andaki kuvvet değeri Newton (N) olarak kaydedilmiş, ardından bu değer megapascal (MPa)'a dönüştürülmesi için,  $MPa=N$  (uygulanan kuvvet) /  $mm^2$  (yüzey alanı) formülü kullanılmış ve sonuçlar bağlanma dayanım değerleri olarak kaydedilmiştir.



Şekil 2: Makaslama testlerinin yapılması için hazırlanan sistem ve akrilik bloğa gömülmüş metal braket

### ARI Skorlaması

Çalışmamızda metal braketlerin çıkarılması sonrasında kompozit yüzeyde kalan adeziv miktarının incelenmesi için Artun ve Bergland tarafından tanımlanan ARI (Adhesive Remnant Index) sistemi kullanılmıştır (13) (Tablo 1).

### İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analizler SPSS versiyon 25.0 programı yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu histogram grafikleri ve Kolmogorov-Smirnov testi ile incelenmiştir. Tanımlayıcı analizler sunulurken ortalama, standart sapma, %95 G.A. Alt sınır-üst sınır, ortanca, IQR, min-max

Tablo 1: ARI Adhesive Remnant Index (ARI) skorlaması

ARI Skoru	Özellik
Skor 0	Örnek yüzeyinde hiç yapıştırıcı bulunmamaktadır.
Skor 1	Örnek yüzeyinde %50'den az yapıştırıcı bulunmaktadır.
Skor 2	Örnek yüzeyinde %50'den fazla yapıştırıcı bulunmaktadır.
Skor 3	Tüm yapıştırıcı örnek yüzeydedir ve braket taban alanı izlenmektedir.

değerler kullanılmıştır. Normal dağılım göstermeyen (non-parametrik) değişkenler iki grup arasında değerlendirilken Mann Whitney U Testi kullanılmıştır. P değerinin 0,05'in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

### BULGULAR

En yüksek bağlanma kuvveti  $9,319\pm 1,628$  MPa ile lazer ile pürüzlendirilen yüzeylerde bulunmuştur. En düşük bağlanma kuvveti ise  $4,724\pm 0,891$  MPa ile ortofosforik asit ile pürüzlendirilen yüzeylerde gözlenmiştir (Tablo 2).

Tablo 2: Deney gruplarının bağlanma dayanım analizleri

Grupların MPa Değerleri	Ort±s.s.	Min-Max
G1: Ortofosforik Asit	4,724±0,891	2,785-6,663
G2: Kumlama	9,077±1,480	7,175-11,167
G3: Lazer	9,319±1,628	7,156-11,652

Gruplar arası yapılan ikili karşılaştırma sonuçları Tablo 2'de verilmiştir. Yapılan posthoc analiz sonucunda, Tukey HSD çoklu karşılaştırma testine göre %37'lik ortofosforik asit ile pürüzlendirilen grupların bağlanma dayanımları  $Al_2O_3$  ile kumlama ve Er:YAG lazer ile pürüzlendirilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ).

$Al_2O_3$  ile kumlama ve Er:YAG lazer ile pürüzlendirilen grupların karşılaştırılmasında ise anlamlı olarak bir fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ) (Tablo 3).

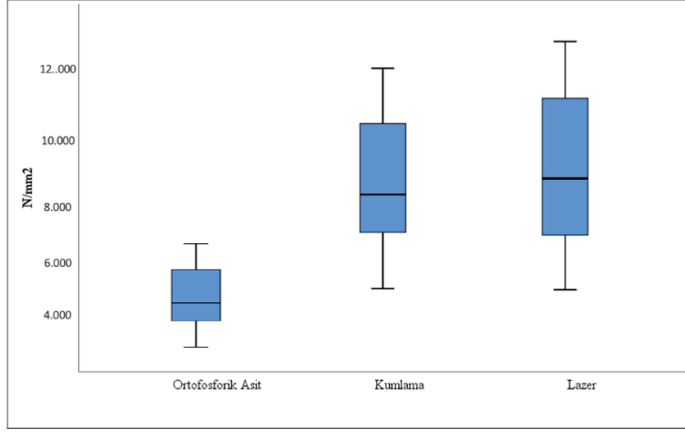
Tablo 3: Mann Whitney U testi

Grupların Birbirleri ile Karşılaştırılması	P
Ortfofosforik Asit-Kumlama	0,04*
Ortfofosforik Asit-Lazer	0,045*
Kumlama-Lazer	1,000

\* $p<0.05$

Grupların  $N/mm^2$  olarak Megapascal cinsinden kuvvetlerini ölçerek alttaki grafikte gösterilmiştir (Şekil 3).

Şekil 1. Kompozit yüzeylere metal braketlerin bağlanma dayanımlarına etki eden pürüzlendirme yöntemlerinin kutu grafiği (Her bir dikey kutunun ortasında yer alan yatay çizgi ilgili grubun median değerini, kutuların alt çizgileri %25 ve üst çizgileri



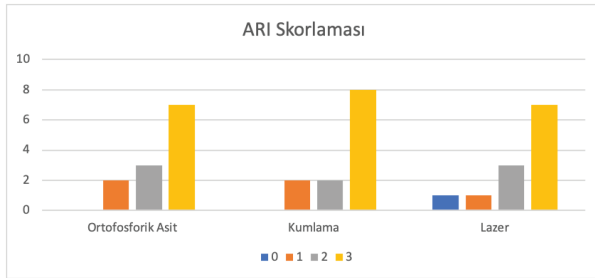
Şeki 3: Bağlanma dayanımlarının kutu grafiği

%75 dağılımı, kutuların dışında kalan yatay çizgiler ise %5'lik ve %95'lik aralığı ifade etmektedir.)

#### Arı Skorları

ARI skorlaması için braket tabanları ve örnek yüzeyleri İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Araştırma Laboratuvarında bulunan Olympus Işık Mikroskobu ( Olympus SZX-7 Stereo Mikroskop, New York, USA) ile 20x büyütme altında incelenmiştir.

Metal braketlerin %37'lik ortofosforik asit ile pürüzlendirilen yüzeylere yapıştırıldığı örneklerin (grup 1) %16.6'sında örnek yüzeyinde %50'den az yapıştırıcı kaldığı (ARI skoru 1), %25'inde örnek yüzeyinde %50'den fazla yapıştırıcı kaldığı (ARI skoru 2) ve %58,3'ünde de tüm yapıştırıcının örnek yüzeyinde kaldığı ve braket tabanının izlenebildiği (ARI skoru 3) gözlenmiştir (Şekil 4).

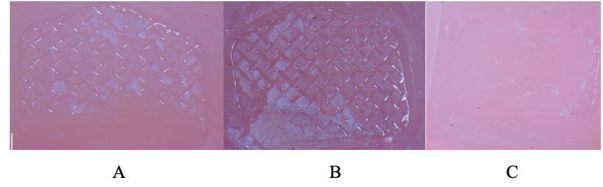


Şekil 4: ARI skorlamalarının değerlendirilmesi

Metal braketlerin Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ile kumlama yapılarak pürüzlendirilen yüzeylere yapıştırıldığı örneklerin (grup 2) %8.3'ünde örnek yüzeyinde %50'den az yapıştırıcı kaldığı (ARI skoru 1), %8,3'ünde örnek yüzeyinde %50'den fazla yapıştırıcı kaldığı (ARI skoru 2) ve %66,6'sında ise tüm yapıştırıcının örnek yüzeyinde kaldığı ve braket tabanının izlenebildiği (ARI skoru 3) gözlenmiştir (Şekil 4).

Metal braketlerin Er:YAG lazer yapılarak pürüzlendirilen yüzeylere yapıştırıldığı örneklerin (grup 3) %8,3'ünde örnek yüzeyinde hiç yapıştırıcı olmadığı (ARI skoru0), %8,3'ünde %50'den az yapıştırıcı kaldığı (ARI skoru 1), %25'inde örnek yüzeyinde %50'den fazla yapıştırıcı kaldığı (ARI skoru 2) ve %58,3'ünde ise tüm yapıştırıcının örnek yüzeyinde kaldığı ve braket tabanının izlenebildiği (ARI skoru 3) gözlenmiştir (Şekil 4).

Hiçbir grupta kompozit örneklerde ya da braketlerde kırık veya çatlak gözlenmemiştir.



Şekil 5: Test sonucu kompozit yüzeylerin görünümü

A: Ortofosforik asit ile pürüzlendirilmiş yüzeyden braketin koparılması sonucu kompozit yüzey. B: Kumlama ile pürüzlendirilmiş yüzeyden braketin koparılması sonucu kompozit yüzey. C: Er:YAG lazer ile pürüzlendirilmiş yüzeyden braketin koparılması sonucu kompozit yüzey.

#### TARTIŞMA

Çalışmamızın sonuçlarına göre kompozit yüzeylerin pürüzlendirilmesinde ortofosforik asit ile pürüzlendirme yeterli bir bağlanma direnci göstermemektedir ( $p>0,05$ ) (Tablo 2). Yapılan çalışmaların birçoğunda ortofosforik asidin kompozit-kompozit yapıştırma mekanizmasına katkısının yetersiz olduğu bildirilmiş ve bizim çalışmamızda da destekleyici yönde sonuçlar elde edilmiştir (14-17).

Çalışmamızda kumlama ile pürüzlendirme sonuçları ortofosforik asit ile karşılaştırıldığında daha yüksek bir bağlanma direnci oluşturmuş ve klinik olarak yeterli bulunmuştur (Tablo 2) ( $p<0,05$ ). Wendler ve ark.'nın yaptıkları çalışmanın sonuçlarına göre kumlama ile pürüzlendirme ile sağlanan tutuculuk miktarının ortofosforik aside göre yüksek olduğu bulgulanmıştır (18). Bayram ve ark. yaptıkları çalışmaya göre ise kompozit yüzeye bağlanmada en iyi ve güvenli yöntem olarak kumlama belirlenmiştir (19). Valizadeh ve ark. yaptıkları çalışmaya göre ise kompozit yüzeylere metal braket yapıştırılmasında en yüksek bağlanma kuvveti sırasıyla kumlama, lazer ve ortofosforik asit gruplarında gözlenmiştir (20). Kumlama belirgin mikrorentasyon alanları ile homojen bir yüzey oluşturmada ve daha fazla bir yapışma yüzey alanı oluşturmaktadır (9,16,21). Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

ile kumlama sayesinde klinik olarak yeterli bağlanma direnci elde edilebilmesine rağmen hasta tarafından yutulması ya da hekim tarafından solunması istenmeyen yan etkilere sebep olabilmektedir (22).

Er:YAG lazer, kumlama ile benzer, ortofosforik aside göre ise yüksek bir bağlanma direnci göstermektedir. Rosatto ve ark. kompozit yüzeyler üzerine yaptıkları ve elmas frez, kumlama ile farklı güçlerdeki Er:YAG lazeri (2 W, 3 W, 4 W ve 10 Hz) karşılaştırdıkları çalışmaya göre, Er:YAG lazer diğer gruplarla benzer bir bağlanma dayanımı göstermiştir (23). Burnett ve ark. yaptıkları çalışmayla ile de Er:YAG lazerin (2 W, 10 Hz) kompozit-kompozit bağlantısını arttırdığı yönde sonuçlar elde etmiştir (24). 2020 yılında yapılan bir çalışmaya göre ise lazer ile hiçbir yüzey hazırlığı yapılmayan grup arasında bağlanma direnci arasından anlamlı bir fark bulunmamıştır (20). Er:YAG lazerler kullanım açısından oldukça kolay ve konforlu olmasına rağmen en büyük dezavantajları maliyetinin yüksek olması ve hassas bir çalışma prensibi gerektirmesinden dolayı rutin olarak kliniklerde bulunamamaktadır. Aynı zamanda pürüzlendirme sonrası incelenen örnek yüzeylerinde Er:YAG lazer ile gözle görülebilecek değişiklikler oluşmuş ve braketlerin sökümünden sonra yüzeylerde pürüzlendirmenin etkilerinin kalıcı olduğu gözlenmiştir. Çalışmamız daha önce yapılan literatür çalışmalarıyla benzer sonuçlar göstermiştir.

Çalışmamızın sonuçlarına göre %37'lik ortofosforik asit yüzey pürüzlendirme için yeterli bir yüzey değişikliği oluşturmamıştır. Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ile kumlama ve Er:YAG lazer ile pürüzlendirme bağlanma direnci için yeterli bir yüzey değişikliği oluştursa bile, Er:YAG lazerin ayrıntılı bir kullanım hassasiyetine sahip pahalı bir cihaz olması, kumlama ile pürüzlendirmenin ise kum taneciklerinin aspirasyon riskinin olması bu iki sistemin dezavantajları olarak görülmektedir. Yapılan çalışmanın ışığında kumlamanın yan etkileri doğru ve etkili bir şekilde elimine edilebilirse klinik açıdan oldukça başarılı sonuçlar elde edilebileceği gözlenmiştir.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Çalışma Konsepti/Tasarım- M.F.V., S.E.Ö.; Veri Toplama- M.F.V., S.E.Ö.; Veri Analizi/Yorumlama- M.F.V., S.E.Ö.; Yazı Taslağı- M.F.V., S.E.Ö.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- M.F.V., S.E.Ö.; Son Onay ve Sorumluluk- M.F.V., S.E.Ö.; Malzeme ve Teknik Destek- M.F.V., S.E.Ö.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir

**Finansal Destek:** Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

**Peer Review:** Externally peer-reviewed.

**Author Contributions:** Conception/Design of Study- M.F.V., S.E.Ö.; Data Acquisition- M.F.V., S.E.Ö.; Data Analysis/Interpretation- M.F.V., S.E.Ö.; Drafting Manuscript- M.F.V., S.E.Ö.; Critical Revision of Manuscript- M.F.V., S.E.Ö.; Final Approval and Accountability- M.F.V., S.E.Ö.; Material and Technical Support- M.F.V., S.E.Ö.

**Conflict of Interest:** Authors declared no conflict of interest.

**Financial Disclosure:** Authors declared no financial support.

## KAYNAKLAR

1. Gottlieb EL, Nelson AH, Vogels DS. JCO Orthodontic Practice Study. Part 1: Trends. J Clin Orthod 1997;31(10):675-84.
2. Koser C, Nalcaci A. Çürük prevalansındaki yaklaşımlar ve karyogram konsepti. Cumhuriyet Dent J 2011;14(3):230-45.
3. Doğan BG, Gökalp S. Türkiye’de diş çürüğü durumu ve tedavi gereksinimi 2004. Hacettepe Diş Hekim Fakültesi Derg 2008;32(2):45-7.
4. Karan S, Toroğlu S. Ortodontide Seramik ve Kompozit Yüzeylere Bağlanma: Farklı Materyal ve Yüzey Değişikliği Uygulamalarının Metal Ve Porselen Braketlerin Basma Dayanıklılığı Üzerindeki Etkileri, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ortodonti Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 2007;4-5.
5. Dursun MN. Kompozit Tamirinde Farklı Yüzey Hazırlama Yöntemlerinin ve Yaşlandırma Sürelerinin Bağlanma Dayanıklılığına Etkisi. Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Uzmanlık Tezi, 2019;1-3
6. Hatırlı H, Yaşa B, Gök A, Dallı M. Farklı içeriğe sahip estetik restoratif materyallerin polimerizasyon sonrası renk değişimlerinin değerlendirilmesi. EÜ Dişhek Fak Derg 2015;36(2):79-85.
7. Sahin D, Kapdan A, Murat U, Hurmuzlu F. Farklı yapıdaki kompozit rezin materyallerinin su emilimi ve suda çözünürlük değerlerinin karşılaştırılması. Cumhuriyet Dent J 2009;12(1):22-8.
8. Göztaş Z, Tosun G, Yıldız E, Kahraman K. Nanodoldurucu içeren beş farklı kompozitin yüzey sertliği ve pürüzlülüğü açısından değerlendirilmesi. Selcuk Dent J 2014;1(2):43-8.
9. Cavalcanti AN, De Lima AF, Peris AR, Mitsui FHO, Marchi GM. Effect of surface treatments and bonding agents on the bond strength of repaired composites. J Esthet Restor Dent 2007;19(2):90-8.
10. Oonsombat C, Bishara SE, Ajlouni R. The effect of blood contamination on the shear bond strength of orthodontic brackets with the use of a new self-etch primer. Am J Orthod Dentofac Orthop 2003;123(5):547-50.
11. Toledano M, Osorio R, De Leonardi G, Rosales-Leal JJ, Ceballos L, Cabrerizo-Vilchez MA. Influence of self-etching primer on the resin adhesion to enamel and dentin. Am J Dent 2001;14(4):205-10.
12. Wang WN, Tarng TH. Evaluation of the sealant in orthodontic bonding. Am J Orthod Dentofac Orthop 1991;100(3):209-11.
13. Årtun J, Bergland S. Clinical trials with crystal growth conditioning as an alternative to acid-etch enamel pretreatment. Am J Orthod 1984;85(4):333-40.
14. Hannig M, Reinhardt KJ, Bott B. Self-etching primer vs phosphoric acid: an alternative concept for composite-to-enamel bonding. Oper Dent 1999;24:172-80.
15. Papacchini F, Dall Oca S, Chieffi N, Goracci C, Sadek FT, Suh BI, vd. Composite-to-composite microtensile bond strength in the repair of a microfilled hybrid resin: effect of surface treatment and oxygen inhibition. J Adhes Dent 2007;9(1):25.
16. Dall’Oca S, Papacchini F, Radovic I, Polimeni A, Ferrari M. Repair potential of a laboratory-processed nano-hybrid resin composite. J Oral Sci 2008;50(4):403-12.
17. Moradi M, Hormozi E, Shamohammadi M, Rakhshan V. Effects of debonding of orthodontic brackets on topography and surface roughness of composite restorations. Int Orthod 2018;16(4):623-37.

18. Wendler M, Belli R, Panzer R, Skibbe D, Petschelt A, Lohbauer U. Repair bond strength of aged resin composite after different surface and bonding treatments. *Materials (Basel)* 2016;9(7):547.
19. Bayram M, Yeşilyurt C, Kuşgöz A, Ülker M, Nur M. Shear bond strength of orthodontic brackets to aged resin composite surfaces: effect of surface conditioning. *Eur J Orthod* 2011;33(2):174-9.
20. Valizadeh S, Alimohammadi G, Nik TH, Etemadi A, Tanbakuchi B. In vitro evaluation of shear bond strength of orthodontic metal brackets to aged composite using a self-adhesive composite: Effect of surface conditioning and different bonding agents. *Int Orthod* 2020;18(3):528-37.
21. Brosh T, Pilo R, Bichacho N, Blutstein R. Effect of combinations of surface treatments and bonding agents on the bond strength of repaired composites. *J Prosthet Dent* 1997;77(2):122-6.
22. Çağlaroğlu M, Çatalbaş B, Gelgör E. Farklı Yöntemlerle Pürüzlendirilmiş Mine Yüzeylerinin Fotoğrafik Görüntülerinin Karşılaştırılması. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekim Fakültesi Derg* 2012;2012(2):154-9.
23. Rossato DM, Bandeca MC, Saade EG, Lizarelli RFZ, Bagnato VS, Saad JRC. Influence of Er: YAG laser on surface treatment of aged composite resin to repair restoration. *Laser Phys* 2009;19(11):2144-9.
24. Burnett Jr LH, Shinkai RSA, Eduardo CDP. Tensile bond strength of a one-bottle adhesive system to indirect composites treated with Er: YAG laser, air abrasion, or fluoridric acid. *Photomed Laser Ther* 2004;22(4):351-6.



# PSİKOTRAVMATOLOJİK AÇIDAN ÖFKEYİ YORDAYAN ŞEMA ALANLARININ İNCELENMESİ\*

## AN INVESTIGATION OF SCHEMA DOMAINS PREDICTING ANGER FROM A PSYCHOTRAUMATOLOGICAL PERSPECTIVE

Merve ERDOĞDU<sup>1</sup> , Şennur KIŞLAK<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Hacettepe Üniversitesi, Adli Bilimler Anabilim Dalı, Adli Psikoloji Bölümü, Ankara, Türkiye

<sup>2</sup>Ankara Üniversitesi, Dil ve Tarih-Coğrafya Fakültesi, Psikoloji Bölümü, Klinik Psikoloji Anabilim Dalı

ORCID ID: M.E. 0000-0002-3745-2639; Ş.K. 0000-0001-8199-9802

**Atf/Citation:** Erdogdu M, Kislak S. Psikotraumatojik açıdan öfkeyi yordayan şema alanlarının incelenmesi. Journal of Advanced Research in Health Sciences 2023;6(1):108-116. <https://doi.org/10.26650/JARHS2023-1172505>

### Öz

**Amaç:** Çocukluk çağı travmaları ve öğrenilmiş olumsuz yaşam dinamiklerinin yetişkinlik yaşamındaki ruhsal izlerini belirlemek, ruhsal travmayı analiz ve tedavi etmek klinik adli psikolojinin önemli uygulama alanlarından biridir. Bu çalışmada genç yetişkin olan üniversite öğrencilerinde erken dönem uyumsuz şema alt boyutlarının öfke duygusu, öfkenin ifade edilmiş biçimini açıklama gücünü ortaya koymak, cinsiyete göre farklılıkları belirlemek ve şiddet yaşantıları hakkında bilgi toplamak amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Araştırmanın örneklemini Ankara ilindeki 115'i (%57,5) kadın, 85'i erkek (%42,5) olmak üzere toplamda 200 üniversite öğrencisinden oluşmaktadır. Araştırmada gönüllük esas alınıp rastgele örneklem yöntemi ile uygun örnekleme test bataryaları kapalı bir zarf içinde verilerek yüz yüze yapılmıştır. Katılımcılar, Bilgilendirilmiş Onam Formu, Demografik Bilgi Formu ve Young Şema Ölçeğinin yanı sıra Sürekli Öfke-Öfke Tarz Ölçeğini tamamlamıştır.

**Bulgular:** Yapılan regresyon analizleri sonucunda, sürekli öfkenin yordayıcısı olarak aşırı tetikte olma şema alanı ile ayrılma ve dışlanma şema alanı tespit edilmiştir. Durumluk öfke yordayıcısının ise başkalarına yönelimlilik ile zedelenmiş sınırlar şema alanlarının olduğu gözlemlenmiştir. Zedelenmiş özerklik, ayrılma ve dışlanma ile zedelenmiş sınırlar şema alanları kontrol altında tutulan öfkeyi yordayan şemalar olup, dışarı vurulan öfkenin yordayıcısı zedelenmiş özerlik, ayrılma ve dışlanma ile aşırı tetikte olma ve baskılama şema alanları olmuştur. İçte tutulan öfkeyi yordayan kavramların ise dışlanma ve ayrılma ile zedelenen sınırlar olduğu görülmüştür. Bağımsız örneklem t testi analizlerine göre kadın öğrencilerin öfke puanları erkek öğrencilerden daha düşük bulunmuştur.

Ayrılma ve dışlanma/reddedilme, zedelenmiş sınırlar, aşırı tetikte olma ve baskılama/ketleme şema alan puanları ise kadınlarda daha yüksektir. Buna ek olarak, katılımcıların betimsel analizleri sonucunda kendine-başkalarına zarar verme, şiddet yaşantısı ve intihar girişim oranlarının dikkat çektiği belirlenmiştir.

**Sonuç:** Bu çalışmanın, erken dönem uyumsuz şema alanlarının öfke ifade edilme tarzı üzerindeki rolüne ilişkin alan yazına katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Travma çalışmaları biliş ve duygular perspektifinden analiz edildiğinde, elde edilen sonuçların klinik ve adli psikoloji alanlarındaki öneleyici çalışmalara destek olacağı ileri sürülebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Erken dönem uyumsuz şema alanları, öfke, ruh sağlığı

### ABSTRACT

**Objective:** Identifying the psychological traces of childhood traumas and learned negative life dynamics in adult life along with analyzing and treating mental trauma are important application areas of clinical forensic psychology. In this study, it was aimed to reveal the power of early maladaptive schema sub-dimensions in explaining feelings of anger and ways of expressing anger, in order to determine any differences according to gender, and to gather information about experiences of violence in young adult university students.

**Materials and Method:** The study group of the research consisted of 200 university students in Ankara, 115 (57.5%) female and 85 (42.5%) male. The research was conducted face-to-face by giving the appropriate sampling test batteries in a sealed envelope using the random sampling method on a voluntary basis. Participants were subjected to Informed Consent Form, Demographic Information Form, and Young Schema Scale as well as Trait Anger-Anger Style Scale questions.

**Results:** As a result of the regression analysis, it was observed that the predictors of trait anger were the excessive alertness schema area and the separation and exclusion schema area. The damaged autonomy, separation and exclusion, and damaged boundaries schema areas are schemas that predict controlled anger, and the predictors of expressed anger are impaired autonomy, separation and exclusion, and over-alertness and suppression schema areas. It has been observed that the concepts that predict internal anger are borders damaged by exclusion and separation. According to independent samples t-test analysis, female students' anger scores were found to be lower than male students. Separation and exclusion/rejection, damaged boundaries, hypervigilance, and suppression/inhibition schema scores were higher in females. In addition, as a result of the descriptive analysis of the participants, it was determined that the rates of self-harm, violence and suicide attempts were worthy of attention.

**Conclusion:** It is thought that this study will contribute to the literature on the role of early maladaptive schema domains on anger expression. When trauma studies are analyzed from the perspective of cognition and emotions, it can be argued that the results obtained will support preventive studies in the fields of clinical and forensic psychology.

**Keywords:** Early maladaptive schema domain, anger, mental-health

\*Bu çalışma sorumlu yazarın, yüksek lisans tezinden türetilmiş bir araştırma makalesidir. (This study is a research article derived from the lead author's master's thesis)

**Sorumlu Yazar/Corresponding Author:** Merve ERDOĞDU E-mail: [merve.erdogdu@hacettepe.edu.tr](mailto:merve.erdogdu@hacettepe.edu.tr)

**Başvuru/Submitted:** 08.09.2022 • **Revizyon Talebi/Revision Requested:** 12.09.2022 • **Son Revizyon/Last Revision Received:** 26.10.2022 •

**Kabul/Accepted:** 27.10.2022 • **Online Yayın/Published Online:** 14.02.2023



This work is licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

## GİRİŞ

Psikoloji alan yazınında aile kavramı; yapısı, figürleri, bağlanma modelleri ve gelişimsel evreler açılarından incelenmektedir. Çoğu zaman çocukluk çağı travmaları maruz kalınan toksik aile yaşantıları ileri yaşlardaki patolojilerin temeli olarak ele alınmaktadır (1-4). Oldukça katı olan, değişime dirençli ve erken dönemde oluşmaya başlayan bu örüntülerin ya da şemaların, çocuğun çekirdek aile dinamiği içerisinde deneyimlenen travmalardan oluştuğu ve tetiklendiği düşünölmektedir. Bu örüntülerin gelişimini besleyen erken dönemde edinilen yaşam deneyimleri; “gereksinimlerin engellenmesi”, “travmatize etme ya da kurban haline gelme”, “olağanüstü anılar” ile “içselleştirme veya özdeşleşme” olmak üzere dört başlıkta yer almaktadır (5).

Nesne yitimi; yoksun bırakılma, istismar, kaynağını sevgiden alan güvenli bağlanmanın olmaması, tahmin edilen sağlıklı seviyeye ulaşmasını engelleyen ve direkt olarak sevgi nesnesinin kendisiyle yaşanan travmalar olarak tanımlanmaktadır (6). Yıkıcı enerjinin zamanla birikerek primitif yıkıcı eylemlere dönüşmesi bu tarz travmatik durumlar sonucunda gerçekleşmektedir (7). Bununla birlikte içinde bulunulan çevrenin etkisi, okul, arkadaşlar, çocuğun içinde geliştiği kültür gibi diğer etkenlerin, her ne kadar çocuğun olgunlaşması sırasında önemli etkiye sahip olsalar da, erken dönemdeki şemalar kadar katı veya değişmez etkilere neden olmadığı da ileri sürölmektedir (1, 3-5). Bu bağlamda, anlaşılma, süreklilik ve sevgi gibi temel gereksinimleri engellenen çocuğun, deneyimlediği eksiklikler nedeniyle bırakılma/terk edilme ya da duygusal yoksunluk gibi şemalar geliştirebileceği belirtilmektedir. Travmatize olma durumunda, çocuk zarar gören ve kurban konumunda olmakta, bu durumun sonucu olarak da çocuğun zihninde suistimal edilme ve kusurluluk gibi şemalar oluşabilmektedir. Olağanüstü yaşantılar deneyimlediğinde ise aileler aşırı müdahale ederek çocuğu gereğinden fazla korursa, bağımlılık veya hak görme gibi şemalar gelişebilmektedir. İçselleştirme veya özdeşim kurma durumunda ise çocuk; ebeveynin sahip olduğu düşünceleri ve hisleri, ebeveynin kararlarını ve belirli durumlarda gösterdiği belirli tepkilerini, ebeveynin yaptığı eylemlerini seçerek içselleştirip bu kavramlarla özdeşim kurmaktadır. Örneğin, bir çocuk ebeveyni tarafından istismar gördüğünde bu duruma karşı koymayıp durumu içselleştirmezse kurban rolüne kendini kaptrabilir ve bunun sonucunda güvensizlik şeması geliştirebilir. Çocuk istismara uğradığında eğer istismarcı ebeveyniyle özdeşim kurarsa, cezalandırıcılık şeması geliştirip kendisi de saldırgan ve istismarcı olabilmektedir (4, 8,9).

Young karşılanmamış duygusal ihtiyaçları beş temel alan içerisinde gruplandırmış ve beş farklı ‘şema alanı’ altında toplam 18 şema belirlemiştir. Aşağıdaki tabloda bu beş alanın barındırdığı şemalar belirtilmiştir (5).

Son dönemlerde yürütölen çalışmalarda, beyin ve duğu biyolojisi üzerinde yoğunlaşan biyolojik yaklaşımların, erken dönemde yaşanan travmatik olayların incelenmesi amacıyla geliştirildiği görölmektedir. Amigdala, orbita frontal korteks ve medial frontal korteks gibi beyindeki bazı alanların öfke oluşumunda görev aldığı gözlemlenmiştir (10-11, 14). Ayrıca, yeme bozuklukları,

beyin travması ve doğum komplikasyonları gibi bazı durumların da dışarıdan kaynaklanan tetikleyiciler olarak öfkeyi etkilediği belirtilmektedir (11). Bunlara ek olarak, duygusal örselenme sırasında bilinç düzeyinde bulunan hatıraların, kortikal bölgeleri kapsayan ve hipokampusun de içinde bulunduğu bir sistem tarafından aktiveleştirildiği öne sürölmektedir. Aynı zamanda, amigdalanın aktiviteleriyle devreye giren endişe koşullanma mekanizmalarının, bilinçdışı anıların oluşturulmasında etkili olduğu ve bahsi geçen mekanizmaların, bu eylemi gerçekleştirdiği esnada işlediği deneyimlerle ilgili farklı bilgi çeşitlerini de depoladığı belirtilmektedir (12).

**Tablo 1:** Erken dönem uyumsuz şema alanları\*

Şema Alanları	Şemalar
<b>Ayrılma dışlanma ve reddedilme</b>	Terk edilme/İstikrarsızlık Güvensizlik/ Suistimal edilme Duygusal Yoksunluk Kusurluluk/ Utanç Sosyal izolasyon/ Yabancılaşma
<b>Zedelenmiş özerklik ve performans</b>	Bağımlılık/Yetersizlik Hastalıklar ve zarar görme karşısında dayanıksızlık Yapışıklık/Gelişmemiş benlik Başarsızlık
<b>Zedelenmiş sınırlar</b>	Hak görme/Büyüklencilik Yetersiz öz-denetim/Öz-disiplin
<b>Başkalarına yönelimlilik</b>	Boyun eğicilik Kendini feda Onay Arayıcılık/ Tanınma arayıcılık
<b>Aşırı tetikte olma ve baskılama/ Ketleme</b>	Olumsuzluk/Karamsarlık Duygusal baskılama/Ketleme Yüksek standartlar/Aşırı eleştiricilik Cezalandırıcılık/Acımasızlık

\*Bu Tablo Jeffrey E.Young’ın kitabından alınmıştır (5).

Öfkenin tanımıyla ilgili alan yazın taraması yapıldığında, öfke hakkında tek bir tanım üzerinde anlaşmaya varılmadığı, yürütölen çok sayıda araştırmada öfkenin tek bir tanım altında toplanmayıp farklı türleri olduğu ve çeşitli şekillerde tanımlandığı görölmektedir. Öfke sözcüğü psikoloji alanyazınında, “engellenme, yoksun bırakılma, saldıryı maruz kalma, tehdit alma ve sınırlanma gibi durumlarda hissedilebilen, genelde sebep olan olgu veya kişiye yönelen farklı biçimlerde sonuçlanabilen yoğun bir “negatif duğu” olarak açıklanmaktadır (13,14). Yürütölen çalışmalar sonucunda, kontrol altında tutulan öfkenin, kişinin kendisine duyduğu sayrı, dışadönüklük, zihinsel esneklik ve diğer bireylere uyum sağlama alanlarında negatif yönde bir ilişkisi olduğu görölmüştür. Ancak öfkenin diğer ifade türleri incelendiğinde, bu türlerin depresyon, nevrozizm ve obsesif kompulsif semptomlar gibi değişkenlerle pozitif yönde bir ilişkisi olduğu ve aynı zamanda suç eğilim, saldırgan davranışlar sergileme, antisosyal tutumlar, özkıyım gibi psikopatolojik durumlara yol açabileceği belirtilmektedir (14-16).

Alanyazında bireyin tutumlarının direkt olarak şemaların bir yansıması biçiminde görölmüğüne dikkat çekilmektedir. Teoride şemaların davranışları güdüleyebildiği, fakat bu davranışların

herhangi bir Őemanın bütönlüycisi/parçası olarak görölmek zö-runda olmadığı da ifade edilmektedir. Őemaları oluşturan kavramların kendilik yıkan düşünce yönlü ve duygu yönlü öörüntüler olduğu varsayılmaktadır (17). Alanyazında yer alan bulgular doğrultusunda bu araştırmada öfke duygusu, öfkenin ifade ediliş biçimi ile erken dönem uyum bozucu Şemalar arasındaki ilişkiler incelenecektir. Alan yazında Şema öörüntülerinin “bağlanma figürleri” ile “çocukluk veya ergenlik öörseleyici yaşantıları” etkisinde oluştuğu varsayımı sunulmaktadır. Bu bağlamda araştırma değişkenleriyle ilgili ölçek puanlarının cinsiyete göre farklılıklarını belirlemek ve yanı sıra Şema alt boyutlarının öfke duygusu, öfkenin ifade ediliş biçimini açıklama gücünü ortaya koymak hedeflenmektedir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Bu bölümde, araştırmada kullanılan öörneklem ölçütleri, katılımcıların demografik özellikleriyle ilgili bilgiler, veri toplama araçlarının psikometrik özellikleri ve veri analizi ile ilgili bilgilere yer verilmiştir. Nicel analizler içinde betimsel analizler, t testi ve regresyon analizleri yer almaktadır.

### Çalışma popölasyonu

Araştırmada 17-35 yaşları arasındaki Ankara ilindeki bir üniversitede de eğitim gören 200 üniversite öğrencisinden oluşan bir öörneklem kullanılmıştır. Kasım 2015-Mart 2016 tarihleri arasında test bataryaları kapalı bir zarf içinde katılımcılara verilerek uygulamalar yüz yüze yapılmıştır. Toplamda 280 kişiye ulaşılmış ancak araştırmaya katılan fakat ölçeklerin bir kısmını hiç doldurmayan ya da her bir ölçek için toplam madde sayısının %10’undan daha fazla maddeyi boş bırakan katılımcıların verileri analiz dışında bırakılmıştır. %10 barajını geçmeyen kayıp değerler için ise ilgili maddenin ortalama puanı atanmıştır. Araştırma değişkenleri için uç puanlar (z puanı) hesaplanmış ve veriler  $\pm 3,29$  aralığı dışında kalan değerlerden arındırılarak 30 katılımcıya ait veriler araştırma öörnekleminden çıkarılarak analiz dışında bırakılmıştır. Sonuçta 80 kişinin verileri çıkarılmış ve 200 kişi çalışmanın öörneklemi oluşturmuştur. Öörneklem %57,5’ini (n=115) kadın katılımcılar oluştururken, %42,5’ini (n=85) erkek katılımcılar oluşturmaktadır. Bu katılımcılardan %68’i (n=136) 17 ile 25 yaşları arasında bulunurken % 30,4’ü (n=61) 21 ile 25 yaşları arasında, % 1,5’i (n=3) ise 26-35 yaş aralığındadır. Çalışma, üniversitede okuyanlar için rastgele öörnekleme yöntemi ile seçilen ve araştırmaya katılan çeşitli faköltelelerin (hukuk, psikoloji, mühendislik) öğrencilerinin dâhil olmasıyla ile yürütölmüştür. Rastgele öörnekleme yönteminin yapısı gereği öörnekleme seçilen bireylerin öörneğe seçilme olasılıkları gelişigüzel tasarlanmıştır, evrenin bir parçasının seçilmesi ve seçime bağlı yanlılık (selection bias) olasılığını azaltılması amaçlanmıştır (18).

### Çalışma dizaynı ve protokolü

Bu çalışmada katılımcıların yaşi, kendisinin kaçınıcı çocuk olduğu, kardeş sayısı, yaşamının büyük çoğunluğunu kimlerle geçirdiği, anne ve babasının hayatta olup olmadıkları, ebeveynlerinin evliliklerinin devam edip etmediği, içinde büyüdüğu aile ortamında fiziksel, duygusal veya sözel şiddete maruz kalıp kalmadığı, şiddet yaşantısı ve intihar veya zarar verme davranışı gösterip göstermediği gibi sorulara yanıtlarını değerlendirmek amacıyla evet/hayır şeklinde ve açık uçlu olarak yanıtlanan 20 sorudan oluşan “*Sosyodemografik Bilgi Formu*” araştırmacı tarafından oluşturulmuştur.

Bilgilendirilmiş Onam Formu’nda çalışmanın genel amaçları; katılımın gönöüllölkü esasıyla olduğu ve verecekleri bilgilerin gizli kalması gibi konularla ilgili ön bilgilendirme yapılmıştır. Araştırmada bulunmak isteyen katılımcılardan, söz konusu araştırmada gönöüllö olarak buldukları ve verecekleri bilgilerin bilimsel amaçlı olarak kullanılabileceğini kabul ettiklerini beyan eden işaretlemeyi yapmaları istenmiştir. Mevcut çalışmada, Genç Şema Ölçeği (YŐÖ-KF3) ile Sürekli Öfke ve Öfke İfade Tarzı Ölçeği (SÖÖTÖ) kullanılmıştır. Bu bağlamda araştırma değişkenleriyle ilgili ölçek puanlarının cinsiyete göre farklılıklarını belirlemek ve yanı sıra Şema alt boyutlarının öfke duygusu, öfkenin ifade ediliş biçimini açıklama gücünü ortaya koymak hedeflenmektedir. Katılımcıların öfke yansıma modellerini incelemek amacıyla Spielberger ve arkadaşları (19) tarafından geliştirilmiş olan 4’lü likert tipi 34 madde içeren “*Sürekli Öfke İfade Tarzı Ölçeği*”, uygulanmıştır. Katılımcıların bu ölçekten alabilecekleri en düşük puan 10 iken en yüksek puan 40’tır. Bahsedilen ölçek, üç alt gruptan oluşmaktadır. Bu alt gruplar *öfke içe vurumu* (13, 15, 16, 20, 23, 26, 27 ve 31. maddeleri), *öfke dışa vurumu* (12, 17, 19, 22, 24, 29, 32 ve 33. maddeleri) ve *öfke kontrolü* (11, 14, 18, 21, 25, 28, 30 ve 34. maddeleri) şeklinde ayrılmıştır. Katılımcıların bu üç alt ölçekten alabilecekleri en düşük puan 8 iken en yüksek puan ise 32’dir. Ölçek Türkçe’ye Özer (1994) tarafından uyarlanmıştır. Orijinal ölçekte cronbach alfa değeri ,77 ile ,88 arasında değişmektedir. Bu çalışmada ölçeğin Cronbach Alpha kat sayısı ,76; sürekli öfke için. 82; alt ölçeklerden öfke içe vurumu için. 64; öfke dışa vurumu için ,79; öfke kontrolü için ise ,81 olarak bulunmuştur.

Bu ölçeklere ek olarak, katılımcılara “*Genç Şema Ölçeği*” de uygulanmıştır. Ölçeğin özgün formunda 205 madde bulunmakta ve ölçek 18 Şema içermektedir. Young tarafından ölçeğin 75 maddelik kısa bir formu geliştirilmiştir (20). Ölçeğin Türkçeye uyarlandığı çalışma Karaoşmanoğu ve arkadaşları tarafından yürütölmüştür (21). Ölçeğin bu kısa formunda yer alan 18 boyut, 5 alt boyut; Kopukluk ve Reddedilmişlik, Zedelenmiş Otonomi ve Kendini Ortaya Koyma, Zedelenmiş Sınırlar, Diğerı Yönelimlilik, Aşırı Tetikte Olma ve Bastırılmışlık Şema alanlarını kapsamaktadır. Ölçüm aracı 90 madde içermektedir. Katılımcılardan beklenen, 6’lı Likert ölçeği şeklinde tasarlanan her bir maddeyi (1 seçeneği “Benim için tamamiyla yanlış”, 6 seçeneği “Beni mükelmel şekilde tanımlıyor” ifade etmek üzere) derecelendirmeleridir. Ölçeğin özgün formunda, her bir alt ölçekte 5 adet madde bulunmakta, bu maddelere verilen cevaplara göre alt ölçeklerden 5 ile 30 arasında değişen puanlar alınabilmektedir. Bu çalışmada ölçeğin iç tutarlılık katsayısı (Cronbach Alfa=,95) olarak bulunmuştur. Ölçeğin alt ölçeklerinin iç tutarlılık katsayıları ise ,94 ile ,95 arasında değiştiği saptanmıştır.

### Etik beyanı

Anket Bilgilendirme Formunda; araştırmanın neden yapıldığı, bilgilerin gizli tutulacağı ve tamamen araştırma amacı ile kullanılacağı ve çalışmaya katılmada gönöüllölüğün esas alındığı bilgilendirmeler yer alır. Öörneklem için veri toplama işlemi Kasım 2015-Mart 2016 tarihleri arasında Gazi Üniversitesinde yüz yüze gerçekleştirilmiştir. Araştırmanın uygulama aşamasından önce Ankara Üniversitesi Tıp Etik Kurulu’ndan 3 Ekim 2016 tarih ve 85434274-050.04.04 Sayı ve 21 272 Karar No ile etik onay alındıktan sonra gerçekleştirilmiştir. İlgili üniversitenin dekanlıkları

aracılığı ile bazı fakültelerde (hukuk, edebiyat ve mühendislik) uygulama yapabilmek için izin alınmıştır.

## BULGULAR

Betimsel analizlere göre yaşamının büyük bir kısmını metropol ya da şehirlerde geçiren katılımcılar, tüm katılımcı grubunun %71'ini (n=143), kasaba veya köyde geçiren katılımcılar ise %6'sını (n=12) oluşturmaktadır. Katılımcıların %66'sı (n=132) orta gelir durumuna sahipken, %18'i (n=36) düşük ve %16'sı (n=32) yüksek gelir durumuna sahip bulunmaktadır. Katılımcıların %68'i (n=136) 17 ile 25 yaşları arasında, % 30,4'ü (n=61) 21 ile 25 yaşları arasında ve % 1,5'i ise (n=3) 26 ile 35 yaşları arasındadır. Ayrıca, katılımcıların Sosyodemografik Bilgi Formu'nda yer alan erken dönem ve şiddet sorularına ilişkin öz bildirimleri; intihar girişimi ve zarar verme davranışları ile ilgili veriler incelendiğinde; intihar girişimlerinin %23,5 (n=47), kendine zarar verme davranışlarının %31.5 (n=63) ve başkasına zarar verme davranışlarının %36.5 (n=73) oranlarında seyrettiğini göstermiştir.

Araştırmanın amacı doğrultusunda t testi ile cinsiyet karşılaştırmaları yapılmıştır. Tablo 2'de belirtildiği gibi, kadınların (Ort.=1,89; standart sapma=.71) Ayrılma ve Reddedilme/Dışlanma Alanında elde ettikleri puan ortalamaları, erkeklerin toplam puanından (Ort.=2,52; Ss=.99) anlamlı derecede düşüktür (t=-4,99, p<.001). Erkeklerin Zedelenmiş Sınırlar Alanında elde ettikleri puan ortalaması (Ort.=2,50, ss=1,12) ise kadınlarınkine göre (Ort.=3,42; ss=.92) anlamlı oranda düşük bulunmuştur (t= 6,14, p<.05). Aşırı Tetikte Olma ve Baskılama/Ketleme Alanı düzeylerinden alınan puan ortalamalarının erkeklerde (Ort.=2,33; ss=.93), kadınlara göre (Ort.=2,90; ss=.73) anlamlı oranda düşük olduğu görülmektedir (t=4,75, p<.05). Zedelenmiş Özerklik ve Performans Alanı ve Başkalarına Yönelimlilik Alanına bakıldığında ise cinsiyetler arasında anlamlı düzeyde bir farkın olmadığı gözlemlenmiştir.

**Tablo 2:** Cinsiyete göre erken dönem uyumsuz şema alanları puanlarına ilişkin Bağımsız Örneklemler t Testi sonuçları

şema alanı	Kadın N=115		Erkek N=85		T
	$\bar{x}$	Ss	$\bar{x}$	Ss	
Ayrılma ve dışlanma/reddedilme	1,89	,71	2,52	,99	-4,99*
Zedelenmiş özerklik ve performans	2,13	,70	2,07	,76	,59
Zedelenmiş sınırlar	3,42	,92	2,50	1,12	6,14*
Başkasına yönelimlilik	3,27	,75	3,05	1,15	1,61
Aşırı tetikte olma ve baskılama/ketleme	2,90	,73	2,33	,93	4,75*

\*p<.05

Tablo 3'te, kadın ve erkekler arasında sürekli öfke, durumluk öfke, kontrollü öfke, dışa vurulan ve içte tutulan öfke değişken-

leri puanlarında anlamlı derecede fark olduğu görülmektedir. Kadınların sürekli öfke düzeyleri (Ort.=2,18; Ss=.53) erkeklerle göre (Ort.=2,70; Ss=1.02) anlamlı derecede daha düşüktür (t=-4,29, p<.001). Kadınların (Ort.=2,43; Ss=.35) durumluk öfke düzeylerinin de erkeklerin düzeyinden (Ort.=2,63; Ss=.33) anlamlı seviyede daha düşük olduğu görülmektedir (t=-4,03, p<.001). Dışa Vurulan Öfke incelendiğinde ise kadınların puanlarının (Ort.=2,20; Ss=.50) erkeklerin puanından (Ort.=2,56; Ss=.97) anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür (t=-2,96, p<.001). Ayrıca, kadınların içte Tutulan Öfke puanları (Ort. =2,34; Ss=.50) erkeklerin bu alandaki puanlarından (Ort. =2,49; Ss=.46) anlamlı oranda daha düşüktür (t=-2,09, p<.05). Son olarak, Kontrol Altına Alınmiş Öfke alanına bakıldığında iki cinsiyet arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur.

**Tablo 3:** Cinsiyete göre sürekli öfke ve öfke ifade tarzı ölçek puanlarına ilişkin Bağımsız Örneklemler t-Testi sonuçları

Sürekli öfke ve öfke ifade ediş tarzı	Kadın N=115		Erkek N=85		T
	$\bar{x}$	ss	$\bar{x}$	ss	
Sürekli öfke	2,18	,53	2,70	1,02	-4,29*
Durumluk öfke	2,43	,35	2,63	,33	-4,03*
Kontrol altına alınmiş öfke	2,58	,45	2,56	,76	,26
Dışa vurulan öfke	2,20	,59	2,56	,97	-2,96*
içte tutulan öfke	2,34	,50	2,49	,46	-2,09*

\*p<.05

Pearson Momentler Çarpımı Korelasyon Analizi ise regresyon analizi öncesi değişkenler arasındaki ilişkileri inceleme amacıyla uygulanmıştır. Sürekli öfke ile zedelenmiş sınırlar, içte tutulan öfke, aşırı tetikte olma ve baskılama/ketleme, zedelenmiş özerklik ve performans, ayrılma ve dışlanma/reddedilme ve dışa vurulan öfke arasında ,08 ve ,86 (p <,01) arasında değişen pozitif yönde anlamlı ilişki bulunmaktadır. Sürekli öfke ile durumluk öfke, başkalarına yönelimlilik ve kontrol altına alınmiş öfke ile -,03 ile -,60 (p <,01) arasında değişen ters yönlü anlamlı ilişkiler saptanmıştır.

şemaların öfke puanlarını yordama gücü yordayıcı değişkenlerin regresyon denklemine belirli bir anlamlılık düzeyine göre sırayla elendiği ya da sırayla seçildiği regresyon tekniği olan Hiyerarşik Regresyon Analizleri/ stepwise ile incelenmiştir.

Tablo 4'te görüleceği üzere, birinci alanda denkleme giren "Ayrılma ve Dışlanma/Reddedilme" değişkeni, sürekli öfkeyi yordayan ilk değişken olmuştur. Bu değişkenin açıkladığı varyans %20 "dir (F=49,95, p<.001). Bu değişkenin ardından beşinci alandan denkleme giren "Aşırı Tetikte Olma/Baskılama" ile açıklanan varyans %28 olmuştur (F=38,19, p<.001).

Tablo 5'te görüleceği üzere, birinci değişken alan dörtten "Başkalarına Yönelimlilik" değişkeni denkleme girmiş ve durumluk öfkeyi yordayan değişken olmuştur. Sözü edilen değişken %9 varyans açıklamıştır (F=21,74, p<.001). Bu değişkenin ardından

**Tablo 4:** Sürekli öfkenin yordanmasına ilişkin Hiyerarşik Regresyon Analizi bulguları

Yordayıcı	B	Standart hata	R	R <sup>2</sup>	Uyarlanmış R <sup>2</sup>	Beta	T	F
Ayrılma ve dışlanma/reddedilme	,41	,05	,45	,20	,20	,45	7,07*	49,95*
Aşırı tetikte olma/baskılama	,27	,05	,53	,28	,27	,28	4,62*	38,19*

\*p<,01

**Tablo 5:** Durumluk öfkenin yordanmasına ilişkin Hiyerarşik Regresyon Analizi bulguları

Yordayıcı	B	Standart hata	R	R <sup>2</sup>	Uyarlanmış R <sup>2</sup>	Beta	T	F
Başkalarına yönelimlilik	,12	,02	,32	,09	,09	,32	4,66**	21,74**
Zedelenmiş sınırlar	-,13	,02	,45	,24	,23	-,41	-6,15*	31,79**

\*\*p<,01; \*p<,05

**Tablo 6:** Kontrol altına alınmış öfkenin yordanmasına ilişkin Hiyerarşik Regresyon Analizi bulguları

Yordayıcı	B	Standart hata	R	R <sup>2</sup>	Uyarlanmış R <sup>2</sup>	Beta	T	F
Zedelenmiş özerklik ve performans	-,34	,05	,41	,17	,16	-,41	-6,38*	40,65*
Ayrılma ve dışlanma	-,13	,05	,44	,20	,19	-,19	-2,54*	24,10*
Zedelenmiş sınırlar	-,17	,03	,49	,23	,22	-,32	-5,19*	30,51*

\*p<,01

**Tablo 7:** Dışa vurulan öfkenin yordanmasına ilişkin Hiyerarşik Regresyon Analizi bulguları

Yordayıcı	B	Standart hata	R	R <sup>2</sup>	Uyarlanmış R <sup>2</sup>	Beta	T	F
Zedelenmiş özerklik ve performans	,47	,07	,43	,19	,18	,43	6,74*	45,60*
Ayrılma ve dışlanma	,16	,06	,46	,21	,20	,18	2,37*	26,02*
Aşırı tetikte olma ve baskılama	,14	,07	,48	,23	,21	,16	2,04*	19,01*

\*p<,01

alan üçten denkleme giren “Zedelenmiş Sınırlar” ile açıklanan varyans %24’e yükselmektedir (F=31,79, p<,001).

Tablo 6’da kontrol altına alınmış öfkeyi yordayan ilk değişken alan, %17 varyans ile ikinci bloktan denkleme giren “Zedelenmiş Özerklik ve Performans” olmuştur (F=40,65, p<,001). “Ayrılma ve Dışlanma/Reddedilme” ile açıklanan varyans %20’ye yükselmiştir (F=24,10, p<,001). Ardından denkleme alan üçten “Zedelenmiş Sınırlar” eklenmiş ve açıklanan varyans %23’e ulaşmıştır (F=21,30, p<,001).

Tablo 7’de yer alan “Zedelenmiş Özerklik ve Performans” değişkeni, %19 varyans ile dışa vurulan öfkeyi yordamaktadır (F=45,60, p<,001). Bu değişkenin ardından denkleme giren “Ayrılma ve Dışlanma/Reddedilme” ile açıklanan varyans %21’e yükselmekte (F=26,02, p<,001) ve “Aşırı Tetikte Olma ve Baskılama” ile varyans %23’e ulaşmaktadır (F=19,01, p<,001).

Tablo 8’de yer alan “Ayrılma ve Dışlanma/Reddedilme” %13 varyans ile içte tutulan öfkeyi yordayan ilk değişken olmuştur (F=29,43, p<,001). Ardından denkleme katılan “Zedelenmiş Sınırlar” ile açıklanan varyans %15’e yükselmiştir (F=17,74, p<,001).

## TARTIŞMA

Fiziksel ve duygusal ihmâl, istismar ve örselenme gibi çocukluk çağı döneminde yaşanan çeşitli ruhsal travmaların incelemesi ve ilgili psikopatolojilerin analiz edilmesi psikoloji temelli kuramsal yaklaşımlarla sağlanmaktadır. Gelişimsel psikoloji ve klinik psikoloji perspektifinden yapılan bu incelemeler, özellikle çocukluk dönemini merkez alırken, sonuçlar klinik adli psikoloji sahası için de yadsınamaz bir öneme sahiptir. Bu doğrultuda mevcut araştırmada çocukluk yaşantıları sonucu gelişen erken dönem uyum bozucu şemalar ile öfke duygusu, öfkenin ifade



**Tablo 8:** İte tutulan öfkenin yordanmasına ilişkin Hiyerarşik Regresyon Analizi bulguları

Yordayıcı	B	Standart hata	R	R <sup>2</sup>	Uyarlanmış R <sup>2</sup>	Beta	T	F
Ayrılma ve dışlanma	,19	,03	,36	,13	,13	,36	5,43*	29,43*
Zedelenmiş sınırlar	-,07	,02	,39	,15	,14	,15	-2,32*	17,74*

\*p<.01

ediliş biçimi arasındaki ilişkiler ele alınmıştır. Araştırma değişkenlerinin cinsiyete göre farklılaşıp farklılaşmadığı incelenmiş ve yapılan bağımsız örneklemeler için t-testine göre, kadın ğrencilerin Zedelenmiş zerklik ve Performans, Zedelenmiş Sınırlar, Başkalarına Yönelimlilik, Aşırı Tetikte Olma ve Baskılama/Ketleme alanları açısından (Ayrılma Dışlanma/Reddedilme alanı hariç), erkek öğrencilere göre daha yüksek puan aldığı belirlenmiştir. Araştırmada karşılaştırılmal olarak ele alınan ilk değişken zedelenmiş özerklik ve performansdır. Bu şema alanında kişiiler, diğerlerinden yardım alamadıklarında pratik problemleri zemeyecekleri, yeni işlere girişemeyecekleri, sorumlulukları idare edemeyip başaramayacakları gibi yanlış inançlara sahiptir ve kendilerini savunmasız olarak tanımlamaktadır. Bir diğer değişken zedelenmiş sınırlar şema alanında bireyler öz disiplin sağlama, başkalarının sınırlarına sayđı gösterme ve işbirliği yapma gibi konularda zorluklar yaşamaktadırlar. Başkalarına yönelimlilik alanında ise kendi ihtiyaçlarından çok başkalarının ihtiyaçlarına öncelik veren fedakar bir profil dikkati çekmektedir. Bu profildeki kişiiler; çocukluk ve erişkinlik dönemlerinde içsel farkındalıklarından yoksun yetişmekte, daha çok dışsal olarak yönlendirilip başkalarının arzularına uyarak, kendi duygusal tepki ve öfkelerini bastırmaktadır. Erkek ve kadında karşılaştırılmal olarak ele alınan son değişken ise aşırı tetikte olma ve baskılamadır. Bu alanda ise kendini ifade edememe, haz, cinsel heyecan dürtülerini katı bir biçimde kurallara sığdırmaya çalışma grlmektedir. Nitekim yukarıda işaret edilen şemalara bağlı özellikler, bu puanların kadınlarda yüksek olmasını anaşılır kılmakta; cinsiyet rollerinin kadın ve erkek davranışlarını ve tutumlarını erken yaşta şekillendirdiğinin, üstelik üniversitede okuyan gençlerin de geleneksel cinsiyet rollerini srdrdklerinin altını çizmektedir. Kadınlardan olumsuz çocukluk yaşantısı ve yetişkin psikopatolojisine daha yatkın olduğunu ileri süren çalışmalar da mevcuttur (24-27). Bu bağlamda mevcut çalışmadan elde edilen bulguların alan yazınla örtüştüğü grlmektedir.

Araştırmada yer alan katılımcılar sürekli öfke, durumluk öfke, kontrolü sağlanmış öfke, dışa yansayan ve içte kalan öfke alanları açısından karşılaştırıldığında, bulgular erkeklerin sürekli öfke, durumluk öfke, içte kalan öfke ve dışa yansayan öfke düzeylerinin çok daha fazla olduğuna işaret etmektedir. Tutarlı biçimde kontrol altına alınmış öfke açısından erkeklerin daha düşük puan aldığı da görülmüştür. Buna göre kültürümüzde genç erkeklerin genç kadınlara oranla sürekli öfkeyi ve durumluk öfkeyi hem kendilerine hem de dışarıya daha fazla yönelttiği ve öfkelerini kontrol etmekte güçlük yaşadığı söylenebilir. Nitekim öfkesini ie veya dışarı yansıtın bireylerin öfke kontrolünde zorluklar yaşadıkları belirtilmektedir (41). Ancak, erkeklerin

fkelerini daha doğrudan yansıtıklarına, kadınlardan ise bunu yapamayıp kontrol altına alınmış öfke düzeylerinin daha yüksek olduğuna işaret eden yurtdışında yapılan çalışmalar da alan-yazında mevcuttur (15, 19). Geleneksel bakış açısında, sevecenlik, anlayışlı olma, sabırlı olma, sadakatli olma, yardımseverlik, diğerkamlık gibi nitelikler kadınlara ilişkili görülürken; tesirli olma, g, cömert olma, hırslı olma, baskın olma ve hislerini açığa vuramama gibi karakteristikler erkek cinsiyeti ile ilişkili grlmektedir. Toplumsal olarak kabul edilen ve kişinin göstermesi beklenen eğilim, tutum ve eylemler olan "cinsiyet rollerinin" benlik yapısını büyük ölçüde etkilediği bilinmektedir. Alan yazında çocukların cinsiyetlerine göre saldırganlık puanlarının anlamlı düzeyde farklılaştığı, erkek çocukların daha yüksek saldırganlık puan ortalamalarına sahip olduğu bulguları mevcuttur (13,41). Yine erkek öğrenciler toplumsal cinsiyet rolleri açısından kadın öğrencilerden daha geleneksel bulunmuştur (42).

Regresyon Analiz sonuçları, ayrılma dışlanma/reddedilme, zedelenmiş özerklik ve performans, zedelenmiş sınırlar, başkasına yönelimlilik, aşırı tetikte olma ve baskılama/ketleme alanları değişkenlerinin sürekli öfke, durumluk öfke ve öfke ifade tarzını yordadığına işaret etmektedir.

Ayrılma ve dışlanma/reddedilme alanından yüksek puan alan bireyler, başkalarına karşı güvenli, doyum verici bağlanma oluşturamayabilir. Sürekli, güvende hissetme, sevilme, bir bütünün parçası olma ihtiyaçlarının giderilmeyeceğine inanabilir. Alan yazında, ayrılma ve dışlanma alanındaki şemaların, ocugn genellikle duygusal olarak sevgisiz, soğuk, ilgisiz, empatik olmayan, duyguları paylaşmayan, reddedici, kısıtlayıcı, belirsiz, mesafeli veya suistimalci olarak hissettiği aile ortamlarından kaynaklandığı ileri sürülmüştür (18-20). Bununla birlikte, çocukluk ağı fiziksel ve cinsel istismar konularına ilişkin şemaların (rn., tehditlere karşısı dayanıksızlık: "Fiziksel saldırıya uğramaktan hep korkarım."; güven yoksunluğu: "Başkalarının beni kullandığını düşünüyorum") gelişimine; ihmal edilmek ise kaybolunmuş hissi ve değersizlik olgularına ilişkin şemaların (rn., duygusal yoksunluk: "Bir başkası için özel olabileceğimi hiç hissetmedim."; sosyal izolasyon: "Kendimi diğerlerinden izole veya kopuk hissediyorum.") oluşumuna neden olduğu belirtilmektedir (20). Güven duymama, sevgiyeye dayalı ilişki kuramama, utanç yaşama, istismarın izleri ve duygusal açıdan yetersizlik yaşamanın kişiilerde sürekli öfke içinde olmaya neden olduğu söylenebilir. Buradan hareketle, travma mađđuru bireylerin, kendilerinin hatalı olduğu, utanç duymaları gerektiği, insanlara inanmanın zor olduğu ve duygusal anlamda terk edilmiş, yoksun, izole oldukları yönündeki inana sahip olmaları beklenen bir bulgu olmaktadır (4-5, 31-32). Ayrıca kendini kusurlu

bulan, utanç duyan, izole, diğerlerine güvenemeyen kişilerin öfkelerini içte tuttıkları da ileri sürülmektedir. Öte yandan bu öfkenin kontrolden çıkabileceği ve öfkeyle kişinin kendine verdiği zararlar (depresyon, intihar...) üzerinde de durulmaktadır (42). Öfkeyi yordayan bir diğer değişken ise, *aşırı tetikte olma ve baskılamadır*. Bu bulgu ile çoğu kez mutluluğun bastırılması, kendini ifade edememe, rahatlayamama, duygularını, itkilerini ve seçimlerini bastırma ya da katı yaklaşım sergileyebilen kişilerin sürekli öfke yaşamalarında erken dönemde maruz kaldıkları katı, talepkar bazen cezalandırıcı aile kökenlerinin belirleyici bir unsur olabileceği söylenebilir (20). Ayrıca, alanyazın incelendiğinde, algılanan ebeveyn kabul ya da reddinin bireylerde depresyon belirti düzeyini yordadığı, öfkeyi/saldırganlığı ise aracı rol olarak yordadığı görülmüştür (43). Çalışmada öfkeyi yordadığı saptanan bir diğer değişken ise *başkalarına yönelimlilik*dir. Buna göre, bu şema alanına sahip bireyler, kendi gereksinimlerinden çok başkalarının gereksinimlerini karşılamaya önem verirler. Diğer bir deyişle, onay alma, duygusal bağlantıyı sürdürme ve tepkiden kaçınmak için kendi ihtiyaçlarını görmezden gelirler. Bu bağlamda kişi kendi istek ve ihtiyaçlarını görmezden gelerek öfkesini yansıtmaktan kaçınmaktadır. Nitekim mevcut yazındaki bu bulguyla tutarlı bir çalışma da vardır (27).

*Zedelenmiş sınırlar* şema alanına sahip bireyler öz disiplin veya sağlıklı içsel sınırlar geliştiremezler (19). Dürtü ve arzularını dizginleme ve yarınlar uğruna řu anda yaşanan memnuniyeti erteleme yeteneğinden yoksunlardır. Başkalarının haklarına saygı gösterme, işbirliği yapma, sözleri yerine getirme ve uzun vadeli hedefler oluşturmada zorluklar yaşadıkları belirtilmektedir. Haklılık ve yetersiz özenetim bu alanda tanımlanan erken dönem uyumsuz şemalar olarak belirtilmektedir (27). Bu bağlamda değerlendirilecek olursa zedelenmiş sınırlarla ilgili şemaya sahip olmak; kendine her şeyi hak görmek ya da özenetimi kaybetme korkusunun kişilerin öfke duygularını canlı tuttuğu düşünülebilir. Ancak zedelenmiş sınırlara ilişkin şemaların yani hak görmek ya da özenetim eksikliğinin bazı durumlarda öfkenin kontrol altına alınmasına yol ağtığı da ortaya konmuştur. Öfkeyi yordayan değişkenlerden biri de *zedelenmiş özerklik ve performans*dir. Tehditler karşısında dayanıksızlık şeması (bir musibetin olacağı ve ondan korunamayacağı inancı), bariz bir tehdit ve fiziksel bütünlüğe saldırı şeklinde gerçekte fiziki şiddet sonucu gelişebilmektedir. Bulgular böyle bir şemaya sahip bireylerin tehditler karşısında kendini dayanıksız görmesinin, bir şekilde öfkeyi kontrol altına almaya yol açmakta olduğuna işaret etmektedir. Öfkeyi kontrol edemeyecek olmak belki de beden bütünlüğünü daha da koruyamayacak duruma düşme endişesini beraberinde getiriyor olabilir. İlgili alanyazında, fiziki şiddete maruz kalınmasıyla da ortaya çıkabilen bu şemaların kişiyi bunalım, anksiyete (haddinden fazla dikkatli, hazır ve tetikte), çevresindekilere karşı düşmanca ve tepkisel belirtiler geliştirmesine yatkın hale getirebildiğinden söz edilmektedir. Ayrıca bunu destekler nitelikte, duygusal suistimal ile ruhsal yörden iyi olma hali arasındaki ilişkiye ayrılma ve dışlanma/reddedilme ve zedelenmiş özerklik ve performans şema alanlarının tam aracılık ettiğini öne süren çalışmalar da vardır. Bulguların, literatürdeki diğer çalışmaların bulguları ile tutarlı olduğu söylenebilir (2-8). İlgili alanyazında depresyon

belirtilerini meydana getiren bilişsel üçleme ile şemaların ilişkili olduğu saptanmıştır ve araştırmalardaki bulgular şemaların depresyonun tetiklenmesinde etkili olduğunu göstermiştir (1-2, 9). Ek olarak, depresyonu doğuran bilişlerin; kaybetme, yoksunluk ve negatif kendilik değerlendirmesi ile ilişkili olduğu dikkate alındığında, erken dönem olumsuz yaşantıların bu gibi zihinsel süreçlerin ve depresyonun da oluşmasına sebep olabileceğini düşündürmektedir. Sonuç olarak, erken dönem uyum bozucu yaşantılar sonucunda geliştirilen bu şemalar, kişinin öfkesini içte tutmasına da yol açabilmekte ve yakın ilişkilerinin zedelenmesine, ilişkilerden kaçınmasına yol açmakta, bilhassa bireyin öfkesini içte tutması ile kendine zarar vermesi ve bazı psikolojik rahatsızlıklar geliştirmesine zemin oluşturarak genel psikolojik sağlığının etkilenmesine sebep olabilmektedir (33). Genel olarak bulguları destekler biçimde, bu olumsuz tecrübeler maruz kalan bireylerin, karamsarlık (yaşamın yalnızca olumsuzluklarına odaklanma), yalnız bırakılmak (sevdiikleri tarafından terk edileceği inancı) ve tehditlere karşı dayanıksızlık (beklenmedik bir zamanda bir felakete uğrayıp bundan korunamayacağı beklentisi) gibi zedelenmiş özerklik ve performans şema alanında yer alan örüntüler de geliştirebileceği öne sürülmektedir (33-34). Yine zedelenmiş sınırlar, ayrılma ve dışlanma/reddedilme şemalarına sahip olan bireylerin, çevreye ve diğerlerine karşı aşırı ilgi, korkular, kaygı belirtileri ve yakın ilişkilerden kaçınma eğilimi gösterdikleri de bilinmektedir (17). Elde edilen bulgular erken dönem uyumsuz şemalar doğruğtusunda kişilerin öfke davranışları sergilediklerini ortaya koymaktadır. Ancak kişilerarası ilişkilerde yaşanan sorunların sağlıklı başa çıkma yollarıyla çözülememesi bu kişilerin uyumsuz şemalarının sürdürülmesine katkıda bulunabileceği de dikkate alınmalıdır.

Klinik adli psikoloji kapsamında yapılan çalışmalarda, çođu kez ceza veya hukuk davalarına konu olan vakalarda çocukluk çağı travmaları ile kendine ve/veya başkasına zarar verme davranışları ile intihar girişimi olguları arası ilişkiler gözlemlenmektedir. Sonuç olarak çocuklukta kötü muameleye maruz kalmak; beden ve ruh sağlığı açısından yaşam boyu sürebilecek olumsuz sonuçlara (örn. alkol ve madde kullanımı, depresyon ve obezite) yol ačan, dikkatle incelenmesi gereken önemli bir risk faktörüdür. Travmalar sonucunda oluşan bilişsel örüntüler ile duygu düzenleme ve psikolojik bozukluklar arası ilişkilere alanyazında yer verilmektedir (36-38, 44). Dolayısıyla travma çalışmaları biliş ve duygular perspektifinden analiz edildiğinde, elde edilen sonuçların klinik ve adli psikoloji alanlarında önleyici çalışmalara katkı sağlayacağı düşünölmektedir. Gelecekte yapılacak çalışmalarda travmalar, bilişler ve duygular çalışılırken, cinsel, duygusal, ekonomik veya fiziksel istismar deneyimi içeren hatıraların bozulma ve çarpıtılma olasılığı ile birlikte hatalı bir görüşme tekniğinin de buna yol açabileceği dikkate alınmalıdır (40-42). İstismarın uzun vadedeki sonuçlarının farklı boyutlarda incelenmesinin de önemli olduğu düşünölmektedir. Bu alanda boylamsal çalışmaların gerçekteştirilmesine, neden-sonuç ilişkisi açısından güvenilir verilerin elde edilmesine açısından ihtiyaç duyulmaktadır. Mevcut çalışmada öğrencilerden elde edilen bulguların klinik adli psikoloji alanında çalışın uzmanlara yol göstereceği düşünölmekte; şiddet uygulayan, öfke kontrolü olmayan kişilerin rehabilitasyon ya da psikoterapi süreçlerinde şema terapidin

yararlanılması, ayrıca duyu dzenleme ve durtü kontrolü üzerinde çalışılması önerilmektedir. Büyük örneklemli nicel çalışmaların yanı sıra nitel çalışmalarla, daha derinlemesine yapılacak incelemelerle bulguların güçlendirilmesi önemlidir. Tüm bunlara ek olarak, etik ilkeler erken dönem travmalar incelenirken özellikle önem taşımakta ve dikkat gerektirmektedir.

**Etik Komite Onayı:** Bu çalışma için etik komite onayı Ankara Üniversitesi Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Tarih: 03.10.2016, No: 272). Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

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

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir

**Finansal Destek:** Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

**Ethics Committee Approval:** This study was approved by Ankara University Ethics Committee (Date: 03.10.2016, No: 272).

**Peer Review:** Externally peer-reviewed.

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

**Conflict of Interest:** Authors declared no conflict of interest.

**Financial Disclosure:** Authors declared no financial support.

## KAYNAKLAR

- Harris AE, Lisa C. Parental perceptions, early maladaptive schemas, and depressive symptoms in young adults. *Cognitive therapy and research* 2002;26(3):405-16.
- Mcgin LK, Cukor D, Sanderson WC. The relationship between parenting style, cognitive style, and anxiety and depression, does increased early adversity influence symptom severity through the mediating role of cognitive style. *Cognitive Therapy and Research* 2005;29(2):219-42.
- Pinto-Gouveia, J. Early schemas and social phobia. *Cognitive Therapy and Research* 2006;30(5):571-84.
- Wright MO, Crawford E, Castillo D. Childhood emotional maltreatment and later psychological distress among college students, the mediating role of maladaptive schemas. *Child Abuse Negl* 2009;33(1):59-68.
- Young JE, Klosko JS, Weishaar ME. *Schema therapy: The Guilford Press. A practitioner's guide*; 2017.p.65-70.
- Björkdahl A. *Violence prevention and management in acute psychiatric care aspects of nursing practice: Stockholm Univ.* 2010.
- Björkly S. *Psychological theories of aggression: principles and application to practice. Violence in mental health settings*; 2006.p.27-46.
- Bosmans G, Braet C, Van Vlierberghe L. Attachment and symptoms of psychopathology: early maladaptive schemas as a cognitive link. *Clin Psychol Psychother* 2010;17(5):374-85.
- Calvete E. Emotional abuse as a predictor of early maladaptive schemas in adolescents: Contributions to the development of depressive and social anxiety symptoms. *Child Abuse Negl* 2014;38(4):735-46.
- Whittington R, Richter D. From the Individual to the Interpersonal: Environment and Interaction in the Escalation of Violence in Mental Health Settings. D. Richter., R. Whittington (Eds), Springer. *Violence in Mental Health Settings*; 2006.p.53-5.
- Blonigen DM, Krueger RF. Human quantitative genetics of aggression. In: Nelson RJ, editor. *Biology of aggression*. New York: Oxford University Press; 2006.p.20-37.
- LeDoux J. *Duygusal Beyin (2. Baskı). (A. Uysal, Çev). Pegasus. Yayınları*; 2006.p.20-35.
- Contreras IM, Kosiak K, Hardin, KM, Novaco RW. Anger rumination in the context of high anger and forgiveness. *Personality and Individual Differences*; 2021.p.170-2.
- Snyder J, Schrepferman L, Mceachem A, Deleeuw J. The contribution of child anger and fear and parental discipline to early antisocial behavior: An integrative model. M. Potegal, G. Stemmler, C. Spielberger (Eds.), *International handbook of anger: Constituent and concomitant biological, psychological and social process*. Springer Publishing; 2010.p.517-34.
- Yıldırım F, Küçüköncü S, Beştepe E. Erişkin unipolar depresyon örnekleminde çocukluk çağı istismar ve ihmhal yaşantılarının intihar girişimi ile ilişkisi. *Nöropsikiyatri Arşivi* 2014;51(1):133-40.
- Welburn K, Corstine M, Dagg P. The schema questionnaire—short form, factor analysis and relationships between schemas and symptoms. *Cognitive Therapy and Research* 2002;26(4): 519-30.
- Kömürçü B. Erken dönem uyumsuz şemalar, ebeveynlik biçimleri ve psikolojik belirtiler ile psikolojik dışlanmanın tehdit ettiği ihtiyaçlar arasındaki ilişkiler: Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Univ. 2014.
- Dawson B, Trapp RG. Probability related topics for making inferences about data. *Basic & Clinical Biostatistics*. 3rd Edition, Lange medical Books/McGraw-Hill Medical Publishing Division, 2001. p.69-72.
- Spielberger CD, Jacobs G, Russell S, Crane RS. Assessment of anger: The State Trait Anger Scale. In J. N. Butcher, C. D. Spielberger (Eds.), NJ: Lawrence Erlbaum Associates. *Advances in personality assessment*; 1983.p.159-87.
- Young JE. *Cognitive therapy for personality disorders: A schema-focused approach (3rd ed.)*. Professional Resource Press/ Professional Resource Exchange; 1999.p.50-70.
- Karaosmanoğlu HA, Soyğüt G, Kabul A. Psychometric properties of the turkish young compensation inventory. *Clin Psychol Psychother* 2013;20(2):171-9.
- Briere J, Gil E. Self-mutilation in clinical and general population samples, prevalence, correlates and functions. *Am J Orthopsychiatry* 1998;68(2):609-20.
- Favazza AR, Conterio K. Female habitual selfmutilators. *Acta Psychiatr Scand* 1989;79(2):283-9.
- Freedman JL, Sears DO. Selective exposure. *Advances in Experimental Social Psychology*; 1965;2:57-97.
- Walsh C, Mcmillian LH, Jamieson E. The relationship between

- parental substance abuse and child maltreatment: Findings from the Ontario health supplement. *Child Abuse Negl* 2003;27(12):1409-25.
26. Kapçı EG, Hamamcı Z. Aile işlevi ile psikolojik belirtiler arasındaki ilişki: erken dönem uyum bozucu şemaların aracı rolü, *Klinik Psikiyatri* 2010;13(3):127-36.
  27. Battistich V. Character education, prevention and positive youth development. *Character Education Partnership*; 2005.p.2-8.
  28. Joireman J. Empathy and the self- absorption paradox II: self-rumination and self-reflection as mediators between shame, guilt and empathy.*Self and Identity* 2004;3(3):225-38.
  29. Kula T. Ergenlerde öfke duygusu; benlik algısı, tanrı algısı, suçluluk ve utanç duyguları açısından bir değerlendirme Diyarbakır Örneklemi: Ankara Univ. 2012.
  30. Cecero JJ, Nelson JD, Gillie J.M. Tools and tenets of schema therapy: Toward the construct validity of the early maladaptive schema questionnaire—research version (EMSQ-R). *Clin Psychol Psychother* 2004;11(2):344-57.
  31. Mccarthy MC, Lumley MN. Sources of emotional maltreatment and the differential development of unconditional and conditional schemas, *Cognitive Behavior Therapy* 2012;41(4):288-97.
  32. Sukhodolsky DG, Golub A, Cromwell EN. Development and validation of the anger rumination scale. *Personality and Individual Differences* 2001;31(5):689-700.
  33. Myers IJ, Berliner L, Briere J, Hendrix CT, Reid T, et al.Treating adult survivors of severe childhood abuse and neglect: Further development of an integrative model. *The APSAC handbook on child maltreatment, 2nd Edition*. Newbury Park, CA: Sage Publications; 2002.p.p.50-65.
  34. Kessler RC, Ustun B. The World Mental Health (WMH) Survey Initiative version of the World Health Organization (WHO) Composite International Diagnostic Interview (CIDI). *Int J Methods Psychiatr Res* 2004;13(2):93-121.
  35. Erdoğdu M, Şentürk G, Şatıroğlu ON. Bireysel olarak riskli gruplarda riskli alkol tüketimi, alkol kullanımının sağlığa etkisi, *Adli Bilimler ve Suç Araştırmaları Dergisi* 2021;3(1):91-101.
  36. Lavoie J, Wyman J, Crossman AM, Talwar V. Meta-analysis of the effects of two interviewing practices on children's disclosures of sensitive information: Rapport practices and question type. *Child Abuse Neglect* 2021;1(2):112-3.
  37. Wood J, M Garven S. How sexual abuse interviews go astray: Implications for prosecutors, police, and child protection services. *Child Maltreatment* 2000; 5(2):109-18.
  38. Cronch LE, Viljoen JL, Hansen DJ. Forensic interviewing in child sexual abuse cases: Current techniques and Future Directions. *Aggression and Violent Behavior* 2006;11(3):195-207.
  39. Cyr M, Dion J, Gendron A, Powell M, Brubacher S. A test of three refresher modalities on child forensic interviewers' posttraining performance. *Psychology Public Policy and Law* 2021;27(2):220-1.
  40. Starner TM, Peters RM. Anger Expression and Blood Pressure in Adolescents. *J Sch Nurs* 2004;20(6):335-42.
  41. Boman P. Gender Differences in School Anger. *Int Edu J* 2003;4(2):71-7.
  42. Akse J, Hale Wwiii, Engels Rcme, Raaijmakers Qaw, Meeus Whj. Personality, perceived parental rejection and problem behavior in adolescence. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol* 2004;39(1):980-8.
  43. Yılmaz,DV, Zeyneloğlu, S, Kocaöz,S, Kısa,S, Taşkın,L, Eroğlu,K. Üniversite öğrencilerinin toplumsal cinsiyet rollerine ilişkin görüşleri. *Uluslararası İnsan Bilimleri Dergisi* 2009;6(1): 775-92.
  44. Eldoğan D, Barışkın E. Erken dönem uyumsuz şema alanları ve sosyal fobi belirtileri: Duygu düzenleme güçlüğü'nün aracı rolü var mı. *Türk Psikoloji Dergisi* 2014;29(74):108-15.



**Amaç ve Kapsam**

Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi (SABİAD); bağımsız, önyargısız ve çift-kör hakemlik ilkeleri çerçevesinde yayın yapan İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün uluslararası ve açık erişimli bilimsel yayın organıdır. Dergi Şubat, Haziran ve Ekim aylarında olmak üzere dört ayda bir yayınlanır ve üç sayıda bir cilt tamamlanır. Yayın dili Haziran 2023'ten itibaren İngilizcedir.

Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi (SABİAD), tıbbın tüm alanlarında klinik ve deneysel, özgün araştırmalar, ender görülebilecek olgu sunumları, özel ve güncel konularda literatür derlemeleri ve editöre mektup yayınlamaktadır. Orijinal metot geliştirme, yeni bir girişim tekniği ve orijinal çalışmaların ön sonuçlarını içeren kısa raporlara da dergide yer verilmektedir.

**Editöryal Politikalar ve Hakem Süreci**

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 potansiyelli 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.

Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi'ne (SABİAD) 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 Editöründür.

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 yazarlardan Etik Komisyon raporu veya eşdeğeri olan resmi bir yazı talep edilebilir. İnsanlar üzerinde yapılmış deneysel çalışmaların sonuçlarını bildiren yazılarda, çalışmanın yapıldığı kişilere uygulanacak prosedürler tümüyle açıklandıktan sonra, onaylarının alındığına dair bir açıklamaya metin içinde yer verilmelidir. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda ise ağrı, acı ve rahatsızlık verilmemesi için yapılmış olanlar açık ve net 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 eşleşme oranı değerlendirmesi, 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 koşullarının karşılanması 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 sorgulandığının ve çözümlendiğinin garantisini vermek amacıyla çalışmadan her yönüyle sorumlu olmayı kabul etmek.

Bir yazar, çalışmada katkı sağladığı kısımların sorumluluğunu almasına ilaveten, diğer yazarların da



çalışmanın hangi kısımlarından sorumlu olduğunu tanımlayabilmelidir. Ayrıca, her yazar diğer yazarların katkı bütünlüğüne güven duymalıdır.

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

Derginin Yayın Kurulu, itiraz ve şikâyet durumlarında, COPE rehberleri kapsamında işlem uygular. Yazarlar, itiraz ve şikâyetleri için doğrudan Yayıncılık Birimi ile temasa geçebilirler. İhtiyaç duyulduğunda Yayın Kurulu'nun kendi içinde çözemediği konular için tarafsız bir temsilci atanmaktadır. İtiraz ve şikâyetler için karar verme süreçlerinde nihai kararı Baş Editör verecektir.

Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi her makalenin <https://dergipark.org.tr/tr/pub/sabiad> adresinden erişebileceğiniz Telif Hakkı Anlaşması Formu ile beraber gönderilmesini talep eder. Yazarlar, basılı ya da elektronik formatta yer alan resimler, tablolar ya da diğer her türlü içerik dâhil daha önce yayınlanmış bir alıntıyı kullanırken telif hakkı sahibinden izin almalıdırlar. Bu konudaki yasal, mali ve cezai sorumluluk yazar(lar)a aittir.

Dergide yayınlanan makalelerde ifade edilen görüşler ve fikirler Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi, Editör, Editör Yardımcıları, Yayın Kurulu ve Yayıncı'nın değil, yazar(lar)ın bakış açılarını yansıtır. Editör, Editör Yardımcıları, Yayın Kurulu ve Yayıncı, bu gibi durumlar için hiçbir sorumluluk ya da yükümlülük kabul etmemektedir. Yayınlanan içerik ile ilgili tüm sorumluluk yazarlara aittir.

### Yayın Politikası

Dergi yayın etiğinde en yüksek standartlara bağlıdır ve Committee on Publication Ethics (COPE), Directory of Open Access Journals (DOAJ), Open Access Scholarly Publishers Association (OASPA) ve World Association of Medical Editors (WAME) tarafından yayınlanan etik yayıncılık ilkelerini benimser; Principles of Transparency and Best Practice in Scholarly Publishing başlığı altında ifade edilen ilkeler için: <https://publicationethics.org/resources/guidelines-new/principles-transparency-and-best-practice-scholarly-publishing>

Gönderilen makaleler derginin amaç ve kapsamına uygun olmalıdır. Orijinal, yayınlanmamış ve başka bir

dergide değerlendirme sürecinde olmayan, her bir yazar tarafından içeriği ve gönderimi onaylanmış yazılar değerlendirmeye kabul edilir.

Makale yayınlanmak üzere Dergiye gönderildikten sonra yazarlardan hiçbirinin ismi, tüm yazarların yazılı izni olmadan yazar listesinden silinemez ve yeni bir isim yazar olarak eklenemez ve yazar sırası değiştirilemez.

İntihal, duplikasyon, sahte yazarlık/inkar edilen yazarlık, araştırma/veri fabrikasyonu, makale dilimleme, dilimleyerek yayın, telif hakları ihlali ve çıkar çatışmasının gizlenmesi, etik dışı davranışlar olarak kabul edilir. Kabul edilen etik standartlara uygun olmayan tüm makaleler yayından çıkarılır. Buna yayından sonra tespit edilen olası kuraldışı, uygunsuzluklar içeren makaleler de dahildir.

### İntihal

Ön kontrolden geçirilen makaleler, iThenticate yazılımı kullanılarak intihal için taranır. İntihal/kendi kendine intihal tespit edilirse yazarlar bilgilendirilir. Editörler, gerekli olması halinde makaleyi değerlendirme ya da üretim sürecinin çeşitli aşamalarında intihal kontrolüne tabi tutabilirler. Yüksek benzerlik oranları, bir makalenin kabul edilmeden önce ve hatta kabul edildikten sonra reddedilmesine neden olabilir. Makalenin türüne bağlı olarak, bunun oranının %15 veya %20'den az olması beklenir.

### Çift Kör Hakemlik

İntihal kontrolünden sonra, uygun olan makaleler baş editör tarafından orijinallik, metodoloji, işlenen konunun önemi ve dergi kapsamı ile uyumluluğu açısından değerlendirilir. Editör, makalelerin adil bir şekilde çift taraflı kör hakemlikten geçmesini sağlar ve makale biçimsel esaslara uygun ise, gelen yazıyı yurtiçinden ve /veya yurtdışından en az iki hakemin değerlendirmesine sunar, hakemler gerek gördüğü takdirde yazıda istenen değişiklikler yazarlar tarafından yapıldıktan sonra yayınlanmasına onay verir.

### Açık Erişim İlkesi

Dergi açık erişimlidir ve derginin tüm içeriği okura ya da okurun dahil olduğu kuruma ücretsiz olarak sunulur. Okurlar, ticari amaç haricinde, yayıncı ya da yazardan izin almadan dergi makalelerinin tam metnini okuyabilir, indirebilir, kopyalayabilir, arayabilir ve link sağlayabilir. Bu BOAI açık erişim tanımıyla uyumludur.

Derginin açık erişimli makaleleri Creative Commons Atıf-GayrıTicari 4.0 Uluslararası (CC BY-NC 4.0) (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/deed.tr>) olarak lisanslıdır.

### Telif Hakkında

Yazarlar dergide yayınlanan çalışmalarının telif hakkına sahiptirler ve çalışmaları Creative Commons Atıf-GayrıTicari 4.0 Uluslararası (CC BY-NC 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/deed.tr> olarak lisanslıdır. CC BY-NC 4.0 lisansı, eserin ticari kullanım dışında her boyut ve formatta paylaşılmasına, kopyalanmasına, çoğaltılmasına ve orijinal esere uygun şekilde atıfta bulunmak kaydıyla yeniden düzenleme, dönüştürme ve eserin üzerine inşa etme dâhil adapte edilmesine izin verir.

### Makale Hazırlama

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 <https://dergipark.org.tr/tr/pub/sabiad> adresinde yer alan derginin online makale yükleme ve değerlendirme sistemi üzerinden gönderilebilir. Farklı mecralardan gönderilen makaleler değerlendirilmeye alınmayacaktır.

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

Yazar(lar)ın aşağıdakileri sunmaları gerekir:

### Telif Hakları Formu

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

- Makalenin Türkçe ve İngilizce başlığı ve 50 karakteri geçmeyen Türkçe ve İngilizce kısa başlığı,
- Yazarların isimleri, kurumları, eğitim dereceleri ve ORCID numaraları

- Finansal destek bilgisi ve diğer destek kaynakları hakkında detaylı bilgi,
- Sorumlu yazarın ismi, adresi, telefonu (cep telefonu dâhil), faks numarası ve e-posta adresi,
- 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 bölümlerinde alt başlıklar yazılmamalıdır.

**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 sözcükler 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 başlıklarından oluşmalıdır.

Özgün Araştırmalarla ilgili sınırlandırmalar için lütfen Tablo 1’i inceleyiniz.

Sonucu desteklemek için istatistiksel analiz genellikle gereklidir. İstatistiksel analiz, tıbbi dergilerdeki istatistik verileri 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, Gereç ve 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 hakem tarafından kısaca yorumlanması amacını taşımaktadır. Yazar(lar), dergi tarafından seçilip davet edilir. Özet, anahtar sözcük, tablo, şekil, resim ve diğer görseller kullanılmaz.

**Davetli Derleme:** Konunun alanında birikimi olan ve bu birikimleri uluslararası literatüre yayın ve atıf sayısı olarak yansıtmış uzmanlar tarafından hazırlanmış yazılar değerlendirmeye alınır. Yazar(lar) dergi tarafından da davet edilebilir. Bir bilgi ya da konunun klinikte kullanılması için vardığı son düzeyi anlatan, tartışan, değerlendiren ve gelecekte yapılacak çalışmalara yön veren bir düzeyde 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 yöntemi tarif eden, kitaplarda yer verilmeyen bilgiler 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:** Yazar(lar), 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 formatında Editöre Mektup yazılarını sunabilirler. Bu metinde, özet, anahtar sözcük, tablo, şekil, resim ve diğer görseller kullanılmaz. Ana metin alt başlıksız olmalıdır. Hakkında mektup yazılan yayına ilişkin cilt, yıl, sayı, sayfa numaraları, yazı başlığı ve yazar(lar)ın 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 numaralandırılmalıdır. Tabloların üzerinde tanımlayıcı bir başlık yer almalı ve tablo içerisinde geçen kısaltmaların açılımları tablo altına yazılmalıdır. 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; verileri destekleyici nitelikte olmalıdır.

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)	50	6	7 ya da toplamda 15 resim
Davetli Derleme	5000	250	50	6	10 ya da toplamda 20 resim
Olgu Sunumu	1000	200	15	Tablo yok	10 ya da toplamda 20 resim
Editöre Mektup	500	Uygulanamaz	5	Tablo yok	Resim yok

**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 metin içerisinde sunulmamalıdır. Alt birimlere ayrılan görseller olduğunda, alt birimler tek bir görsel içerisinde verilmemelidir. Her bir alt birim sisteme, ayrı bir dosya olarak yüklenmelidir. Resimler alt birimleri belli etmek amacıyla etiketlenmemelidir (a, b, c vb.). Resimlerde altyazıları desteklemek için kalın ve ince oklar, ok başı, yıldızlar, asteriksler ve benzer işaretler kullanılabilir. Makalenin geri kalanında olduğu gibi resimlerde kör olmalıdır. Bu sebeple, resimlerde yer alan kişi ve kurum bilgilerine kesinlikle yer verilmemelidir. Görsellerin minimum çözünürlüğü 300 DPI olmalıdır. Değerlendirme sürecindeki aksaklıkları önlemek için gönderilen tüm görsellerin çözünürlüğü net ve büyük boyutlu (minimum boyutlar 100x100 mm) olmalıdır. Resim altyazıları ana metnin sonunda yer almalıdır.

Makale içerisinde geçen tüm kısaltmalar, ana metin ve özetinde ayrı ayrı olmak üzere ilk kez kullanıldıkları yerde açıklanarak kısaltma açıklamanın ardından parantez içerisinde verilmelidir.

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

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

Özgün araştırmaların kısıtlılıkları, engelleri ve yetersizlikleri Sonuç paragrafı öncesi "Tartışma" bölümünde yer almalıdır.

**Revizyonlar**

Yazar(lar) makalelerin 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 bir hakemin yorumunun ardından yazarın cevabı gelmeli ve değişikliklerin yapıldığı satır numaraları da ayrıca belirtilmelidir. Revize edilen makaleler karar mektubunu takip eden 30 gün içerisinde dergiye gönderilmelidir. Makalenin revize versiyonu belirtilen süre içerisinde yüklenemezse, revizyon seçeneği iptal olabilir. Yazar(lar) ın revizyon için ek süreye ihtiyaç duyması durumunda 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 dâhil 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 yazar(lar) 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." yazılmalıdır. 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, Albanese 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 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.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 Listesi

- **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)
  - Kaynakların NLM referans sistemine göre belirtildiği
- Yazar Formu
- Telif Hakkı Anlaşması Formu
- 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 no'su
  - Tüm yazarların ORCID'leri
- Makale ana metin dosyasında olması gerekenler
  - Makalenin Türkçe ve İngilizce başlığı
  - Özetler 250 kelime Türkçe ve 250 kelime İngilizce, (olgu sunumlarında özet 200 kelime Türkçe ve 200 kelime İngilizce)
  - Anahtar Kelimeler: 3 -6 Türkçe ve 3 -6 İngilizce
  - Makale ana metin bölümleri
  - Kaynaklar
  - Teşekkür (varsa belirtiniz)
  - Tablolar-Resimler, Şekiller (başlık, tanım ve alt yazılarıyla)



### **Aims and Scope**

Journal of Advanced Research in Health Sciences (JARHS) 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 Institute of Health Sciences of İstanbul University and it is published every 4 months on February, June, and October. The publication language of the journal is English as of June 2023.

Journal of Advanced Research in Health Sciences (JARHS) 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 Advanced

Research in Health Sciences 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](http://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 author(s). 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 author(s)' 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.

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

(ICMJE - [www.icmje.org](http://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.

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 Advanced Research in Health Sciences requires each submission to be accompanied by a Copyright Agreement Form (available for download at <https://dergipark.org.tr/en/pub/sabiad>). 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 Advanced Research in Health Sciences 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.

### **Publication Policy**

The journal is committed to upholding the highest standards of publication ethics and pays regard to Principles of Transparency and Best Practice in Scholarly Publishing published by the Committee on Publication Ethics (COPE), the Directory of Open Access Journals (DOAJ), the Open Access Scholarly Publishers Association (OASPA), and the World Association of Medical Editors (WAME) on <https://publicationethics.org/resources/guidelines-new/principles-transparency-and-best-practice-scholarly-publishing>

The subjects covered in the manuscripts submitted to the Journal for publication must be in accordance with the aim and scope of the Journal. Only those manuscripts approved by every individual author and that were not published before in or sent to another journal, are accepted for evaluation.

Changing the name of an author (omission, addition or order) in papers submitted to the Journal requires written permission of all declared authors.

Plagiarism, duplication, fraud authorship/denied authorship, research/data fabrication, salami slicing/salami publication, breaching of copyrights, prevailing conflict of interest are unethical behaviors. All manuscripts not in accordance with the accepted ethical standards will be removed from the publication. This also contains any possible malpractice discovered after the publication.

### **Plagiarism**

Submitted manuscripts that pass preliminary control are scanned for plagiarism using iThenticate software. If plagiarism/self-plagiarism will be found authors will be informed. Editors may resubmit manuscript for similarity check at any peer-review or production stage if required. High similarity scores may lead to rejection of a manuscript before and even after acceptance. Depending on the type of article and the percentage of similarity score taken from each article, the overall similarity score is generally expected to be less than 15 or 20%.

### **Double Blind Peer-Review**

After plagiarism check, the eligible ones are evaluated by the editors-in-chief for their originality, methodology, the importance of the subject covered and compliance with the journal scope. The editor provides a fair double-blind peer review of the submitted articles and hands over the papers matching

the formal rules to at least two national/international referees for evaluation and gives green light for publication upon modification by the authors in accordance with the referees' claims.

### Open Access Statement

The journal is an open access journal and all content is freely available without charge to the user or his/her institution. Except for commercial purposes, users are allowed to read, download, copy, print, search, or link to the full texts of the articles in this journal without asking prior permission from the publisher or the author. This is in accordance with the BOAI definition of open access.

The open access articles in the journal are licensed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0) license. (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/deed.en> )

### Copyright Notice

Authors publishing with the journal retain the copyright to their work licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (CC BY-NC 4.0) (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/> ) which permits unrestricted, non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### 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>). Author(s) 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 <https://dergipark.org.tr/tr/pub/sabiad> 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.

Author(s) are required to submit the following:

- **Copyright Agreement Form,**

**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

Type of manuscript	Word limit	Abstract word limit	Reference limit	Table limit	Figure limit
Original Article	3500	250 (Structured)	50	6	7 or total of 15 images
Invited 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

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.

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.

**Invited 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 subheadings. 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 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) 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(s) 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(s) 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, 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: Bengissson S, Sothemin 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/dlEID/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 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.

### • 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
- Acknowledgement (if exists)
- All tables, illustrations (figures) (including title, description, footnotes)



Istanbul University  
İstanbul Üniversitesi

Dergi Adı: Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi  
Journal Name: Journal of Advanced Research in Health Sciences

Telif Hakkı Anlaşması Formu  
Copyright Agreement Form

<b>Sorumlu Yazar</b> <i>Responsible/Corresponding Author</i>	
<b>Makalenin Başlığı</b> <i>Title of Manuscript</i>	
<b>Kabul Tarihi</b> <i>Acceptance Date</i>	
<b>Yazarların Listesi</b> <i>List of Authors</i>	

Sıra No	Adı-Soyadı Name - Surname	E-Posta E-Mail	İmza Signature	Tarih Date
1				
2				
3				
4				
5				

<b>Makalenin türü (Araştırma makalesi, Derleme, v.b.)</b> <i>Manuscript Type (Research Article, Review, etc.)</i>	
--	--

<b>Sorumlu Yazar:</b> <i>Responsible/Corresponding Author:</i>	
---	--

<b>Çalıştığı kurum</b>	<i>University/company/institution</i>	
<b>Posta adresi</b>	<i>Address</i>	
<b>E-posta</b>	<i>E-mail</i>	
<b>Telefon no; GSM no</b>	<i>Phone; mobile phone</i>	

**Yazar(lar) aşağıdaki hususları kabul eder:**  
Sunulan makalenin yazar(lar)ın orijinal çalışması olduğunu ve intihal yapmadıklarını.  
Tüm yazarların bu çalışmaya aslı olarak katılmış olduklarını ve bu çalışma için her türlü sorumluluğu aldıklarını.  
Tüm yazarların sunulan makalenin son halini gördüklerini ve onayladıklarını.  
Makalenin başka bir yerde basılmadığını veya basılmak için sunulmadığını.  
Makalede bulunan metin, şekillerin ve dokümanların diğer şahıslara ait olan Telif Haklarını ihlal etmediğini kabul ve taahhüt ederler.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ'nin bu fikri eseri, Creative Commons Atıf-GayriTicari 4.0 Uluslararası (CC BY-NC 4.0) lisansı ile yayınlamasına izin verirler. Creative Commons Atıf-GayriTicari 4.0 Uluslararası (CC BY-NC 4.0) lisansı, eserin ticari kullanım dışında her boyut ve formatta paylaşılmasına, kopyalanmasına, çoğaltılmasına ve orijinal esere uygun şekilde atıfta bulunmak kaydıyla yeniden düzenleme, dönüştürme ve eserin üzerine inşa etme dâhil adapte edilmesine izin verir.  
Yazar(lar)ın veya varsa yazar(lar)ın işvereninin telif dâhil patent hakları, fikri mülkiyet hakları saklıdır.  
Ben/Biz, telif hakkı ihlali nedeniyle üçüncü şahıslara vuku bulacak hak talebi veya açılacak davalarda İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ ve Dergi Editörlerinin hiçbir sorumluluğuna imdadını, tüm sorumluluğuna yazarlara ait olduğunu taahhüt ederim/ederiz.  
Ayrıca Ben/Biz makalede hiçbir suç unsuru veya kanuna aykırı ifade bulunmadığını, araştırma yapılırken kanuna aykırı herhangi bir malzeme ve yöntem kullanılmadığını taahhüt ederim/ederiz.  
Bu Telif Hakkı Anlaşması Formu tüm yazarlar tarafından imzalanmalıdır/onaylanmalıdır. Form farklı kurumlarda bulunan yazarlar tarafından ayrı kopyalar halinde doldurularak sunulabilir. Ancak, tüm imzaların orijinal veya kanıtlanabilir şekilde onaylı olması gerekir.

**The author(s) agrees that:**  
The manuscript submitted is his/her/their own original work and has not been plagiarized from any prior work,  
all authors participated in the work in a substantive way and are prepared to take public responsibility for the work,  
all authors have seen and approved the manuscript as submitted,  
the manuscript has not been published and is not being submitted or considered for publication elsewhere,  
the text, illustrations, and any other materials included in the manuscript do not infringe upon any existing copyright or other rights of anyone.  
ISTANBUL UNIVERSITY will publish the content under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0) license that gives permission to copy and redistribute the material in any medium or format other than commercial purposes as well as remix, transform and build upon the material by providing appropriate credit to the original work.  
The Contributor(s) or, if applicable the Contributor's Employer, retain(s) all proprietary rights in addition to copyright, patent rights.  
I/We indemnify ISTANBUL UNIVERSITY and the Editors of the Journals, and hold them harmless from any loss, expense or damage occasioned by a claim or suit by a third party for copyright infringement, or any suit arising out of any breach of the foregoing warranties as a result of publication of my/our article. I/We also warrant that the article contains no libelous or unlawful statements and does not contain material or instructions that might cause harm or injury.  
This Copyright Agreement Form must be signed/ratified by all authors. Separate copies of the form (completed in full) may be submitted by authors located at different institutions; however, all signatures must be original and authenticated.

<b>Sorumlu Yazar:</b> <i>Responsible/Corresponding Author:</i>	<b>İmza / Signature</b>	<b>Tarih / Date</b>
		...../...../.....

